



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA E

HISTORIA DE LA CIENCIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE GRASA  
SUBCUTÁNEA Y VISCERAL EN OBESOS  
MÓRBIDOS Y SU RELACIÓN CON LAS LESIONES  
HEPÁTICAS**

**MERCEDES CABA MOLINA**  
Granada, diciembre 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Mercedes Caba Molina  
D.L.: GR 1829-2014  
ISBN: 978-84-9083-012-3

**Dña. Trinidad M<sup>a</sup> Caballero Morales**, Catedrática de Universidad, Departamento de Anatomía Patológica e H<sup>a</sup> de la Ciencia, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

**D. Francisco Javier Salmerón Escobar**, Catedrático de Universidad, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

### **Certifican**

al firmar esta tesis doctoral, realizada por la doctoranda **Dña. Mercedes Caba Molina**, que el trabajo titulado “**Estudio comparativo entre grasa subcutánea y visceral en obesos mórbidos y su relación con las lesiones hepáticas**” ha sido realizado por la misma 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.

Y para que así conste, se expide el presente certificado

En Granada a 16 de diciembre de 2013

Fdo.: Dra. Dña. Trinidad M<sup>a</sup> Caballero Morales

Fdo.: Dr. D. Francisco Javier Salmerón Escobar

**Dña. Trinidad M<sup>a</sup> Caballero Morales**, Catedrática de Universidad, Departamento de Anatomía Patológica e H<sup>a</sup> de la Ciencia, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

**D. Francisco Javier Salmerón Escobar**, Catedrático de Universidad, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

**Certifican**

Que **Dña. Mercedes Caba Molina**, licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral:

**“Estudio comparativo entre grasa subcutánea y visceral en obesos mórbidos y su relación con las lesiones hepáticas”**

ha sido revisada por nosotros y estimamos que está conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Granada ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, se expide el presente certificado

En Granada a 16 de diciembre de 2013

Fdo.: Dra. Dña. Trinidad M<sup>a</sup> Caballero Morales

Fdo.: Dr. D. Francisco Javier Salmerón Escobar

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículo científico con la siguiente referencia:

1 **Título:** Histological and immunohistochemical assessment of liver biopsies in morbidly obese patients.

Caballero T, Gila A, Sánchez-Salgado G, Muñoz de Rueda P, León J, Delgado S, Muñoz JA, Caba-Molina M, Carazo A, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. **Histol. Histopathol.** 2012; 27: 459-66.

**Tipo de producción:** Artículo

**Factor de impacto (JCR):** 2,502

Y como comunicaciones en los siguientes congresos:

1- **Título:** Estudio cuantitativo de grasa subcutánea y abdominal en obesos mórbidos y su relación con las lesiones hepáticas.

**Nombre del congreso:** Semana de Enfermedades Digestivas 2012 (Bilbao)

**Tipo evento:** Congreso

**Ámbito del congreso:** Nacional

**Ciudad de realización:** Bilbao

**Fecha de realización:** 2-5 Junio 2012

Caba Molina M, Carazo A, Caballero T, Sanjuán Núñez L, González Rubio S, García Rubio J, Membrives A, Jiménez Ríos J, Rodríguez Martínez M, de la Mata M, Salmerón J

2- **Título:** Expresión en tejido adiposo de la proteína desacoplante mitocondrial UCP1 durante la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA).

**Nombre del congreso:** Semana de Enfermedades Digestivas 2012 (Bilbao)

**Tipo evento:** Congreso

**Ámbito del congreso:** Nacional

**Ciudad de realización:** Bilbao

**Fecha de realización:** 2-5 Junio 2012

Alcázar Jaén LM, Martín-Lagos Maldonado A, Caba Molina M, Caballero T, Gila A, García Rubio J, Jiménez Rios JA, Rodríguez MD, Membrives A, González Rubio S, De la Mata M, Sanjuán L, Muñoz JA, Carazo A, Salmerón FJ

3- **Título:** Incremento del grado de hipertrofia de los adipocitos y de la cantidad de macrófagos del tejido adiposo blanco durante la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) en la obesidad mórbida.

**Nombre del congreso:** XXXVIII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (Madrid)

**Tipo evento:** Congreso

**Ámbito del congreso:** Nacional

**Ciudad de realización:** Madrid

**Fecha de realización:** 20-22 Febrero 2013

Carazo A, Sanjuan L, Caba-Molina M, Caballero T, Gila A, González-Rubio J, Membrives A, Muñoz-Gámez JA, Martín A, López-Viota J, De la Mata M, Ruiz-Escolano E, Ruiz-Extremera A, Salmerón J

4- **Título:** Relation between the adipocyte hypertrophy degree and adipose tissue macrophage infiltration with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) progression in morbid obesity.

**Nombre del congreso:** 48<sup>a</sup> annual meeting of de European Association for the Study of the Liver

**Tipo evento:** Congreso

**Ámbito del congreso:** Internacional

**Ciudad de realización:** Amsterdam

**Fecha de realización:** 24-28 Abril 2013

Carazo A, Sanjuan L, Caba-Molina M, Caballero T, Muñoz-Gámez JA, Gila A, García-Rubio J, Membrives A, Martín A, Quiles R, López-Viota J, De la Mata M, Ruiz-Escolano E, Ruiz-Extremera A, Salmerón J

**5- Título:** Influencia del sexo en las lesiones hepáticas y características topo morfológicas de la grasa en obesos mórbidos

**Nombre del congreso:** XXVI Congreso Nacional SEAP-IAP XXI Congreso Nacional SEC II Congreso Nacional SEPAF

**Tipo evento:** Congreso

**Ámbito del congreso:** Nacional

**Ciudad de realización:** Cádiz

**Fecha de realización:** 22-24 Mayo 2013

M Caba Molina, A Carazo, R Ríos Pelegrina, L Sanjuan, MD Rodríguez, JA González Rubio, J Salmerón, T Caballero

La disciplina es la parte más importante del éxito

*Truman Capote*

Tropezando se aprende a caminar

*Proverbio búlgaro*



# Resumen

La obesidad se considera en la actualidad como uno de los grandes problemas médicos en todo el mundo, pero sobre todo en países desarrollados, donde afecta a todo el espectro poblacional, incluidos los niños. El extremo sobrepeso (obesidad mórbida - OM-) se puede resolver sometiendo al paciente a cirugía bariátrica para reducción de peso, lo que ha favorecido la posibilidad de tomar biopsias para estudio de la grasa visceral y biopsias hepáticas. La grasa visceral desde hace pocos años se considera que juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad y es la fuente de numerosas sustancias que median el proceso inflamatorio de bajo grado que se produce en esta patología, influyendo en la aparición de graves complicaciones asociadas (metabólicas -ejem. diabetes tipo-2-, cardiovasculares, hepáticas (enfermedad del hígado graso no alcohólica – EHGNA-), et).

En este trabajo hemos realizado estudio histológico (convencional, inmunohistoquímico y cuantitativo) de biopsias de grasa (subcutánea y visceral) y biopsias hepáticas tomadas a pacientes con OM en el transcurso de cirugía bariátrica; hemos comparado estos hallazgos con parámetros antropométricos de obesidad, de síndrome metabólico y de función hepática; los valores topo-morfológicos obtenidos de la grasa también se han comparado con las alteraciones histológicas hepáticas y de éstos con las principales adipocinas, algunas citoquinas inflamatorias y marcadores macrofágicos expresados en grasa subcutánea y abdominal y medidos con técnicas moleculares.

Los resultados obtenidos nos han permitido establecer diferencias morfológicas entre la grasa blanca visceral (GBvis) y entre la grasa blanca subcutánea (GBsub) indicando que los adipocitos de la GBvis presentan menor tamaño. El recuento adipocitario y los estudios con morfometría realizados se han correlacionado con la intensidad de las lesiones hepáticas evaluadas, de manera que conforme existen lesiones histológicas más intensas el tamaño del adipocito es mayor, por lo que éste podría utilizarse como marcador indirecto de daño hepático.

También existen diferencias en cuanto a la densidad de macrófagos CD68. El nº total de macrófagos tisulares ha sido superior en la grasa visceral; sin embargo el de coronas macrofágicas tisulares y la concentración de ARNm de CD11c ha sido superior en GBsub. Hemos llegado a la conclusión de que quizás esto ocurre porque es en la grasa subcutánea donde puede existir mayor recambio adipocitario ya que podría haber más destrucción de adipocitos por su mayor tamaño. Los mediadores liberados en este proceso también podrían influir en el desarrollo de las lesiones hepáticas. Se han observado escasas correlaciones y débiles entre los marcadores de macrófagos en general (con ciertas variaciones según el método de determinación) y algunos parámetros antropométricos y metabólico-bioquímicos.

Respecto a la concentración de adipocinas determinadas, hemos obtenido resultados parecidos a los ya publicados, obteniendo mayores concentraciones de leptina y adiponectina en GBsub. En general han presentado correlaciones directas y débiles con algunos parámetros antropométricos, de síndrome metabólico y de función hepática.

Para la evaluación de las lesiones hepáticas se ha utilizado un sistema de valoración semicuantitativo por medio de Categorías Diagnósticas, basado en estudios previos y en modificaciones propias. Para la fibrosis se ha utilizado el sistema de Estadios de Kleiner. Un dato observado en nuestra serie es la frecuente presencia de inflamación portal, a menudo descrita como más característica de la enfermedad del hígado graso no alcohólico infantil y esteatosis multivesicular,

Hemos observado diferencias respecto al sexo. En términos generales los varones han presentado adipocitos de mayor tamaño, parámetros antropométricos y metabólico-bioquímicos más alterados así como mayor número de biopsias hepáticas con lesiones más intensas. En cambio en las mujeres se ha observado lo contrario: han mostrado adipocitos de menor tamaño, menor alteración en los parámetros antropométricos y metabólico-bioquímicos y biopsias hepáticas con lesiones menos graves.

# ÍNDICE

	Pg.
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>22-23</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>24-59</b>
<b>1.1 Obesidad: generalidades</b>	<b>26-27</b>
<b>1.1.2 Trastornos metabólicos asociados a obesidad: resistencia a la insulina y síndrome metabólico</b>	<b>27-31</b>
<b>1.1.3 Criterios clínicos para la valoración de la obesidad</b>	<b>31-32</b>
<b>1.1.4 Bases morfológicas de la obesidad: el órgano adiposo</b>	<b>32-35</b>
<b>1.1.4.1 Adipocitos</b>	<b>35-37</b>
<b>1.1.4.1.1 Estructura y formación de las gotas lipídicas</b>	<b>37-40</b>
<b>1.1.4.2 Macrófagos</b>	<b>41-45</b>
<b>1.1.5 Histogénesis del LA (adipogénesis)</b>	<b>45-47</b>
<b>1.1.6 Mediadores liberados en el LA: adipoquinas (adipocinas)</b>	<b>48-55</b>
<b>1.2. Lesiones hepáticas en la obesidad</b>	<b>55</b>
<b>1.2.1 Enfermedad del hígado graso-no alcohólico (EHGNA)</b>	<b>55-59</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>61-64</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>65-78</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>79-146</b>
<b>4.1 Resultados generales demográficos, parámetros antropométricos y datos bioquímico-metabólicos</b>	<b>81-86</b>
<b>4.2 Resultados histológicos, cuantitativos y morfométricos de la grasa visceral y subcutánea</b>	<b>87</b>

<b>4.2.1 Adipocitos</b>	<b>87-90</b>
<b>4.2.2 Macrófagos</b>	<b>91-98</b>
<b>4.2.3 Adipo-citoquinas liberadas en GB</b>	<b>99-101</b>
<b>4.3 Resultados de las lesiones hepáticas</b>	<b>102-110</b>
<b>4.4 Correlación entre parámetros topo-morfológicos de la grasa y las lesiones hepáticas</b>	<b>111-121</b>
<b>4.5 Correlaciones clínico-patológicas</b>	<b>122</b>
<b>4.5.1 Con parámetros topográficos y morfológicos de la grasa</b>	<b>122-132</b>
<b>4.5.2 Con lesiones hepáticas</b>	<b>133-146</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>147-164</b>
<b>5.1 Características generales demográficas, parámetros antropométricos y datos bioquímico-metabólicos</b>	<b>149-150</b>
<b>5.2 Características histo-topográficas y morfométricas de la grasa blanca</b>	<b>151-153</b>
<b>5.3 Lesiones histológicas hepáticas</b>	<b>154-160</b>
<b>5.4 Correlaciones clínico-patológicas</b>	<b>161-164</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>165-168</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>169-185</b>

## ABREVIATURAS

AcG: ácido/s graso/s

Ac: anticuerpo/s

BORD: “borderline” (límite)

CC: circunferencia de la cintura

CCC: cociente cintura/cadera

DM-2: diabetes mellitus-tipo2

EHGNA: enfermedad del hígado graso no-alcohólico

EHNA: esteatohepatitis no-alcohólica

EROs: especies reactivas de oxígeno

GB: grasa blanca

GBsub: GB subcutánea

GBvis: GB visceral

GL: gota/s lipídica/s

GGT: gamma-glutamyl-transferasa

GLUT: transportador de glucosa

GOT: transaminasa glutámico-oxalacética (o AST)

GPT: transaminasa glutámico-pirúvica (o ALT)

HCC: hepatocarcinoma

HDLc: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

HE: hematoxilina-eosina

HENA: hepatoesteatosis no-alcohólica

HI: hiperinsulinismo

HIF: factor inducible por hipoxia

HOMA-IR: “homeostasis model assessment” -insulin resistance

HSL: lipasa sensible a hormonas

ICC: índice cintura-cadera

IFN: interferón

IGF: factor de crecimiento parecido a la insulina

IKK: quinasa kappa-I

Il: interleuquina (interleucina)

IMC: índice de masa corporal

Ins: insulina

IR: resistencia a la insulina

JNK: quinasa c-jun N-terminal

LDLc: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

LPS: lipopolisacáridos

MCP: proteína quimotáctica para monocitos

MDB: cuerpos de Mallory-Denk

NAFLD: “Non-alcoholic fatty liver disease”(enfermedad del hígado graso no-alcohólico)

NAS: NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease) Activity Score

NASH: “Non-alcoholic steatohepatitis” (esteatohepatitis no-alcohólica)

NF $\kappa$  B: factor nuclear potenciador de genes de cadena ligera kappa de células B

NO: óxido nítrico

OM: obesidad mórbida

PAI: inhibidor del activador del plasminógeno.

PC: perímetro de cintura

PMN: polimorfonucleares neutrófilos

PPAR: receptor activado por proliferador peroxisómico.

RE: retículo endoplásmico

R-Ins: receptor de insulina

S: síndrome.

SAA: amiloide A sérico

SM: síndrome metabólico

TG: triglicéridos

TGF: factor de crecimiento transformante

TIP47: “tail-interacting protein of 47 kDa”

TLR: “toll-like” receptors (receptores de tipo señuelo o peaje)

TNF: factor de necrosis tumoral

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Obesidad: generalidades

La incidencia de obesidad ha incrementado notablemente en las últimas décadas en todo el mundo, tanto en adultos como en niños, y, por tanto, también lo han hecho los trastornos metabólicos asociados a ella: Síndrome Metabólico -SM-, enfermedad del hígado graso no-alcohólico (EHGNA), complicaciones cardiovasculares, etc., así como otros procesos (cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc.) (Hotamisligil, 2006; Odgen et al., 2006; Schernthaner and Morton, 2008; Starley et al., 2010; Shimizu et al., 2013), motivado, entre otros factores, por el cambio en los hábitos de vida.

La obesidad se considera una enfermedad epidémica en EE.UU. (Ross and Pawlina, 2007) y en otros países industrializados y está aumentando de modo alarmante en España (Aranceta-Bartrina y cols., 2005). Los factores ambientales pero sobre todo los genéticos juegan un papel importante en su desarrollo (Brooks and Perosio, 2012); la herencia no suele ser mendeliana y es clara su influencia en la predisposición a la enfermedad (Flier and Maratos-Flier, 2007). Además existen mutaciones genéticas raras asociadas a obesidad, no solo en ratones, sino en la especie humana; los productos de dichos genes están implicados en la regulación del apetito y el peso corporal a través de la leptina (ejem. leptina y receptor de leptina, proopiomelanocortina, receptor de hormona estimulante de melanocitos, proenzima convertasa 1) (Flier and Maratos-Flier, 2007).

La obesidad se caracteriza por: 1) aumento de la cantidad de grasa corporal y 2) resistencia a la insulina (IR), en la que influye la liberación de mediadores (citoquinas y adipocinas) durante el estado subinflamatorio crónico o inflamación crónica de bajo grado que se produce en el órgano adiposo (Wellen and Hotamisligil, 2003; Angulo, 2006; Andersson et al., 2008; Clément and Vignes, 2009).

No todos los tipos de obesidad son igual de peligrosos (Arner, 1998): la obesidad central (visceral o abdominal) se correlaciona con aumento del riesgo cardiovascular, debido a sus características funcionales y anatómicas. La grasa visceral es considerada el desencadenante de la disfunción metabólica debido a su mayor actividad lipolítica y



liberación de citoquinas que otros tipos de depósitos, así como por su drenaje al sistema venoso portal (Maher, 2010). La obesidad central forma parte del fenotipo clinicopatológico del SM (Antuna-Puente et al., 2008), cuya expresión hepática es la EHGNA.

Algunos estudios confieren un importante papel a las alteraciones en la grasa mesentérica en la enfermedad de Crohn (Schäffler et al., 2005; Sheley-Frase et al., 2011); la proliferación de grasa que envuelve el intestino (“fat-wrapping”), característica de la enfermedad, se relaciona con la inflamación transmural; la “obesidad mesentérica” que muestran los pacientes, con la liberación de mediadores inflamatorios y otras adipocinas, podría contribuir a las lesiones.

La EHGNA asociada a obesidad está incrementando su incidencia en la misma medida que lo hace esta enfermedad en países industrializados (Newschwander-Tetri and Caldwell, 2003; Caballería and Rodés, 2003; Yeh and Brunt, 2007). La diabetes mellitus tipo-2 (DM-2) es la enfermedad endocrino-metabólica humana más común en la actualidad (llegando a adquirir características epidémicas en muchos países) y en su patogenia influyen múltiples factores, siendo la IR y el hiperinsulinismo (HI) compensador (típicos del SM) los destacados con más frecuencia (Andersson et al., 2008), por lo que no es de extrañar que la EHGNA afecte al 80% de pacientes con DM-2 (Moscatiello et al., 2007).

### **1.1.2 Trastornos metabólicos asociados a obesidad: Resistencia a la insulina y síndrome metabólico**

Estudios epidemiológicos subrayan la importancia del tejido adiposo en la IR y en la intolerancia a la glucosa y explican en parte el gran incremento de DM-2 (Shuldiner et al., 2001). En la aparición de IR influyen múltiples factores (genéticos, nutricionales, estilo de vida, etc.) (Tilg and Moschen, 2008) quizás siendo los factores genéticos los más decisivos.

La patogénesis molecular de la IR parece ser multifactorial y compleja, habiéndose identificado diversas moléculas diana implicadas en la inhibición de la acción de la insulina (Angulo, 2002; Cusi, 2009).

El receptor de insulina (R-Ins) pertenece a la familia de receptores tirosín-quinasa y, cuando se acopla a su ligando-específico, la insulina (Ins), se produce fosforilación del R-Ins y del substrato (S)-R-Ins (tipos 1 y 2 en el hígado), desencadenando la activación de diversas moléculas y caminos de señalización (PKC, PI3K/PKB o Akt1); éstos, entre otros, conducen al efecto metabólico de la Ins a nivel de miocito y adipocito e incluye la activación del transportador de glucosa GLUT-4 (transportador selectivo de glucosa, mediador de captación de la misma) (Arner, 2003; Hotamisligil, 2006; Tilg and Moschen, 2008; Malaguarnera et al., 2009).

La falta de ejercicio y el aporte excesivo de alimentos, junto a la insuficiente oxidación de ácidos grasos (AcG) por fallo mitocondrial, pueden desencadenar IR en el miocito cargado de grasa, que es compensada inicialmente con elevación de la secreción pancreática de insulina -HI compensador- (Pessayre and Fromenty, 2005).

El mecanismo por el que se produce IR en la adiposidad visceral no está claro (Cheung and Sanyal, 2009), aunque algunos investigadores sugieren que sucede de forma similar a la del músculo (Pessayre and Fromenty, 2005) y/o por la acción de citoquinas liberadas por el órgano adiposo (Cheung and Sanyal, 2009); sus consecuencias son un incremento de lipólisis y liberación de AcG.

Cuando existe IR, las consecuencias metabólicas en las células que intervienen de forma mas activa en el metabolismo hidrocarbonado (adipocitos, hepatocitos y miocitos) varían. En situaciones normales, la Ins inhibe a la lipasa sensible a hormonas (HSL) adipocitaria, pero si existe IR se produce inhibición defectuosa de la HSL mediada por la Ins (Browning and Horton, 2004), lo que aumenta la lipólisis adipocitaria, con el consiguiente incremento sérico de AcGs, que llegan al hígado (Larter and Farrell, 2006; Sanyal, 2005; Pessayre and Fromenty, 2005; Begriche et al., 2006; Monga and Behari, 2009); a ellos se

pueden unir los procedentes de la dieta rica en grasas, siendo los principales contribuyentes del

acúmulo lipídico hepatocitario (Tilg and Moschen, 2008). La lipólisis adipocitaria también es estimulada por  $\text{TNF}\alpha$  (Arner, 2003).

El hígado participa en el mantenimiento de la glucemia tanto en situaciones de alimentación, en las que transforma el exceso de glucosa en AcG por mediación de la Ins, como en las de ayuno, obteniendo glucosa a partir de otros precursores diferentes a la glucosa (gluconeogénesis) (Monga and Behari, 2009). La IR en miocitos y adipocitos incrementa los niveles plasmáticos de glucosa y/o insulina (Pessayre and Fromenty, 2005) y ésto deriva en una mayor síntesis intrahepática de AcG. Hiperglucemia e IR son características de la DM- 2.

El SM es frecuente (Eckel et al., 2005) y cuando fué descrito en 1988 por Reaven se enfatizaba sobre el riesgo cardiovascular asociado, pero no incluía la obesidad (Zimmet et al., 2005). No obstante, existen referencias al SM muy anteriores en publicaciones del primer tercio del siglo pasado realizadas por Kylin y Marañón (Zimmet et al., 2005; Eckel et al., 2005).

Los criterios para su diagnóstico fueron primero publicados por la OMS en 1999 y se han ido sucediendo distintas propuestas como las elaboradas por el EGIR (**E**uropean **G**roup for the **S**tudy of **I**nsulin **R**esistance) y ATP-III (**A**dult **T**reatment **P**anel III, del National Cholesterol Education Program -NCEP-) (Zimmet et al., 2005), entre los que existen algunas variaciones (Tabla-1).

Los criterios diagnósticos más utilizados para el SM son los de la ATP-III, que requiere la presencia de 3 o más de los siguientes parámetros: 1) obesidad visceral (perímetro de cintura  $>102$  cm para hombres y  $88$  para mujeres), 2) triglicéridos  $> 150$  mg/dl; 3) HDLc  $<40$  mg/dl para hombres o  $<50$  mg/dl para mujeres, 4) TA  $\geq 130/85$  mm Hg, y 5) glucemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dl (Ramesh and Sanyal, 2005).

DEFINICIONES DEL SÍNDROME METABÓLICO (*)		
OMS, 1999	EGIR, 1999	ATP-III, 2001
Diabetes o alterac. tolerancia glucosa o resist frente a la insulina	Resistencia a la insulina o hiperinsulinemia (no diabéticos)	
2 o más de los factores siguientes: 1-Obesidad: IMC > 30 o CCC > 0,9 en los varones o > 0,85 en las mujeres	2 o más de los factores siguientes: 1. Obesidad central: PC ≥ 94 cm o ≥ 80 cm en las mujeres en los varones	3 o más de los factores: 1. Obesidad central: PC > 102 cm o > 88 cm en las mujeres
2-Dislipemia: TG > 1,7 mmol/l o cHDL < 0,9 en los varones o < 1,0 en las mujeres	2. Dislipemia: TG > 2,0 mmol/l o cHDL < 1,	2. Hipertrigliceridemia: TG o ≥ 1,7 mmol/l
3. Hipertensión: presión arterial ≥ 140/90 mmHg o tratamiento medicamentoso	3. Hipertensión: presión arterial ≥ 140/90 mmHg, o tratamiento medicamentoso o ambos	3. Disminución del cHDL: < 1, 0 en los varones mmol/l o < 1,3 mmol/l en las mujeres
4. Microalbuminuria: excreción de albúmina ≥ 20 µg/min	4. Glucemia en ayunas ≥ 6,1 mmol/l	4. Hipertensión: presión arterial ≥ 130/85 mmHg o tratamiento medicamentoso 5. Glucemia en ayunas ≥ 6,1 mmol/l

(\*) Tomado de: Zimmet P, Alberti K, Serrano Ríos M. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. Rev Esp Cardiol. 2005;58:1371-376.

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance; ATP-III: Adult Treatment Panel III; IMC: índice de masa corporal; CCC: cociente entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera; PC: perímetro de la cintura; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad. aDefinida como el cuartil superior de la concentración de insulina en ayunas en personas no diabéticas.

Tabla-1

El SM se asocia a una serie de alteraciones como el ovario poliquístico o acantosis nigricans (oscurecimiento y engrosamiento de pliegues cutáneos en cuello, codos y espacios interfalángicos dorsales) en niños, existiendo casos hereditarios con alto riesgo de EHGNA: síndrome (S) de lipodistrofia, S Bardet-Biedl o de Laurence-Moon-Biedl (retraso mental, malformaciones renales y cardíacas, hipogonadismo primario, etc.), S de Ahlstrom (hipogonadismo en varones, inteligencia normal), S de Prader-Willi (talla corta, retraso mental, facies típica, hipogonadismo primario, etc.) y S de Dorfman-Chanarin (ictiosis, cataratas, estatura baja, miopatía, etc.); todos, excepto el último, se asocian con obesidad (Brunt, 2007a; Flier and Maratos-Flier, 2007).

Alrededor del 80% de los pacientes con EHGNA tienen SM (Ramesh and Sanyal, 2005). Algunos autores incluyen a la EHGNA como un componente más de SM, al que consideran como una enfermedad endocrina multifactorial, en cuyo mecanismo patogénico pueden estar implicados, entre otros, factores nutricionales maternos (Bruce

and Byrne, 2009). La IR e hiperglucemia que caracterizan al SM son factores que contribuyen al desencadenamiento lesional en EHGNA (Angulo, 2002; Newschwander-Tetri and Caldwell, 2003).

### 1.1.3 Criterios clínicos para la valoración de la obesidad

El aumento de grasa corporal, característica de los pacientes obesos, se ha hecho equivalente al aumento de peso, aunque algunas personas con sobrepeso no tienen exceso de grasa sino de masa muscular (Flier and Maratos-Flier, 2007). La distribución de la grasa en las diferentes localizaciones anatómicas es de importancia por su relación con la patología asociada a obesidad, siendo la más nociva la grasa intravisceral y la grasa subcutánea visceral, así como la grasa de la parte superior del cuerpo (Flier and Maratos-Flier, 2007).

El criterio más común para la valoración clínica de los pacientes obesos es el índice de masa corporal (IMC), que se obtiene dividiendo el peso (kg) por el cuadrado de la altura (m), el cual ha de ser igual o mayor de 30. Según el IMC se distinguen 3 subtipos de obesidad: obesidad 1 (IMC entre 30 y 34.9), obesidad 2 (IMC entre 35 y 39.9) y obesidad extrema o mórbida (IMC igual o mayor de 40) (Gastrointestinal Surgery for severe obesity: NIH consensus, 1992; Zimmet et al., 2005; Schernthaner and Morton, 2008). Se habla de sobrepeso cuando el IMC está entre 25 y 30 (Flier and Maratos-Flier, 2007).

Otro parámetro clínico de obesidad es el perímetro de la cintura, que varía según el criterio utilizado: igual o mayor de 94 cm en varones y de 80 cm en mujeres (criterios del EGIR, 1999) o mayor de 102 cm en varones y 88 en mujeres (criterios de ATPIII, 2001); también se ha usado el índice cintura:cadera o cociente entre perímetro de cintura/perímetro de cadera (CCC), que ha de superar 0.9 en varones y 0.85 en mujeres (OMS, 1999) (Zimmet et al., 2005).

Los criterios de obesidad citados no se pueden aplicar a pacientes asiáticos, cuyos valores de IMC son inferiores a los de caucásicos (obesidad:  $IMC > 27$ ); su alto riesgo cardiovascular con el mismo IMC debe ser atribuido a la mas alta proporción de

adiposidad visceral (Farrell, 2003). Algo similar ocurre con la medida del perímetro visceral ( $> 90$  para varones y  $> 80$  para mujeres) (Eckel et al., 2005).

Otras formas de cuantificar la obesidad son la antropometría (grosor del pliegue cutáneo), densitometría (peso bajo el agua), tomografía computadorizada o la resonancia magnética (Flier and Maratos-Flier, 2007).

Por otra parte, no todos los pacientes obesos tienen factores de riesgo cardiovasculares; algunas series señalan la existencia de un 22% de pacientes obesos metabólicamente sanos, debido probablemente a que tienen menor adiposidad visceral/ grasa ectópica (Després, 2012). Por ello, se ha propuesto la valoración de 2 parámetros clínicos, circunferencia de cintura y trigliceridemia, como base del llamado fenotipo “cintura hipotriglicéridémica” (Lemieux et al., 2000) para detección de obesos con riesgo cardiovascular.

### **1.1.4 Bases morfológicas de la obesidad: el órgano adiposo**

El órgano adiposo (grasa orgánica) es un órgano endocrino peculiar, caracterizado por su distribución discontinua a través del cuerpo, con varios depósitos subcutáneos y viscerales (Armani et al., 2010). Durante décadas ha sido considerado como un lugar de almacenamiento energético de poco interés científico (Arner, 2003; Rosen and Spiegelman, 2006), hecho que ha cambiado en los últimos años debido al incremento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas.

Este órgano multifuncional está implicado no solo en el almacenamiento de reservas energéticas sino también en la regulación de numerosas funciones (metabolismo, inmunidad, homeostasis vascular, curación de heridas, proliferación celular/apoptosis, reproducción, etc.), a través de una red compleja de señales autocrinas, paracrinas y endocrinas que implican efectos pleiotrópicos orgánicos (hipotálamo, páncreas, hígado, músculo esquelético, riñón, sistema inmune, sistema vascular, etc.) (Frühbeck, 2008).

Existen dos tipos morfofuncionales de grasa: blanca y parda (a veces referidos como unilocular y multilocular, respectivamente, debido a las características morfológicas de los adipocitos que los constituyen -Ross and Pawlina, 2007-), encargados, entre otras funciones, del almacenamiento de triglicéridos (TG) como reserva energética (especialmente en la localización visceral y subcutánea) y del mantenimiento de la temperatura corporal en el recién nacido en el caso de la grasa parda (Frühbeck, 2008); ésta desaparece casi completamente en el adulto y tiene diferente morfología y función a la grasa blanca (Rosen and Spiegelman, 2006; Gesta et al., 2007).

Macroscópicamente la grasa blanca (GB) suele ser de color amarillo brillante y homogéneo, a veces blanco o marfil, con aspecto grasiento al corte, y está dividida en lobulillos (Brooks and Perosio, 2012; Frühbeck, 2008).

Según su topografía, existen dos tipos de GB: subcutánea (o panículo adiposo) e interna, que constituyen el 80% y 20% de la grasa corporal total, respectivamente (Ross and Pawlina, 2007; Frühbeck, 2008).

La GB **subcutánea (sub)** forma una capa denominada panículo adiposo, concentrada en determinadas zonas (craneal, abdomen, glúteos, muslos, axilas y tronco), que se diferencia en ambos sexos y con una importante función aislante (Ross and Pawlina, 2007; Gesta et al., 2007). En el varón los depósitos de grasa subcutánea tienen predilección por la nuca, zona que cubre el deltoides y triceps y por región lumbosacra, mientras que en la mujer se concentran en zona glúteofemoral y mamas (Frühbeck, 2008). La grasa subcutánea está dividida en lóbulos mal definidos por delgadas bandas de colágeno.

Estudios realizados con tomografía axial computerizada (TAC) diferencian 2 tipos morfo-funcionales de grasa subcutánea abdominal, superficial y profunda; ambas están separadas por un plano fascial (Kelley et al., 2000).

La GB interna, a su vez se divide en **visceral (vis)** y no visceral (Frühbeck, 2008); la visceral se localiza principalmente en epiplon mayor, mesenterio y retroperitoneo (Ross and Pawlina,

2007); algunos autores (Gesta et al., 2007) utilizan el término de grasa intraabdominal para referirse a la grasa del epiplon, del retroperitoneo y la que rodea a las vísceras. Posee mayor nivel de recambio de lípidos que la GBsub, lo que está condicionado por el contenido de determinadas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico y la expresión de varios receptores hormonales (catecolaminas, insulina) (Arner, 1998; Yang and Smith, 2007).

Existen diferencias sexuales en la distribución de la grasa, ya sea en la parte alta del cuerpo (obesidad androide) o en la parte baja (obesidad ginoide), y en el contenido de grasa corporal (las niñas tienen más grasa que los niños) así como en su porcentaje (pico más alto en chicos durante las etapas precoces de la adolescencia y en chicas en toda la adolescencia) (Brooks and Perosio, 2012).

Las bases morfológicas de la obesidad son la hipertrofia y/o hiperplasia adipocitaria (Drolet et al., 2008) y según su distribución puede ser global o más localizada. Con la edad tiende a incrementar la grasa visceral en el varón, hecho que también sucede en la obesidad androide o de tipo masculino; en la obesidad ginoide o de tipo femenino incrementa la grasa subcutánea glúteo-femoral (Frühbeck, 2008); ambos tipos de obesidad han sido denominados en forma de manzana y de pera, respectivamente (Gesta et al., 2007).

La distribución regional de la grasa corporal es un importante indicador de alteraciones cardiovasculares y metabólicas. El fenotipo de obesidad central se asocia con incremento de grasa troncal, tanto vis como sub (Angulo, 2006), eleva el riesgo metabólico (SM) y de complicaciones cardiovasculares que van asociados al incremento sérico moderado aunque crónico de mediadores inflamatorios (Wellen and Hotamisligil, 2003; Andersson et al., 2008; Clément and Vignes, 2009). Los productos liberados tras lipólisis de la GBvis drenan al hígado a través del sistema portal (Arner, 1998 y 2003) y pueden contribuir al desarrollo de lesiones hepáticas.

Desde el punto de vista histológico, en la GB existen diversas poblaciones celulares (Figura-1): adipocitos uniloculares o lipocitos maduros y precursores (preadipocitos y



células madre multipotenciales); endotelios, fibroblastos, histiocitos y macrófagos, junto con otros componentes de la matriz extracelular (MEC), que constituyen el estroma conectivo-vascular (Clément and Vignes, 2009; Armani et al., 2010); también están presentes células del sistema inmune (leucocitos).

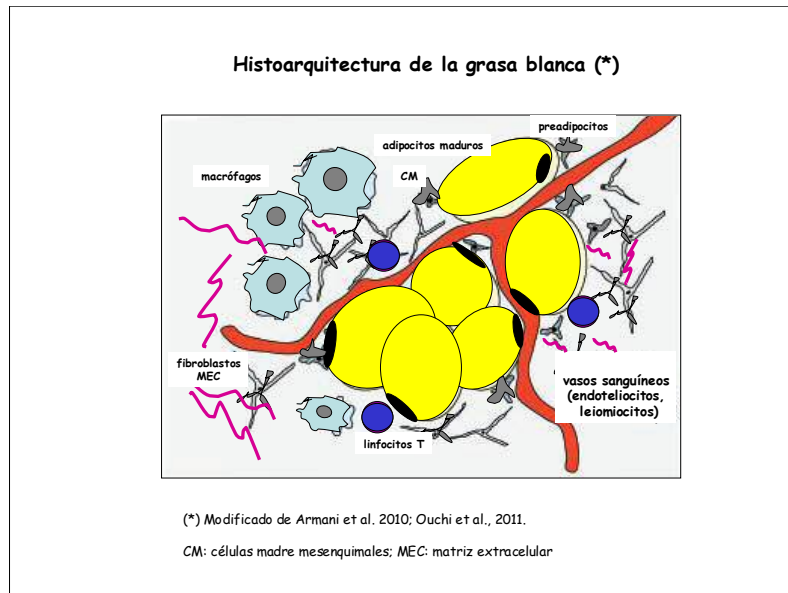


Figura-1.-

Los adipocitos constituyen el 35-70% de la masa adiposa en adultos y solo el 25% de la población celular, mientras que el 75% restante lo forman las células de la llamada “fracción estroma-vascular” (Frühbeck, 2008).

#### 1.1.4.1 Adipocitos

Los adipocitos maduros son células grandes, de 100  $\mu\text{m}$  o más de diámetro (pueden variar entre 25 y 200  $\mu\text{m}$ ), de forma ovalada o poliédrica; tienen una gran inclusión lipídica o gota lipídica (GL) que ocupa el 90% del volumen celular, desplazando el núcleo y las organelas a la periferia; están rodeados de membrana basal, fibras reticulínicas (resaltadas

con tinciones de PAS y reticulina, respectivamente) y sustancia fundamental amorfa; adoptan aspecto reticulado o de malla (Ross and Pawlina, 2007; Frühbeck et al., 2009; Armani et al., 2010; Brooks and Perosio, 2012).

En los adipocitos blancos el citoplasma forma un anillo periférico a la gran GL que ocupa gran parte del mismo. Tienen un núcleo oval, aplanado, semilunar o en forma de copa, con una vacuola central - en cortes apropiados-, mientras que en los inmaduros, que además contienen múltiples GL citoplásmicas, es redondo u oval (Frühbeck, 2008; Frühbeck et al, 2009; Brooks and Perosio, 2012). Las mitocondrias son escasas, pequeñas y alargadas, como lo es el retículo endoplásmico (RE) tanto rugoso como el liso (Frühbeck et al, 2009).

La aplicación de tinciones para demostración de los lípidos contenidos en los adipocitos deben realizarse sobre tejido congelado, con objeto de evitar la formación de una vacuola de extracción por efecto de los líquidos intermediarios utilizados durante el procesamiento histológico convencional (inclusión en parafina) (Aguilar y cols., 1993); la fijación prolongada en formaldehído también hace que se pierdan los lípidos (Brooks and Perosio, 2012). Las tinciones usadas habitualmente como el Sudán IV, oil red O, etc. tiñen los lípidos neutros, mientras que la tinción de sulfato azul de Nilo permite diferenciar grasas neutras de AG y fosfolípidos (Brooks and Perosio, 2012). Los ésteres lipídicos que forman las GL son insolubles con tetróxido de osmio (Fujimoto et al., 2008).

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, los adipocitos expresan el filamento intermedio vimentina y son inmunorreactivos frente a la proteína S-100, que tiene una tinción citoplásmica (Brooks and Perosio, 2012). La proteína S-100 es una proteína ácida de unión al calcio, de 21000 daltons de peso molecular, constituida por 2 cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que forman 3 tipos de dímeros: S-100a ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), S-100b ( $\beta$ ,  $\beta$ ) y S-100ao ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ) (Brooks and Perosio, 2012); la forma S-100b, también expresada por las células de Schwann, es la única presente en los adipocitos.

Los adipocitos poseen una dotación completa de enzimas y proteínas reguladoras necesarias para llevar a cabo tanto la lipólisis como la lipogénesis de novo (Frühbeck et al., 2001). Con inmunohistoquímica se pueden poner de manifiesto diversas proteínas

adipocitarias de unión a lípidos (ver apartado siguiente): la perilipina, que se expresa alrededor de gotas lipídicas maduras, y la adipofilina y TIP47 (“tail interacting protein of 47 kDa”) en las pequeñas o inmaduras, tanto en el tejido adiposo como en hepatocitos esteatósicos característicos de EHGNA (Fujii et al., 2009; Kimmel et al., 2010).

#### **1.1.4.1.1 Estructura y formación de las gotas lipídicas**

Las inclusiones lipídicas o GL, también denominadas adiposomas en animales (Ducharme and Bickel, 2008), cuerpos lipídicos y cuerpos de grasa (Walther and Farese Jr, 2009), ocupan gran parte del citoplasma en el adipocito blanco y están constituidas mayoritariamente por TG. Son la fuente principal de energía para el organismo y tras su hidrólisis se pueden utilizar para la  $\beta$ -oxidación, síntesis de membranas, modificación de proteínas y generación de moléculas de señalización y otros productos lipídicos (Fujimoto et al., 2008); además de participar en diversas funciones celulares, interaccionan con otras organelas (Fujimoto et al., 2008; Guo et al., 2009).

Con microscopía electrónica de transmisión, las GL son estructuras esféricas de contenido homogéneo y variable densidad, que no están rodeadas por una unidad de membrana y muchas veces no se delimitan claramente del citoplasma circundante (Fujimoto et al., 2008; Walther and Farese Jr, 2009). En los adipocitos diferenciados se disponen a su alrededor filamentos del citoesqueleto (vimentina), dándoles estabilidad; se puede observar aposición de GL con RE -donde se sintetizan- y con peroxisomas y mitocondrias, responsables de la  $\beta$ -oxidación de los AcG.

Las GL están constituidas (Figura-2) por un núcleo de ésteres lipídicos (TG - sobre todo-, diglicéridos y ésteres de colesterol) altamente hidrofóbicos, envueltos por una monocapa de fosfolípidos y colesterol libre, entre las que se intercalan proteínas estructurales y enzimáticas (enzimas para síntesis de lípidos -ejem. acetil-CoA-, lipasas) (Fujimoto et al., 2008; Guo et al., 2009; Olofsson et al., 2009; Walther and Farese Jr, 2009). La monocapa de

fosfolípidos, de composición similar a la de las membranas del RE, separa a las GL del medio acuoso citosólico (Fujimoto et al., 2008; Walther and Farese Jr, 2009).

Las GL son organelas dinámicas y las proteínas regulan su formación, mantenimiento, modificación e involución (Ducharme et al., 2008; Fujimoto et al., 2008).

Las proteínas estructurales pertenecen a la familia de proteínas denominadas PAT: perilipina, ADRP (adipocyte differentiation-related protein) o adipofilina y TIP47 (tail-interacting protein of 47 kDa- o PP17); son proteínas anfifílicas asociadas a la monocapa de fosfolípidos que rodea las gotas lipídicas. Con técnicas de ME de fractura por congelación y marcado con inmuno-oro las proteínas PAT se pueden localizar no solo en la superficie, sino también en el interior de las GL (Robenek et al., 2009).

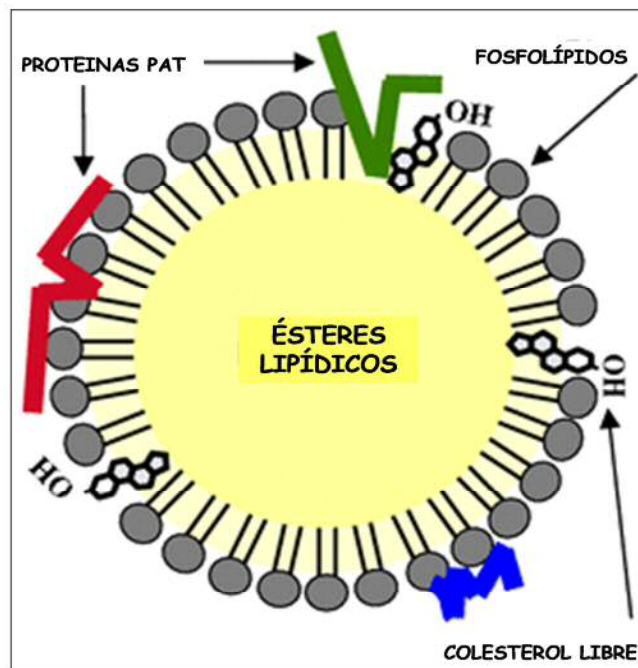


Figura-2- Estructura de las gotas lipídicas (Modificada de Fujimo et al., 2008).

Se reconocen 5 miembros de la familia PAT en mamíferos, habiéndose sugerido su red denominación como perilipina (PLIN) 1 a 5; la perilipina, adipofilina y TIP47 equivalen a PLIN 1, 2 y 3, respectivamente (Olofsson et al., 2009; Kimmel et al., 2010). Perilipina y ADPR están localizadas en las GL, mientras que TIP47 es soluble y forma parte de GL en determinadas circunstancias (Fujimoto et al., 2008).

La perilipina tiene 3 isoformas (A, B y C), las 2 primeras se expresan en el adipocito y si están fosforiladas constituyen el lugar de acoplamiento para la HSL activada durante el proceso de lipólisis (Fujimoto et al., 2008). La perilipina estabiliza las GL y previene la hidrólisis de TG; tras estimulación adrenérgica o por estimulación hormonal, HSL y perilipina son fosforiladas y la primera se trasloca a la GL (Frühbeck, 2008). ADPR disminuye durante la adipogénesis en adipocitos (no en otros tipos celulares) y junto con TIP 47 protegen frente a la lipólisis (Fujimoto et al., 2008).

A diferencia de lo que sucede en el preadipocito, el adipocito maduro muestra actividad enzimática con presencia, entre otras, de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), NADH-tetrazolio-reductasa o lipoproteín-lipasa, que transporta TG séricos al adipocito en forma de AG (Brooks and Perosio, 2012).

Existen otras proteínas en las GL implicadas en la regulación de la lipólisis y en el recambio y tráfico de GL (Olofsson et al., 2009), como por ejemplo las caveolinas, localizadas dentro de GL, y oleosinas (Fujimoto et al., 2008).

Las GL se forman en las membranas microsomales (RE) en forma de gotas primordiales con un diámetro de 0,1 a 0.4 micras y aumentan de tamaño por fusión (Fujimoto et al., 2008; Guo et al., 2009; Olofsson et al., 2009; Ohsaki et al., 2009). Para ello se requiere la entrada en la célula, por difusión pasiva, de AcG liberados de los TG transportados por lipoproteínas o la formación de novo a partir de hidratos de carbono, principalmente; en el RE se forman primero los diglicéridos, los cuales son convertidos en TG.

El modelo más aceptado sobre biogénesis de GL es que los TG formados se depositan en la membrana del RE y, cuando se excede la proporción que puede ser asimilada en la

membrana, se acumulan entre las 2 capas lipídicas, protruyendo en la membrana externa y posteriormente formando una gota inicial, que está rodeada de la hoja externa de la bicapa fosfolipídica del RE (Fujimoto et al., 2008; Ohsaki et al., 2009; Walther and Farese Jr, 2009). Esta organela también podría tener un papel importante en el crecimiento de la GL, aunque existe la posibilidad de que, una vez separada del RE, el aumento de tamaño sea por fusión (Walther and Farese Jr, 2009). En otros estudios, las GL parecen desarrollarse externamente a las membranas de RE en lugares especializados (Robenek et al., 2009).

Las GL muestran diferente composición en otros tipos celulares no-adipocíticos (ejem. células adrenocorticales, células intersticiales de testículo y ovario, células estrelladas hepáticas, células secretoras de leche en la mama, etc.) (Fujimoto et al., 2008). En situaciones patológicas como ocurre en hepatocitos esteatósicos o en macrófagos en placas de ateroma, las GL son mucho más pequeñas que las de los adipocitos (Ohsaki et al., 2009).

La heterogeneidad de las GL respecto a su tamaño, localización y proteínas dentro de un tejido y entre diferentes tejidos, sugiere que probablemente existen subtipos de GL con funciones metabólicas especializadas, aunque todavía quedan muchas incógnitas sobre la biología de las GL en humanos (Ducharme and Bickel, 2008).

Además de la obesidad y comorbilidades, existen diversas enfermedades relacionadas con las GL, tanto en la GB como en otros órganos: a) el síndrome de Chanarin-Dorfman o enfermedad por almacenamiento de lípidos neutros (depósito anómalo de TG en muchos tejidos, excepto en el adiposo), relacionada con mutación de un activador de la triglicérido-lipasa adiposa -ATGL- o desnutrina (CGI-58 -Comparative gene identification 58- o ABHD5 -Alpha/beta hydrolase domain 5-); b) la lipodistrofia, caracterizada por carencia total o parcial de GB, asociada a mutación de varios genes (BSCL2 -Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2- y caveolina-1); c) la replicación de la *Chlamydia trachomatis* y del virus de la hepatitis C (Fujimoto et al., 2008; Walther and Farese Jr, 2009).

### 1.1.4.2 Macrófagos

Los macrófagos constituyen el 40% del componente celular de la GB, siendo mayor en la obesidad (Weisberg et al., 2003; Andersson et al., 2008), lo que ha sido evidenciado tras la realización, entre otros, de estudios inmunohistoquímicos (Weisberg et al., 2003; Canello et al., 2006; Harman-Boehm et al., 2007). Son fuente de mediadores inflamatorios que participan en los efectos sistémicos de la obesidad (Tordjman et al., 2009).

Forman parte del sistema de fagocitos mononucleares, que se origina en precursores hematopoyéticos mieloides; la población circulante, los monocitos, colonizan diferentes órganos, transformándose en macrófagos residentes con heterogeneidad fenotípica y funcional, o bien emigran a ellos en situaciones inflamatorias, actuando como células efectoras de la inmunidad innata (Geissmann et al., 2010).

Los macrófagos humanos se identifican por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CD68, cuyo homólogo murino es la macrosialina; es una sialoglicoproteína presente en los lisosomas y endosomas, con un dominio extracelular parecido a mucina, que puede estar relacionada con su actividad fagocítica; su ligando es la LDL-oxidada (Rabinowitz and Gordon, 1996; Martínez-Pomares et al., 1996; Gordon, 1998). Se expresa en células dendríticas, además de en la línea monocito-macrófago.

Existen 2 tipos funcionales de macrófagos, denominados M1 y M2, por comparación con la polarización Th1/Th2 de los linfocitos T (Zeyda and Stulnig, 2007; Antuna-Puente et al., 2008; Andersson et al., 2008; Maher et al., 2008; Olefsky et al., 2010; Wentworth et al., 2010; Dalmas et al., 2011):

1) Con fenotipo M1, proinflamatorio o clásicamente activados, que son inducidos por citoquinas Th1 como el  $IFN\gamma$ , productos bacterianos (ejem. lipopolisacáridos -LPS-), o por otros factores (factor de necrosis tumoral alfa - $TNF\alpha$ -, factor estimulante de colonia granulocito-macrófago) y liberan citoquinas inflamatorias como Il (interleuquina)-1, Il-6, Il-12, Il-23 y  $TNF\alpha$ , así como EROs y óxido nítrico (NO), tienen alta capacidad de presentación antigénica y promueven respuesta Th1. La molécula de adhesión de la

superfamilia de las integrinas CD11c está sobreexpresada en este subtipo de macrófagos en ratones obesos y en humanos obesos.

2) Con fenotipo M2, antiinflamatorio o alternativamente activados (por Il-4 e Il-13, corticoides y adiponectina), segregan citoquinas antiinflamatorias como la Il-10, promueven respuesta Th2 y participan en la defensa frente a parásitos; expresan diversos receptores de superficie (ejem. receptor de manosa CD206), lo que permite su participación activa en la captación de partículas; también se le atribuye participación en la remodelación tisular y el metabolismo lipídico. En ratones delgados, estos macrófagos residentes de la grasa, que son CD11c-, producen arginasa. Los macrófagos de la GB en humanos se parecen a los M2.

Se han descrito diversos subtipos de macrófagos M2 (Dalmas et al., 2011): 1) M2a (inducidos por Il-4 y 13) tienen gran capacidad para destruir o encapsular parásitos, 2) M2b, inducidos por inmunocomplejos e implicados en la inmunoregulación, y 3) M2c, inducidos por Il-10 y corticoides e implicados en el depósito de matriz y remodelación tisular.

En la obesidad se incrementa el reclutamiento de macrófagos en los lobulillos adiposos y además se produce un cambio en su fenotipo (Maher et al., 2008); expresan marcadores de superficie como los M2, aunque producen moléculas proinflamatorias como los M1 o clásicamente activados (Zeyda and Stulnig, 2007; Dalmas et al., 2011); además exhiben gran actividad fagocítica frente a adipocitos necróticos (Zeyda and Stulnig, 2007), disponiéndose alrededor de ellos en forma de coronas o rosetas.

Otros autores describen 3 tipos de macrófagos con actividades homeostáticas diferentes: a) clásicamente activados, con actividad microbicida, que equivalen a los M1, b) que cicatrizan heridas, con función en reparación tisular y que expresan una molécula parecida a la resistina, y c) reguladores, con actividad antiinflamatoria, pero no participan en la cicatrización (Mosser and Edwards 2008); éstos últimos se confunden con los M2, ya que producen Il-10, pero no arginasa. Para estos autores en humanos no obesos los macrófagos asociados a la GB muestran fenotipo antiinflamatorio, similar al de macrófagos que cicatrizan heridas.



Los macrófagos en las rosetas de pacientes obesos son mas fácilmente visualizables con técnicas inmunohistoquímicas -CD68- (Canello et al., 2006; Clément and Vignes, 2009); expresan marcadores M1 (CD86 y CD40) y M2 (CD206 y CD150) (Dalmas et al., 2011) y son CD11c+, frente a los macrófagos aislados que son CD11c- (Wentworth et al., 2010). Los macrófagos de la GB en ratones no obesos están situados predominantemente de modo aislado o disperso entre los adipocitos (Wentworth et al., 2010).

El nº de macrófagos en la GB visceral se correlaciona con el IMC y con las lesiones hepáticas pacientes obesos (Canello et al., 2006; Zeyda et al., 2007; Tordjman et al, 2009). Asimismo estudios recientes señalan mayor nº de macrófagos en grasa profunda subcutánea que en la superficial, y su posible relación con las lesiones hepáticas (Tordjman et al., 2012). Otros estudios señalan relación entre densidad de coronas macrofágicas y resistencia a la insulina (Wentworth et al., 2010).

La infiltración de la GB por macrófagos podría tener un doble efecto: a) local y beneficioso, al actuar como células “descombradoras” de adipocitos senescentes o muertos y reducir el desarrollo de la masa adiposa, inhibiendo la diferenciación de preadipocitos, que también pueden adquirir un fenotipo proinflamatorio, y b) sistémico y nocivo, por el aumento de producción de citoquinas inflamatorias, responsables en gran medida de las complicaciones de la obesidad (Clément and Vignes, 2009).

En la Figura 3 se representan los subtipos principales de macrófagos, factores que los activan y los mediadores liberados en situaciones de obesidad y delgadez, así como su relación con los adipocitos.

Existe una relación paracrina entre adipocitos y macrófagos en la GB (Figura 3), ya que las citoquinas liberadas por los macrófagos (ejem. TNF) estimulan receptores de la superficie de adipocitos (ejem. R-TNF) que activan al factor de transcripción NFκB, lo que resulta en: a) liberación de citoquinas inflamatorias que, a su vez, actúan sobre los macrófagos; b) aumento de lipólisis con liberación de AG (Schäffler et al., 2007).

Desde un punto de vista molecular, la respuesta inflamatoria en la GB se podría iniciar con la activación de receptores de la inmunidad innata (TLR -“Toll-like” receptors-),

presentes en macrófagos y adipocitos; LPS activan TLR4 expresados en adipocitos y los AcG liberados por adipocitos estimulan TLR4 en macrófagos, lo que conduce a la activación de NF- $\kappa$ B en ambos casos (Schäffer et al., 2007; Andersson et al., 2008; Clément and Vignes, 2009).

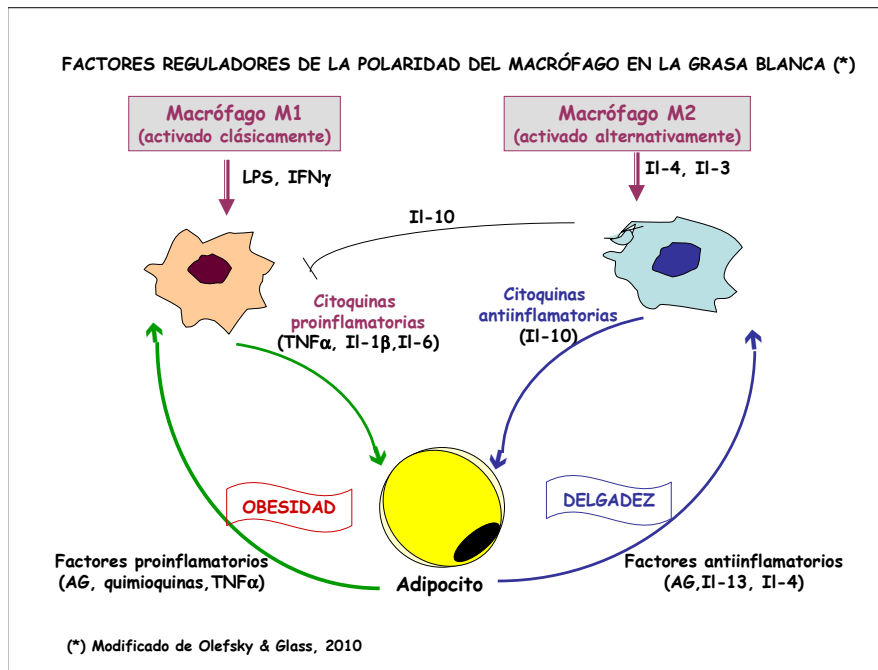


Figura-3

Los acontecimientos que inician la inflamación en la GB en la obesidad no están claros (Dalmás et al., 2011): los adipocitos hipertróficos podrían cambiar el fenotipo secretor hacia la liberación de mediadores inflamatorios y/o la muerte de dichos adipocitos desencadenaría una respuesta fagocítica macrofágica, según se desprende de estudios en animales. Asimismo la inflamación puede ser secundaria a la activación de receptores TLR4, expresados tanto en adipocitos como en macrófagos, por diversos agentes (ejem. AG, LPS), a la hipoxia local por el incremento de la masa adiposa o al estrés del RE.

Las señales que activan quinasas (JNK e IKK) que participan en el camino de señalización NF- $\kappa$ B (Antuna-Puente et al., 2008) son transmitidas y detectadas por el RE, organela que podría actuar como sensor de estrés-metabólico que transforma en señal inflamatoria (Hotamisligil, 2006).

### **1.1.5 Histogénesis de la GB (adipogénesis).-**

La adipogénesis es un proceso en múltiples etapas en el que están implicados una serie de factores de transcripción y proteínas del ciclo celular reguladoras de expresión génica que conducen al desarrollo adipocitario (Brasaemle, 2008; Ducharme 08; Armani et al., 2010).

Los adipocitos se originan de células madre mesenquimales situadas en la adventicia de vénulas pequeñas (Ross and Pawlina, 2007), representados en el adulto por los pericitos, o de células endoteliales (Brooks and Perosio, 2012); su diferenciación está regulada por un factor de transcripción denominado PPAR $\gamma$  (peroxisome-proliferator activated receptor-gamma: receptor gamma activado del proliferador peroxisómico), y por la proteína C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) codificada por el gen CHOP (C/EBP-homologous protein), que está alterado en neoplasias adipocitarias como el liposarcoma mixoide.

En la especie humana, la grasa empieza a formarse precozmente: alrededor de la 14-16 semanas del desarrollo se forma la llamada grasa primaria en determinadas localizaciones, lo que va seguido por la formación de la grasa secundaria después de la 23 semana así como en el período postnatal precoz (Frühbeck, 2008).

Se han descrito 5 fases en el desarrollo de la grasa fetal humana (Brooks and Perosio, 2012): a) estadio I, que se caracteriza por la presencia de células estrelladas inmersas en sustancia fundamental amorfa; b) estadio II, inicio de angiogénesis, con agregación de células mesenquimales alrededor de vasos sanguíneos primitivos proliferados; c) estadio III, desarrollo de una red de capilares alrededor de cada vaso, con formación de lóbulos de mesénquima en los que se encuentran preadipocitos estrellados que no contienen

lípidos; d) estadio IV, en el que se acumulan múltiples gotas lipídicas citosólicas en los adipocitos (adipocitos multiloculados, también denominados lipoblastos intermedios - Ross and Pawlina, 2007-), que se agrupan alrededor de los capilares, y e) estadio V, caracterizado por formación de adipocitos uniloculares o maduros (coalescencia de finas gotas lipídicas) densamente agrupados y condensación del mesénquima en la periferia del lóbulo con formación de septos fibrosos interlobulares.

La GB se desarrolla de modo paralelo al de los restantes órganos durante los 10 primeros años de vida, aunque en los primeros 6 meses los adipocitos se hipertrofian (aumento de volumen) sin sufrir hiperplasia; la hiperplasia (por formación de nuevos adipocitos) ocurre de modo importante durante la pubertad, acompañada de hipertrofia (Brooks and Perosio, 2012); el número de lóbulos adiposos permanece constante (Frühbeck, 2008).

Cada año se produce renovación aproximada de 1/10 del total de adipocitos, mediante muerte adipocitaria (apoptosis) y adipogénesis, lo que condiciona los distintos tipos de morfología de la GB (Frühbeck, 2008; Arner et al., 2010), la cual es independiente del sexo y de la grasa corporal total aunque estos resultados se han obtenido en estudios realizados en grasa subcutánea; así, la hipertrofia se asocia con tasas bajas de generación de adipocitos y lo opuesto sucede con la hiperplasia (Arner et al., 2010).

El sobrecrecimiento del órgano adiposo en la obesidad se puede producir por hipertrofia, hiperplasia o ambos (Arner et al., 2010); la hipertrofia adipocitaria, que suele ser el mecanismo inicial, se relaciona con hiperinsulinemia, Ins-R y riesgo de DM-2, así como alteración funcional de la GB, con independencia de su localización. Existen variaciones en el tamaño de los adipocitos entre individuos, tanto en obesos como en personas delgadas, no existiendo métodos sencillos para su valoración (Arner et al., 2010).

El tamaño absoluto de los adipocitos en obesos depende del grado de obesidad (Arner et al., 2010), añadiéndose anualmente más adipocitos a la GB que en sujetos delgados (Arner et al., 2010).

La adipogénesis y otras funciones del tejido adiposo están reguladas por el receptor nuclear **PPAR $\gamma$** , perteneciente a una superfamilia de receptores nucleares que actúan como sensores del metabolismo lipídico; al unirse a su ligando, codimeriza con otro receptor nuclear, el RXR (**retinoid X receptor**) (Arner, 2003; Yki-Järvinen, 2004; Brunt, 2007a; Tilg and Moschen, 2008; Malaguarnera et al., 2009). Diversos caminos de señalización y factores de transcripción que influyen en el desarrollo adipocitario convergen en la regulación de PPAR $\gamma$  (Frühbeck, 2008).

Los eventos moleculares y el resultado biológico de su activación se traducen en sensibilidad a la Ins, almacenamiento de AcG en adipocitos y efecto antiinflamatorio, ya que promueve la diferenciación de preadipocitos en adipocitos (sensibles a la Ins), que sustituyen a los adipocitos hipertróficos (resistentes a la Ins), aumenta la expresión de adiponectina, inhibe la transcripción de NF- $\kappa$ B e incrementa los macrófagos con fenotipo M2 o antiinflamatorio (Yki-Järvinen, 2004; Brunt 2007a; Andersson et al., 2008).

Existen diferentes tipos de PPAR: 1)  $\alpha$ , presente en hígado, corazón, músculo esquelético, endotelios y angiomiocitos; 2)  $\delta$  o  $\beta$ , expresado en muchos tejidos, aunque la más alta es en piel, cerebro y tejido adiposo, y 3)  $\gamma$ , más abundante en tejido adiposo y bajo en hígado (Yki-Järvinen, 2004); en el tejido adiposo no solo es expresado por los adipocitos, sino también por macrófagos y otras células del sistema inmune (Andersson et al., 2008). PPAR $\alpha$  regula genes que influyen en el metabolismo de AcG y lipoproteínas y en la producción de mediadores inflamatorios (Yki-Järvinen, 2004), así como en otros procesos celulares.

La regulación de la adipogénesis es un proceso complejo en el que participan otros factores (**Figura-4**), cuyo resultado puede tener efecto adipogénico o antiadipogénico; además está influida por factores ambientales y genéticos (Frühbeck, 2008).

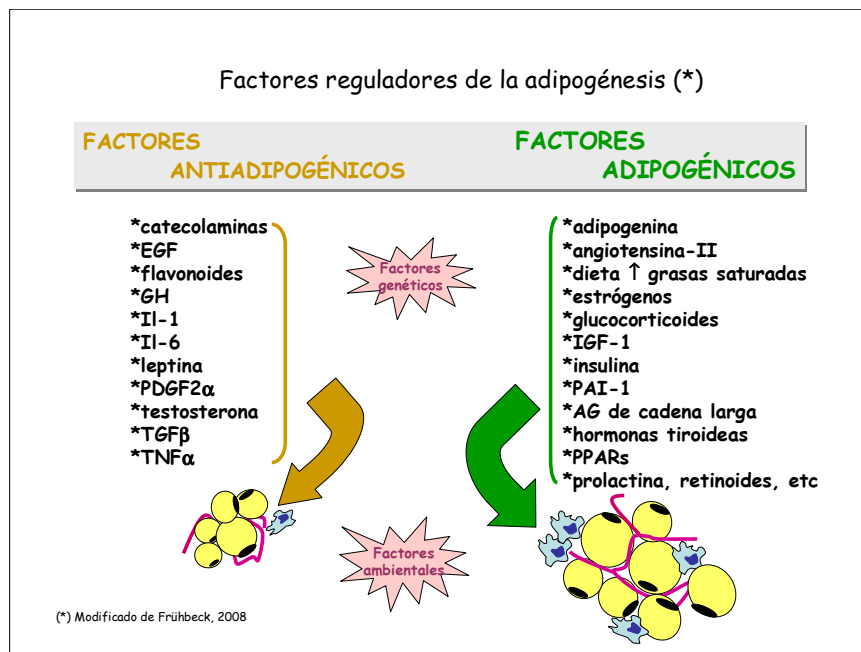


Figura 4

### 1.1.6 Mediadores liberados en la GB: adipoquinas (adipocinas)

Las adipoquinas (adipocinas) o adipocitoquinas son moléculas biológicamente activas, producidas por la GB de una manera regulada, que pueden influenciar la estructura y función de otros tejidos; algunas actúan como mediadores en los efectos sistémicos de la obesidad (Díez and Iglesias, 2003; Marra and Bertolani, 2009). La mayoría de ellas está disregulada en la obesidad, participando en la etiopatogenia de las comorbilidades asociadas a la misma (Frühbeck, 2008).

El término adipoquinas significa citoquinas segregadas por adipocitos, aunque se suele utilizar en sentido amplio para referirse a todos los productos liberados por las células de la GB (Frühbeck, 2008). Los depósitos de grasa más abundantes (sub y vis) tienen distinto perfil de adipoquinas (Ouchi et al., 2011).

Entre ellas se incluyen, en sentido amplio (Arner, 2003; Brunt, 2007a; Andersson et al., 2008; Antuna-Puente et al., 2008; Clément and Vignes, 2009; Ouchi et al., 2011):

a) Proteínas de comportamiento hormonal que regulan el metabolismo de la glucosa, la insulina y el almacenamiento de energía, tales como leptina, adiponectina, resistina, RBP4, visfatina, omentina, adiposina, adiponutrina, apelina, etc. (adipoquinas en sentido estricto).

b) Citoquinas proinflamatorias/antiinflamatorias, reguladoras del sistema inmune y quimiotácticas (quimioquinas): Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-8, Il-10, Il-12, Il-17, Il-18, Il-23, TNF $\alpha$ , quimioquina CCL2 (o proteína quimiotáctica para monocitos-1 -MCP-1-), factor inhibidor de la migración de macrófagos, etc. Algunas de las adipoquinas señaladas en el apartado anterior, a su vez, pueden tener efecto pro- o antiinflamatorio (Ouchi et al., 2011), como se señala más adelante.

c) Factores de crecimiento: transformante beta (TGF $\beta$ ), parecido a la insulina (IGF-1), epidérmico (EGF), vásculo-endotelial (VEGF), neural (NGF), etc.

d) Proteínas relacionadas con función vásculo-endotelial como angiotensinógeno e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

e) Moléculas relacionadas con el metabolismo lipídico, tales como AcG, glicerol, lipoproteín-lipasa, apolipoproteína E (ApoE), PPAR, etc.

f) Proteínas de la fase aguda: amiloide A sérico -SAA-, proteína C reactiva (PCR), Il-1RA, etc.

g) Factores reproductivos y endocrinos, como corticosteroides y esteroides sexuales.

h) Otros: proteínas de la MEC (ejem. fibronectina), factores de transcripción (ejem. factor inducible por hipoxia -HIF-1 $\alpha$ -), factores del complemento (factor D o adiposina), proteínas de membrana, etc.

Tanto los adipocitos como las otras células de la GB, especialmente macrófagos, pueden contribuir a su secreción (Marra and Bertolani, 2009); los adipocitos hipertróficos, característicos de la obesidad, segregan sobre todo citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 o MCP1 y adipoquinas como leptina y adiponectina; preadipocitos y endoteliositos producen MCP1, que atrae macrófagos, los cuales al activarse segregan diversas citoquinas (MCP1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, etc.) y otras adipoquinas (resistina, visfatina y adiposina) (Wellen and Hotamisligil, 2003, Antuna-Puente et al., 2008; Clément and Vignes, 2009). La quimiotaxis y activación macrofágica es inducida también por mediadores liberados por adipocitos, como el MCP1, y algunas adipoquinas como la leptina son quimiotácticas para monocitos (Tilg and Moschen, 2006; Clément and Vignes, 2009).

En el inicio de la inflamación en la obesidad también se le ha atribuido un papel a la hipoxia que acompaña al incremento de la masa adiposa, lo que explicaría el incremento de HIF (Frubeck, 2008).

A continuación se comentan algunas características de las principales adipoquinas.

La **leptina**, codificada por el gen OB (obeso), es producida fundamentalmente en GB por adipocitos diferenciados, con mayor expresión y secreción en la grasa subcutánea (80%) que en la visceral (Hamilton et al., 1995; Antuna-Puente et al., 2008). Esta hormona actúa sobre sus receptores tanto en el sistema nervioso central, donde inhibe la ingestión de comida y promueve el gasto energético (Rahmouni and Haynes, 2001; Czaja, 2004; Antuna-Puente et al., 2008), como en los tejidos periféricos, en los que inhibe la incorporación de grasa (Ceddia, 2005) y aumenta la sensibilidad a la insulina (Farooqi et al., 2002).

La leptina es profibrogénica hepática (estimula CE e inhibe su apoptosis), inmunomoduladora, antiesteatósica y angiogénica; también se ha sugerido que puede ejercer un efecto lesivo sobre pared arterial (Antuna-Puente et al., 2008; Marra and Bertolani, 2009; Tessari et al., 2009).

En la obesidad los niveles séricos de leptina están aumentados en proporción al IMC, por lo que se postula la existencia de un fenómeno de “resistencia a la leptina” (LR) o



respuesta deficiente en pacientes que desarrollan EHNA (Czaja, 2004; Brunt, 2007a; Antuna-Puente et al., 2008; Monga and Behari, 2009). El papel de la leptina en la inflamación que ocurre en EHGNA no está clara (Tilg and Moschen, 2008), existiendo resultados contradictorios entre los niveles de leptina y lesiones en EHNA, aunque no hay duda de que está disregulada (Tsochatzis et al., 2009).

Se conocen 6 isoformas del receptor de leptina (Ob-R), designadas con letras *a a f*, que se expresan en SNC y muchos tejidos, entre ellos el hígado; Ob-R*b* es responsable de muchos efectos biológicos de la leptina (Marra and Bertolani, 2009); a través de la cascada de transducción de señales JAK/STAT se van a producir los múltiples efectos sistémicos de la leptina (Frühbeck, 2006). Se ha demostrado un descenso de la expresión hepática de Ob-R en un modelo de obesidad en ratas inducida por dieta (Liu et al., 2007), desconociéndose lo que ocurre en pacientes obesos.

La **adiponectina**, la hormona circulante que más abunda en humanos, es segregada exclusivamente por adipocitos, en mayor cantidad por los viscerales que por los subcutáneos, y su concentración está en relación inversa con la obesidad (Brunt, 2007a; Díez and Iglesias, 2003; Marra and Bertolani, 2009). La adiponectina humana es sintetizada en forma de monómeros por los adipocitos, pero segregada a la circulación tras sufrir un proceso un proceso de multimerización (multímeros de bajo peso molecular –trímeros y hexámeros- y de alto peso molecular –HMW-), siendo cada uno de ellos responsable de sus diferentes acciones en los distintos órganos (Wang et al., 2008; Simpson and Whitehead, 2010). Las formas de HMV median la mayoría de los efectos sobre el hígado.

Esta adipoquina aumenta la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo, hígado, páncreas endocrino y músculo esquelético, regula el metabolismo de AG, inhibe gluconeogénesis y tiene efecto antiinflamatorio (induce la secreción de la citoquina antiinflamatoria Il-10 e inhibe la liberación de TNF $\alpha$ , IL-6 y quimioquinas) (Díez and Iglesias, 2003; Antuna-Puente et al., 2008; Marra and Bertolani, 2009).

La liberación de adiponectina está disminuida en obesos con IR o DM-2 (Gesta et al., 2007; Antuna-Puente et al., 2008) y, en los sometidos a cirugía bariátrica, los niveles son más bajos que en los controles (Baranova et al., 2006), al igual que en EHGNA (Tilg and Moschen, 2008), en la que solo se asocia con esteatosis y necroinflamación pero no con fibrosis

(Marra and Bertolani, 2009). Los niveles séricos de adiponectina son inferiores en varones que en mujeres, debido al efecto inhibitor de la testosterona sobre su producción (Wang et al., 2008).

Se conocen 2 receptores de adiponectina: AdipoR1, expresados en muchas células, sobre todo en rabiomiocitos y adipocitos, y AdipoR2 presentes en adipocitos y hepatocitos, los cuales están disminuidos en la obesidad en ambas localizaciones (Kadowaki et al., 2006) y en el hígado de pacientes con EHGNA (Shimizu et al., 2007; Marra and Bertolani, 2009); otros trabajos aportan datos contradictorios respecto a su aumento o disminución en la obesidad y su relación con daño hepático (Tsochatzis et al., 2009; Nanipieri et al., 2009). Estudios recientes indican aumento en la expresión de AdipoR1 y R2 con la progresión de EHGNA (Carazo et al., 2011). El efector de la activación de AdipoR2 es PPAR $\gamma$  (Marra and Bertolani, 2009).

El tejido adiposo subcutáneo secreta en mayor cantidad de leptina y adiponectina que el tejido adiposo visceral (Wajchenberg, 2000). Se ha detectado mayor concentración de ARNm de leptina en GBsub que en GBvis en obesos mórbidos (Hube et al., 1996).

La **resistina** es una proteína expresada en GB de roedores e incrementa en la obesidad en animales y humanos (Czaja, 2004; Marra and Bertolani, 2009); es liberada por adipocitos en ratones y por monocitos y macrófagos en humanos (Ouchi et al., 2011); sus niveles se correlacionan con IR (Valenti et al., 2009). Tiene propiedades proinflamatorias y su secreción es inducida por citoquinas inflamatorias (Ouchi et al., 2011).

Su papel en la EHGNA no está claro, habiéndose publicado resultados contradictorios respecto a la relación entre resistinemia e IMC (Antuna-Puente et al., 2008) o EHGNA (Tsochatzis et al., 2009; Marra and Bertolani, 2009) (elevada en NASH y posible asociación con fibrosis, en estudios clínicos- (Tsochatzis et al., 2009).

La **RBP4** (retinol-binding protein 4) es una proteína transportadora de vitamina A, producida por hepatocitos y, en menor grado, por adipocitos y macrófagos; sus niveles están elevados en obesidad, diabetes y se relacionan con IR en humanos, debido a disregulación del transportador de glucosa GLUT4 en adipocitos (Yang et al., 2005;

Graham. et al., 2006; Wolf, 2007); es producida en grasa visceral y sus niveles séricos elevados se asocian con parámetros de SM y con nefropatía diabética (Ochiet al., 2011).

La **visfatina** (o NAMPT -nicotinamide phosphoribosyltransferase- o pre-B cell colony enhancing factor) es sintetizada por macrófagos de la grasa visceral y sus niveles plasmáticos se correlacionan con la masa adiposa; tiene un efecto metabólico parecido al de la insulina, aumentando la captación de glucosa por miocitos y adipocitos e inhibiendo su liberación por los hepatocitos, incrementa con DM-2 y SM, aunque su función principal es como mediador inflamatorio (Antuna-Puente et al., 2008; Marra and Bertolani, 2009; Ouchi et al., 2011). Estudios más recientes indican que no hay diferencias en la secreción de visfatina entre GBvis y GBsub, no se asocia a parámetros de obesidad y sí lo hace con RI e hiperperlipidemia (Chang et al., 2010).

La **adipsina**, proteasa sérica que es el factor D del complemento (inicia la vía alternativa), es producida por macrófagos (Federico et al., 2010) y disminuye la síntesis de TG (Frühbeck et al., 2001).

La **omentina** se expresa en grasa visceral sobre todo, siendo producida por las células del estroma; sus niveles plasmáticos están más elevados en sujetos delgados que en obesos, existiendo una correlación inversa entre omentinemia e IMC, IR y leptinemia (Antuna-Puente et al., 2008).

La citoquina proinflamatoria **TNF $\alpha$**  es producida por adipocitos y sobre todo por macrófagos (Weisberg et al., 2003), da lugar a un aumento en la producción de leptina y otras

citoquinas inflamatorias y un descenso de adiponectina, lo que también puede contribuir a la acumulación de macrófagos activados, creándose un círculo vicioso con producción de más citoquinas inflamatorias (Wellen and Hotamisligil, 2003; Andersson et al., 2008). Muchos resultados demuestran que MCP-1 (véase más adelante) y TNF $\alpha$  alteran al adipocito contribuyendo a la IR (Hotamisligil et al., 1993; Antuna-Puente et al., 2008; Valenti et al., 2009). Está elevada en EHGNA y EHNA, correlacionándose con la fibrosis (Tsochatzins et al., 2009).

La **IL-6** es liberada en GB, sobre todo visceral, por diversas células (fibroblastos, endotelios, macrófagos y adipocitos) y es la fuente principal de esta citoquina circulante en ausencia de proceso inflamatorio agudo; controla la producción hepática de proteína C reactiva (factor de riesgo cardiovascular) y también está implicada en la IR (Weisberg et al., 2003; Andersson et al., 2008; Antuna-Puente et al., 2008; Ouchi et al., 2011).

La **IL-8**, importante agente quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en la inflamación aguda, es producida por macrófagos y adipocitos (Andersson et al., 2008).

El **CCL2** (ligando 2 de quimioquina C-C o MCP-1), liberado por endotelios, adipocitos y macrófagos, es necesario, junto con su receptor, para el acúmulo de macrófagos inflamatorios en la grasa (Antuna-Puente et al., 2008 Andersson et al., 2008).

En la Tabla-2 se indican de manera resumida las principales adipoquinas y citoquinas inflamatorias segregadas por adipocitos y macrófagos en la GB.

**PRINCIPALES ADIPOCITOQUINAS LIBERADAS EN LA GRASA BLANCA (\*)**

	Fuente		Función principal
	ADPC	MF	
<b>Leptina</b>	+	-	↓ IR, pro-IF
<b>Adiponectina</b>	+	-	↓ IR, anti-IF
<b>Resistina</b>	- (a)	+	↑ IR, pro-IF
<b>RBP4</b>	+	+	↑ IR
<b>Visfatina</b>	-	+	↓ IR, pro-IF
<b>TNFα</b>	+	+	↑ leptina, pro-IF
<b>IL-6</b>	+	+	↑ IR, pro-IF
<b>CCL2</b>	+	+	quimiotaxis MF

(\*) Rosen and Spiegelman, 2006; Fenoglio 2007a; Antuna-Puente et al., 2008; Frühbeck, 2008; Clément and Vignes, 2009; Federico et al., 2010; Chang et al., 2010; Ouchi et al., 2011.  
(a) si en adipocitos murinos  
ADPC: adipocitos; MF: macrófagos; IR: resistencia a la insulina; IF: inflamatoria

**Tabla-2**

Aunque quedan muchos puntos por dilucidar, parece claro que el cambio en la secreción de adipoquinas por el tejido adiposo es uno de los factores responsables de la aparición de IR periférica (tejido adiposo) en la obesidad, paso previo a la aparición de EHGNA (Tilg and Moschen, 2006). Su papel es fundamental en la patogénesis y gravedad lesional de EHGNA, aunque el propio hígado también libera citoquinas que agravan las lesiones (Tsochatzis et al., 2009).

## **1.2. Lesiones hepáticas en la obesidad**

Las lesiones hepáticas que pueden presentar los pacientes obesos se engloban bajo diversos términos, aunque el más aceptado en la actualidad es el de EHGNA, descrita en pacientes con SM (el cual incluye la obesidad) o síndrome de IR; las biopsias muestran cambios histológicos similares a los de la enfermedad hepática alcohólica en ausencia de alcoholismo (Brunt, 2009a).

El estudio de biopsias obtenidas en el curso de la cirugía bariátrica (Ong et al., 2005) ha puesto de manifiesto que no todos los individuos obesos, ni los obesos y diabéticos tienen EHGNA (Brunt, 2009b).

### **1.2.1 Enfermedad del hígado graso-no alcohólico (EHGNA)**

La prevalencia de EHGNA (o NAFLD) en obesos es variable según las series; para algunos (con IMC  $\geq 30$ ) es del 74% y se incrementa hasta un 90% en obesos mórbidos (IMC  $\geq 40$ ), constituyendo un problema clínico emergente (García Monzón et al., 2000; Loguercio et al., 2001; Beymer et al., 2003; Clark JM, 2006); si la obesidad se asocia a DM-2, este riesgo es aún mayor (Tilg and Moschen, 2008).

Se ha descrito EHGNA asociada a otros procesos, entre los que destacan: a) alteraciones del metabolismo de los lípidos (ejem. lipodistrofia congénita o adquirida -VIH-) o de otra naturaleza (ejem. enfermedad de Wilson); b) trastornos nutricionales (malnutrición,

inanición, nutrición parenteral, pérdida rápida de peso), que pueden ser secundarios a cirugía digestiva (ej. cirugía gastrointestinal para el tratamiento de la obesidad); c) fármacos o tóxicos (ejem. corticoides, algunos antiretrovirales, cocaína, etc.) (Angulo, 2002; Caballería and Rodés, 2003; Farrell, 2003; Ramesh and Sanyal, 2005; Hübscher, 2006; Brunt, 2007a). A estas otras causas se les han denominado secundarias, para diferenciarlas de las asociadas a IR o primarias (Hübscher, 2006).

La influencia del tejido adiposo en la IR y el mecanismo de las lesiones hepáticas que pueden aparecer en la obesidad se comentan a continuación.

El requisito inicial para el desarrollo de la enfermedad hepática es el acúmulo de lípidos en los hepatocitos en forma de TG y esta alteración es consecuencia de la IR (Angulo, 2002), como se ha señalado previamente (ver apartado 1.1.2); el SM que se desarrolla tras la IR (Tessari et al., 2009) está presente virtualmente en todos los casos de EHGNA (Marchesini et al., 1999).

En 1998 se postula una de las hipótesis patogénicas sobre la EHGNA más atractivas y por ello más referidas en la literatura: la teoría del “doble impacto” (Day and James, 1998), según la cual el acúmulo intrahepatocitario de TG (esteatosis), constituiría el primer impacto, y el estrés-oxidativo, con el desarrollo de EHNA, sería el segundo impacto (Loguercio et al., 2001; Tessari et al., 2009). Un paso previo a la esteatosis hepática es la aparición de inflamación y alteraciones metabólicas en el tejido adiposo.

Histológicamente la EHGNA se caracteriza por un espectro lesional que va desde esteatosis a esteatohepatitis y cirrosis hepática (Angulo, 2002; Brunt, 2009a); en general, las lesiones de EHGNA asociadas a metabopatía son indistinguibles de las formas leves de esteatosis y esteatohepatitis alcohólica (Brunt, 2009a).

La esteatosis es la lesión elemental característica de la EHGNA; se caracteriza por acúmulo principalmente de TG en el citoplasma hepatocitario, pudiendo adoptar la forma de una gran vacuola (debido a la extracción de los lípidos durante el procesamiento histológico), con desplazamiento del núcleo a la periferia, o de múltiples vacuolas, por lo que se denomina esteatosis macrovesicular o microvesicular, respectivamente; ambas pueden coexistir en una misma biopsia (Brunt, 2007b).

La **esteatohepatitis no alcohólica** (EHNA o NASH) es una forma de EHGNA que puede progresar a cirrosis; desde el punto de vista histológico muestra esteatosis, balonización hepatocitaria, que puede o no (lo más habitual) ir acompañada por inclusiones hialinas eosinófilas -hialina de Mallory o cuerpos de Mallory-Denk (MBD)-, necrosis y apoptosis,

focos inflamatorios y fibrosis pericelular. Muchas lesiones son de distribución centrozonal (Brunt, 2001), aunque también puede apreciarse fibrosis e inflamación portal.

Las biopsias que solo tienen esteatosis con algún grado de inflamación lobulillar acompañante pero sin balonización ni fibrosis pericelular se han catalogado como EHGNA sin EHNA (Brunt, 2007b).

La prevalencia de las diferentes lesiones en EHGNA se ha estimado en 50-90% para la esteatosis, 20-30% para EHNA/fibrosis y 5% para la cirrosis (Hübscher, 2006). Los pacientes con obesidad y/o DM-2 no siempre tienen esteatosis o EHGNA, como se deduce del estudio de series de enfermos sometidos a cirugía bariátrica (Ong et al., 2005; Caballero et al., 2012), o biopsiados por otras circunstancias; en el caso de cirugía bariátrica, las lesiones observadas pueden no ser superponibles a las de otros pacientes adultos con EHGNA de otra etiología (Brunt, 2009b).

En las series iniciales publicadas sobre EHGNA no ha existido consenso respecto a los criterios histológicos requeridos para el diagnóstico de los diferentes cuadros lesionales, lo que ha provocado discrepancias en la prevalencia de los mismos. Uno de los estudios pioneros que los han clarificado ha sido el de Brunt (Brunt et al., 1999), en el que se propone el uso de porcentajes para cuantificar la esteatosis y se establecen grados de actividad y fibrosis en la esteatohepatitis, que han sido modificados con posterioridad (Kleiner et al., 2005).

Las propuestas recomendadas para estudios clínicos, elaborada por patólogos americanos de la Red de Investigación Clínica para el estudio de EHGNA (Kleiner et al., 2005), clasifica las biopsias de pacientes adultos con EHGNA en: 1) esteatohepatitis

(EHNA), 2) esteatohepatitis probable o indefinida (EHNA “borderline”) y 3) no-esteatohepatitis (No-EHNA) (Tabla-3A), tras la aplicación de un sistema de valoración lesional de tipo semicuantitativo o NAS (Non alcoholic fatty liver disease Activity Score).

**VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD HISTOLÓGICA EN EHGNA (\*)**

Esteatosis (1)	Balonización (2)	Inflamación lobulillar (3)	Valor Total: Diagnóstico ("score")
-0 (< 5%)	- 0	- 0	<b>0-2: No EHNA</b>
-1 (5-33%)	- 1 (muy pocos)	- 1(< 2 focos/20x)	<b>3-4: EHNA posible o "borderline"</b>
-2 (34-66%)	- 2 (muchos)	- 2 (2-4 focos/20x)	<b>≥ 5: EHNA</b>
-3 (67-100%)		- 3 (> 4 focos/20x)	

**Índice de actividad en EHGNA ("NAS score"): suma de 1+2+3**

EHGNA: enfermedad del hígado graso no-alcohólico; NAS (NAFLD-non alcoholic fatty liver disease-activity scoring); EHNA: esteatohepatitis no-alcohólica.

(\*) Kleiner et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005; 42:1313-1321.

**Tabla-3A**

**VALORACIÓN DE LA FIBROSIS EN EHGNA (\*)**

**ESTADIOS DE FIBROSIS**

- 0: ninguna
- 1: fibrosis perisinusoidal o periportal
  - 1A: perisinusoidal, en zona 3, leve
  - 1B: perisinusoidal, en zona 3, moderada
  - 1C: portal/periportal
- 2: fibrosis perisinusoidal y porto-periportal
- 3: fibrosis puentes de fibrosis
- 4: cirrosis

(\*) Kleiner et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005; 42:1313-1321.

**Tabla-3B**



Existen diferencias en los patrones lesionales de EHGNA según se trate de pacientes adultos o de niños y jóvenes (hasta los 18 años) (Kleiner et al., 2005; Schwimmer et al., 2005; Brunt et al., 2009). En niños y en una serie de obesos se han descrito, además de esteatosis, fibrosis en área portal e inflamación en esta misma localización (Brunt, 2001; Abrams et al., 2004; Schwimmer et al., 2005; Caballero et al., 2012).

Para la fibrosis, se consideran 5 estadios (Tabla-3B), parecidos a los establecidos en hepatitis crónicas: a) estadio 0 -sin fibrosis, b) estadio1 -fibrosis perisinusoidal leve (1A), fibrosis perisinusoidal moderada (1B) o fibrosis portal/peripoportal (1C), c) estadio 2 -fibrosis perisinusoidal y porto-peripoportal, d) estadio 3 -fibrosis en puentes y e) estadio 4 -cirrosis (Kleiner et al., 2005).

La EHGNA suele mantenerse estable en la mayoría de los pacientes y un pequeño porcentaje de casos desarrolla EHNA; ésta puede progresar con el desarrollo de fibrosis y/o cirrosis, con las consiguientes complicaciones (incluido hepatocarcinoma –HCC-) o permanecer estable e incluso producirse regresión de la fibrosis (Figura-5) (Starley et al., 2010). En la obesidad, como se ha señalado previamente, existe un incremento en el riesgo de desarrollo de diversos tipos de cáncer, que es de 1.5-4 veces para el HCC (Starley et al., 2010).

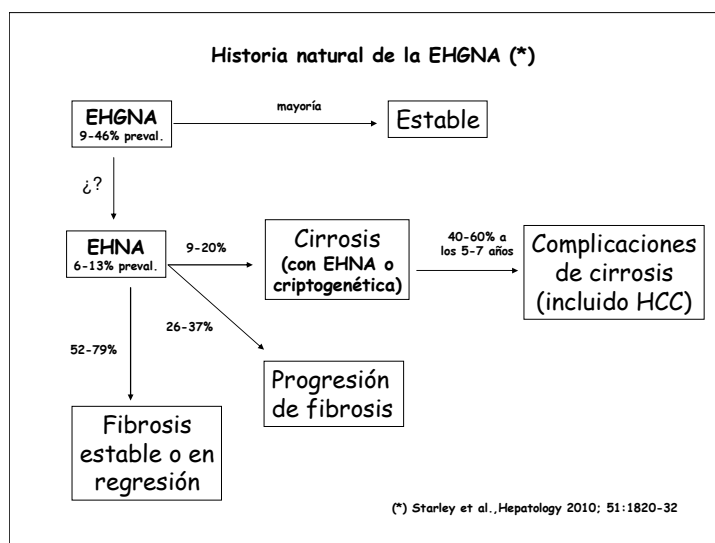


Figura-5.-

## **2. OBJETIVOS**

La obesidad constituye un problema médico de gran magnitud en las últimas décadas, lo que se deriva de la patología asociada a ella y/o sus complicaciones, entre las que cabe citar la enfermedad del hígado graso no alcohólica. Por otro lado, se empieza a reconocer la importancia de la grasa, sobre todo visceral, como fuente de mediadores inflamatorios, responsables del “estado inflamatorio de bajo grado” que caracteriza a la obesidad, así como el cambio en el perfil secretorio de las adipoquinas producidas por los adipocitos.

El tratamiento quirúrgico (cirugía bariátrica) del grado extremo de obesidad, la obesidad mórbida, nos permite el acceso a muestras tisulares de diferentes localizaciones en estos pacientes, cuyo estudio histológico puede contribuir al conocimiento patogénico lesional.

En este estudio nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Realizar un estudio histológico cuantitativo y morfométrico comparativo entre grasa subcutánea y visceral, referido al número y diámetro de los adipocitos, como marcadores de volumen adipocitario.
- 2) Cuantificar los macrófagos presentes en grasa subcutánea y visceral y/o determinar la expresión de las moléculas CD68 y CD11c como indicadores indirectos del grado de inflamación en este órgano y de un subtipo funcional de macrófago, respectivamente.
- 3) Relacionar los parámetros cuantificados en grasa blanca visceral y subcutánea con la expresión tisular de determinadas adipo-citoquinas liberadas en la grasa blanca por adipocitos y macrófagos.
- 4) Evaluar la patología hepática en los pacientes de esta serie, aplicando diversos índices de valoración lesional y Categorías Diagnósticas.
- 5) Estudiar más específicamente la esteatosis hepática (grado y tipo morfológico) y su potencial relación con algunas características de la grasa blanca.

- 6) Identificar posibles lesiones hepáticas identificativas de los pacientes obesos mórbidos.
  
- 7) Relacionar los datos morfométricos y cuantitativos obtenidos de la grasa blanca en las localizaciones mencionadas y las adipo-citoquinas liberadas por este órgano con las lesiones hepáticas.
  
- 8) Correlacionar los hallazgos morfológicos de las muestras estudiadas histológicamente con diversos parámetros antropométricos de obesidad, datos bioquímicos de función hepática y de síndrome metabólico, considerando las diferencias que pueden ser atribuidas al sexo de los pacientes, así como los hospitales de procedencia de los mismos.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

Durante las intervenciones de cirugía bariátrica (derivación bilio-pancreática tipo Scopinaro, en su mayoría, y cirugía laparoscópica) para tratamiento de obesidad mórbida realizadas en el Hospital Universitario San Cecilio (HUSC) de Granada entre Febrero de 2010 y Marzo de 2013 (97 casos), se han obtenido muestras correspondientes a grasa subcutánea y visceral de los pacientes, cuyo tamaño ha oscilado entre 1 y 2.5 cm de longitud y de 0.5 cm de diámetro; han sido fijadas en formaldehído tamponado para su valoración histológica; fragmentos de similar tamaño han sido congeladas a -80° C.

Simultáneamente a los pacientes se les han tomado biopsias hepáticas, con aguja de punción tipo Tru-cut de 18 G que han sido fijadas en formaldehído tamponado para su procesamiento habitual. En todos los casos se ha tomado un segundo cilindro hepático que ha sido congelado a -80 °C.

La casuística se ha completado con 96 muestras (de grasa subcutánea y visceral así como cuñas hepáticas) de obesos mórbidos procedentes del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS) de Córdoba las cuales han seguido el mismo procedimiento<sup>1</sup>.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES EN LA CASUÍSTICA OBJETO DE ESTUDIO**

Para entrar en la casuística objeto de estudio clínico-patológico, los pacientes han de reunir una serie de requisitos:

---

<sup>1</sup> Este estudio es parte de un proyecto de Investigación de Excelencia interhospitalario concedido por la Junta de Andalucía sobre obesidad mórbida (a desarrollar entre 2009-2013), que ha sido autorizado por el Comité de Investigación del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, llevado a cabo por un equipo de trabajo formado por facultativos de los Servicios de Cirugía, Aparato Digestivo y Anatomía Patológica, con la colaboración de investigadores del CIBEREHD (Centros de Investigación Biomédica en Red, área temática Enfermedades Hepáticas y Digestivas de Granada y Córdoba) dirigidos por el Prof. Javier Salmerón Escobar. Parte del material estudiado procede del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Todos los pacientes han firmado un consentimiento informado para participar en el estudio.

I.-Criterios de inclusión clínicos.-

-Obesos mórbidos mayores de edad, con IMC  $\geq$  de 40 (o  $\geq$ 35 con comorbilidades asociadas a SM).

-Carecer de tratamiento con fármacos hepatotóxicos potencialmente, antineoplásicos o inmunomoduladores.

-No padecer patología asociada o enfermedad hepática crónica diferente de EHGNA o EHNA.

-Ausencia de ingesta mayor de 40 gr de alcohol diario en los varones y 20 gr para las mujeres o evidencias de consumo de drogas en el año previo al estudio.

-Dar el consentimiento informado (ver Anexo I).

II.- Criterios de inclusión anatomopatológicos (Bravo et al., 2001; Riley and Rugiero, 2008):

-longitud del cilindro hepático: igual o mayor de 1.4 cm y/o presencia de al menos 7 espacios porta en la biopsia (también para las cuñas hepáticas).

A cada paciente se le han realizado estudios clínico-bioquímicos, moleculares y anatomopatológicos, que se relacionan a continuación; los primeros se han obtenido de la historia clínica del paciente.

## MÉTODOS DE ESTUDIO

De los 193 casos de obesidad mórbida operados en el HUSC de Granada y en el HURS de Córdoba, 33 han sido excluidos del estudio clínico-patológico debido a la ausencia de biopsia hepática, poca longitud/fragmentación de la misma o por la observación de patología no relacionada, así como por la ausencia de biopsia de grasa; por ello el número final de casos estudiados es de 160 (Diagrama-1). En 58 biopsias de grasa procedentes del HURS no se ha podido realizar valoración inmunohistoquímica y morfométrica completa (ver apartado de Inmunohistoquímica)

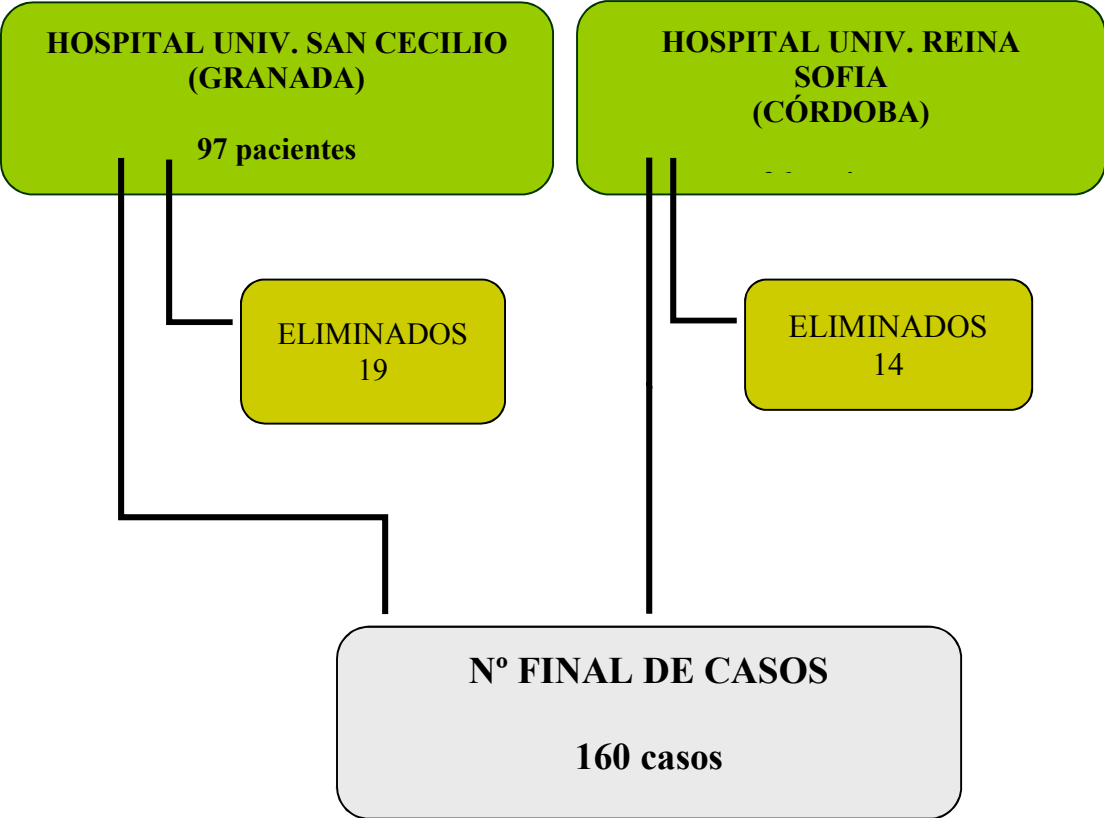


Diagrama-1.-



## I.- ANÁLISIS CLÍNICO-BIOQUÍMICO

### A) Parámetros analíticos en sangre

Niveles de GPT (ALT), GOT (AST), GGT, fosfatasa-alcalina, bilirrubina, albúmina, ferritina, VCM.

### B) Parámetros bioquímicos y hemodinámicos de Síndrome de resistencia a la insulina (SIR) o Síndrome Metabólico (SM) :

.Insulinemia en ayunas  $\geq 16,7$  mU/l (17,3 mU/l en mujeres y 15,7 mU/l en hombres).

.Índice HOMA-IR  $\geq 3,8$ , (3,9 en mujeres y 3,5 en hombres) [HOMA -Homeostasis model assessment- se calcula según la fórmula de Matthews: insulina ( $\mu$ U/ml) x glucosa (mmol/l) / 22,5] (Levy et al., 1998).

.Glucemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dl

.cHDL  $< 40$  mg/dl en hombres y  $< 50$  mg/dl en mujeres

.Trigliceridemia  $\geq 150$  mg/dl

.Tensión arterial  $\geq 130$  /  $\geq 85$  mmHg en hombres y mujeres.

### C) Parámetros antropométricos

A los pacientes se les ha realizado las siguientes medidas antropométricas

1) Peso y la talla para el cálculo del IMC:

$$\text{IMC} = \text{peso} / \text{altura}^2$$

2) Circunferencia de la cintura (CC) o perímetro de cintura (PC) o perímetro abdominal (PA): Debe medirse a nivel intermedio entre el borde inferior de la caja torácica y la cresta ilíaca (nivel L4-L5) y se expresa en cm. Se considera normal un valor  $< 80$  cm en la mujer y  $< 94$  cm en el hombre. Se correlaciona con la cantidad de grasa visceral (modificación de criterios de ATP-III).

3) Índice de cintura/cadera (ICC) o cociente cintura cadera (CCC): Se calcula dividiendo el perímetro de la cintura (circunferencia mínima medida entre el reborde costal y la cresta iliaca) por el perímetro de la cadera (circunferencia máxima medida a nivel intermedio entre la cintura y los muslos). Se considera un ICC normal de 0,71-0,85 para mujeres y 0,78-0,94 para hombres. Se correlaciona con la cantidad de grasa visceral.

## **II.- ESTUDIO HISTOLÓGICO**

Se han considerado para valoración histológica las biopsias de grasa subcutánea y visceral, y hepáticas, realizando diversos estudios que se relacionan a continuación.

### **1) Análisis histológico convencional (cualitativo y semicuantitativo)**

Todas las biopsias han sido fijadas en formalina tamponada e incluidas en parafina, obteniéndose cortes de 4  $\mu$ , los cuales han sido teñidos con HE.

A las **biopsias hepáticas**, además, se les han realizado tinciones de tricrómico de Gomori, reticulina de Gordon-Sweet, PAS-diestasa y Perls.

En cuanto a las lesiones hepáticas, se considera el diagnóstico de esteatohepatitis no-alcohólica (EHNA/NASH) (Brunt et al., 1999) cuando las biopsias muestran grado variable de esteatosis hepatocitaria, balonización y fibrosis perihepatocitaria en área perivenular e infiltrado inflamatorio lobulillar y portal de intensidad leve o moderada; las restantes biopsias que tengan algún grado de esteatosis se incluirán con diagnóstico de EHGNA sin EHNA (Brunt 2007b).

Además se ha efectuado un sistema de valoración semicuantitativo de las biopsias hepáticas (Kleiner et al., 2005) para aplicarlo a una sistematización de Categorías Diagnósticas

reciente, con ligeras modificaciones (Caballero et al., 2012). El sistema de gradación de la actividad histológica de Kleiner establece el diagnóstico de esteatohepatitis cuando la puntuación NAS (Sistema de Actividad de EHGNA) obtenida tras la suma aritmética de la valoración semicuantitativa de tres lesiones histológicas (esteatosis -0 a 3-, inflamación lobulillar -0 a 3- y balonización hepatocitaria -0 a 2-), es mayor o igual a 5; si la puntuación es igual o inferior a 2, la categoría diagnóstica es No-EHNA y los valores intermedios (3 y 4) se engloban como EHNA-“borderline” (Tabla-3A).

Para las biopsias con esteatosis pero sin EHNA hemos utilizado el término de hepatoesteatosis no-alcohólica (HENA) y las carentes de este cambio como No-EHGNA, considerando por tanto las siguientes categorías diagnósticas: 1) Categoría 0-No-EHNA, 2) Categoría 1-HENA, 3) Categoría 2-EHNA-BORD, y 3) Categoría 3-EHNA (Tabla-4). A su vez la categoría 2 o EHNA-BORD se ha subdividido en 3 subtipos: 2A o 2B, cuando las lesiones se encuentran en la zona acinar 3 o 1, respectivamente, y 2C, si el daño ocurre en ambas zonas (Tabla-4) (Caballero et al., 2012).

En la valoración de la esteatosis se han considerado 2 tipos de características: a) el porcentaje de hepatocitos con esteatosis, en relación a la superficie parenquimatosa; 2) el subtipo de esteatosis hepatocitaria (macrovesicular, multivesicular) (Caballero et al., 2012).

La fibrosis hepática se ha evaluado siguiendo los criterios de Kleiner et al. (2005) (Tabla-3B). Los estadios 1A y 1B (lesiones centrozonales) se han agrupado y separado, a su vez, del 1C. (lesiones porto-periportales) (Caballero et al., 2012).

**Categorías diagnósticas histológicas en biopsias hepáticas de obesos mórbidos (\*)**

CATEGORIAS
0- No-EHGNA (HcS=0, NAS ≤ 2)
1- EHGNA no-EHNA or HENA (HcS>0, NAS: 1-2)
2-EHNA-BORD (NAS: 3-4) •2A-BORD 1 (zona 3) •2B-BORD 2 (zona 1) •2C-BORD 1+2 (zona 3 + zona 1)
3- EHNA (NAS: 5-8)

NAS: NAFLD Activity Score (Kleiner et al., 2005);EHGNA: enfermedad del hígado graso no alcohólico; HENA: hepatoesteatosis no-alcohólica; EHNA: esteatohepatitis no-alcohólica ; BORD: borderline; HcS: hepatocitosteatois; zona : 3 (centrozonal or perivenular) y 1 (portal-periportal).

(\*) Caballero et al. Histological and immunohistochemical assessment of liver biopsies in morbidly obese patients.Histol Histopathol, 2012; 27: 459-466.

**Tabla-4**

## 2) Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo

Se han realizado técnicas inmunohistoquímicas para identificación de adipocitos y macrófagos en grasa subcutánea y visceral; las técnicas aplicadas han sido de inmunoperoxidasa, utilizando un sistema automatizado (Lab Vision Autostainer 720), con anticuerpos (Acs) primarios frente a proteína S-100 (policlonal, prediluido, DAKO, Dinamarca) y a CD68 (monoclonal 512H12, prediluido, MD, España); además se han aplicado Acs frente a p62 (monoclonal 3/p62 LCK, prediluido, MD) y mieloperoxidasa (policlonal, prediluido, MD), para identificación de hialina de Mallory o MDB y de hepatitis quirúrgica, respectivamente.

Para la proteína S-100, que delimita el citoplasma del adipocito, los cortes han sido mas gruesos de lo habitual (5µ), con objeto de evitar la rotura de los mismos y poder así efectuar su recuento.

La **cuantificación** de adipocitos y macrófagos (totales y dispuestos en corona alrededor de adipocitos) se realizó sobre cortes teñidos con inmunoperoxidasa, mediante un dispositivo Eyepiece Olympus, con una retícula de 1 centímetro de lado (dividido en cien cuadrículas de  $1 \text{ mm}^2$  de superficie) adaptada al ocular de un microscopio de luz convencional, observándose con un objetivo de 40 aumentos (Anderson and Lowe, 1990). El área de cada cuadrícula es de  $1 \text{ mm}^2$ , a través de la cual observamos la superficie de preparación aumentada cuarenta veces, por lo que se debe aplicar un factor de corrección para conocer la superficie real que estamos observando. En cada caso se ha contado el número de adipocitos y macrófagos en 10 retículas elegidas al azar en 10 campos y la media del número total se ha dividido por el un factor de corrección<sup>2</sup>.

En 58 biopsias de grasa no se ha podido realizar el recuento de macrófagos, debido al exceso de tiempo de fijación de las mismas y en 48 hígados no se ha podido valorar p62 y mieloperoxidasa por carecer de secciones; todos ellos procedían del HURS

### 3) Análisis morfométrico

Se han efectuado 5 microfotografías, con un objetivo de 10 x, de cortes teñidos con HE de GBvis y de GBsub; se ha realizado un análisis morfométrico usando un software especializado (Image J NIH, Bethesda MD) tras la medición del diámetro de 200 adipocitos en cada caso, que ha sido estimado en micras (Tchoukalova et al., 2003; Chen and Farese, 2002). Se han excluido los adipocitos con un diámetro inferior a 100 micras para minimizar los errores que pudieran existir por el artefacto de procesamiento (Chen and Farese, 2002).

---

<sup>2</sup> El factor de corrección permite conocer el número de células por  $\text{mm}^2$ : al medir el lado de la cuadrícula 1 mm, su área mide  $1 \text{ mm}^2$ ; la equivalencia del lado de la cuadrícula será de  $1 \text{ mm} / 40 = 0,025 \text{ mm}$ , y por tanto la superficie de la cuadrícula es  $(0,025 \text{ mm})^2 = 0,00062 \text{ mm}^2$ , con lo que el área total de recuento (100 cuadrículas) es  $0,062 \text{ mm}^2$ .

### **III.- ESTUDIO MOLECULAR DE ALGUNAS ADIPO-CITOQUINAS Y MARCADORES MACROFÁGICOS PRODUCIDOS EN LA GRASA BLANCA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA**

Se han estimado niveles de expresión génica en las muestras de grasa de las adipoquinas leptina y adiponectina, la citoquina inflamatoria IL-6 y los marcadores macrofágicos CD68 y CD11c (este último indicador de fenotipo inflamatorio). La técnica empleada ha sido la de PCR cuantitativa en tiempo real que se 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.

Para su realización primero se ha extraído RNA total de las muestras de grasa (que incluye RNAs mensajeros, ribosómicos y de transferencia) 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”. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Quiagen) con una pequeña modificación, debido a la naturaleza lipídica del tejido. Posteriormente se procedió a la retrotranscripción de RNA total a DNA copia, que se realizó mediante el kit comercial “iScript™ Select cDNA Synthesis Kit de BioRad”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados se normalizaron con la media del nivel de expresión de tres genes “housekeeping” (genes de expresión constante) bien establecidos en la bibliografía<sup>3</sup>: PPIA (Peptidilprolil Isomerasa A) RPS13 (Proteína Ribosomal S13) y ubiquitina C. Las unidades de expresión relativas fueron picogramos de RNA por femtogramos de la media de los genes de referencia (“housekeeping”).

Se desecharon muestras de grasa que no contenían una cantidad mínima de ARNm (<50ng/ml) o aquellas en las que había dispersión de los genes “housekeeping”.

---

<sup>3</sup> de Jonge HJ et al. PLoS ONE. 2007;2:e898

#### IV. ESTUDIO ESTADÍSTICO

La base de datos así como el tratamiento estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS versión 20.0 (SPSS Inc. IBM, Chicago, IL, USA) para entorno Windows.

Se confirmó la distribución normal de las variables mediante la prueba de Kolmogóroff-Smirnoff.

Para el análisis descriptivo, en las variables cuantitativas se ha calculado la media y error estándar de la media ( $M \pm EM$ ) y en las cualitativas el número y porcentaje.

Después del análisis descriptivo de la muestra se llevó a cabo un estudio bivalente mediante el test de la  $t$  de Student ( $t$  de Student) o el equivalente no paramétrico, el test U de Mann-Whitney y el test del análisis de la varianza de una vía [ANOVA1], o el equivalente no paramétrico, el test de Kruskal-Wallis.

A la hora de realizar comparaciones múltiples entre 3 o más grupos de variables cuantitativas se ha utilizado como prueba de comparaciones múltiples o prueba "post-hoc" la prueba de Bonferroni (Bonferroni).

Para las variables cualitativas se ha realizado el test de Chi-cuadrado.

El criterio para la significación se consideró cuando  $p \leq 0.05$ .

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  $< 0,6$ ; fuerte si oscila entre  $\geq 0,6$  y  $< 0,8$ ; y muy fuerte si es  $\geq 0,8$

## ANEXO I

### MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES (PROYECTO DE EXCELENCIA JA)

#### HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** “INFLUENCIA DEL TIPO DE GRASA EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO-ALCOHÓLICO (EHGNA) EN LA OBESIDAD MÓRBIDA. ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL ASOCIADOS A LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS.”

#### ¿Por qué hacemos este estudio?

La enfermedad del hígado graso no-alcohólico (EHGNA) es la forma más común de enfermedad crónica hepática en el mundo occidental. En USA, un 20% de la población general presenta EHGNA, pero su prevalencia aumenta hasta un 74% en caso de obesidad y hasta un 90% en obesidad mórbida. Este trastorno del hígado incluye esteatosis, esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis.

#### ¿Por qué hemos pensado en incluirle en el estudio?

Son factores de riesgo alguna o varias de las siguientes alteraciones metabólicas: obesidad, hipertensión, hiperlipemia y resistencia a insulina. La obesidad genera una situación de inflamación crónica en la que se desarrolla resistencia a insulina y EHGNA. La cirugía bariátrica es una de las terapias más utilizadas frente a la obesidad y que se han mostrado más eficaces, tras la cual desaparecen alteraciones del hígado como la esteatohepatitis.

#### ¿Qué se conoce de la EHGNA?

Según los últimos estudios realizados, parece ser que un aumento de grasa visceral/intraabdominal (central) se ha relacionado con elevado riesgo de sufrir alteraciones metabólicas (síndrome metabólico), frente a un aumento de grasa subcutánea (periférica), relacionado con bajo riesgo. Es decir que cada tipo de grasa tiene funciones distintas en el organismo y seguramente sea necesario un equilibrio adecuado entre ambas. Los productos generados por la grasa visceral pueden conducir a daños en el metabolismo de las células del hígado. Sin embargo no se conoce lo suficiente sobre los mecanismos moleculares y metabólicos que causan esta enfermedad. Además no existen estudios que relacionen la cantidad y la función de los diferentes depósitos corporales de grasa con la desaparición de esteatohepatitis tras la cirugía.

#### ¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Conocer cómo están relacionados “el volumen y la función” del tejido adiposo con la aparición de EHGNA en pacientes obesos sometidos a cirugía. Para ello será necesario: medición del tejido adiposo visceral y subcutáneo mediante tomografía computerizada; con las muestras que más adelante se especifican se realizarán estudios de expresión de determinados genes celulares y mitocondriales. Ha de quedar claro que no se trata de un estudio del perfil genético del paciente (no se estudia el ADN). Así mismo será necesario un estudio anatomopatológico de la biopsia de hígado.

#### ¿Qué le pedimos que haga?

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Su médico se pondrá en contacto con Ud. Le pedimos que done muestras de sangre, de biopsia hepática y de grasa corporal.



**¿Cómo se protegerá su intimidad?**

Tanto si finaliza el estudio como si no sus datos serán confidenciales, y se le garantiza que su nombre no saldrá en ninguna publicación o informe relativo al estudio. La información que recogemos como parte de este estudio, será compartida con otros investigadores y doctores.

Le agradecemos de antemano su colaboración en el estudio.

Dr.  
Colegiado N°

**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO**

TÍTULO DEL ESTUDIO: " INVESTIGACIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO-ALCOHÓLICO (EHGNA)".

Yo.....  
(nombre y apellidos del paciente escritos por él)

Doy mi pleno consentimiento, de manera libre, para participar en este estudio. He leído la hoja informativa sobre el proyecto. He comprendido que la investigación puede aportar una contribución a los conocimientos médicos y científicos. Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier fase del procedimiento.

Estoy de acuerdo en que se utilice las muestras de sangre, hígado y de grasa corporal en el estudio. He comprendido que no puedo reclamar ningún derecho en la utilización no restringida de estas muestras o de cualquier material preparado a partir de ellas.

Doy mi permiso para que los datos de mi historia clínica sean utilizados por el equipo de investigación para cotejarlos con las muestras, entendiendo que tras esta comprobación se eliminará del registro toda información que pudiera identificarme.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer preguntas sobre el estudio.  
He recibido suficiente información sobre el estudio y he comprendido que este trabajo es una contribución a los conocimientos médicos/científicos.  
Comprendo que mi participación es voluntaria.  
Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

\_\_\_\_\_  
Fecha                      Nombre y Apellidos del participante                      Firma del participante

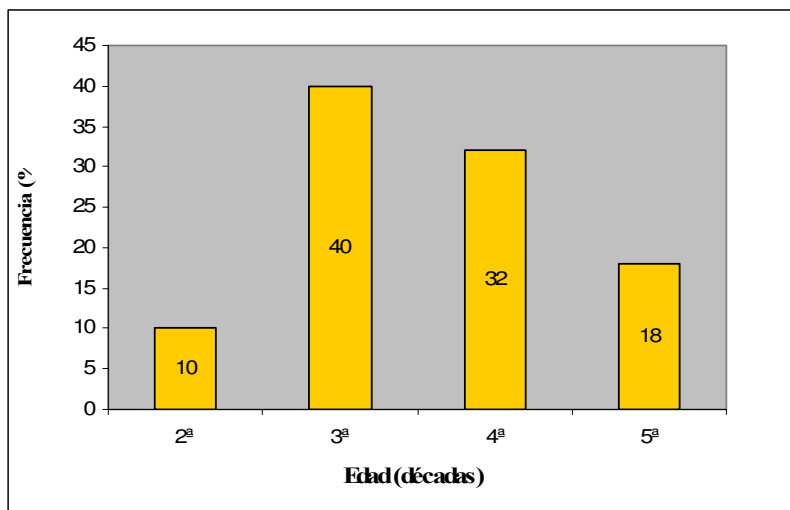
Confirmando que he explicado al participante el carácter y el propósito del proyecto de investigación.

Firmado \_\_\_\_\_ (miembro del equipo del proyecto)

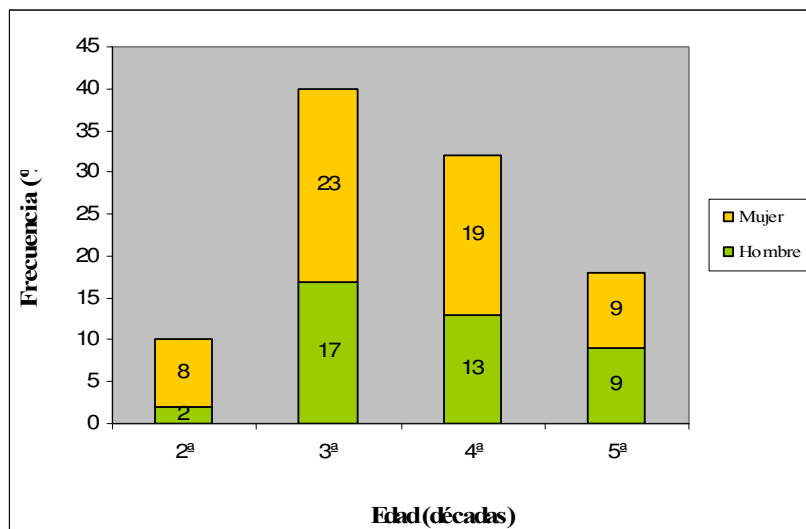
## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Resultados generales demográficos, parámetros antropométricos y datos bioquímico-metabólicos

Del total de 160 pacientes incluidos en el estudio, 65 son varones y 95 mujeres. La media de edad en el global de la serie es de 40,74 años siendo de  $41,54 \pm 1,14$  en varones y de  $40,19 \pm 0,99$  en mujeres (rango entre 22-62 y 20-64, respectivamente). El 67% de los casos pertenecían a pacientes menores de 44 años. En la Gráfica-1A se representa la edad separada en décadas; el porcentaje mayor de casos está entre la 3ª y 4ª décadas. Si consideramos la edad, expresada en décadas, y el sexo de los pacientes (Gráfica-1B), se aprecia que tanto en los varones como en las mujeres las décadas que predominan son la 3ª y 4ª.



Gráfica-1A.- Distribución de pacientes según edad expresada en décadas.



**Gráfica -1B.- Distribución de pacientes según edad (décadas) y sexo.**

El IMC de nuestros pacientes ha oscilado entre 34 y 76 kg/m<sup>2</sup> (promedio de 49.99±0.60). El PC (medido en el 88,1% de los casos) osciló entre 108 y 185 cm, con un valor medio de 139.30±1.32 y el ICC (calculado en el 86.2%) varió entre 0.69 y 1.23, con valor promedio de 0.93±0.01. Si se separan por sexos, tanto el IMC como el PC y el ICC han sido superiores en varones (p=0.031, p<0.001 y p<0.001, respectivamente, *t* de Student) (Tabla-5A pág. 86).

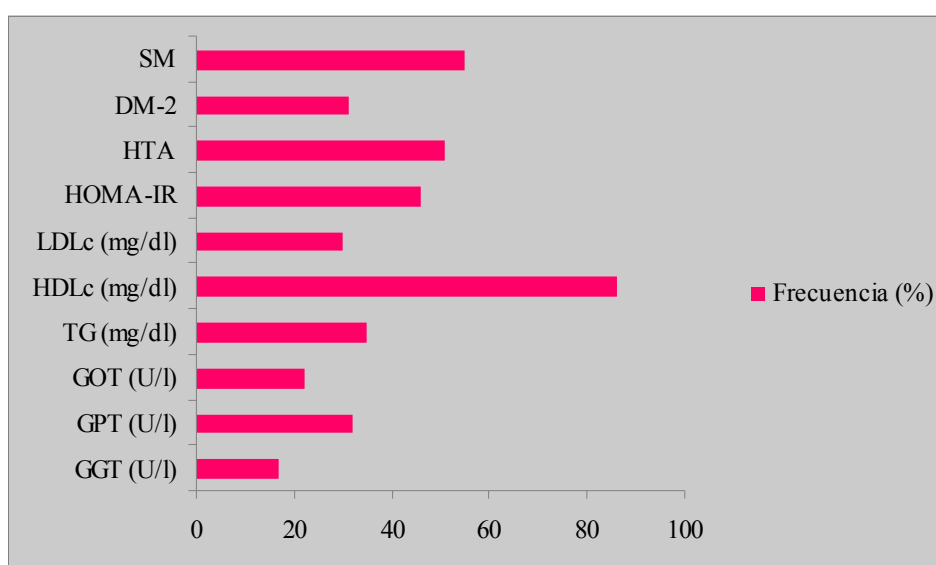
El 55% de los pacientes tenían síndrome metabólico, el 31% eran diabéticos y el 51% eran hipertensos. Los valores de HOMA-IR, LDLc, HDLc, y TG fueron 4.22±0.32, 112.77±2.88, 37.92±0.74 y 146.03±5.51, respectivamente. Se ha observado elevación de HOMA-IR en el 46% de los pacientes, de LDLc en el 30% y de TG en el 35%, mientras que en el 86% de los casos la HDLc estaba por debajo de lo normal<sup>1</sup> (Gráfica-2).

Los valores promedio de las transaminasas han sido los siguientes: GOT 29.29±1.34, GPT 36.67±1.67 y GGT 36.84±2.26. Las transaminasas, GOT y GPT, mostraban valores por

<sup>1</sup> No se dispone de algunos datos (SM, HTA, DM-2) en los pacientes procedentes de Córdoba.

encima de lo normal en el 22% y 32% de los casos, respectivamente; la GGT sólo estaba elevada en el 14% de los pacientes (Gráfica-2).

Si separamos a los pacientes según el sexo, los valores promedio de HOMA-IR, TG, GOT, GPT y GGT han estado más elevados ( $p=0.025$ ,  $p<0.001$ ,  $p=0.023$ ,  $p<0.001$  y  $p<0.001$ , respectivamente,  $t$  de Student) y la HDLc mas baja ( $p<0.001$ ,  $t$  de Student) en varones que en mujeres (Tabla-5A, pág. 86).



**Gráfica-2.- Porcentaje de los principales parámetros metabólicos y bioquímicos alterados**

Se ha observado un porcentaje mayor de hombres con síndrome metabólico, DM-2 y valores alterados de TG, GOT, GPT Y GGT. La distribución de pacientes con HTA y valores alterados de HOMA-IR fue similar en ambos sexos. El mayor porcentaje de pacientes con HDLc no alterada han sido en mujeres (Tabla-6).

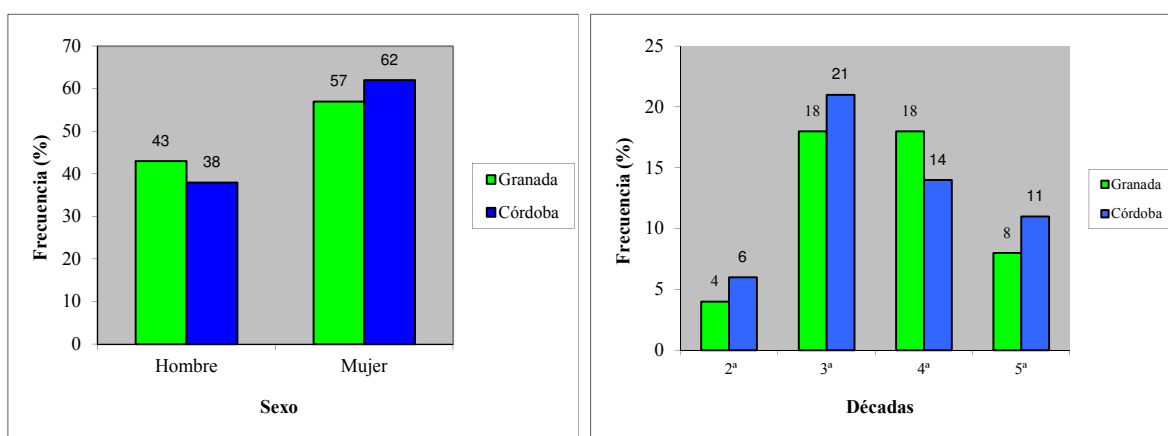
Parámetros metabólicos y bioquímicos		Hombre	Mujer	Valor p (°°)
		N (%)	N (%)	
SM	Ausente	10 (13)	25 (32)	<b>0.016</b>
	Presente	24 (31)	19 (24)	
DM-2	Ausente	20 (25)	34 (44)	0.080
	Presente	14 (18)	10 (13)	
HTA	Ausente	14 (17)	24 (31)	0.241
	Presente	20 (26)	20 (26)	
HOMA-IR	Normal	21 (19)	39 (35)	0.109
	Alterado	26 (23)	26 (23)	
LDLc (mg/dl)	Normal	44 (28)	68 (43)	0.417
	Alterado	20 (12)	27 (17)	
HDLc (mg/dl)	Normal	3 (2)	20 (12)	<b>0.004</b>
	Alterado	62 (39)	75 (47)	
TG (mg/dl)	Normal	31 (19)	73 (46)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterado	34 (21)	22 (14)	
GOT (U/l)	Normal	43 (27)	81 (52)	<b>0.004</b>
	Alterado	21 (13)	13 (8)	
GPT (U/l)	Normal	33 (21)	76 (47)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterado	32 (20)	19 (12)	
GGT (U/l)	Normal	49 (31)	89 (55)	<b>0.001</b>
	Alterado	16 (10)	6 (4)	

N: n° de casos; (°°) test Chi<sup>2</sup>

**Tabla-6. Parámetros metabólicos y bioquímicos cuando se considera el sexo de los pacientes.**

Cuando separamos las dos poblaciones de obesos estudiadas según el hospital de procedencia, no hay diferencias entre ellas respecto al sexo; de los 78 pacientes de Granada, 44 (57%) son mujeres y 34 (43%) son hombres, mientras que de los 82 pacientes de Córdoba, 51 (62%) son mujeres y 31 (38%) son hombres (Gráfica-3A).

La media de edad es similar en ambos hospitales [Granada:  $41.28 \pm 1.03$  (rango 24-64); Córdoba:  $40.22 \pm 1.09$  (rango 20-60)]. Al igual que en el global de la serie, en ambos hospitales la mayoría de pacientes estaban por debajo de los 44 años y entre la 3ª y 4ª décadas, en Granada con una frecuencia similar en cada década [29 casos (18%)], y en Córdoba con mayor porcentaje en la 3ª (21%) (Gráfica-3B).



**Gráfica-3.- Distribución de pacientes según hospital de procedencia en relación al sexo (A) y edad (décadas) (B).**

Si consideramos los parámetros analíticos generales, los pacientes de Granada han mostrado valores medios menores de IMC, HOMA-IR y LDLc que en los de Córdoba ( $48.77 \pm 0.80$  vs  $51.15 \pm 0.85$ ,  $3.49 \pm 0.39$  vs  $5.19 \pm 0.51$  y  $94.61 \pm 3.36$  vs  $130.27 \pm 3.75$ ;  $p=0.043$ ,  $p=0.008$  y  $p<0.001$ , respectivamente, *t* de Student). Por el contrario, GOT y GPT estaban más elevados en los pacientes de Granada ( $37.35 \pm 2.23$  vs  $21.83 \pm 1.01$  y  $43.61 \pm 2.63$  vs  $30.07 \pm 1.80$ ;  $p<0.001$  y  $p<0.001$ , respectivamente, *t* de Student) (Tabla-5B, pág. 86).

**PRINCIPALES DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y ANALÍTICOS DE LOS PACIENTES OBESOS MÓRBIDOS ESTUDIADOS**

Datos antropométricos y analíticos	Global de la serie	Hombre	Mujer	Valor p (°)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	49.99±0.60	51.52±1.01	48.94±0.70	<b>0.031</b>
PC (cm)	139.30±1.32	150.37±1.91	132.00±1.29	<b>&lt;0.001</b>
ICC	0.93±0.01	0.99±0.01	0.89±0.01	<b>&lt;0.001</b>
HOMA-IR	4.22±0.32	5.05±0.61	3.60±0.31	<b>0.025</b>
LDLc (mg/dl)	112.77±2.88	108.23±4.96	115.82±3.45	0.197
HDLc (mg/dl)	37.92±0.74	34.74±0.91	40.10±1.02	<b>&lt;0.001</b>
TG (mg/dl)	146.0±5.51	172.25±9.27	128.10±6.15	<b>&lt;0.001</b>
GOT (U/l)	29.29±1.34	32.97±1.91	26.79±1.80	<b>0.023</b>
GPT (U/l)	36.67±1.67	45.89±2.85	30.37±1.76	<b>&lt;0.001</b>
GGT (U/l)	36.84±2.26	49.85±4.40	29.47±1.87	<b>&lt;0.001</b>

(°) test *t* de Student; los valores expresados corresponden a media ± error estándar

**Tabla-5A.- Pacientes separados por sexo.**

Datos antropométricos y analíticos	Global de la serie	Granada	Córdoba	Valor p (°)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	49.99±0.60	48.77±0.80	51.15±0.85	<b>0.043</b>
PC (cm)	139.30±1.32	137.27±1.99	140.75±1.75	0.195
ICC	0.93±0.01	0.93±0.13	0.93±0.10	0.839
HOMA-IR	4.22±0.32	3.49±0.39	5.19±0.51	<b>0.008</b>
LDLc (mg/dl)	112.77±2.88	94.61±3.36	130.27±3.74	<b>&lt;0.001</b>
HDLc (mg/dl)	37.92±0.74	37.32±1.09	38.49±1.02	0.431
TG (mg/dl)	146.03±5.51	153.93±7.8	138.51±7.71	0.162
GOT (U/l)	29.29±1.34	37.35±2.31	21.83±1.01	<b>&lt;0.001</b>
GPT (U/l)	36.67±1.67	43.61±2.63	30.07±1.80	<b>&lt;0.001</b>
GGT (U/l)	36.84±2.26	35.64±3.69	37.98±2.69	0.608

(°) test *t* de Student. Los valores expresados corresponden a media±error estándar

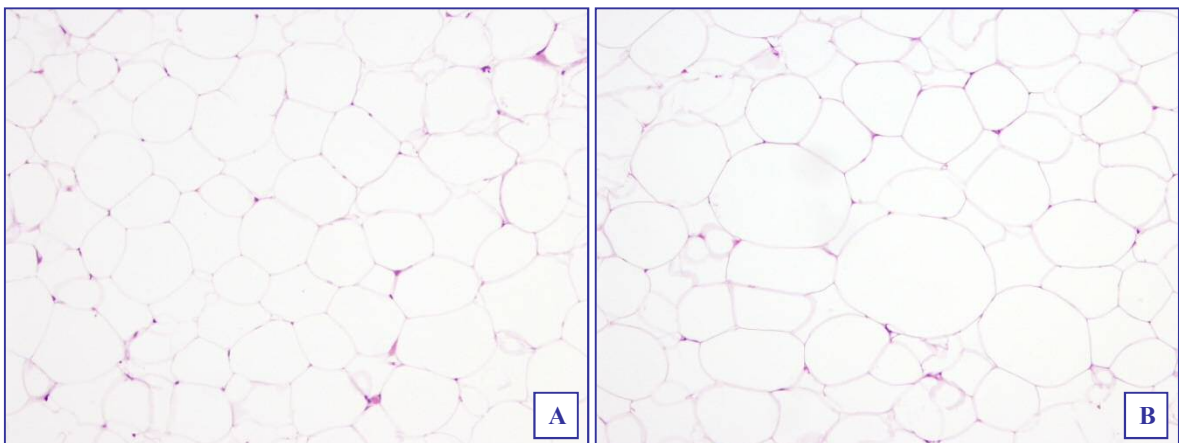
**Tabla-5B.- Pacientes separados por hospital de procedencia.**



## 4.2 Resultados histológicos, cuantitativos y morfométricos de la grasa visceral y subcutánea

### 4.2.1 Adipocitos

La grasa abdominal visceral y la subcutánea, con microscopía óptica, muestra apariencia normal, con adipocitos univacuolados de morfología y tamaño parecido (Figura-7A y B); están separados por escaso estroma en el que se evidencian capilares sanguíneos y están divididos en lóbulos por septos fibrosos muy delgados. En ocasiones se pueden observar algunos acúmulos de células inflamatorias mononucleadas estromales.

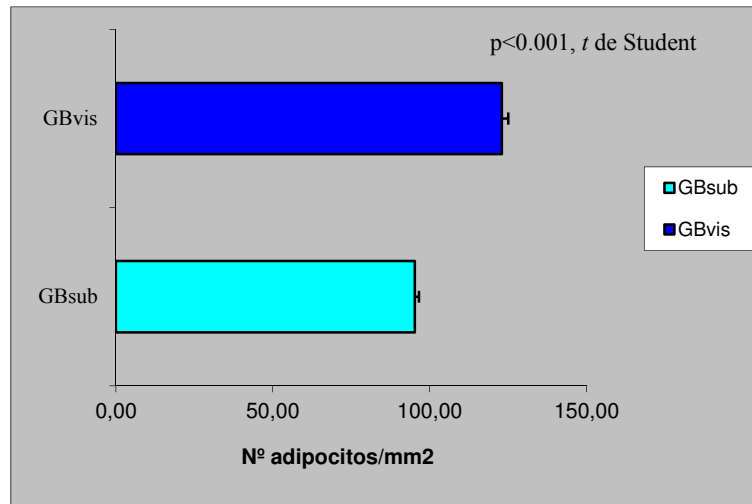


**Figura-7.- Morfología de los adipocitos en biopsias de GBvis (A) y GBsub (B) (HE, aumento original x10).**

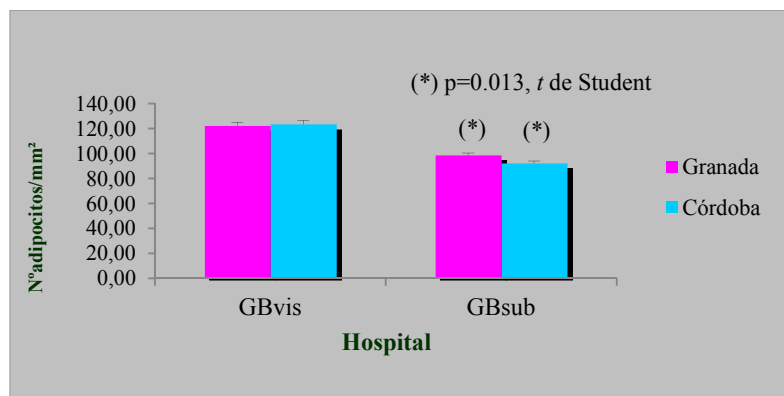
La valoración cuantitativa de los adipocitos ha permitido detectar diferencias entre grasa visceral y subcutánea, que se relacionan a continuación.

El recuento de adipocitos por  $\text{mm}^2$  de superficie fue superior en grasa visceral que en subcutánea ( $122.99 \pm 2.06$  vs  $95.24 \pm 1.32$ ,  $p < 0.001$ ,  $t$  de Student) (Gráfica-4).

Cuando separamos las biopsias de grasa según el hospital de procedencia, el nº de adipocitos/mm<sup>2</sup> en GBvis fue similar en ambos hospitales (122.20±2.62 vs 123.28±3.12), mientras que en GBsub fue significativamente superior en Granada que en Córdoba (98.62±1.78 vs 92.10±1.87, p=0.013, *t* de Student) (Gráfica-5).

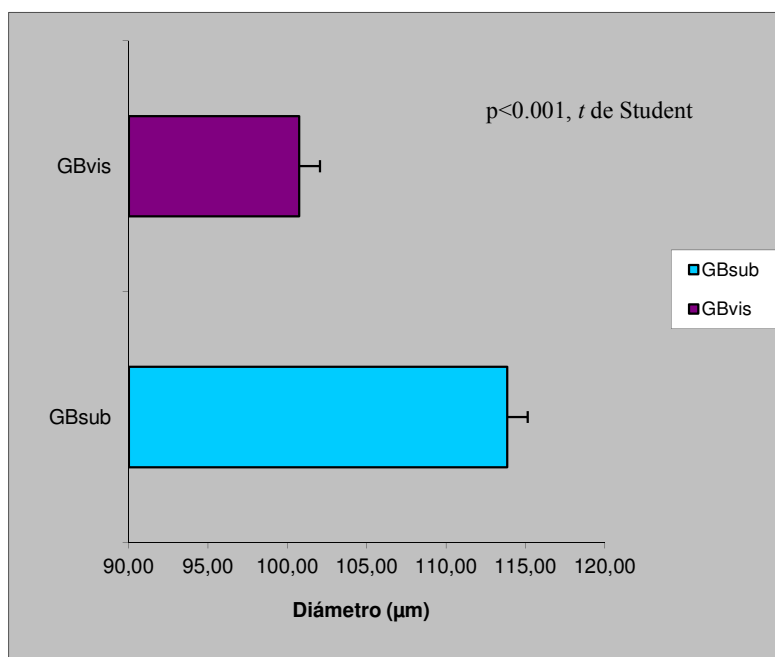


Gráfica-4.- Cuantificación de adipocitos en GBvis y GBsub.



Gráfica-5.- Cuantificación de adipocitos según hospital de procedencia de las biopsias.

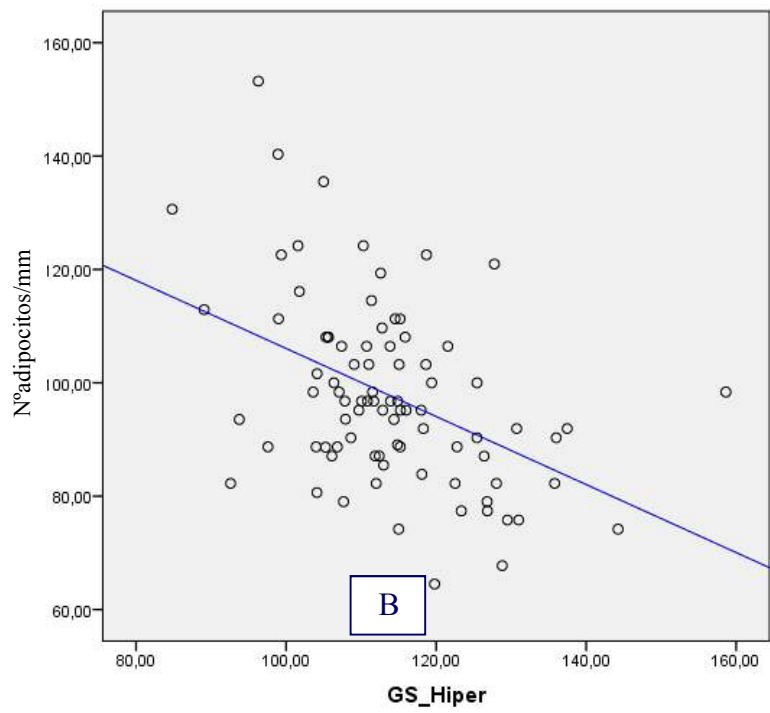
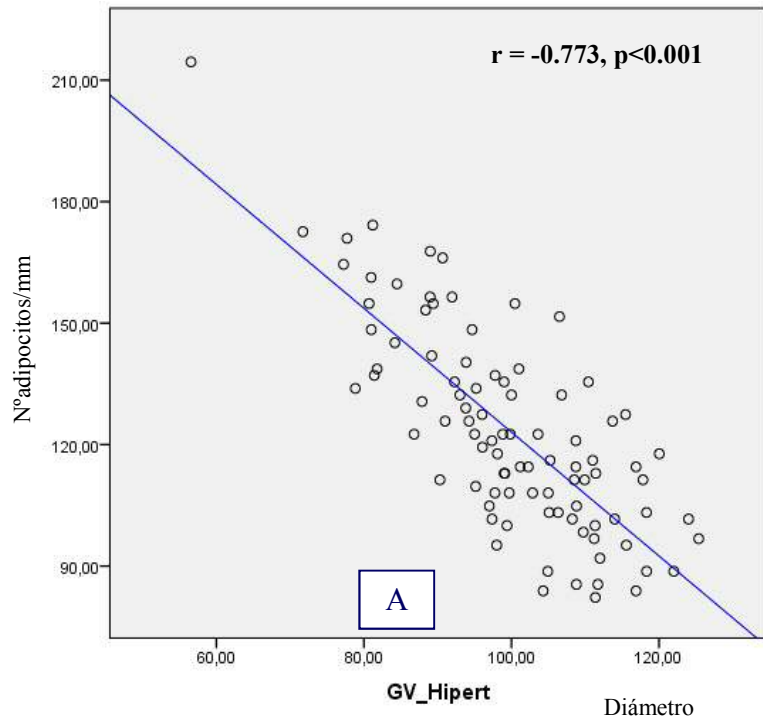
El diámetro de los adipocitos, obtenido por análisis de imagen en 93 casos en GBvis (58.12%) y en 86 casos en GBsub (53.75%), la mayoría de casos procedentes de pacientes de Granada, ha proporcionado resultados significativamente inferiores en GBvis que en GBsub ( $100.74 \pm 1.24$  vs  $113.85 \pm 1.29$ ,  $p < 0.001$ , *t* de Student) (Gráfica-6).



**Gráfica-6.- Diámetro de adipocitos en GBvis y GBsub.**

Se ha observado una correlación lineal inversa fuerte entre el nº de adipocitos totales y el diámetro en GBvis ( $r = -0.773$ ,  $p < 0.001$ , coeficiente de correlación de Pearson); es decir, a mayor nº de adipocitos éstos presentan menor diámetro (Gráfica-7A).

En el caso de GBsub la correlación entre el nº de adipocitos totales y el diámetro ha sido también inversa pero moderada ( $r = -0.445$ ,  $p < 0.001$ , coeficiente de correlación de Pearson) (Gráfica-7B).



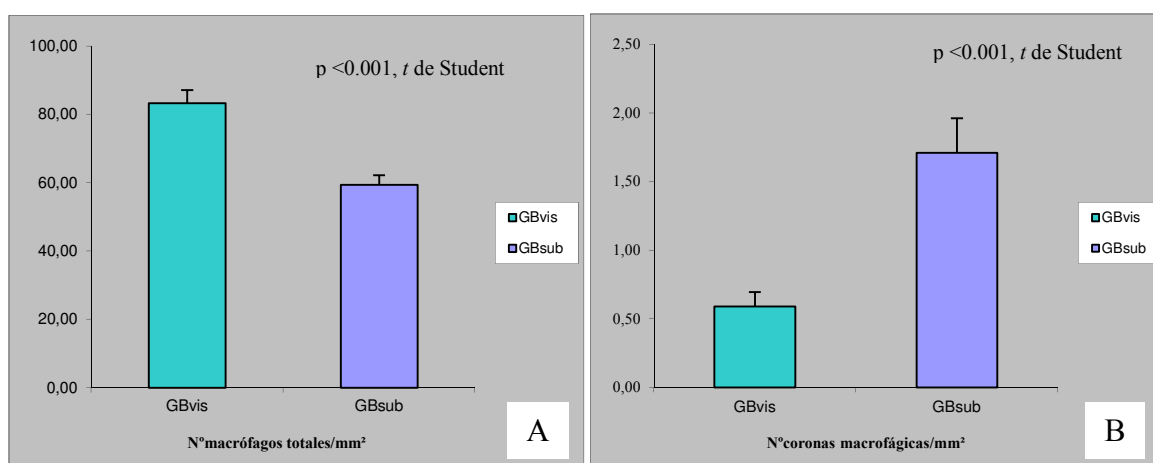
Gráfica-7.- Correlación lineal inversa y fuerte entre el n°adipocitos y el diámetro en GBvis (A) y moderada en GSub (B).

#### 4.2.2 Macrófagos

La mayoría de las células inflamatorias visualizadas con microscopía de luz correspondían a macrófagos, los cuales se reconocen mejor con técnicas inmunohistoquímicas cuando se aplican anticuerpos anti-CD68 (Figuras-8A y B). Éstos se visualizan de forma aislada o dispersa, entre adipocitos, o bien constituyendo acúmulos, con frecuencia dispuestos en coronas o rosetas a su alrededor (Figuras-8C-F); en casos de biopsias de GBsub hemos observado zonas con excesivo acúmulo macrofágico, el cual ha sido obviado al realizar los recuentos.

Se han valorado recuento de macrófagos totales y de coronas macrofágicas, no obstante debido a la calidad de muchas biopsias de grasa procedentes de pacientes de Córdoba, sólo se ha efectuado en el 29% de biopsias de esta procedencia.

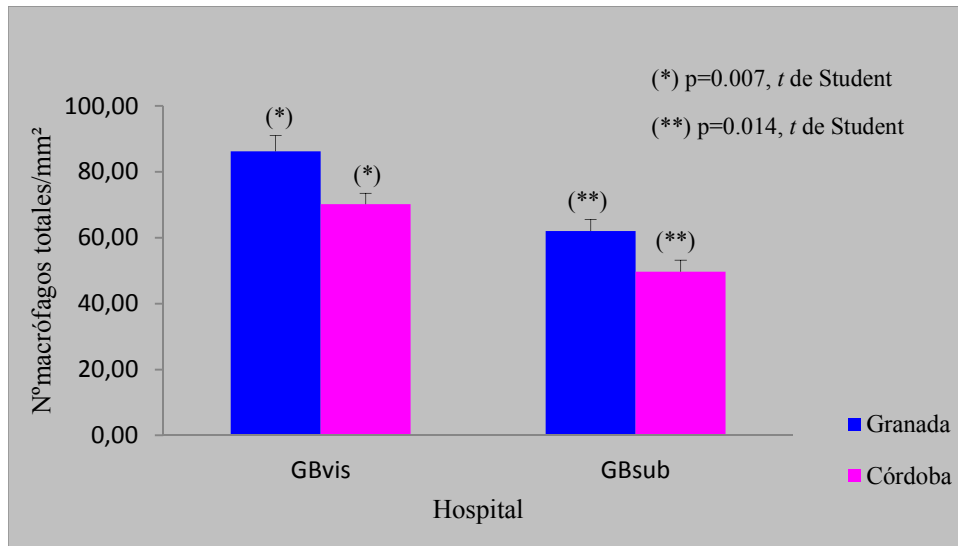
El nº de macrófagos totales por  $\text{mm}^2$  ha sido superior en GBvis que en GBsub ( $83.26 \pm 3.84$  vs  $59.38 \pm 2.80$ ,  $p < 0.001$ ,  $t$  de Student) (Gráfica-8A). Respecto al número de coronas macrofágicas por  $\text{mm}^2$  ha sido significativamente menor en GBvis que en GBsub ( $0.59 \pm 0.11$  vs  $1.71 \pm 0.25$ ,  $p < 0.001$ ,  $t$  de Student) (Gráfica-8B).



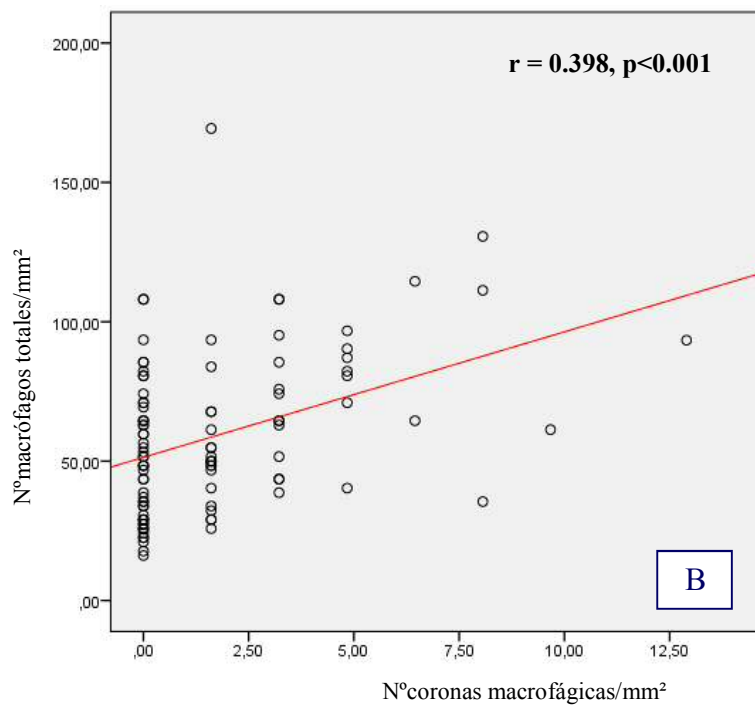
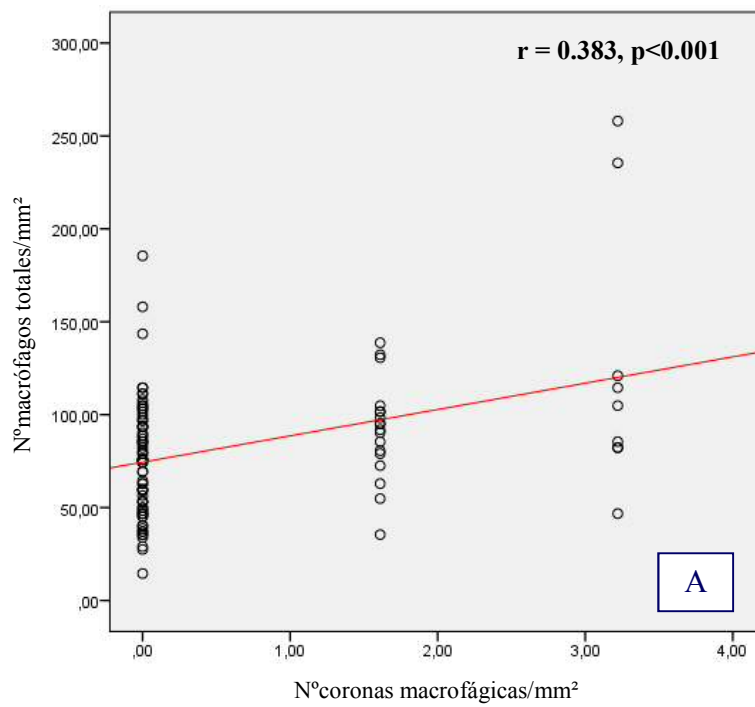
**Gráfica-8.-** Cuantificación de macrófagos totales (A) y coronas macrofágicas (B) en GBvis y GBsub.

Si separamos por el hospital de procedencia de las biopsias, en las de Granada el nº de macrófagos totales es mayor tanto en GBvis como GBsub (GBvis:  $86.25 \pm 4.75$  vs  $70.19 \pm 3.30$ ; GBsub:  $62.04 \pm 3.43$  vs  $49.65 \pm 3.48$ ,  $p=0,007$  y  $p=0,014$ , respectivamente, *t* de Student) (Gráfica-9). Respecto al nº de coronas, no ha habido diferencias entre las muestras de ambos hospitales.

El nº total de macrófagos se ha correlacionado de forma débil y directa con el nº de coronas tanto en GBvis como en GBsub ( $r=0.383$ ,  $p<0.001$  y  $r=0.398$ ,  $p<0.001$ , respectivamente, coeficiente de correlación de Pearson) (Gráfica- 10).



**Gráfica-9.- Cuantificación de macrófagos totales según hospital de procedencia de las biopsias.**



Gráfica-10.- Correlación lineal directa y débil entre el nº de macrófagos totales y el nº de coronas macrofágicas en GBvis (A) y en GSub (B).

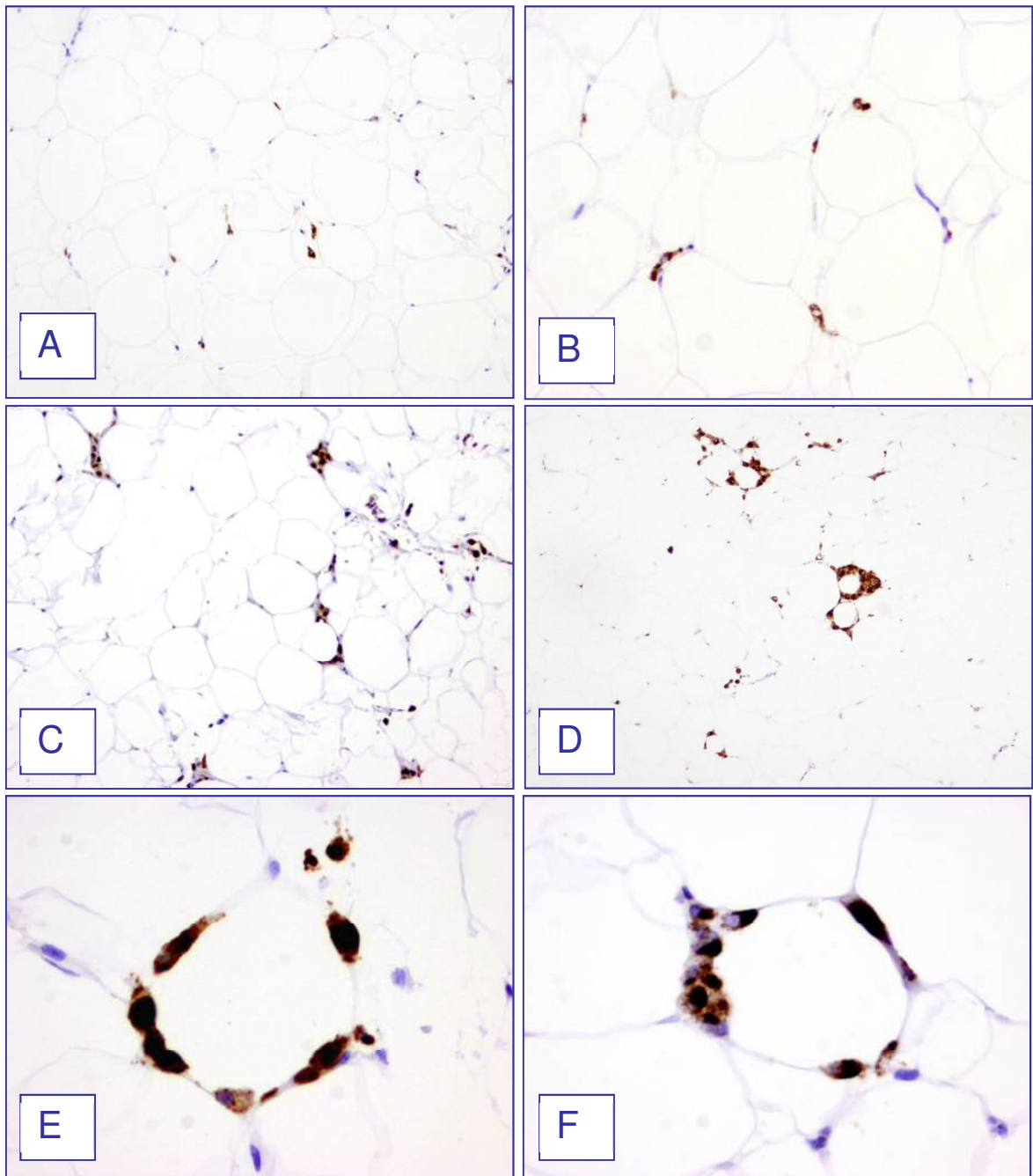
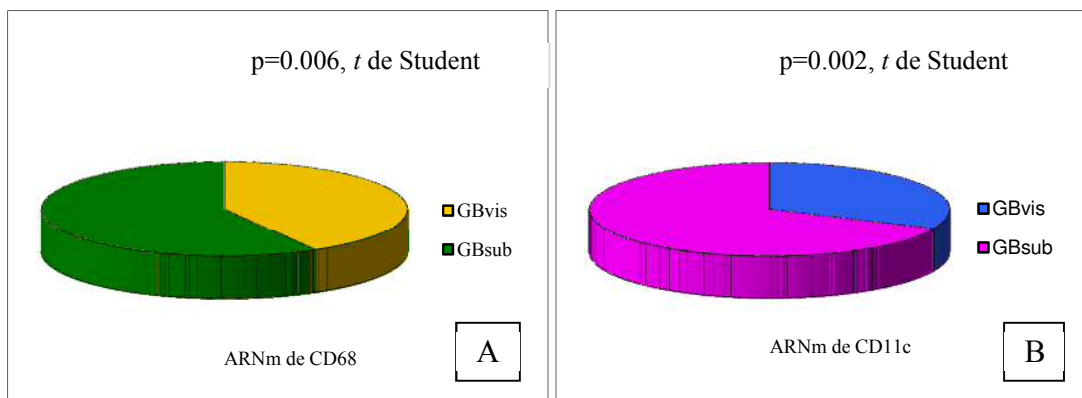


Figura-8.- Presencia de macrófagos CD68 positivos dispuestos de manera dispersa (A-D) y formando coronas (C-F) alrededor de los adipocitos, tanto en GBvis (A, C y E) como en GBsub (B, D y F) (Inmunoperoxidasa, aumento original: A y B x10, C y D x4, E y F x40).



La concentración de ARNm de CD68 en macrófagos de la grasa, determinada en el 37% de GBvis y en el 39% de GBsub, ha sido inferior en GBvis que en GBsub ( $8.41 \pm 2.62$  vs  $11.72 \pm 2.17$ ;  $p=0.006$ , *t* de Student) (Gráfica-11A).

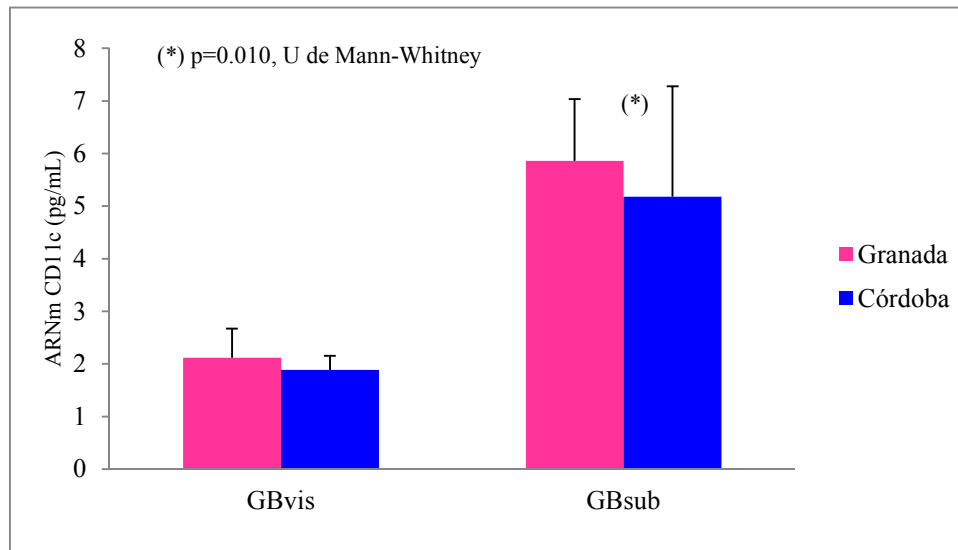
La concentración de ARNm de la integrina leucocitaria CD11c, expresada por macrófagos inflamatorios, se ha determinado en el 32% de GBvis y en el 53% de GBsub. Al igual que para CD68, los valores han sido inferiores en GBvis que en GBsub ( $2.00 \pm 0.26$  vs  $4.27 \pm 0.73$ ;  $p=0.002$ , *t* de Student) (Gráfica-11B).



**Gráfica-11.- Concentración de ARNm de CD68 (A) y de CD11c (B) en GBvis y GBsub.**

No existen diferencias en la concentración de ARNm de CD68 si separamos las biopsias por hospital de procedencia, aunque en Granada la media fue superior (GBvis  $12.11 \pm 6.00$  vs  $5.53 \pm 0.62$ ; GBsub  $15.50 \pm 4.91$  vs  $10.14 \pm 1.68$ ;  $p=0.602$  y  $p=0.219$ , respectivamente, U de Mann-Whitney).

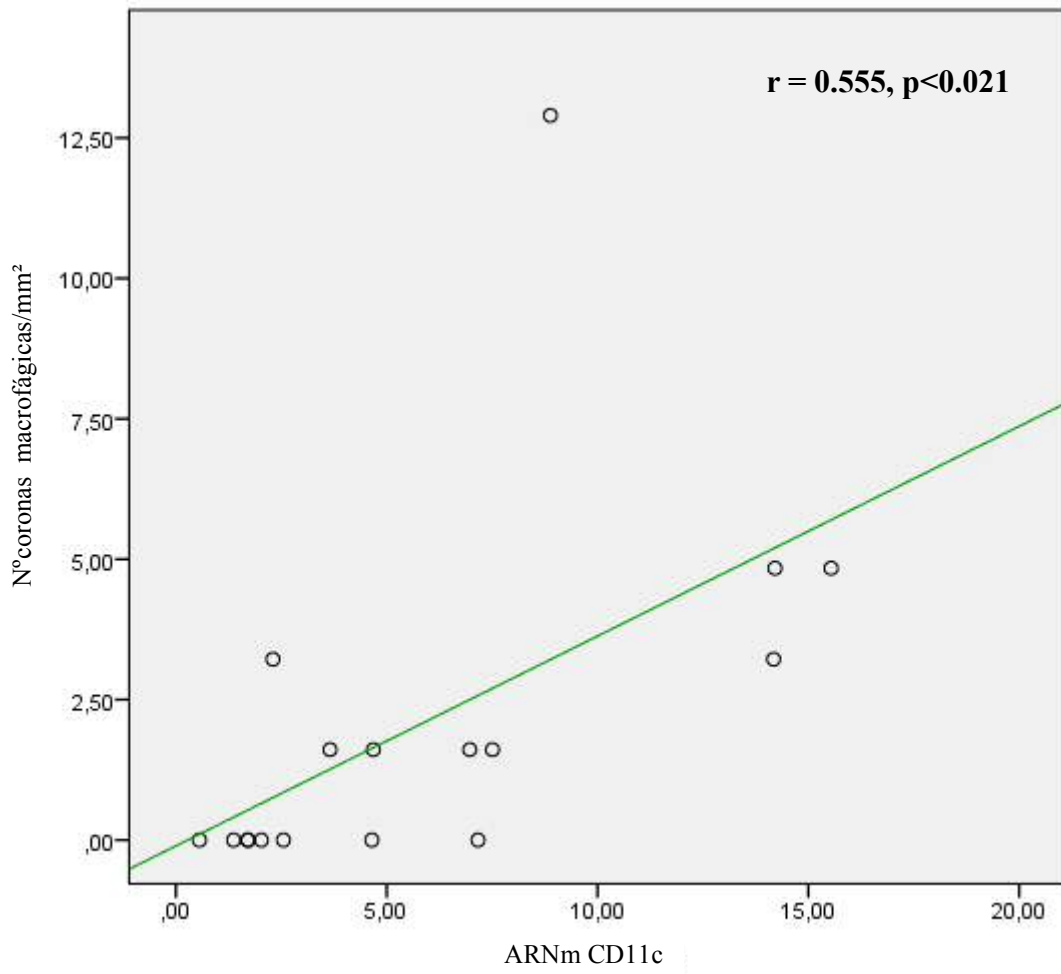
Lo mismo ocurre con la concentración de ARNm de CD11c en GBvis ( $2.12 \pm 0.55$  vs  $1.89 \pm 0.27$ ) ( $p=5.99$ , U de Mann-Whitney), aunque en GBsub las diferencias fueron significativas ( $5.86 \pm 1.18$  vs  $5.18 \pm 2.10$ ;  $p=0.010$ , U de Mann-Whitney) (Gráfica-12).



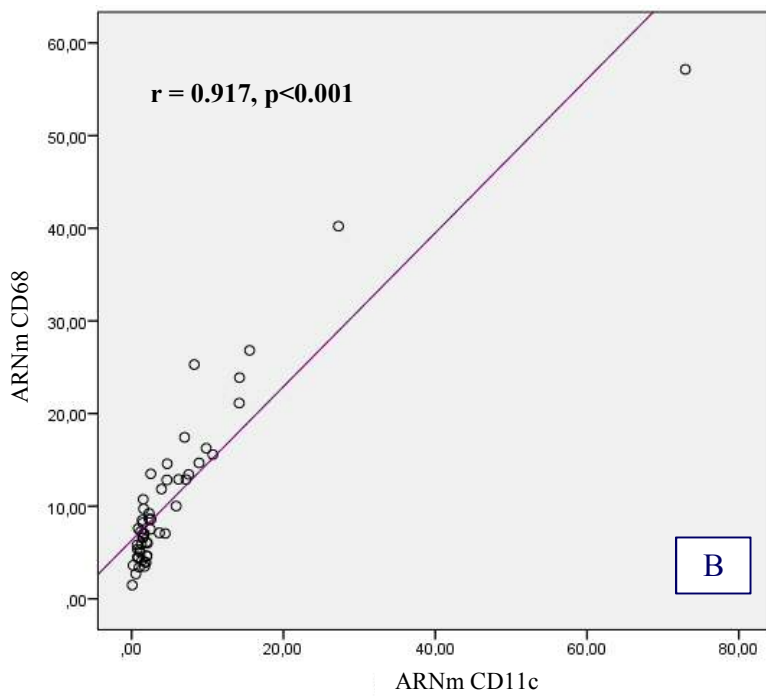
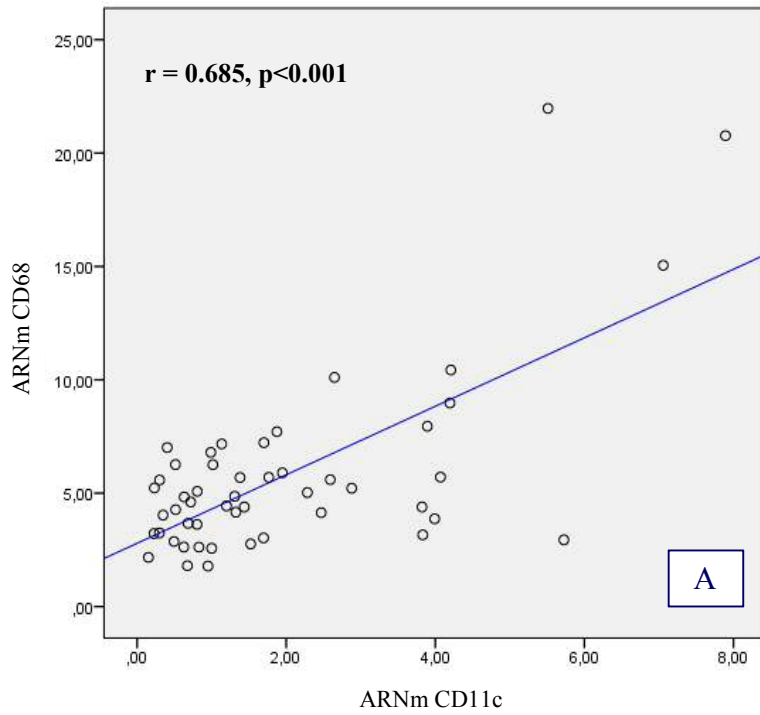
**Gráfica-12.- Concentración de ARNm de CD11c en GBvis y GBsub según hospital de procedencia.**

No existe correlación entre el nº total de macrófagos y la concentración de CD68 y CD11c tanto en GBvis como en GBsub. Algo parecido ocurre con las coronas macrofágicas excepto con CD11c en GBsub donde existe una correlación directa moderada ( $r=0.555$ ,  $p=0.021$ , coeficiente de correlación de Pearson) (Gráfica-13).

Existe una correlación fuerte entre la concentración de ARNm de CD68 y de CD11c en GBvis ( $r=0.685$ ,  $p<0.001$ , coeficiente de correlación de Pearson) y muy fuerte en GBsub ( $r=0.917$ ,  $p<0.001$ , coeficiente de correlación de Pearson) (Gráfica-14).



**Gráfica-13.- Correlación lineal directa moderada entre el nº de coronas macrofágicas y la concentración de CD11c en GBsub.**



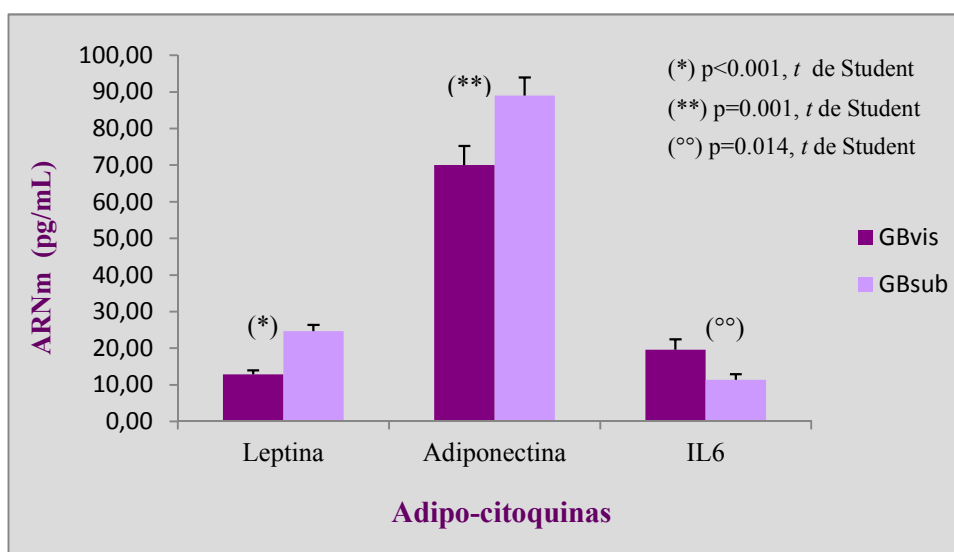
Gráfica-14.- Correlación lineal directa entre la concentración de ARNm de CD68 y CD11c, fuerte en GBvis (A) y muy fuerte en GBsub (B).

### 4.2.3 Adipo-citoquinas liberadas en GB

La concentración de ARNm de leptina (determinada en el 43% de las biopsias de GBvis y en el 44% en GBsub) fué de  $12.85 \pm 1.01$  en GBvis y de  $24.65 \pm 1.65$  en GBsub ( $p < 0.001$ ,  $t$  de Student).

Respecto a la concentración de ARNm de adiponectina, valorada en el mismo número de casos que la leptina, ha sido de  $70.03 \pm 5.14$  en GBvis y de  $88.99 \pm 4.92$  en GBsub ( $p = 0.001$ ,  $t$  de Student).

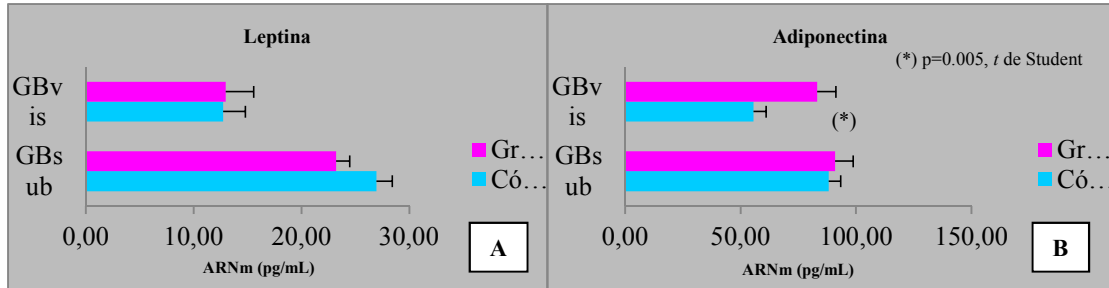
La concentración de ARNm de citoquina proinflamatoria IL-6, evaluada sólo en el 26% de los casos, ha mostrado valores más elevados en GBvis que en GBsub ( $19.59 \pm 2.82$  vs  $11.38 \pm 1.52$ ,  $p = 0.014$ ,  $t$  de Student) (Gráfica-15).



Gráfica-15.- Cuantificación de ARNm de algunas adipo-citoquinas en GBvis y GBsub.

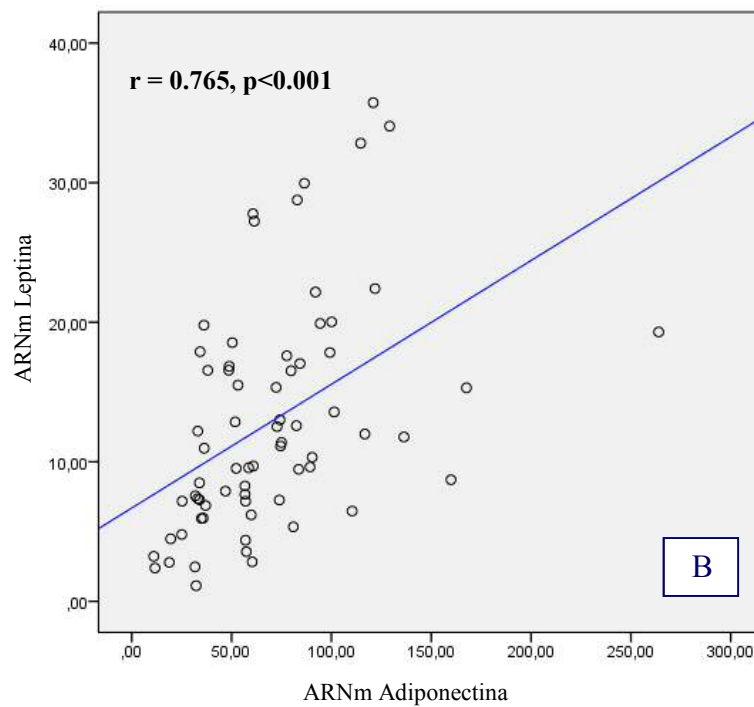
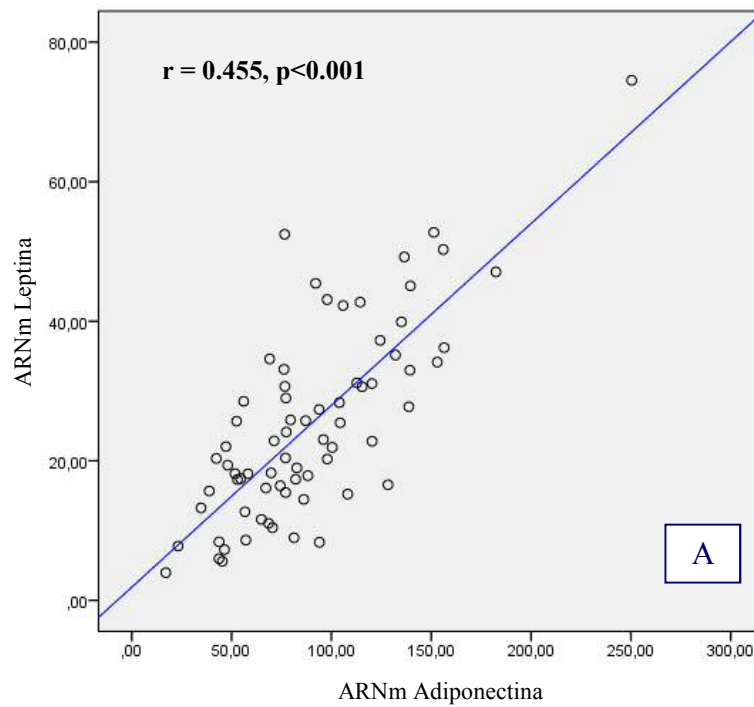
Si separamos por hospitales de procedencia, observamos que en las muestras de los pacientes de Granada hay mayor concentración de ARNm de adiponectina visceral que en las de Córdoba ( $83.23 \pm 7.93$  vs  $55.52 \pm 5.18$ ;  $p = 0.005$ ,  $t$  de Student). Respecto a los valores

de ARNm de leptina e IL-6, no se han obtenido diferencias significativas (Gráfica-16A y B).



**Gráfica-16-. Cuantificación de ARNm de las adipocinas leptina (A) y adiponectina (B) según hospital de procedencia.**

Existe una correlación directa moderada entre la concentración de ARNm de leptina y de adiponectina en GBvis ( $r=0.455$ ,  $p<0.001$ ) y fuerte en GBsub ( $r=0.765$ ,  $p<0.001$ ) (coeficiente de correlación de Pearson) (Gráfica-17).



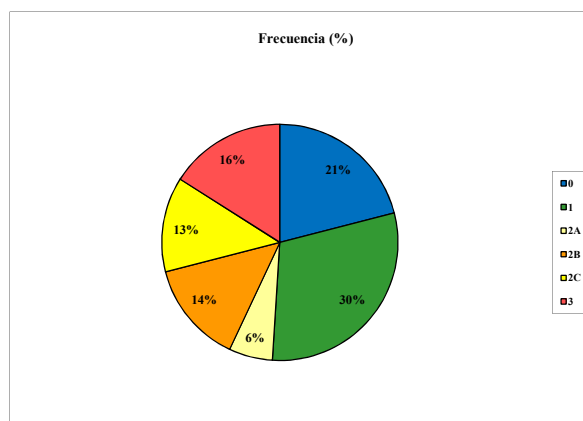
Gráfica-17.- Correlación lineal directa entre la concentración de ARNm leptina y adiponectina, moderada en GBvis (A) y fuerte en GBsub (B).

No existe correlación entre los valores de ARNm de IL-6 con los de CD68 ni con los CD11c tanto en GBvis como en GBsub.

### 4.3 Resultados de las lesiones hepáticas

A todos los pacientes se les realizaron biopsias hepáticas, obteniéndose cilindros (HUSC) o cuñas (HRSC). En todos se evaluaron diferentes lesiones histopatológicas que permitieron incluirlas en una de las Categorías Diagnósticas mencionadas en el Material y Métodos, así como establecer grados de actividad (NAS “score”) y Estadios de fibrosis de Kleiner.

La distribución en Categorías Diagnósticas ha sido la siguiente: el 21% (33 casos) se diagnosticaron de no-EHGNA, al no existir esteatosis, el 30% (48 casos) de hepatoesteatosis, el 33% (53 casos) de EHNA-borderline y el menor % (16) (26 casos) correspondió a la categoría EHNA. Ninguna de las biopsias ha mostrado cirrosis. Al valorar las diferentes subcategorías de EHNA-BORD la distribución ha sido la siguiente: 6% (9 casos) para la Categoría 2A, 14% (23 casos) para la 2B y 13% (21 casos) para la 2C (Gráfica 18).



**Gráfica 18.- Distribución de las distintas Categorías Diagnósticas (A) y con subdivisión de categoría 2 (B) en las biopsias hepáticas.**

Cuando consideramos el índice de actividad de Kleiner (NAS “score”), el 51% de los casos entrarían dentro del diagnóstico no-EHNA (NAS: 0-2), lo que equivale a la suma de las 2



primeras Categorías Diagnósticas indicadas previamente; el porcentaje de casos EHNA-“borderline” (NAS: 3-4) y EHNA (NAS: 5-8) son similares a las Categorías 2 y 3.

La esteatosis estuvo ausente en el 21% de las biopsias y presente en el 79% restante; histológicamente se reconoce por la presencia en el citoplasma hepatocitario de una gran vacuola que desplaza el núcleo -esteatosis macrovesicular- (Figura-9A) o de múltiples vacuolas citosólicas de pequeño tamaño, en la mayoría de casos sin desplazamiento del núcleo a la periferia -esteatosis multivesicular- (Figura-9B). Hemos evaluado el grado de esteatosis, que ha sido leve en el 35% de los casos, moderada en el 25% e intensa en el 19%. Asimismo hemos tenido en cuenta la presencia o ausencia de esteatosis multivesicular que fue observada en el 69% de los casos, en todos coincidiendo con la forma macrovesicular.

Otro parámetro valorado ha sido la balonización, caracterizada por la presencia de hepatocitos con citoplasma claro de aspecto reticulado, forma redondeada e incremento de tamaño, que estuvo presente en el 22% de los casos; en ocasiones se podían observar inclusiones hialinas eosinófilas con HE, correspondientes a MDB (Figura-9C) que se tiñen de color verde con tricrómico (figura-9D); se evidencian más claramente, en el 21% de casos, tras estudio inmunohistoquímico con Acs frente a proteína p62 (figura-9E y F).

Los hepatocitos balonizados se distribuyen predominantemente en área perivenular, pueden estar acompañados de focos inflamatorios y con frecuencia de fibrosis pericelular, datos que son característicos de EHNA.

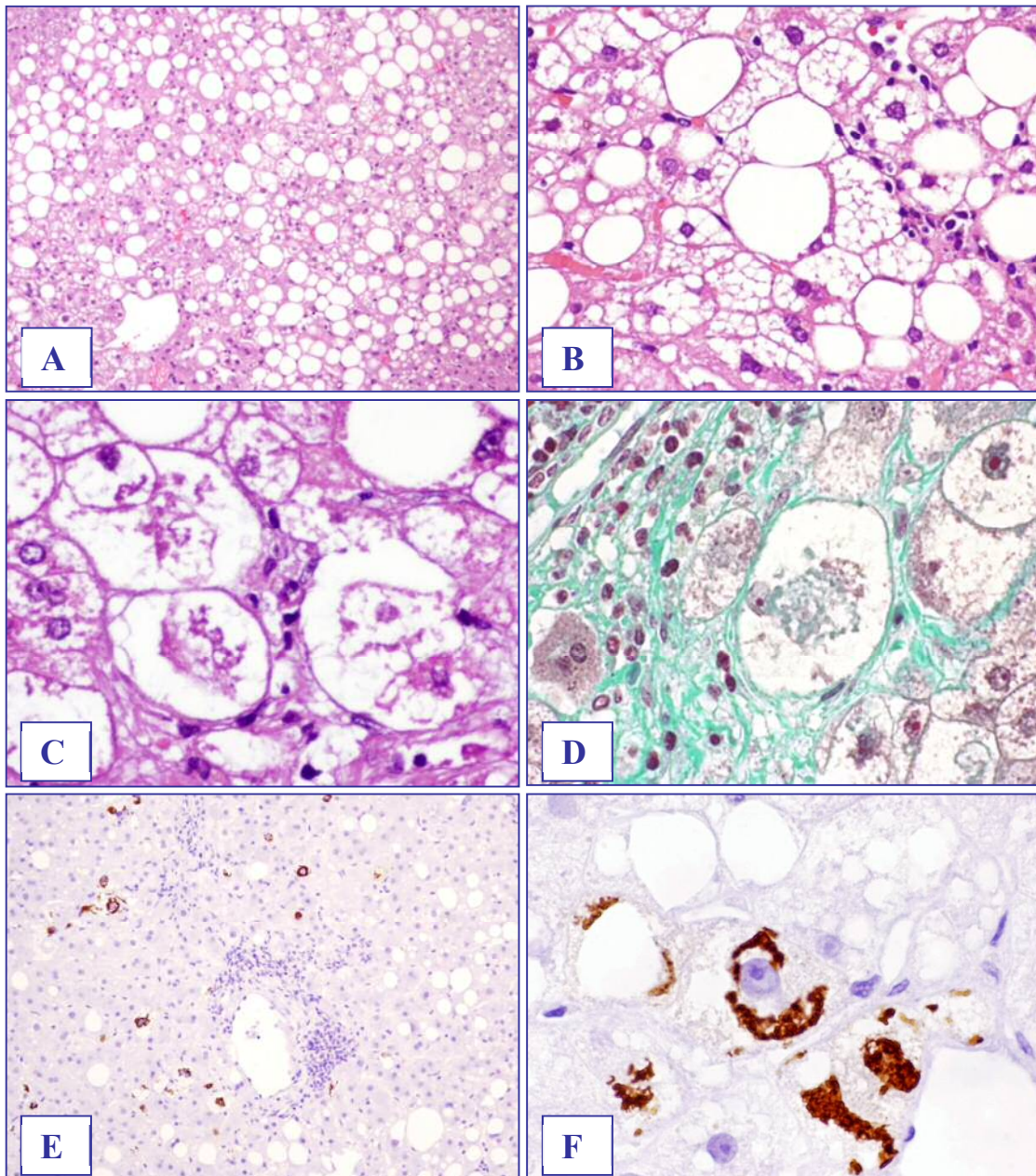
La inflamación lobulillar de tipo crónico o mixto se ha observado en numerosos casos (74%), generalmente con una intensidad leve (61%) (Figura-10A); en ocasiones podía ser difícil de diferenciar del infiltrado inflamatorio agudo, el cual suele estar presente en las biopsias tomadas en el transcurso de la cirugía, fenómeno conocido como “hepatitis quirúrgica”; ésta es perfectamente diferenciable tras la visualización de secciones teñidas con Acs frente a mieloperoxidasa (Figura-10B).

Un hallazgo frecuente ha sido la existencia de inflamación crónica en espacios porta, presente en el 78% de las biopsias; en la mayoría de los casos la intensidad era leve o mostraba un carácter focal (Figura-10C) y se acompaña de grado variable de fibrosis, generalmente leve.

Al considerar los Estadios de fibrosis, el 23% de las biopsias carecían de ella (estadio 0), el 48% estaban en estadio 1, con presencia de fibrosis perivenular en el 9 % (estadio 1A y 1B) o portal en el 39 % de casos (estadio 1C). El estadio 2 se apreció en el 23% de biopsias y el estadio 3 solo en 10 casos (6%) (Figura-11A-C).

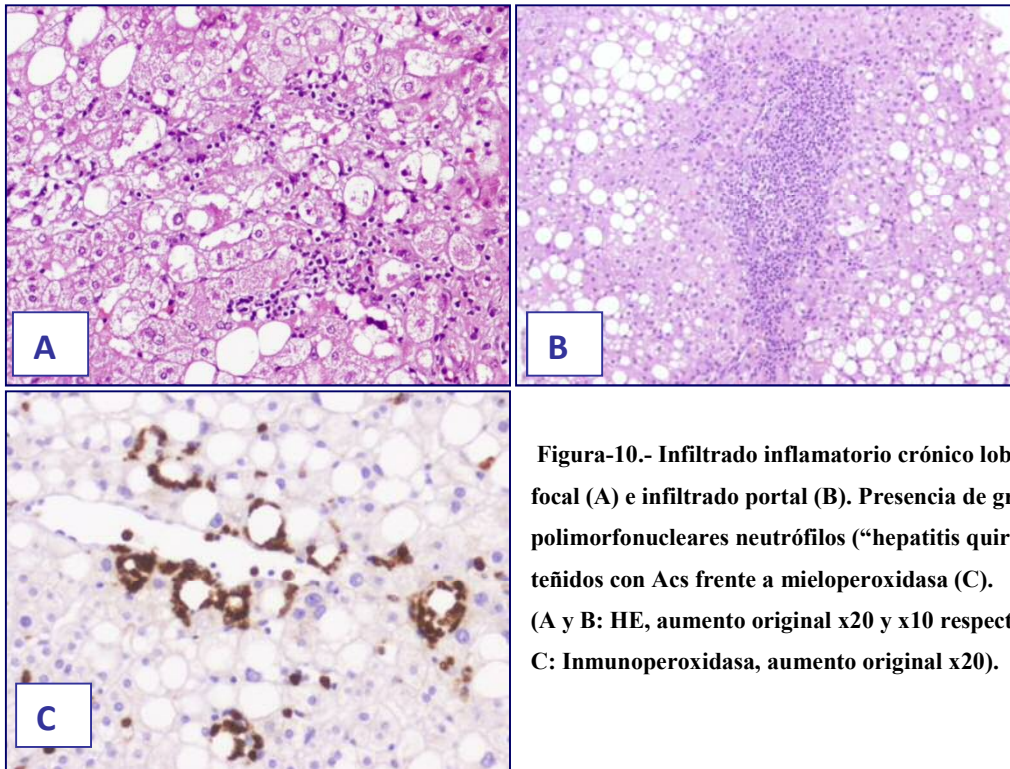
Si analizamos nuestras muestras teniendo en cuenta el hospital de procedencia, observamos que existen diferencias en cuanto a la distribución de las Categorías Diagnósticas: en Granada existen menos pacientes sin esteatosis (Categoría 0: 8% vs 13 %) y con EHNA-BORD (14% vs 19%), y más con EHNA (12% vs 4%); la Categoría 1 (hepatoesteatosis) fue similar en ambos hospitales (15%). Las mayores diferencias las observamos entre las Categorías extremas (0 y 3) (Tabla-8A).

Respecto al resto de parámetros histológicos evaluados, la balonización estuvo presente en un 15% de las biopsias de Granada siendo lo más frecuente que fuera de intensidad leve (10%) y solamente estuvo presente en un 7% de las biopsias de Córdoba. En el 20% de las biopsias de Granada se observó la presencia de MBD y en el 4% de las biopsias de Córdoba (aunque en las muestras de esta procedencia solo se determinó el Acs frente a la proteína p62 en el 41% de casos). En los pacientes de Granada existe mayor número de biopsias con esteatosis multivesicular y con inflamación portal que en los pacientes de Córdoba (Tabla-9).

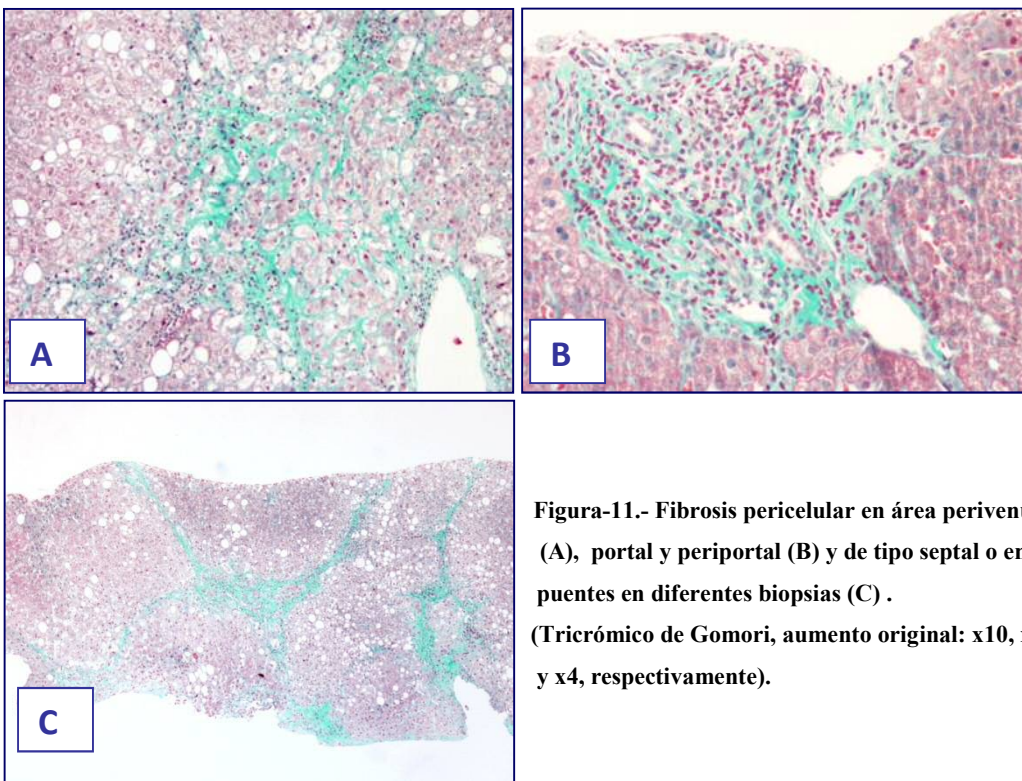


**Figura 9.-Hepatocitos con esteatosis macrovesicular (A y B) y multivesicular (B). Hepatocitos balonzados con inclusiones hialinas eosinófilas (C) o verdes (D) correspondientes a hialina de Mallory , las cuales reaccionan frente a Acs anti-p62 (E y F)**

(A, B y C: HE, aumento original, x4, x20 y x40, respectivamente. D: tricrómico de Gomori, aumento original x40. E y inmunoperoxidasa, aumento original x10 y x40, respectivamente).



**Figura-10.- Infiltrado inflamatorio crónico lobulillar focal (A) e infiltrado portal (B). Presencia de grupos de polimorfonucleares neutrófilos (“hepatitis quirúrgica”) teñidos con Acs frente a mieloperoxidasa (C). (A y B: HE, aumento original x20 y x10 respectivamente. C: Inmunoperoxidasa, aumento original x20).**



**Figura-11.- Fibrosis pericelular en área perivenular (A), portal y periportal (B) y de tipo septal o en puentes en diferentes biopsias (C) . (Tricrómico de Gomori, aumento original: x10, x20 y x4, respectivamente).**

Al considerar los Estadios de fibrosis, no ha habido diferencias significativas en los resultados de ambas, aunque en Granada había menor número de biopsias que carecían de fibrosis (estadio 0: 10% vs 13%) y mayor número de casos en estadio 2+3 que en las de Córdoba (18% vs 11%) (Tabla-8B) lo que está en concordancia con las Categorías Diagnósticas indicadas previamente.

El grado de esteatosis aumenta cuando es mayor la Categoría Diagnóstica y el Estadio de fibrosis ( $p < 0.001$ , respectivamente,  $\text{Chi}^2$ ).

Existe reducido nº de casos con EHNA en los que la esteatosis multivesicular está ausente; aunque existe asociación significativa entre su presencia o ausencia y las distintas lesiones histológicas evaluadas, Categorías Diagnósticas y Estadios de fibrosis (Tabla-10).

Respecto a la inflamación portal se aprecia asociación significativa con las lesiones histológicas hepáticas evaluadas, las Categorías Diagnósticas, y los Estadios de fibrosis, Así por ejemplo su ausencia se observa en pocas biopsias con balonización o inflamación lobulillar (Tabla-10).

De las 35 biopsias con balonización, la mayoría presentaron un grado de esteatosis moderado o intenso (15 casos respectivamente) ( $p < 0.001$ ,  $\text{Chi}^2$ ). El mayor número de biopsias con balonización (25 casos) se encuentra en biopsias con EHNA y con Estadios de fibrosis 2+3 (30 casos) ( $p < 0.001$ , respectivamente en ambas,  $\text{Chi}^2$ ).

En 33 casos no existió esteatosis, la mayoría de estas biopsias (30) tampoco presentaron inflamación lobulillar ( $p < 0.001$ ,  $\text{Chi}^2$ ).

## HOSPITALES DE PROCEDENCIA

Categorías Diagnósticas	Total N (%)	Granada N (%)	Córdoba N (%)	Valor p <sup>(oo)</sup>
No-EHGNA	33 (21%)	13 (8%)	20 (13%)	<b>0.037</b>  (*)
HENA	48 (30%)	24 (15%)	24 (15%)	
EHNA-BORD	53 (33%)	22 (14%)	31 (19%)	
2A	9 (6%)	3 (2%)	6 (4%)	
2B	23 (14%)	9 (6%)	14 (8%)	
2C	21 (13%)	10 (6%)	11 (7%)	
EHNA	26 (16%)	19 (12%)	7 (4%)	
<b>Total</b>	<b>160 (100%)</b>	<b>78 (49%)</b>	<b>82 (51%)</b>	

N: n° de casos; (oo) test Chi<sup>2</sup>; (\*) al subdividir EHNA-BORD el valor de p= 0.107.

**Tabla-8A.- Distribución de las Categorías Diagnósticas en las biopsias hepáticas según el hospital de procedencia.**

Estadios de fibrosis	Total N (%)	Granada N (%)	Córdoba N (%)	Valor p <sup>(oo)</sup>
Estadio 0	36 (23%)	15 (10%)	21 (13%)	0.135(·)
Estadio 1	78 (48%)	34 (21%)	44 (27%)	
1A +1B	15 (9%)	7 (4%)	8 (5%)	
1C	63 (39%)	27 (17%)	36 (22%)	
Estadio 2	36 (23%)	22 (14%)	14 (9%)	
Estadio 3	10 (6%)	7 (4%)	3 (2%)	
2+3 (°)	46 (29%)	29 (18%)	17 (11%)	
<b>Total</b>	<b>160 (100%)</b>	<b>78 (49%)</b>	<b>82 (51%)</b>	

N: n° de casos; (oo) test Chi<sup>2</sup>; (·) el valor de p cambia (p=0.146) cuando los estadios 1A y 1B se consideran juntos y los estadios 2 y 3 se suman; (°) Se han considerado juntos debido al escaso n° de casos en estadio 3.

**Tabla-8B.- Estadios de fibrosis en las biopsias hepáticas según el hospital de procedencia.**

## HOSPITALES DE PROCEDENCIA

Lesiones histológicas	Total N (%)	Granada N (%)	Córdoba N(%)	Valor p (°°)
ESTEATOSIS				
-Grado				
0 (ausente)	33 (21%)	13 (8%)	20 (13%)	0.443
1 (leve)	56 (35%)	27 (17%)	29 (18%)	
2 (moderada)	41 (26%)	20 (13%)	21 (13%)	
3 (intensa)	30 (18%)	18 (11%)	12 (7%)	
-Multivesicular				
ausente	50 (31%)	18 (11%)	32 (20%)	0.030
presente	110 (69%)	60 (38%)	50 (31%)	
BALONIZACIÓN				
ausente	125 (78%)	54 (34%)	71 (44%)	0.020
presente	35 (22%)	24 (15%)	11 (7%)	
INFLAMACIÓN				
-Lobulillar				
ausente	42 (27%)	17 (11%)	25 (16%)	0.212
presente	118 (73%)	61 (38%)	57 (35%)	
-Portal				
ausente	36 (23%)	11 (7%)	25 (16%)	0.013
presente	124 (77%)	67 (42%)	57 (35%)	

N: n° de casos; (°°) test Chi<sup>2</sup>

**Tabla-9.- Lesiones histológicas hepáticas según el hospital de procedencia de los pacientes.**

	ESTEATOSIS MULTIVESICULAR			INFLAMACIÓN PORTAL		
	Ausente N (%)	Presente N (%)	Valor p (°)	Ausente N (%)	Presente N (%)	Valor p (°)
<b>ESTEATOSIS</b>						
-Grado						
0 (ausente)	33 (21)	0 (0)	<b>&lt;0.001</b>	17 (11)	16 (10)	<b>&lt;0.001</b>
1 (leve)	10 (6)	46 (29)		9 (6)	47 (29)	
2 (moder.)	4 (2)	37 (23)		7 (4)	34 (21)	
3 (intensa)	3 (2)	27 (17)		3 (2)	27 (17)	
- Multivesicular						
ausente				23 (14)	27 (17)	<b>&lt;0.001</b>
presente				13 (8)	97 (61)	
<b>BALONIZACIÓN</b>						
ausente	44(27)	81 (51)	<b>0.042</b>	34 (21)	91 (57)	<b>0.007</b>
presente	6 (4)	29 (18)		2 (11)	33 (21)	
<b>INFLAMACIÓN</b>						
-Lobulillar						
ausente	32 (20)	10 (6)	<b>&lt;0.001</b>	22 (14)	20 (12)	<b>&lt;0.001</b>
presente	18 (11)	100 (63)		14 (9)	104 (65)	
-Portal						
ausente	23 (14)	13 (8)	<b>&lt;0.001</b>			
presente	27 (17)	97(61)				
<b>CAT. DIAGNÓSTICAS</b>						
NO-EHGNA	33 (21)	0 (0)	<b>&lt;0.001</b>	17 (11)	16 (10)	<b>&lt;0.001</b>
EHGNA	8 (5)	40 (25)		9 (6)	39 (24)	
EHNA-BORD	5 (3)	48 (30)		7 (4)	46 (29)	
EHNA	4 (2)	22 (14)		3 (2)	23 (14)	
<b>ESTAD. DE FIBROSIS</b>						
Estadio 0	27 (17)	9 (6)	<b>&lt;0.001</b>	24 (15)	12 (7)	<b>&lt;0.001</b>
Estadio 1A+B	3 (2)	12 (7)		12 (7)	3 (2)	
Estadio 1C	16 (10)	47 (29)		0 (0)	63 (40)	
Estadio 2+3	4 (3)	42 (26)		0 (0)	46 (29)	

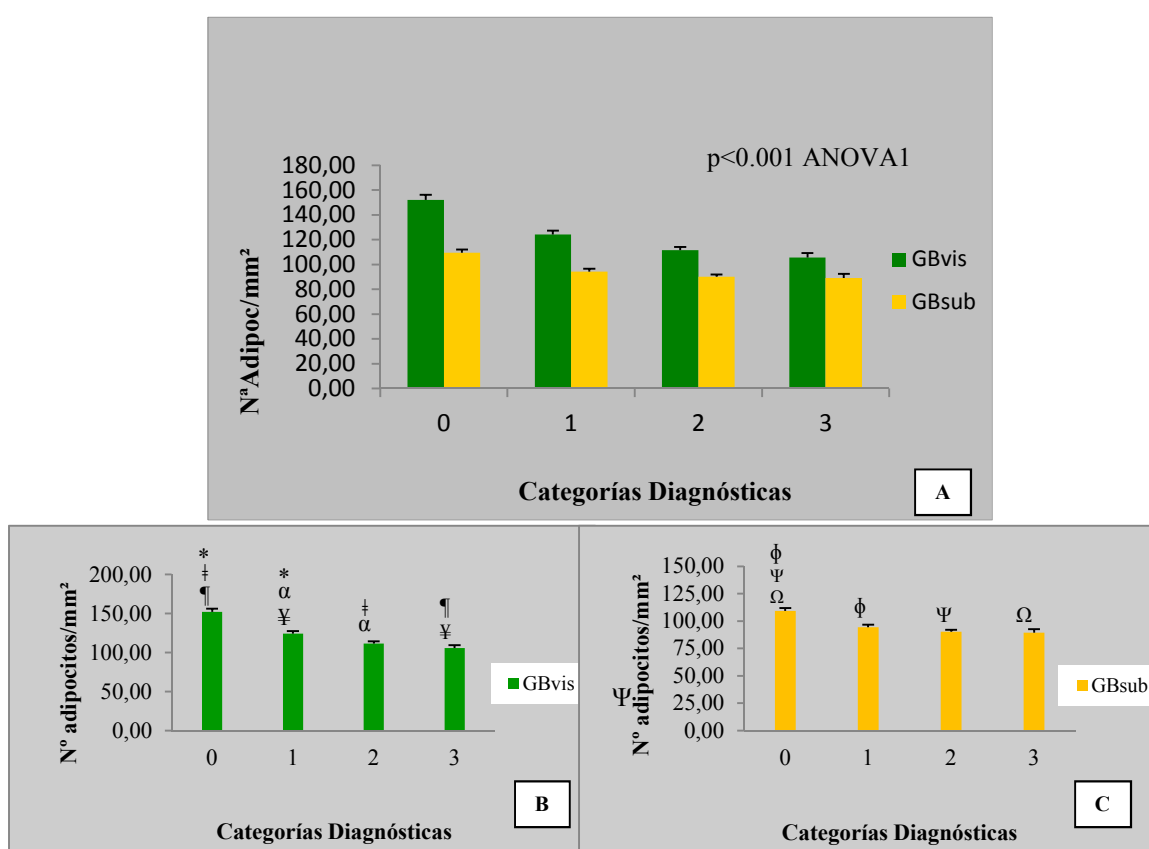
Cat.: categorías; Estad.: estadios; N.: n° de casos; (°) test Chi<sup>2</sup>. Los estadios 2 y 3 se han considerado en conjunto debido al reducido número de biopsias en estadio 3.

**(Tabla-10.-) Asociación entre Esteatosis multivesicular e inflamación portal con lesiones histológicas hepáticas, Categorías Diagnósticas y Estadios de fibrosis**



#### 4.4 Correlación entre parámetros topo-morfológicos de la grasa y las lesiones hepáticas.

El recuento de adipocitos en las distintas Categorías Diagnósticas de EHGNA ha proporcionado los valores más altos en biopsias con ausencia de lesiones o escasez de ellas (Categoría 0) y los más bajos en las lesiones más intensas (Categoría 3 o EHNA) tanto en grasa visceral como en subcutánea (Categoría 0: 151.99±44.08 vs 109.36±2.62, Categoría 3: 105.58±3.66 vs 89.22±3.28,  $p<0.001$ , ANOVA1) (Gráfica-19A).

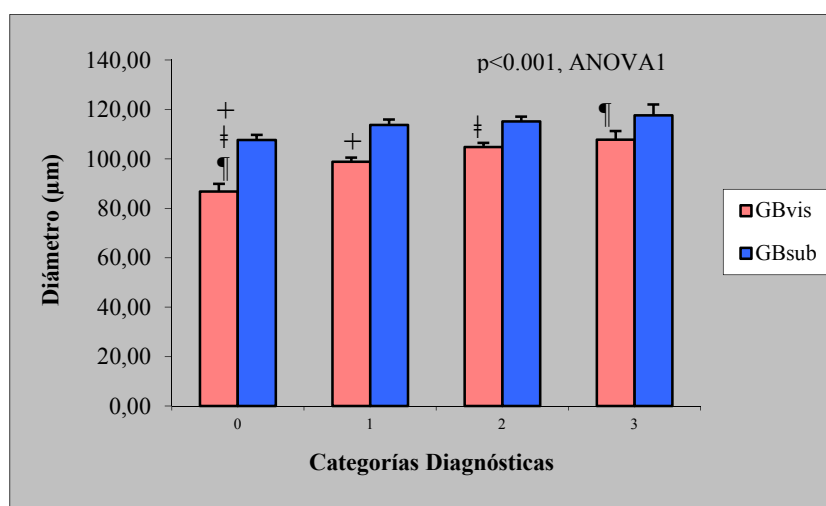


[GBvis: \* entre Categorías 0 y 1,  $p<0.001$ ; † entre 0 y 2,  $p<0.001$ ; ‡ entre 0 y 3,  $p<0.001$ ; α entre 1 y 2,  $p<0.05$ ; β entre 1 y 3,  $p<0.05$ , Bonferroni] [GBsub: φ entre Categorías 0 y 1,  $p<0.001$ ; ψ entre 0 y 2,  $p<0.001$ ; Ω entre 0 y 3,  $p<0.001$ , Bonferroni]

Gráfica-19.- Cuantificación de adipocitos en grasa visceral y subcutánea en las Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas (A) y al aplicar comparación entre Categorías (B: GBvis y C: GBsub).

Las diferencias se establecen entre la Categoría 0 (No-EHGNA) con las otras 3 (HENA, EHNA-BORD y EHNA), tanto en GBvis como en GBsub; entre la Categoría 1 con las Categorías 2 y 3 y entre la Categoría 2 y la Categoría 3 solamente en GBvis (Bonferroni) (Gráfica-19By C).

El diámetro adipocitario es menor cuando no hay lesiones (Categoría 0) y es mayor cuando las lesiones son más intensas (Categoría 3), con diferencias estadísticamente significativas sólo en GBvis ( $86.80 \pm 3.06$  vs  $107.85 \pm 3.39$ ,  $p < 0.001$ , ANOVA1), debiéndose estas diferencias a la comparación entre la Categoría 0 con las otras 3 (Bonferroni) (Gráfica-20).



[GBvis: + entre Categorías 0 y 1,  $p < 0.05$ ; ‡ entre 0 y 2,  $p < 0.001$ ; ¶ entre 0 y 3,  $p < 0.001$ , Bonferroni].

**Gráfica-20.- Comparación del diámetro adipocitario en GBvis y GBsub según Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas.**

Al comparar el nº adipocitos y su diámetro con las subcategorías de la Categoría 2, existen diferencias en el nº de adipocitos, tanto en GBvis como en GBsub, entre la Categoría 0 con las Categorías 2A, 2B y 2C (GBvis:  $p < 0.001$  en los 3; GBsub:  $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$  y  $p < 0.001$ , respectivamente, Bonferroni). Algo similar ocurre con el diámetro adipocitario

pero sólo en GBvis (entre Categorías 0 y 2A  $p=0.008$ , entre 0 y 2B  $p<0.001$  y entre 0 y 2C  $p=0.001$ , Bonferroni).

Cuando aplicamos el índice de actividad de Kleiner el comportamiento es similar. Se obtienen los valores más altos de adipocitos, tanto en GBvis como en GBsub, en las biopsias con un índice de actividad bajo (NAS0-2) ( $135.56\pm 2.82$  y  $100.39\pm 1.92$ ) y los valores más bajos con índices de actividad altos (NAS5-8) ( $105.58\pm 3.66$  y  $89.22\pm 3.28$ ), ( $p<0.001$ , ANOVA1 en ambos). Estas diferencias se establecen entre NAS0-2 con NAS3-4 y NAS5-8 (GBvis:  $p<0.001$  en ambos; GBsub:  $p=0.001$  y  $p=0.007$ , respectivamente, Bonferroni).

Lo contrario ocurre con el diámetro adipocitario en GBvis; los valores menores se obtienen en las biopsias hepáticas con un índice de actividad bajo (NAS 0-2) ( $94.53\pm 1.74$ ) y los valores más altos con índices de actividad altos (NAS5-8) ( $107.85\pm 3.39$ ) ( $p<0.001$ , ANOVA1). Estas diferencias se establecen entre NAS0-2 con NAS3-4 y NAS5-8 ( $p=0.001$  en ambos, Bonferroni).

Si comparamos del número de adipocitos en ambas localizaciones con las diferentes lesiones histológicas hepáticas evaluadas, se obtienen mayores promedios de adipocitos cuando casi todas las lesiones están ausentes (esteatosis, esteatosis multivesicular, balonización e inflamación lobulillar), tanto en GBvis como en GBsub. En el caso del grado de esteatosis, las diferencias se encuentran entre el grado 0 y los otros 3, tanto en GBvis como en GBsub y además en GBvis entre los grados 1 y 2 y entre 1 y 3 (Bonferroni) (Tabla-11).

Por el contrario si el parámetro considerado es el diámetro adipocitario, los valores obtenidos son menores, pero solo son significativos en GBvis. En el caso del grado de esteatosis las diferencias se establecen entre el grado 0 y los otros 3, así como entre los grados 1 y 3 (Bonferroni) (Tabla-12).

El nº de adipocitos disminuye conforme aumenta la intensidad de la fibrosis ( $p<0.001$  para GBvis y  $p=0.010$  para GBsub, ANOVA1), de manera que estas diferencias se establecen

principalmente entre el estadio 0 y el resto de Estadios de fibrosis (1A+B, 1C, 2+3), entre los estadios 1A+B y 1C y entre 1A+B y 2+3 en GBvis. En GBsub sólo hay diferencias entre el estadio 0 y el estadio 2+3 (Bonferroni) (Tabla-13).

El diámetro adipocitario solamente en GBvis es significativamente menor cuando no existe fibrosis en las biopsias hepáticas ( $p < 0.001$ , ANOVA1), con diferencias entre el estadio 0 y los restantes (Bonferroni) (Tabla 14).

Lesiones histológicas	N° DE ADIPOCITOS					
	GBvis	Valor p (°)	Bonf.	GBsub	Valor p (°)	Bonf.
<b>ESTEATOSIS</b>						
-Grado						
0 (ausente)	151.99±4.08	(°)	* , ‡ , ¶	109.36±2.62	(°)	φ, Ψ, Ω
1 (leve)	122.31±2.73	<b>&lt;0.001</b>	* , α, ¥	93.72±2.12	<b>&lt;0.001</b>	φ
2 (moder.)	110.73±2.86		‡ , α,	90.56±1.97		Ψ
3 (intensa)	107.84±3.63		¶ , ¥	88.64±3.00		Ω
-Multivesicular						
ausente	138.73±4.02	<b>&lt;0.001</b>		101.83±2.59	<b>0.002</b>	
presente	115.49±2.00			92.27±1.43		
<b>BALONIZACIÓN</b>						
ausente	127.10±2.34	<b>&lt;0.001</b>		96.96±1.53	<b>0.010</b>	
presente	107.23±3.00			88.70±2.18		
<b>INFLAMACIÓN</b>						
-Lobulillar						
ausente	142.62±4.08	<b>&lt;0.001</b>		103.71±2.51	<b>&lt;0.001</b>	
presente	115.68±1.99			92.16±1.45		
-Portal						
ausente	125.98±4.49	0.397		94.88±2.75	0.568	
presente	121.82±2.30			95.34±1.51		

Vis: visceral ; Sub: subcutánea; (°) test *t* de Student ; (°) test ANOVA1. Bonf.: prueba de Bonferroni. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

[GBvis: \* entre grados de esteatosis 0 y 1,  $p<0.001$ ; ‡ entre grados 0 y 2,  $p<0.001$ ; ¶ entre grados 0 y 3,  $p<0.001$ ; α entre grados 1 y 2,  $p<0.05$ ; ¥ entre grados 1 y 3,  $p<0.05$ ]

[GBsub: φ entre grados 0 y 1,  $p<0.001$ ; Ψ entre grados 0 y 2,  $p<0.001$ ; Ω entre grados 0 y 3,  $p<0.001$ ]

**Tabla-11.- Cuantificación de adipocitos en GBvis y GBsub en las diferentes lesiones histológicas hepáticas.**

Lesiones histológicas	DIÁMETRO DE ADIPOCITOS					
	GBvis	Valor p (°°)	Bonf.	GBsub	Valor p (°°)	Bonf.
<b>ESTEATOSIS</b>						
<b>-Grado</b>						
0 (ausente)	86.80±3.06	(°)	* , ‡ , ¶	107.62±2.14	(°)	
1 (leve)	99.32±1.63	<b>&lt;0.001</b>	* , ¥	113.66±2.21	<b>0.114</b>	
2 (moder.)	102.69±2.19		‡	115.03±2.78		
3 (intensa)	110.73±2.11		¶ , ¥	118.00±2.49		
<b>-Multivesicular</b>						
ausente	93.07±3.24	<b>0.013</b>		110.04±2.05	<b>0.105</b>	
presente	102.17±1.25			115.01±1.55		
<b>BALONIZACIÓN</b>						
ausente	98.41±1.44	<b>0.033</b>		113.14±1.34	<b>0.270</b>	
presente	105.64±2.94			116.74±3.67		
<b>INFLAMACIÓN</b>						
<b>-Lobulillar</b>						
ausente	91.97±2.58	<b>&lt;0.001</b>		110.47±1.99	<b>0.105</b>	
presente	102.90±1.36			115.16±1.60		
<b>-Portal</b>						
ausente	101.23±3.20	<b>0.568</b>		111.19±2.23	<b>0.311</b>	
presente	99.34±1.45			114.51±1.51		

Vis: visceral; Sub: subcutánea; (°°) test *t* de Student ; (°) test ANOVA1. Bonf.: prueba de Bonferroni. Los valores expresados corresponden a media ± error estándar.

[GBvis: \* entre grados de esteatosis 0 y 1, p<0.001; ‡ entre grados 0 y 2, p<0.001; ¶ entre grados 0 y 3, p<0.001); ¥ entre grados 1 y 3, p<0.05]

**Tabla-12.- Comparación del diámetro adipocitario en GBvis y GBsub en las diferentes lesiones histológicas hepáticas.**

Est. de fibrosis	N° DE ADIPOCITOS						DIÁMETRO DE ADIPOCITOS				
	GBvis	Valor p <sup>(°)</sup>	Bo.	GBsub	Valor p <sup>(°)</sup>	Bo.	GBvis	Valor p <sup>(°)</sup>	Bo.	GBsub	Valor p <sup>(°)</sup>
Est. 0	139.29±465	<b>&lt;0.001</b>	*,#,¶	100.89±2.51	<b>0.010</b>	Ω	89.95±2.95	<b>&lt;0.001</b>	*,#,¶	109.43±2.22	0.319
Est. 1A+B	105.26±4.33		*,α, Ø	88.91±5.07		108.49±3.8	*		111.75±3.88		
Est. 1C	125.85±3.03		#,α	96.97±2.17		98.90±1.86	#		115.81±2.17		
Est. 2+3(°)	111.29±2.97		¶,Ø	90.28±2.10		104.01±2.2	¶		114.85±2.46		

Vis: visceral; Sub: subcutánea; Est.: Estadio; (°) test ANOVA1; Bo.: prueba de Bonferroni. Los valores expresados corresponden a media±error estándar; (°) Se han considerado juntos debido al escaso n° de casos en estadio 3.

[N° adipocitos GBvis: \* entre Estadios de fibrosis 0 y 1A+B, p<0.001; # entre 0 y 1C, p<0.05; ¶ entre 0 y 2+3, p<0.001; α entre 1A+B y 1C, p<0.05; Ø entre 1A+B y 2+3, p<0.05]

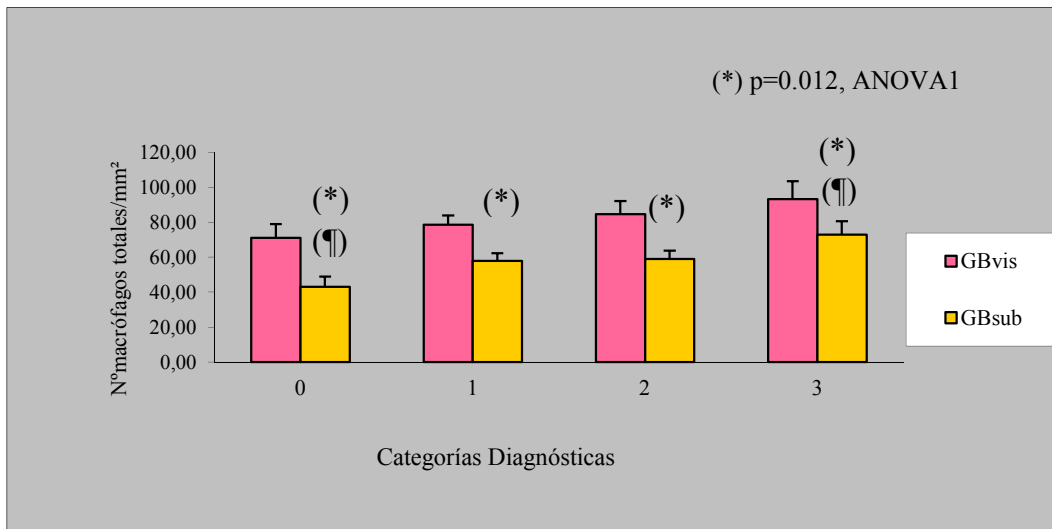
[N° adipocitos GBsub: Ω entre 0 y 2+3, p<0.05]

[Diámetro adipocitos GBvis: \* entre Estadios de fibrosis 0 y 1A+B, p<0.001; # entre 0 y 1C, p<0.05; ¶ entre 0 y 2+3, p<0.001]

**Tabla-13.- Comparación del n° de adipocitos y su diámetro en GBvis y GBsub en los diferentes Estadios de fibrosis de las biopsias hepáticas.**

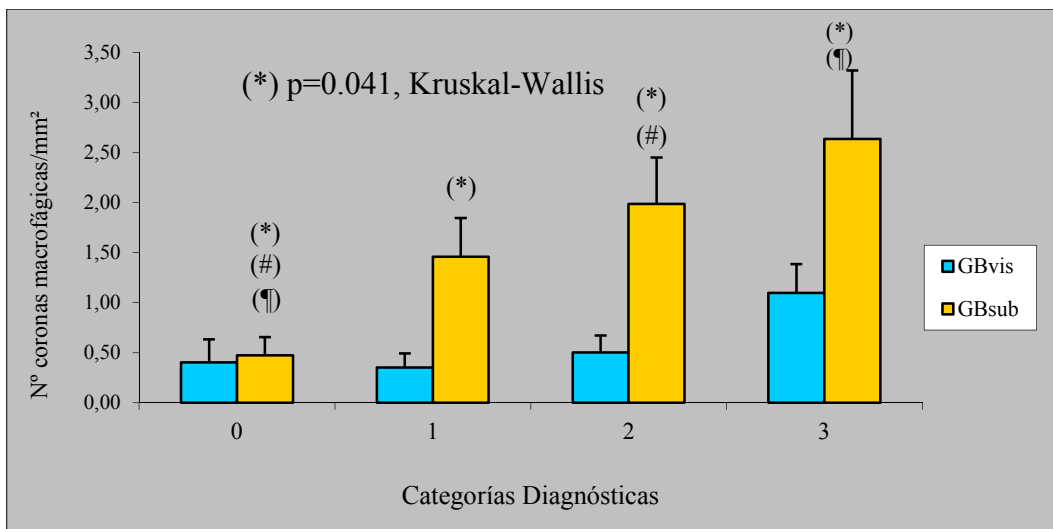
Al considerar el n° de macrófagos totales en las diferentes Categorías Diagnósticas, no ha habido diferencias estadísticamente significativas en GBvis, pero sí en GBsub (p=0,012, ANOVA1). Estas diferencias se establecen entre las Categorías 0 y la 3 (p=0.007, Bonferroni) (Gráfica-21A). Algo similar sucede con las coronas macrofágicas en GBsub (p=0.041, Kruskal-Wallis), es decir, conforme aumentan las Categorías Diagnósticas lesionales, el número de coronas macrofágicas aumenta. Las diferencias se establecen entre las Categorías 0 y 2 (p=0.025) y entre 0 y 3 (p=0.006) (U de Mann-Whitney) (Gráfica 21B).

No hay diferencias en el n° de macrófagos totales ni en el n° de coronas macrofágicas en las subcategorías de EHNA-BORD.



[GBsub: ¶ entre Categorías 0 y 3, p=0.007, Bonferroni]

**Gráfica-21A.-Cuantificación de macrófagos totales en GBvis y GBsub en las Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas**



[GBsub: # entre Categorías 0 y 2, p=0.025; ¶ entre 0 y 3, p=0.006, U de Mann-Whitney]

**Gráfica-21B.-Cuantificación de coronas macrofágicas en GBvis y GBsub en las Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas.**



Si comparamos el n° de macrófagos totales en la GB con las diferentes lesiones histológicas hepáticas evaluadas, se aprecia incremento en GBsub con el aumento de esteatosis y con la presencia de todas las lesiones hepáticas, excepto con la inflamación portal y en GBvis sólo con la balonización. Las diferencias en el caso de la esteatosis se establecieron entre los grados 0 y 2 ( $p=0.020$ , Bonferroni) (Tabla-14).

En relación a las coronas macrofágicas, hay asociación significativa con la esteatosis y la balonización en GBvis ( $p=0.038$  y  $p=0.036$ , respectivamente, Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney). Las diferencias en el caso de la esteatosis se establecen entre los grados 1 y 3 ( $p=0.006$ , U de Mann-Whitney). En GBsub ocurre con el aumento de todas las lesiones, excepto con la inflamación portal y con valores próximos a la significación en el caso de la esteatosis (Tabla-14).

Existe asociación significativa entre el n° de macrófagos y el de coronas macrofágicas, pero solo en GBsub, con los Estadios de fibrosis de Kleiner ( $p=0.027$  y  $p=0.002$ , respectivamente, ANOVA1 y Kruskal-Wallis), cuyas diferencias se establecen entre los estadios 0 y 2+3 ( $p=0.044$ , Bonferroni) en el primer caso, mientras que en el segundo suceden entre los estadios 0 y 2+3 y entre 1C y 2+3 ( $p=0.001$  y  $p=0.002$ , respectivamente, U de Mann-Whitney) (Tabla-15).

No se han obtenido diferencias en las concentraciones de ARNm de CD68 y de CD11c respecto a las Categorías Diagnósticas ni a los Estadios de fibrosis.

Se ha observado relación directa entre el grado de esteatosis y la concentración de ARNm de CD11c en GBvis ( $p=0.049$ , ANOVA1), estableciéndose las diferencias entre los grados 0 y 3 y entre 2 y 3 ( $p=0.045$  y  $p=0.011$ , respectivamente, Bonferroni). En GBsub la presencia de inflamación lobulillar se relaciona con mayor concentración de ARNm de CD11c ( $2.33\pm 0.40$  vs  $7.26\pm 2.29$ ,  $p=0.041$ ,  $t$  de Student).

Al considerar los valores de las adipo-citoquinas determinadas, no se han obtenido diferencias significativas en las diversas Categorías Diagnósticas.

Lesiones histológicas	N° DE MACRÓFAGOS TOTALES				N° DE CORONAS MACROFÁGICAS			
	GBvis	Valor p <sup>(oo)</sup>	GBsub	Valor p <sup>(oo)</sup>	GBvis	Valor p <sup>(*)</sup>	GBsub	Valor p <sup>(*)</sup>
<b>ESTEATOSIS</b>								
-Grado		(°)		(°)		(l)		(l)
0 (ausente)	71.12±7.77	0.341	43.04±5.90	<b>0.025</b> (Φ)	0.40±0.23	<b>0.038</b> (§)	0.47±0.18	<b>0.052</b>
1 (leve)	80.89±5.37		56.97±3.80		0.30±0.12		1.52±0.35	
2 (moder.)	81.86±5.07		69.03±4.64		0.64±0.23		2.01±0.54	
3 (intensa)	93.69±11.96		62.96±7.96		1.05±0.26		2.59±0.66	
-Multivesicular		0.157		<b>0.023</b>		0.693		<b>0.029</b>
ausente	72.08±6.33		46.84±5.27		0.51±0.22		1.03±0.59	
presente	85.36±4.47	62.33±3.15	0.58±0.11	1.90±0.27				
<b>BALONIZACIÓN</b>								
ausente	77.61±4.05	<b>0.043</b>	54.74±2.98	<b>0.012</b>	0.42±0.11	<b>0.036</b>	1.39±0.26	0.021
presente	94.41±8.19		70.21±5.93		0.91±0.23		2.5±0.54	
<b>INFLAMACIÓN</b>								
-Lobulillar		0.445		<b>0.007</b>		0.442		<b>0.007</b>
ausente	76.53±5.39		44.11±5.28		0.40±0.20		0.46±0.16	
presente	84.00±4.51	62.81±3.10	0.61±0.12	2.03±0.30				
-Portal		0.429		0.087		0.971		0.236
ausente	75.05±8.00		47.73±5.88		0.54±0.27		1.41±0.80	
presente	83.81±4.22	61.08±3.07	0.57±0.11	1.76±0.25				

Vis: visceral; Sub: subcutánea; (oo) test *t* de Student ; (°) test ANOVA1; (\*) test U de Mann-Whitney; (l) test Kruskal-Wallis.

Los valores expresados corresponden a media ± error estándar.

[N° macrófagos GBsub:(Φ), diferencias entre los grados 0 y 2, p=0.020, Bonferroni]

[N° coronas GBvis: (§), diferencias entre los grados 0 y 3, p=0.006, U de Mann-Whitney]

**Tabla-14.- Cuantificación de macrófagos totales y de coronas macrofágicas en GBvis y GBsub en las diferentes lesiones histológicas hepáticas.**

Estadios de fibrosis	N° DE MACRÓFAGOS TOTALES				N° DE CORONAS MACROFÁGICAS			
	GBvis	Valor p <sup>(oo)</sup>	GBsub	Valor p <sup>(oo)</sup>	GBvis	Valor p <sup>(o)</sup>	GBsub	Valor p <sup>(o)</sup>
Est. 0	84.08±6.17	0.121	49.60±5.30	<b>0.027</b> (§)	0.40±0.20	0.610	0.61±0.21	<b>0.002</b> (Ω,¶)
Est. 1A+B	82.66±12.35		58.65±9.75		0.60±0.29		2.42±1.61	
Est. 1C	72.12±4.56		54.33±3.82		0.45±0.14		1.14±0.30	
Est. 2+3 <sup>(o)</sup>	93.45±8.46		70.52±5.53		0.78±0.21		2.84±0.46	

Vis: visceral; Sub: subcutánea; Est.: Estadio; <sup>(oo)</sup> test ANOVA1. <sup>(o)</sup> test Kruskal-Wallis. Los valores expresados corresponden a media±error estándar. <sup>(o)</sup> Se han considerado juntos debido al escaso n° de casos en estadio 3.

[N° macrófagos GBsub: (§) entre estadios 0 y 2+3, p=0.044, Bonferroni]

[N° coronas GBsub: (Ω) entre estadios 0 y 2+3, p=0.001; (¶) entre 1C y 2+3, p=0.002, U de Mann-Whitney]

**Tabla-15.-Cuantificación de macrófagos totales y coronas macrofágicas en grasa blanca en los diferentes Estadios de fibrosis de las biopsias hepáticas.**

Si comparamos los valores de adipo-citoquinas en la GB en ambas localizaciones con las diferentes lesiones histológicas hepáticas evaluadas, observamos que en GBsub leptina y adiponectina disminuyen cuando existe inflamación lobulillar (29.69±2.94 vs 22.29±1.82, p=0.027; 105.52±8.49 vs 79.01±5.23, p=0.006, respectivamente, *t* de Student). Respecto a IL6, tienden a aumentar cuando existe inflamación lobulillar, aunque con valores próximos a la significación (8.33±1.68 vs 13.89±2.30, p=0.058, *t* de Student). No se observa relación con el resto de lesiones hepáticas.

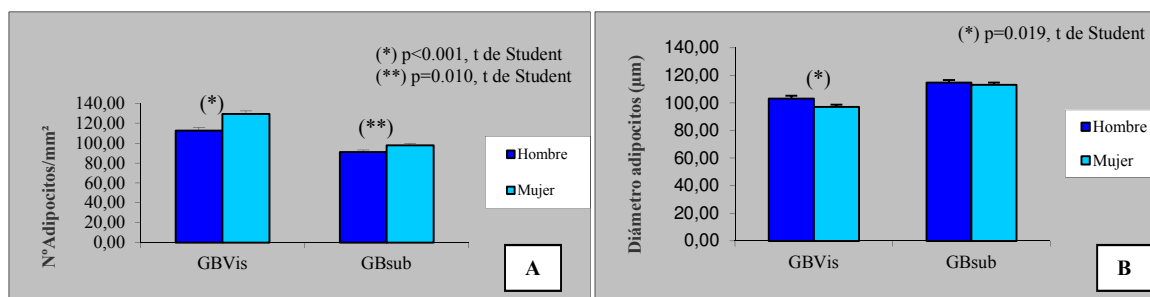
Respecto a los Estadios de fibrosis de Kleiner, la adiponectina en GBsub disminuye a medida que se incrementa el Estadio de fibrosis (estadio 0: 112.09±11.04, estadio 1A+B: 72.12±8.96, estadio 1C: 80.06±6.48, estadio 2+3: 86.89±9.53, p=0.029, ANOVA1), debiéndose las diferencias a la comparación entre los estadios 0 y 1C (p=0.049, Bonferroni).

## 4.5 Correlaciones clínico-patológicas

### 4.5.1 Con parámetros topográficos y morfológicos de la grasa

No hay relación entre el nº de adipocitos/mm<sup>2</sup> y la edad del paciente, ni cuando se considera agrupada por décadas; lo mismo ocurre cuando se determina su diámetro.

Si se separan los pacientes por sexos, el número de adipocitos, tanto en GBvis como en GBsub, ha sido menor en hombres que en mujeres (GBvis: 112.82±2.71 vs 129.55±2.70; GBsub: 91.08±2.01 vs 97.99±1.68; p<0,001 y p=0,010, respectivamente, *t* de Student) (Gráfica-22A); lo contrario sucede cuando se considera el diámetro adipocitario, pero solo es significativo para la GBvis (103.34±1.87 vs 97.12±1.76, p=0.019, *t* de Student) (Gráfica 22B).



Gráfica-22.-Cuantificación (A) y diámetro (B) adipocitario en GBvis y GBsub según el sexo de los pacientes.

El nº de adipocitos ha sido significativamente menor en GBvis cuando los pacientes presentaban SM, DM-2, HTA y valores alterados de HOMA-IR, TG, GOT, GPT y GGT; en el caso de la GBsub también han sido menores cuando presentaban SM, HTA y valores alterados de HOMA-IR, TG y GGT, con valores próximos a la significación para HDLc (Tabla-16).

Por el contrario, el diámetro medio adipocitario ha sido significativamente mayor en GBvis cuando los pacientes tenían SM, DM-2 y valores alterados de HOMA-IR, TG y GGT. Igualmente ha sido mayor en GBsub al presentar SM y cuando estaban alterados HOMA-IR, HDLc, TG y GGT (Tabla-16).

En GBvis, el nº de adipocitos se ha correlacionado de manera inversa y débil con parámetros antropométricos, TG, GOT, GPT y GGT. En GBsub sólo ha existido una correlación débil e inversa con IMC, PC, HOMA-IR, TG y GGT. En ambas localizaciones la correlación ha sido directa con HDLc (Tabla-17).

El diámetro adipocitario se ha correlacionado de manera directa y débil con PC e ICC, así como con TG, GPT y GGT en GBvis. En GBsub la correlación ha sido directa y débil con HOMA-IR, TG y GGT e inversa y débil con HDLc (Tabla-17).

No existe correlación entre el número total de macrófagos ni el de coronas macrofágicas tanto en GBvis como en GBsub, con la edad de los pacientes; tampoco se aprecian diferencias al considerarla separada por décadas.

Parámetros metab- y bioq's		N° DE ADIPOCITOS				DIÁMETRO DE ADIPOCITOS			
		GBvis	Valor p(°)	GBsub	Valor p(°)	GBvis	Valor p(°)	GBsub	Valor p(°)
SM	A	133.00±4.03	<b>&lt;0.001</b>	103.42±2.04	<b>0.014</b>	94.92±1.65	<b>0.001</b>	110.16±2.28	<b>0.019</b>
	P	113.42±2.85		94.73±2.64		103.87±2.10		117.79±2.17	
DM-2	A	125.74±3.30	<b>0.042</b>	100.55±1.98	0.100	97.61±1.49	<b>0.032</b>	112.22±1.85	0.070
	P	114.24±3.81		94.17±3.63		104.80±3.41		119.11±3.26	
HTA	A	129.11±4.14	<b>0.009</b>	102.47±2.21	<b>0.030</b>	97.04±1.96	0.086	111.96±2.10	0.199
	P	115.64±2.97		94.77±2.68		101.99±2.04		116.21±2.55	
HOMA-IR	N	129.43±3.78	<b>0.003</b>	100.19±2.07	<b>0.004</b>	97.00±2.37	<b>0.026</b>	111.27±2.11	<b>0.021</b>
	Alt	114.42±3.11		91.58±2.07		104.31±1.81		118.97±2.42	
LDLc (mg/dl)	N	121.54±2.37	0.296	94.79±1.45	0.509	99.67±1.47	0.936	113.82±1.55	0.963
	Alt	126.24±4.01		96.70±2.82		99.91±2.97		113.95±2.37	
HDLc (mg/dl)	N	128.96±6.09	0.215	101.46±3.88	0.051	99.97±3.32	0.945	107.28±3.16	<b>0.040</b>
	Alt	121.71±2.15		94.17±1.38		99.69±1.44		114.92±1.38	
TG (mg/dl)	N	128.27±2.72	<b>&lt;0.001</b>	99.72±1.70	<b>&lt;0.001</b>	97.53±1.66	<b>0.017</b>	110.65±1.56	<b>0.001</b>
	Alt	112.52±2.40		87.06±1.56		104.13±1.95		119.54±1.95	
GOT (U/l)	N	125.85±2.33	<b>0.008</b>	95.53±1.44	0.757	98.10±1.58	0.060	113.35±1.39	0.709
	Alt	112.61±4.00		94.52±3.27		103.65±2.34		114.42±2.93	
GPT (U/l)	N	126.89±2.46	<b>0.003</b>	96.42±1.62	0.186	98.26±1.60	0.125	114.10±1.41	0.796
	Alt	113.91±3.39		92.67±2.25		102.53±2.26		113.40±2.61	
GGT (U/l)	N	125.11±2.19	<b>0.004</b>	96.27±1.38	<b>0.044</b>	98.00±1.41	<b>0.003</b>	112.39±1.29	<b>0.018</b>
	Alt	107.99±4.58		88.47±3.92		108.05±2.80		120.22±3.80	

Metab.: metabólicos; (°) test *t* de Student; A: ausente; P: presente; N: valor normal; Alt: valor alterado. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

**Tabla-16.- Comparación del n° de adipocitos de grasa blanca y su diámetro con los parámetros metabólico-bioquímicos.**

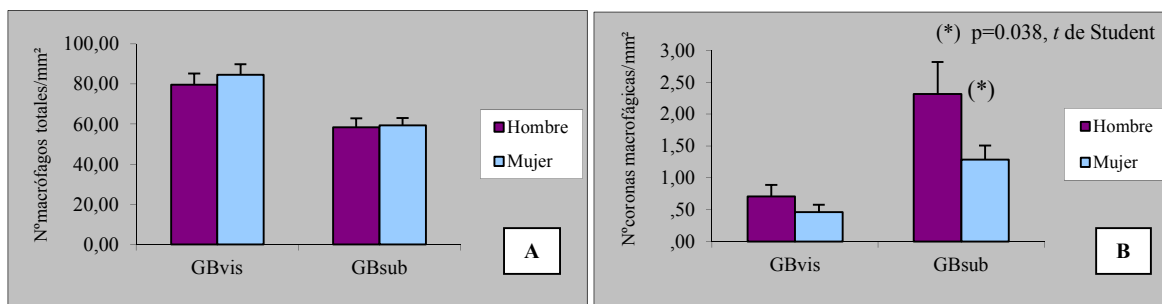
Parámetros antropométricos y bioquímicos	N° DE ADIPOCITOS				DIÁMETRO DE ADIPOCITOS			
	GBvis		GBsub		GBvis		GBsub	
	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0.241	0.002	-0.281	<0.001	0.197	0.059	0.210	0.052
PC (cm)	-0.394	<0.001	-0.246	0.003	0.320	0.004	0.146	0.223
ICC	-0.330	<0.001	-0.140	0.105	0.352	0.002	0.051	0.677
HOMA-IR	-0.199	0.035	-0.322	0.001	0.155	0.225	0.285	0.028
LDLc (mg/dl)	0.087	0.274	0.031	0.698	0.080	0.447	0.003	0.982
HDLc (mg/dl)	0.220	0.005	0.261	0.001	-0.123	0.239	-0.219	0.043
TG (mg/dl)	-0.321	<0.001	-0.356	<0.001	0.370	<0.001	0.350	0.001
GOT (U/l)	-0.223	0.005	-0.026	0.752	0.156	0.138	0.068	0.536
GPT (U/l)	-0.362	<0.001	-0.146	0.068	0.212	0.041	-0.053	0.629
GGT (U/l)	-0.367	<0.001	-0.273	0.001	0.370	<0.001	0.222	0.040

(°) coeficiente de correlación de Pearson.

**Tabla-17.- Correlación entre el n° de adipocitos de grasa blanca y su diámetro con los parámetros antropométricos y bioquímicos.**

No se han observado diferencias en el n° total de macrófagos entre varones y mujeres, tanto en grasa visceral como en la subcutánea (GBvis: 79.70±5.75 vs 84.74±5.19; GBsub 58.52±4.44 vs 59.45±3.06) (Gráfica-23A). En el caso de las coronas macrofágicas, los varones tienen recuentos macrofágicos totales mayores que las mujeres, pero con

diferencias significativas solo en GSub (GBvis:  $0.71 \pm 0.18$  vs  $0.46 \pm 0.12$ ; GSub  $2.32 \pm 0.50$  vs  $1.29 \pm 0.22$ ;  $p=0.253$  y  $p=0.038$ , respectivamente, *t* de Student) (Gráfica-23B).



**Gráfica-23.- Cuantificación de macrófagos totales (A) y coronas macrofágicas (B) en grasa blanca según el sexo.**

No hay diferencias en el n° total de macrófagos cuando se comparan los parámetros bioquímicos normales con los alterados, excepto para la HDLc en GSub que cuando está alterada, el n° total de macrófagos es menor ( $p=0.049$ , *t* de Student) (Tabla-18).

El número de coronas macrofágicas ha sido superior en GBvis si HOMA-IR, los TG y GGT estaban alterados ( $p=0.022$ ,  $p=0.019$ , respectivamente, *t* de Student y  $p=0.039$ , U de Mann-Whitney); en GSub sólo sucede cuando los TG están alterados ( $p=0.044$ , *t* de Student) (Tabla-18).

Se han observado correlaciones escasas y débiles entre el n° de macrófagos o de coronas macrofágicas por  $\text{mm}^2$  y diversos parámetros antropométricos-bioquímicos, como ocurre con el IMC en GSub. Además el n° de coronas macrofágicas en GSub también se han correlacionado con el PC de forma débil (Tabla-19).

Por otra parte, el número de coronas macrofágicas en GBvis ha presentado una correlación débil y directa con TG y GGT y en GSub con HDLc de manera inversa y débil (Tabla-19).



Parámetros metab.- y bioq <sup>o</sup> s		N° DE MACRÓFAGOS TOTALES				N° DE CORONAS MACROFÁGICAS			
		GBvis	Valor p (°)	GBsub	Valor p (°)	GBvis	Valor p (°)	GBsub	Valor p (°)
SM	A	79.93±6.14	0.232	57.59±5.01	0.246	0.41±0.14	0.286	0.93±0.31	0.082
	P	91.41±6.99		65.67±4.70		0.67±0.19		1.92±0.44	
DM-2	A	83.14±5.63	0.328	58.82±3.90	0.155	0.42±0.12	0.151 (*)	1.24±0.30	0.212 (*)
	P	93.28±8.84		69.49±6.85		0.87±0.27		2.03±0.64	
HTA	A	79.10±5.13	0.143	56.75±4.91	0.124	0.47±0.15	0.464	1.39±0.39	0.760
	P	93.06±7.80		67.34±4.73		0.64±0.19		1.57±0.42	
HOMA-IR	N	86.45±4.59	0.820	61.35±3.80	0.783	0.39±0.12	<b>0.022</b>	1.55±0.37	0.242
	Alt	84.41±8.56		59.52±5.77		0.93±0.22		2.23±0.45	
LDLc (mg/dl)	N	81.56±4.17	0.576	59.69±3.23	0.625	0.54±0.11	0.894 (*)	1.69±0.29	0.290 (*)
	Alt	87.18±9.93		56.09±5.42		0.54±0.23		1.88±0.44	
HDLc (mg/dl)	N	102.58±22.69	0.232	37.37±5.80	<b>0.049</b>	0.00±0.00	0.136 (*)	0.80±0.55	0.379 (*)
	Alt	81.56±3.83		60.46±2.89		0.60±0.11		1.76±0.26	
TG (mg/dl)	N	78.19±4.46	0.189	55.70±3.39	0.173	0.36±0.11	<b>0.019</b>	1.27±0.25	<b>0.044</b>
	Alt	88.30±6.50		63.37±4.60		0.84±0.18		2.26±0.45	
GOT (U/l)	N	82.28±4.13	0.971	58.92±3.25	0.919	0.60±0.13	0.610	1.72±0.28	0.979
	Alt	81.98±8.26		58.30±5.58		0.49±0.16		1.78±0.55	
GPT (U/l)	N	78.74±3.62	0.260	56.04±3.22	0.222	0.48±0.13	0.333	1.47±0.28	0.268
	Alt	87.40±7.24		62.93±4.81		0.68±0.17		2.02±0.43	
GGT (U/l)	N	81.18±3.87	0.393	58.95±2.72	0.916	0.45±0.95	<b>0.035</b> (*)	1.80±0.28	0.521 (*)
	Alt	90.12±12.61		59.78±10.78		1.21±0.37		1.18±0.46	

Metab.: metabólicos; (°) test *t* de Student; (\*) test U de Mann-Whitney; A: ausente; P: presente; N: valor normal; Alt: valor alterado. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

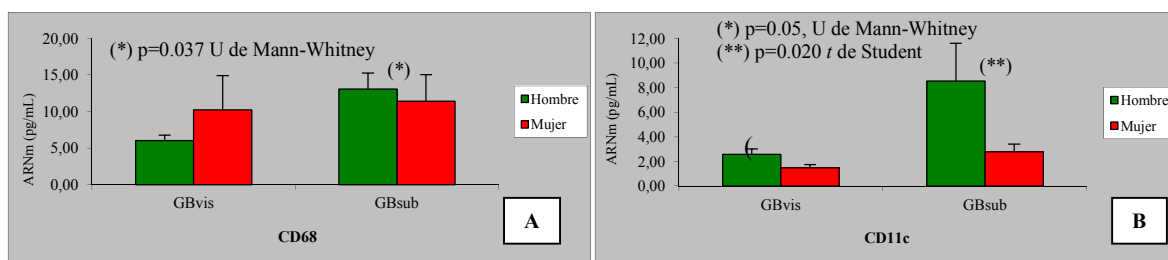
**Tabla-18.- Comparación del n° de macrófagos totales y de coronas macrofágicas en grasa blanca con los parámetros metabólico-bioquímicos.**

Parámetros antropométricos y bioquímicos	N° DE MACRÓFAGOS TOTALES				N° DE CORONAS MACROFÁGICAS			
	GBvis		GBsub		GBvis		GBsub	
	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0.054	0.593	<b>0.260</b>	<b>0.009</b>	0.104	0.300	<b>0.220</b>	<b>0.027</b>
PC (cm)	-0.080	0.476	0.175	0.118	0.205	0.063	<b>0.233</b>	<b>0.035</b>
ICC	-0.180	0.112	-0.103	0.368	-0.026	0.822	0.110	0.333
HOMA-IR	-0.032	0.774	-0.133	0.231	0.091	0.411	0.069	0.535
LDLc (mg/dl)	0.034	0.734	-0.083	0.416	-0.050	0.620	0.072	0.479
HDLc (mg/dl)	-0.064	0.524	-0.192	0.056	-0.178	0.074	<b>-0.236</b>	<b>0.018</b>
TG (mg/dl)	0.183	0.066	0.116	0.250	<b>0.312</b>	<b>0.001</b>	0.071	0.478
GOT (U/l)	0.073	0.475	0.096	0.347	0.030	0.767	-0.020	0.841
GPT (U/l)	0.049	0.626	0.044	0.663	0.034	0.734	0.112	0.264
GGT (U/l)	-0.039	0.696	-0.057	0.574	<b>0.226</b>	<b>0.022</b>	0.014	0.891

(°) coeficiente de correlación de Pearson.

**Tabla-19.- Correlación entre el n° de macrófagos totales y el de coronas macrofágicas en grasa blanca con los parámetros antropométricos y bioquímicos.**

La concentración de ARNm de CD68 y CD11c en GBvis y GBsub no se correlaciona con la edad de los pacientes, ni al considerarla separada por décadas. En el caso del sexo, los valores de CD68 en GBsub son más altos en hombres (13.11±2.16 vs 11.42±3.63, p=0.037, U de Mann-Whitney) (Gráfica-24A); los valores de ARNm de CD11c son más altos en hombres tanto en GBvis como en GBsub (GBvis: 2.57±0.46 vs 1.50±0.26, p=0.05, U de Mann-Whitney; GBsub: 8.55±3.06 vs 2.79±0.63, p=0.020, *t* de Student) (Gráfica-24B).



**Gráfica-24.-Concentración de ARNm de CD68 (A) y CD11c (B) en GBvis y GBsub según el sexo.**

La concentración de ARNm de CD68 en GBsub era mayor cuando los pacientes presentaban valores alterados de HOMA-IR, TG y GPT ( $p=0.017$ ,  $p=0.021$  y  $p=0.046$ , respectivamente, U de Mann-Whitney) (Tabla-20).

La concentración de ARNm de CD11c ha sido superior en GBvis con valores próximos a la significación, cuando los TG estaban alterados ( $p=0.083$ , U de Mann-Whitney) y en GBsub cuando HDLc, TG, GPT y GOT estaban alterados, este último con valores próximos a la significación ( $p=0.013$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.003$  y  $p=0.062$ , respectivamente, U de Mann-Whitney) (Tabla-20).

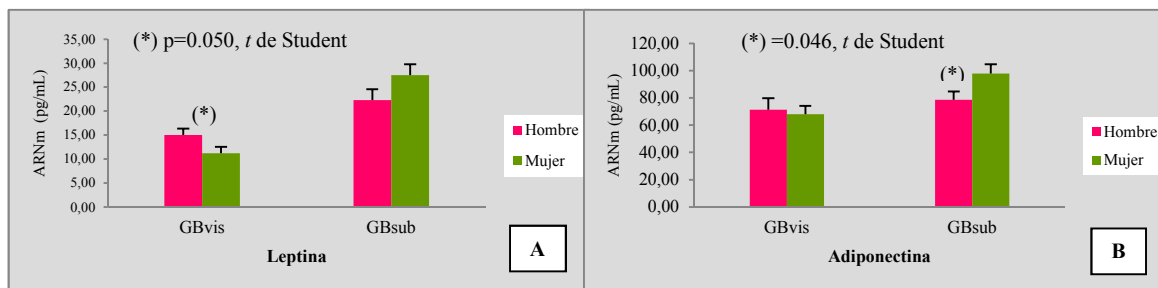
Existe correlación débil y directa entre la concentración de ARNm CD68 en GBvis con HDLc ( $r=0.292$ ,  $r=0.025$ , coeficiente de correlación de Pearson).

En el caso de la concentración de ARNm de CD11c, en GBvis, ha existido correlación directa y débil con el PC ( $r=0.297$ ,  $p=0.047$ , coeficiente de correlación de Pearson) y en GBsub con el IMC, con el PC de forma moderada y con GPT ( $r=0.396$ ,  $p=0.003$ ;  $r=0.429$ ,  $p=0.002$ ;  $r=0.360$ ,  $p=0.008$ , respectivamente, coeficiente de correlación de Pearson).

No existe relación entre edad (tanto promedio como separada por décadas) y las determinaciones de las adipo-citoquinas estudiadas.

En cuanto al sexo, únicamente se han encontrado diferencias significativas en los valores de ARNm de leptina en GBvis, que son superiores en el hombre ( $15.04 \pm 1.33$  vs

11.18±1.359;  $p=0.050$ ,  $t$  de Student) y en los de adiponectina en GBsub, que son superiores en la mujer (97.91±6.87 vs 78.58±6.19;  $p=0.046$ ,  $t$  de Student) (Gráfica-25A y B).



**Gráfica-25.-Concentración de ARNm de algunas adipoquinas (A: leptina, B: adiponectina) en grasa blanca según el sexo del paciente.**

La concentración de ARNm de leptina en grasa visceral aumenta si está alterado el índice HOMA-IR ( $p=0.026$ ,  $t$  de Student); sin embargo en grasa subcutánea disminuye si GPT está por encima de su valor normal ( $p=0.040$ ,  $t$  de Student) (Tabla-20).

La concentración de ARNm de adiponectina en GBvis tiende a disminuir en los pacientes que presentan SM y DM-2, con valores próximos a la significación ( $p=0.069$  y  $p=0.098$ , respectivamente,  $t$  de Student); lo mismo ocurre si GGT está alterada, aunque también con valores próximos a la significación ( $p=0.067$ ,  $t$  de Student) (Tabla-20).

		CD68				CD11c			
Parámetros metab.-bioq's		GBvis	Valor p(*)	GBsub	Valor p(*)	GBvis	Valor p(*)	GBsub	Valor p(°)
HOMA-IR	N	5.44±0.55	0.297	7.27±0.87	<b>0.017</b>	1.38±0.30	0.198	2.82±0.62	0.221
	A	8.14±1.74		16.01±3.64		2.64±0.71		9.86±4.55	
HDLc (mg/dl)	N	23.28±16.56	0.448	19.34±11.69	0.939	1.62±0.61	0.475	1.34±0.26	<b>0.013</b>
	A	5.62±0.49		10.84±1.36		2.04±0.29		6.23±1.74	
TG (mg/dl)	N	9.07±3.76	0.330	10.85±2.80	<b>0.021</b>	1.68±0.25	0.083	3.05±0.58	<b>0.001</b>
	A	6.72±1.08		15.30±3.09		2.80±0.65		12.63±5.38	
GOT (U/l)	N	9.17±3.37	0.845	12.52±2.70	0.414	1.94±0.28	0.898	5.27±1.77	0.062
	A	5.50±0.91		10.97±2.03		2.07±0.64		5.94±1.69	
GPT (U/l)	N	8.82±3.60	0.222	10.86±2.67	<b>0.046</b>	1.81±0.26	0.650	2.84±0.43	<b>0.003</b>
	A	7.06±1.19		15.81±3.49		2.40±0.66		12.52±5.07	
GGT (U/l)	N	8.74±3.03	0.768	12.95±2.51	0.374	1.78±0.25	0.142	5.66±1.68	0.674
	A	5.94±1.21		7.87±1.42		3.12±0.95		3.71±1.31	
		LEPTINA				ADIPONECTINA			
HOMA-IR	N	11.72±1.48	<b>0.026</b>	27.39±2.80	0.584	84.42±11.11	0.268	100.53±7.98	0.356
	A	17.23±1.92		24.84±3.77		69.22±6.36		87.96±11.23	
TG (mg/dl)	N	12.13±1.22	0.294	24.65±1.75	0.616	74.93±6.85	0.132	91.30±5.12	0.574
	A	14.32±1.63		26.45±3.67		58.86±5.80		85.38±10.77	
GOT (U/l)	N	12.02±1.17	0.155	26.05±1.97	0.287	68.58±6.48	0.920	91.74±5.58	0.227
	A	15.23±1.83		21.81±2.90		69.73±6.50		77.83±9.22	
GPT (U/l)	N	11.80±1.23	0.125	27.46±2.04	<b>0.040</b>	70.42±6.93	0.813	94.20±6.01	0.145
	A	14.99±1.56		20.20±2.48		67.88±6.06		78.93±7.68	
GGT (U/l)	N	12.65±1.12	0.668	26.48±1.83	0.102	74.20±5.92	0.067	92.43±5.60	0.197
	A	13.70±2.00		19.52±3.45		51.41±6.66		76.24±7.73	

Metab.: metabólicos; (\*) test U de Mann-Whitney; (°) test *t* de Student; N: valor normal; A: valor alterado.

Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

**Tabla-20.- Comparación de la concentración de ARNm de CD68, CD11c, leptina y adiponectina en grasa blanca con algunos parámetros metabólico-bioquímicos.**

La concentración de ARNm de leptina en GBvis se ha correlacionado de manera débil y directa con el PC, ICC, HOMA-IR y GPT. En GBsub sólo se ha correlacionado con GPT de forma inversa y débil (Tabla-21).

En el caso de adiponectina, en GBvis se ha correlacionado de forma inversa y débil con los TG y con GGT. En GBsub con HDLc de forma directa y débil (Tabla-21).

Parámetros metabólicos y bioquímicos	LEPTINA				ADIPONECTINA			
	GBvis		GBsub		GBvis		GBsub	
	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p	r (°)	Valor p
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0.020	0.872	0.092	0.448	-0.235	0.051	-0.142	0.236
PC (cm)	<b>0.270</b>	<b>0.036</b>	-0.065	0.614	-0.133	0.306	-0.246	0.052
ICC	<b>0.389</b>	<b>0.002</b>	-0.062	0.630	0.049	0.710	0.024	0.852
HOMA-IR	<b>0.314</b>	<b>0.043</b>	-0.116	0.451	-0.077	0.629	-0.104	0.503
LDLc (mg/dl)	0.140	0.250	0.077	0.524	-0.186	0.126	-0.023	0.849
HDLc (mg/dl)	-0.051	0.679	0.164	0.171	-0.112	0.360	0.219	0.067
TG (mg/dl)	0.079	0.521	0.012	0.923	<b>-0.274</b>	<b>0.023</b>	-0.035	0.771
GOT (U/l)	0.150	0.223	-0.164	0.174	-0.023	0.853	-0.153	0.206
GPT (U/l)	<b>0.240</b>	<b>0.040</b>	<b>-0.242</b>	<b>0.042</b>	-0.008	0.945	-0.204	0.088
GGT (U/l)	0.050	0.684	-0.224	0.060	<b>-0.300</b>	<b>0.012</b>	0.192	0.109

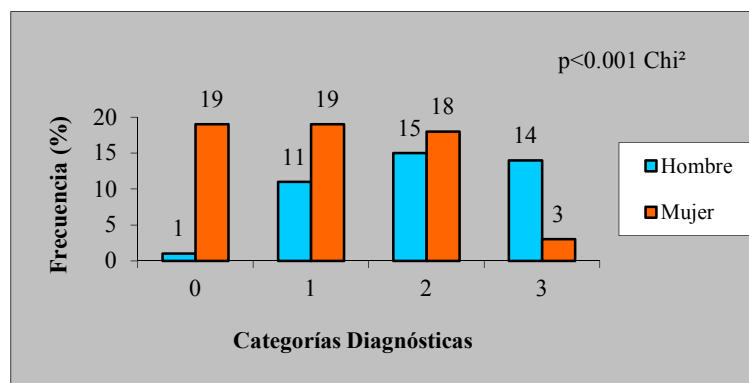
(°) coeficiente de correlación de Pearson.

**Tabla-21.- Correlación entre el ARNm de leptina y adiponectina de grasa blanca con los parámetros antropométricos y bioquímicos.**

#### 4.5.2 Con lesiones hepáticas

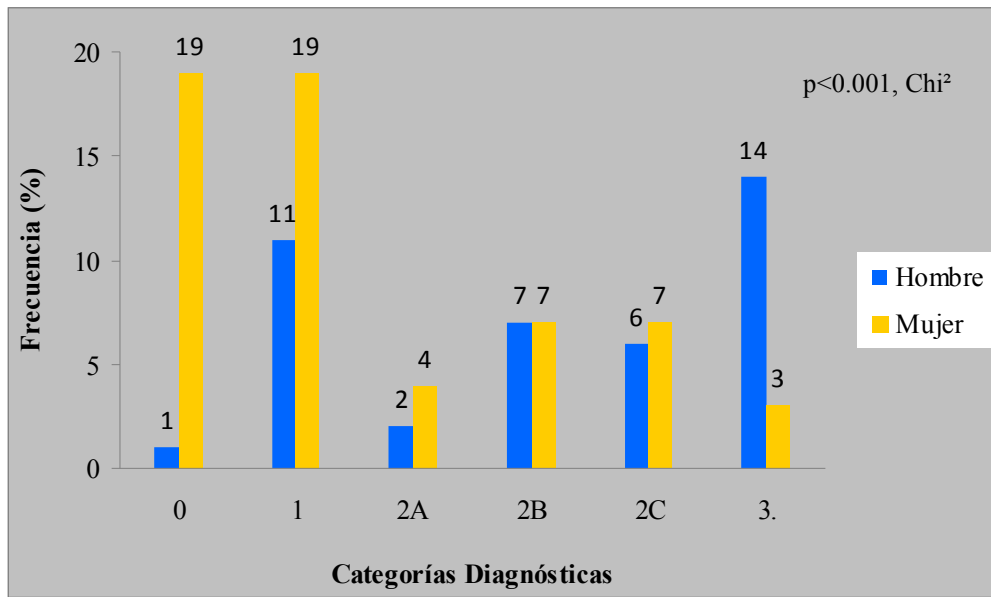
No ha habido asociación entre la edad (incluidas décadas) y las Categorías Diagnósticas ni el índice de actividad.

De los 33 pacientes diagnosticados de no-EHGNA, la mayoría son mujeres (31 casos), lo que corresponde a un 19% del total, y de los 26 casos diagnosticados de EHNA, la mayoría son varones (22 casos, 14%); las mujeres también muestran mayor porcentaje de casos con categoría 1 que los varones ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$ ) (Gráfica-26). Al considerar las 3 subcategorías establecidas en categoría 2 (EHNA-BORD) se parecía que hay doble porcentaje de mujeres que de hombres en la categoría 2A (Gráfica-27).



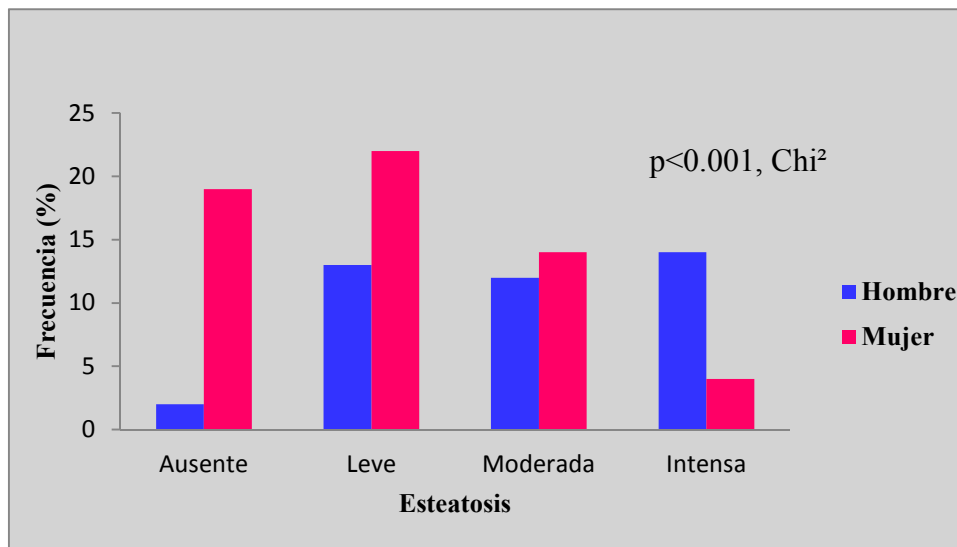
**Gráfica-26.-Categorías Diagnósticas histológicas hepáticas según el sexo de los pacientes.**

Existe relación entre todos los parámetros evaluados en las biopsias hepáticas y el sexo, con excepción de la inflamación portal; en general los casos que presentaron menos lesiones histológicas correspondían a mujeres, como sucede con la esteatosis, la balonización o la inflamación lobulillar (Gráficas-28 y 29).



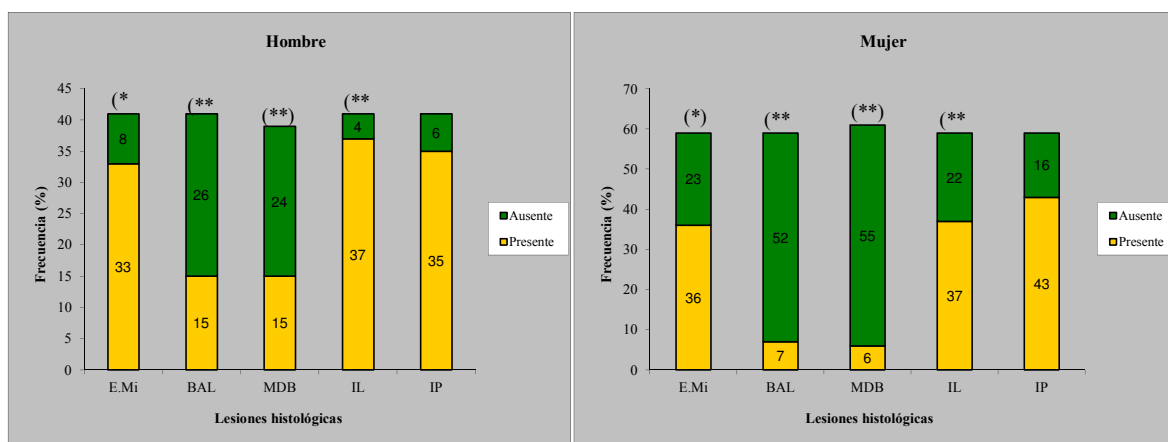
Gráfica-27.-Categorías Diagnósticas histológicas hepáticas con subdivisión de la categoría 2 según el sexo de los pacientes.

De las 50 biopsias que no presentaron esteatosis microvesicular, 37 correspondían a mujeres ( $p=0.011$ , Chi<sup>2</sup>). En los 24 casos en los que se observó hialina de Mallory, la mayoría, 17 casos fueron hombres ( $p < 0.001$ , Chi<sup>2</sup>) (Gráfica-29).



Gráfica 28- Grado de esteatosis hepática según el sexo del paciente.





(\*)  $p=0.011$ ,  $\chi^2$ ; (\*\*)  $p<0.001$ ,  $\chi^2$

E.Mi: esteatosis microvesicular. BAL: balonización. MDB: cuerpos de Mallory Denk o hialina de Mallory. IL: inflamación lobulillar. IP: inflamación portal.

#### Gráfica-29.- Lesiones histológicas hepáticas según el sexo de los pacientes.

Los valores medios de PC, ICC y HOMA-IR, así como los de casi todos los parámetros bioquímicos evaluados, excepto para la LDLc, aumentan conforme es más grave la Categoría Diagnóstica lesional (Tabla-22). Pero cuando consideramos las 3 subcategorías 2A, 2B y 2C, se aprecian valores de de HOMA-IR menores en 2A que en 2B y 2C ( $2.17\pm 0.77$  vs  $5.09\pm 0.57$  vs  $4.77\pm 0.57$ ,  $p=0.054$ , ANOVA1), estableciéndose las diferencias entre las Categorías 2A y 2B ( $p=0.054$ , Bonferroni). Los valores medios de LDLc son menores en la Categoría 2C que en 2A y 2B ( $96.90\pm 7.71$  vs  $148.11\pm 13.41$  vs  $112.50\pm 6.70$ ,  $p=0.002$ , ANOVA1); estas diferencias se encuentran entre las Categorías 2A y 2B y entre 2A y 2C ( $p=0.037$  y  $p=0.002$ , respectivamente, Bonferroni).

Los valores medios de PC, ICC y casi todos los parámetros bioquímicos evaluados excepto LDLc y GOT, aumentan a medida que lo hace el grado de esteatosis, excepto HDLc, que disminuye (Tabla-23).

El ICC y los parámetros bioquímicos, con excepción de LDLc, son mayores ante la presencia de esteatosis multivesicular (Tabla-24). Este fenómeno se aprecia también cuando el cambio histológico considerado es la inflamación portal, aunque solo sucede con ICC, LDLc, HDLc, TG y GPT (Tabla 24).

Parámetros antropométricos, metab.-bioquímicos	CATEGORÍAS DIAGNÓSTICAS				Valor p <sup>(oo)</sup>
	No-EHGNA (0)	HENA (1)	EHNA-BORD (2)	EHNA (3)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	48.08±0.97	48.68±0.99	51.78±1.20	51.19±1.42	0.060
PC (cm)	131.41±2.63 (#, \$)	136.22±2.70 (¥)	143.45±1.99 (#)	147.50±2.58 (\$, ¥)	<0.001
ICC	0.87±0.12 (#, \$)	0.92±0.14	0.96±0.13 (#)	0.97±0.21 (\$)	<0.001
HOMA-IR	2.72±0.37 (\$)	3.86±0.58	4.58±0.39	5.59±1.21 (\$)	0.036
LDLc (mg/dl)	116.55±6.50	117.08±5.19	112.37±5.32	100.81±5.81	0.277
HDLc (mg/dl)	42.30±1.64 (#, \$)	39.35±1.37 (¥)	36.11±1.17 (#)	33.38±1.57 (\$, ¥)	0.001
TG (mg/dl)	97.36±6.74 (+, #, ¥)	140.42±8.86 (+)	166.07±9.56 (#)	177.31±16.07 (¥)	<0.001
GOT (U/l)	23.52±2.93 (¥)	28.85±2.79 (¥)	27.41±1.85 (#)	41.19±2.70 (#, ¥, O)	<0.001
GPT (U/l)	24.85±2.75 (#, ¥)	32.04±2.54 (¥)	39.05±2.68 (#, O)	55.38±4.52 (#, ¥, O)	<0.001
GGT (U/l)	20.39±2.34 (#, ¥)	29.50±2.46 (¥)	42.15±3.72 (#, O)	60.42±8.35 (#, ¥, O)	<0.001

(oo) test ANOVA1; [+ diferencias entre Categorías 0 y 1 p<0.05; † entre 0 y 2 p<0.001; # entre 0 y 2 p<0.05; ¥ entre 0 y 3 p<0.001; § entre 0 y 3 p<0.05; ¥ entre 1 y 3 p<0.05; O entre 2 y 3, p<0.05, prueba de Bonferroni]. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

**Tabla- 22.- Variación de parámetros antropométricos y datos metabólico-bioquímicos en las distintas Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas.**

Parámetros antropométricos, metab.-bioquímicos	ESTEATOSIS				Valor p <sup>(oo)</sup>
	AUSENTE	LEVE	MODERADA	INTENSA	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	48.08±0.97	49.0±0.91	51.93±1.28	50.74±1.63	0.125
PC (cm)	131.41±2.63 (#, ¥)	137.41±2.41	144.31±2.24 (#)	145.24±2.70 (¥)	0.001
ICC	0.87±0.12 (#, ¥)	0.92±0.12 (¥)	0.94±0.11 (#)	0.99±0.24 (#, ¥)	<0.001
HOMA-IR	2.72±0.37 (\$)	3.87±0.47	4.77±0.56	5.48±1.08 (\$)	0.036
LDLc (mg/dl)	116.55±6.50	116.30±4.57	108.10±6.19	108.23±6.47	0.572
HDLc (mg/dl)	42.30±1.64 (#, \$)	39.23±1.32 (¥)	35.73±1.16 (#)	33.63±1.51 (\$, ¥)	0.001
TG (mg/dl)	97.36±6.74 (+, #, ¥)	143.52±18.35 (+)	163.95±10.82 (#)	179.77±14.80 (¥)	<0.001
GOT (U/l)	23.52±2.93	29.22±2.51	30.11±2.42	34.70±2.59	0.069
GPT (U/l)	24.85±2.75 (#, ¥)	33.21±2.49 (¥)	41.22±3.29 (#)	49.93±4.05 (#, ¥)	<0.001
GGT (U/l)	20.39±2.34 (#, ¥)	33.13±3.00 (¥)	44.22±5.12 (#)	51.77±6.35 (#, ¥)	<0.001

(oo) test ANOVA1; [+ diferencias entre grados de esteatosis 0 y 1 p<0.05; † entre 0 y 2 p<0.001; # entre 0 y 2 p<0.05; ¥ entre 0 y 3 p<0.001; § entre 0 y 3 p<0.05; ¥ entre 1 y 3 p<0.05, prueba de Bonferroni]. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

**Tabla- 23.- Variación de parámetros antropométricos y datos metabólico-bioquímicos en los distintos grados de esteatosis de las biopsias hepáticas**

Parámetros antropométricos, metab.-bioquímicos	ESTEATOSIS MULTIVESICULAR			INFLAMACIÓN PORTAL		
	AUSENTE	PRESENTE	Valor p <sup>(oo)</sup>	AUSENTE	PRESENTE	Valor p <sup>(oo)</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	49.47±0.84	50.23±0.77	0.504	48.85±1.20	50.32±0.68	0.298
PC (cm)	136.83±2.34	140.57±1.59	0.182	135.09±2.45	140.58±1.54	0.079
ICC	0.90±0.12	0.94±0.01	<b>0.019</b>	0.90±0.16	0.94±0.01	0.051
HOMA-IR	3.19±0.39	4.60±0.41	<b>0.049</b>	3.21±0.39	4.46±0.38	0.126
LDLc (mg/dl)	118.08±5.19	110.33±3.45	0.212	124.78±6.09	109.25±3.21	<b>0.023</b>
HDLc (mg/dl)	41.82±1.31	36.15±0.85	<b>&lt;0.001</b>	41.69±1.40	36.82±0.84	<b>0.005</b>
TG (mg/dl)	109.92±7.48	162.44±6.71	<b>&lt;0.001</b>	127.33±8.16	151.46±6.63	<b>0.024</b>
GOT (U/l)	23.78±2.10	31.85±1.65	<b>0.005</b>	25.06±2.64	30.54±1.54	0.086
GPT (U/l)	27.08±2.18	41.04±2.09	<b>&lt;0.001</b>	30.03±3.39	38.80±1.88	<b>0.031</b>
GPT (U/l)	28.66±3.75	40.55±2.75	<b>0.014</b>	29.47±3.37	38.98±2.73	0.079

(oo) test *t* de Student. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

**Tabla 24.- Variación de parámetros antropométricos y datos metabólico-bioquímicos según la presencia o ausencia de esteatosis multivesicular e inflamación portal en las biopsias hepáticas.**

Los parámetros metabólicos y bioquímicos alterados que se han evaluado en los pacientes, se han asociado con las distintas Categorías Diagnósticas, excepto LDLc; un hecho a destacar es que la mayoría de pacientes con biopsias hepáticas incluidas en la Categoría 0 (No-EGHNA) no presentan SM, DM-2 o HTA y tienen HOMA-IR, TG, transaminasas y GGT normales; solamente muestran valores bajos de HDLc (Tabla-25).

Cuando tenemos en cuenta las Categorías Diagnósticas con las subdivisiones de la Categoría 2 (EHNA-BORD) se mantienen las mismas asociaciones excepto para LDLc y HDLc. El mayor número de pacientes dentro de la Categoría 2 con valores metabólicos y bioquímicos alterados se encuentran en las Categorías 2B y 2C (Tabla-26).

Algo similar ha sucedido al considerar el índice de actividad de Kleiner con SM y DM-2, así como con la mayoría de parámetros antropométricos y valores analíticos, con significaciones parecidas.

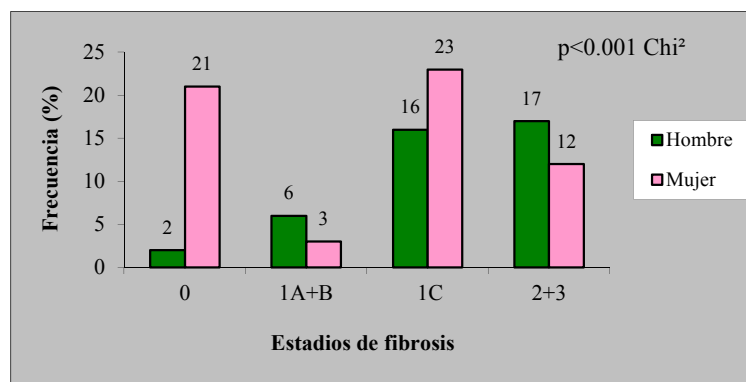
La intensidad de la esteatosis y se asocia significativamente con el SM, DM-2 e HTA así como con casi todos los parámetros analíticos alterados excepto para LDLc y GOT; la significación más alta se obtiene con TG (Tabla-27).

La esteatosis multivesicular se asocia significativamente con el SM y con los valores alterados de HOMA-IR, HDLc, TG y GPT. En el caso de la inflamación portal, ésta se asocia únicamente con el SM, HTA y con los valores alterados de HDLc (tabla-28).

Los valores de HOMA-IR, TG, transaminasas, GGT aumentan y HDLc disminuye conforme es más grave la Categoría Diagnóstica lesional, con valores más alterados en los varones ( $p=0.036$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  y  $p=0.001$ , respectivamente, ANOVA1).

No ha habido asociación entre la edad (incluidas décadas) y los Estadios de fibrosis de Kleiner.

De las 36 biopsias hepáticas que no presentaron fibrosis (Estadio 0), la mayoría son mujeres (34 casos), lo que corresponde a un 21% del total; lo mismo ha sucedido en muchas biopsias del Estadio 1C (de 63 casos, 37 son de mujeres -23% del total-). Los varones presentaron el doble de casos englobados en los estadios 1A+B (10 casos, 6% vs 5 casos, 3%) y de los 46 casos incluidos en los estadios 2+3, la mayoría pertenecen a varones (27 casos, 17% del total); estas diferencias en los estadios 2+3 se deben al estadio 3, ya que de las 10 biopsias en este estadio, 9 correspondían a varones ( $p<0.001$ ,  $\chi^2$ ) (Gráfica-30).



**Gráfica-30.-Estadios de fibrosis en las biopsias hepáticas según el sexo de los pacientes.**

Los valores medios de los parámetros metabólicos y bioquímicos evaluados, excepto HOMA-IR, aumentan cuanto más grave es la fibrosis (Tabla 29). Si consideramos el sexo, los valores más elevados de TG, GOT, GPT y GGT, y los valores más bajos de HDLc se dan en varones en los estadios 2+3 ( $p=0.002$ ,  $p=0.016$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  y  $p<0.001$ , respectivamente, ANOVA1).

Los parámetros metabólicos y analíticos que se asocian con los estadios de fibrosis son SM, DM-2 y valores alterados de LDLc, HDLc, GOT, GPT y GGT. En estadio 0 el mayor porcentaje de pacientes no presentan alteración metabólica y sus datos bioquímicos en la mayoría no están alterados (Tabla-30).

Parámetros metab.- bioquímicos		CATEGORÍAS DIAGNÓSTICAS				Valor p <sup>(oo)</sup>
		NO-EHGNA (0) N (%)	HENA (1) N (%)	EHNA-BORD (2) N (%)	EHNA (3) N (%)	
SM	Ausente	11 (14)	12 (15.5)	10 (13)	2 (3)	<b>0.001</b>
	Presente	2 (3)	12 (15.5)	12 (15.5)	17 (21.5)	
DM-2	Ausente	13 (17)	19 (24)	16 (20)	6 (8)	<b>&lt;0.001</b>
	Presente	0 (0)	5 (6)	6 (8)	13 (17)	
HTA	Ausente	11 (14)	11 (14)	11 (14)	5 (6)	<b>0.014</b>
	Presente	2 (3)	13 (17)	11 (14)	14 (18)	
HOMA -IR	Normal	17 (15)	19 (17)	14 (13)	10 (9)	<b>0.008</b>
	Alterada	5 (4)	11 (10)	26 (23)	10 (9)	
LDLc (mg/dl)	Normal	23 (15)	31 (20)	37 (23)	21 (13)	0.543
	Alterada	10 (6)	17 (11)	15 (9)	5 (3)	
HDLc (mg/dl)	Normal	10 (7)	5 (3)	5 (3)	3 (2)	<b>0.035</b>
	Alterada	23 (14)	43 (27)	48 (30)	23 (14)	
TG (mg/dl)	Normal	31 (19)	32 (20)	28 (18)	13 (8)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	2 (1)	16 (10)	25 (16)	13 (8)	
GOT (U/l)	Normal	29 (19)	40 (25)	44 (28)	11 (7)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	4 (2)	7 (4)	8 (5)	15 (10)	
GPT (U/l)	Normal	28 (18)	39 (24)	34 (21)	8 (5)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	5 (3)	9 (6)	19 (12)	18 (11)	
GGT (U/l)	Normal	32 (20)	45 (28)	46 (29)	15 (9)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	1 (1)	3 (2)	7 (4)	11 (7)	

Metab.: metabólicos; N: n° de casos; (oo) test Chi<sup>2</sup>

**Tabla-25.- Asociación entre parámetros metabólico-bioquímicos y Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas.**

		CATEGORÍAS DIAGNÓSTICAS						
Parámetros metab.- Bioquímicos		NO- EHGNA (0) N (%)	HENA (1) N (%)	EHNA- BORD (2A) N (%)	EHNA- BORD (2B) N (%)	EHNA- BORD (2C) N (%)	EHNA (3) N (%)	Valor p <sup>(oo)</sup>
SM	Ausente	11 (14)	12 (15)	1 (1)	5 (6)	4 (5)	2 (3)	<b>0.003</b>
	Presente	2 (3)	12 (15)	2 (3)	4 (5)	6(8)	17 (22)	
DM-2	Ausente	13 (17)	19 (24)	1 (1)	8 (10)	7 (9)	6 (8)	<b>&lt;0.001</b>
	Presente	0 (0)	5 (6)	2 (3)	1 (1)	3 (4)	13 (17)	
HTA	Ausente	11 (14)	11 (14)	1 (1)	6 (8)	4 (5)	5 (6)	<b>0.030</b>
	Presente	2 (3)	13 (16)	2 (3)	3 (4)	6 (8)	14 (18)	
HOMA -IR	Normal	17 (15)	19 (17)	3 (3)	4 (3)	7 (6)	10 (9)	<b>0.015</b>
	Alterada	5 (4)	11 (10)	2 (2)	13 (12)	11 (10)	10 (9)	
LDLc (mg/dl)	Normal	23 (15)	31 (20)	4 (2)	14 (9)	19 (12)	21 (13)	0.088
	Alterada	10 (6)	17 (11)	5 (3)	8 (5)	2 (1)	5 (3)	
HDLc (mg/dl)	Normal	10 (6)	5 (3)	1 (1)	2 (1)	2 (1)	3 (2)	0.123
	Alterada	23 (14.5)	43 (27)	8 (5)	21 (13)	19 (12)	23 (14.5)	
TG (mg/dl)	Normal	31 (20)	32 (20)	4 (3)	12 (7)	12 (7)	13 (8)	<b>0.002</b>
	Alterada	2 (1)	16 (10)	5 (3)	11 (7)	9 (6)	13 (8)	
GOT (U/l)	Normal	29 (18)	40 (25)	8 (5)	20 (13)	16 (10)	11 (7)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	4 (3)	7 (5)	0 (0)	3 (2)	5 (3)	15 (10)	
GPT (U/l)	Normal	28 (18)	39 (24)	7(4)	15 (19)	12 (8)	8 (5)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	5 (3)	9 (6)	2 (1)	8 (5)	9 (6)	18 (11)	
GGT (U/l)	Normal	32 (20)	44 (27)	8 (5)	20 (12)	18 (11)	15 (9)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	1 (1)	3 (2)	1 (1)	3 (2)	3 (2)	11 (7)	

Metab.: metabólicos; N: n° de casos; (oo) test Chi<sup>2</sup>

**Tabla-26.- Asociación entre parámetros metabólico-bioquímicos y Categorías Diagnósticas lesionales hepáticas, considerando la subdivisión de la Categoría 2 (EHNA-BORD).**

Parámetros metab.- Bioquímicos		ESTEATOSIS				Valor p <sup>(oo)</sup>
		AUSENTE N (%)	LEVE N (%)	MODERADA N (%)	INTENSA N (%)	
SM	Ausente	11 (14)	13 (17)	7 (9)	4 (5)	<b>0.005</b>
	Presente	2 (2)	14 (18)	13 (17)	14 (18)	
DM-2	Ausente	13 (17)	20 (25)	10 (13)	11 (14)	<b>0.018</b>
	Presente	0 (0)	7 (9)	10 (13)	7 (9)	
HTA	Ausente	11 (14)	11 (14)	8 (10)	8 (10)	<b>0.043</b>
	Presente	2 (3)	16 (21)	12 (15)	10 (13)	
HOMA -IR	Normal	17 (15)	22 (20)	10 (10)	10 (9)	<b>0.015</b>
	Alterada	5 (4)	15 (13)	21 (19)	11 (10)	
LDLc (mg/dl)	Normal	23 (15)	38 (24)	29 (18)	22 (14)	0.942
	Alterada	10 (6)	18 (11)	11 (7)	8 (5)	
HDLc (mg/dl)	Normal	10 (6)	6 (4)	5 (3)	2 (2)	<b>0.029</b>
	Alterada	23 (14)	50 (31)	36 (22)	28 (18)	
TG (mg/dl)	Normal	31 (19)	36 (23)	23 (14)	14 (9)	<b>&lt;0.001</b>
	Alterada	2 (1)	20 (13)	18 (11)	16 (10)	
GOT (U/l)	Normal	29 (18)	45 (29)	31 (20)	19 (12)	0.103
	Alterada	4 (3)	10 (6)	9 (5)	11 (7)	
GPT (U/l)	Normal	28 (17)	43 (27)	25 (16)	13 (8)	<b>0.001</b>
	Alterada	5 (3)	13 (8)	16 (10)	17 (11)	
GGT (U/l)	Normal	32 (10)	50 (31)	34 (21)	22 (14)	<b>0.041</b>
	Alterada	1 (1)	6 (4)	7 (4)	8 (5)	

Metab.: metabólicos; N: nº de casos; (oo) test Chi<sup>2</sup>.

**Tabla-27.-Asociación entre parámetros metabólico-bioquímicos y grados de esteatosis.**



Parámetros metab.- Bioquímicos		ESTEATOSIS MULTIVESICULAR			INFLAMACIÓN PORTAL		
		AUSENTE N (%)	PRESENTE N (%)	Valor p (°°)	AUSENTE N (%)	PRESENTE N (%)	Valor p (°°)
SM	Ausente	12 (15)	23 (30)	<b>0.034</b>	9 (11)	26 (33)	<b>0.008</b>
	Presente	6 (8)	37 (47)		2 (3)	41 (53)	
DM-2	Ausente	14 (18)	40 (51)	0.370	10 (13)	44 (56)	0.093
	Presente	4 (5)	20 (26)		1 (1)	23 (30)	
HTA	Ausente	12 (15)	26 (33)	0.082	9 (11)	27 (37)	<b>0.018</b>
	Presente	6 (8)	34 (44)		2 (3)	38 (49)	
HOMA-IR	Normal	22 (20)	38 (34)	<b>0.022</b>	14 (13)	46 (41)	0.291
	Alterada	9 (8)	43 (38)		8 (7)	44 (39)	
LDLc (mg/dl)	Normal	34 (21)	78 (49)	0.648	24 (15)	88 (55)	0.573
	Alterada	16 (10)	31 (20)		12 (8)	35 (22)	
HDLc (mg/dl)	Normal	14 (19)	9 (6)	<b>0.001</b>	27 (17)	110 (69)	<b>0.039</b>
	Alterada	36 (22)	101 (63)		9 (5)	14 (9)	
TG (mg/dl)	Normal	43 (27)	61 (38)	<b>&lt;0.001</b>	26 (16)	78 (49)	0.302
	Alterada	7 (4)	49 (31)		10 (6)	46 (29)	
GOT (U/l)	Normal	43 (27)	81 (51)	0.118	32 (40)	92 (58)	0.084
	Alterada	7 (5)	27 (17)		4 (3)	30 (19)	
GPT (U/l)	Normal	40 (25)	69 (43)	<b>0.030</b>	29 (18)	80 (50)	0.069
	Alterada	10 (6)	41 (26)		7 (4)	44 (28)	
GGT (U/l)	Normal	46 (29)	92 (58)	0.154	33 (21)	105 (65)	0.284
	Alterada	4 (2)	18 (11)		3 (2)	19 (12)	

Metab.: metabólicos; N: nº de casos; (°°) test Chi².

**Tabla-28.-Asociación entre parámetros metabólico-bioquímicos con esteatosis multivesicular e inflamación portal**

Parámetros antropométricos, metab.-bioquímicos	ESTADIOS DE FIBROSIS				Valor p <sup>(oo)</sup>
	Estadio 0	Estadios 1A+B	Estadio 1C	Estadios 2+3	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	46.59±1.07 (#, §)	50.92±1.87	50.89±0.99 (#)	51.11±1.05 (§)	<b>0.020</b>
PC (cm)	127.21±2.22 (+, ‡, ¶)	145.33±3.43 (+)	142.33±2.27 (‡)	143.19±1.93 (¶)	<b>&lt;0.001</b>
ICC	0.87±0.01 (+, #, ¶)	0.97±0.03 (+)	0.93±0.01 (#)	0.96±0.01 (¶)	<b>&lt;0.001</b>
HOMA-IR	3.00±0.39	4.53±1.84	4.22±0.43	4.83±0.60	0.254
LDLc (mg/dl)	116.47±6.37	131.20±9.91 (¥)	115.53±4.48	100.13±4.74 (¥)	<b>0.016</b>
HDLc (mg/dl)	44.33±151 (+, #, ¶)	35.60±2.12 (+)	37.24±1.04 (#)	34.59±1.33 (¶)	<b>&lt;0.001</b>
TG (mg/dl)	118.39±9.32 (§)	160.00±13.66	138.52±8.41	173.39±11.59 (§)	<b>0.002</b>
GOT (U/l)	22.39±2.39 (§)	31.36±3.06	29.21±2.40	34.18±2.31 (§)	<b>0.016</b>
GPT (U/l)	24.00±2.20 (+, ¶)	44.87±5.61 (+)	34.84±2.32 (Ø)	46.43±3.51 (¶, Ø)	<b>&lt;0.001</b>
GPT (U/l)	22.67±2.35 (¶)	44.20±10.13	32.86±2.90 (Ø)	50.98±4.94 (¶, Ø)	<b>&lt;0.001</b>

(oo) test ANOVA1. (\*) Los estadios 2 y 3 se han considerado en conjunto debido al reducido número de biopsias en estadio 3.

[+ entre estadios 0 y 1A+B p<0.05; ‡ entre 0 y 1C p<0.001; # entre 0 y 1C p<0.05; ¶ entre 0 y 2+3 p<0.001; § entre 0 y 2+ 3 p<0.05; ¥ entre 1A+B y 2+ 3 p<0.05; Ø entre 1C y 2+ 3 p<0.05, Bonferroni]. Los valores expresados corresponden a media±error estándar.

**Tabla-29.- Variación de los parámetros antropométricos y datos metabólico-bioquímicos en los Estadios de fibrosis de las biopsias hepáticas.**

Parámetros metab.- Bioquímicos		ESTADIOS DE FIBROSIS				Valor p <sup>(oo)</sup>
		Estadio 0 N (%)	Estadios 1A+B N (%)	Estadio 1C N (%)	Estadios 2+3 N (%)	
SM	Ausente	11 (14)	3 (4)	14 (18)	7(9)	<b>0.015</b>
	Presente	4 (5)	4 (5)	13 (17)	22 (28)	
DM-2	Ausente	13 (17)	4 (5)	23 (30)	14 (18)	<b>0.008</b>
	Presente	2 (2)	3 (4)	4 (5)	15 (19)	
HTA	Ausente	10 (13)	3 (4)	13 (17)	12 (15)	0.447
	Presente	5 (6)	4 (5)	14 (18)	17 (22)	
HOMA -IR	Normal	16 (14)	6 (5)	20 (18)	18 (16)	0.201
	Alterada	6 (5)	4 (4)	23 (21)	19 (17)	
LDLc (mg/dl)	Normal	26 (16)	8 (5)	38 (24)	40 (25)	<b>0.014</b>
	Alterada	10 (6)	7 (5)	24 (15)	6 (4)	
HDLc (mg/dl)	Normal	12 (7)	1 (1)	5 (3)	5 (3)	<b>0.003</b>
	Alterada	24 (15)	14 (9)	58 (36)	41 (26)	
TG (mg/dl)	Normal	26 (16)	9 (6)	44 (27)	25 (16)	0.269
	Alterada	10 (6)	6 (4)	19 (12)	21 (13)	
GOT (U/l)	Normal	35 (22)	10 (6)	50 (32)	29 (18)	<b>0.002</b>
	Alterada	1 (1)	4 (2)	12 (8)	17 (11)	
GPT (U/l)	Normal	32 (20)	9 (6)	46 (29)	22 (14)	<b>0.001</b>
	Alterada	4 (2)	6 (4)	17 (11)	24 (15)	
GGT (U/l)	Normal	35 (22)	12 (7)	58 (36)	33 (21)	<b>0.003</b>
	Alterada	1 (1)	3 (2)	5 (3)	13 (8)	

Metab.: metabólicos; N: nº de casos; <sup>(oo)</sup> test Chi<sup>2</sup>. Los estadios 2 y 3 se han considerado en conjunto debido al reducido número de biopsias en estadio 3.

**Tabla-30.- Asociación entre parámetros metabólico-bioquímicos con los distintos Estadios de fibrosis.**

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1 Características generales demográficas, parámetros antropométricos y datos bioquímico-metabólicos

La obesidad constituye un problema creciente de salud en países desarrollados, habiéndose considerado como la epidemia del siglo XXI, lo que está condicionado por el cambio en los hábitos de vida saludables (Cheung and Sanyal, 2009; Tiniakos et al., 2010). El estudio de pacientes con obesidad ha contribuido a un mayor conocimiento del tejido adiposo como órgano secretor de hormonas y citoquinas, lo que nos ha permitido comprender las alteraciones metabólicas que pueden condicionar el desarrollo de la EHGNA (Arner, 2003; Angulo, 2006; Tilg and Moschen, 2008).

La obesidad se asocia a diversos trastornos metabólicos, como IR y DM-2, que son componentes del SM, a enfermedades cardiovasculares y EHGNA, entre otros (Hotamisligil, 2006; Odgen et al., 2006; Schernthaner and Morton, 2008). Las alteraciones metabólicas de OM, entre las que se encuentra el estado inflamatorio crónico, con liberación de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-6) que contribuyen al desarrollo de lesiones hepáticas (EHGNA), pueden actuar como promotores de la carcinogénesis tras la producción de EROs (Shimizu et al., 2013).

La obesidad forma parte del SM y entre sus criterios se incluyen obesidad visceral y alteración de varios de los siguientes parámetros clínico-bioquímicos: hipertensión, hipertrigliceridemia, HDLc baja, HOMA-IR elevado, etc. (Zimmet et al., 2005), presentes en un porcentaje variable de este grupo de obesos móbidos. Alrededor del 80% de los pacientes con EHGNA tienen SM (Ramesh and Sanyal, 2005). En nuestra serie más de la mitad de los pacientes presentaron SM (55%) y un tercio DM-2 (31%), aunque sólo se conocieron estos datos en los pacientes de Granada.

Para la valoración clínica de la obesidad se utilizan el IMC (peso dividido por altura<sup>2</sup>), que debe ser igual o mayor a 30; cuando es igual o mayor de 40, se habla de obesidad extrema o mórbida (Gastrointestinal Surgery for severe obesity: NIH consensus, 1992; Zimmet et al., 2005; Schernthaner and Morton, 2008); otros parámetros son el perímetro de cintura y el ICC (Zimmet

et al., 2005). Todos estos parámetros estaban elevados en los pacientes de esta serie, ya que para someterlos a cirugía bariátrica debían tener un IMC de 40 (menor si coexistían

comorbilidades), siendo la media del IMC de  $49.99 \pm 0.60$ ; tanto el IMC, como el perímetro de cintura e ICC han sido mayores en varones que en mujeres, aunque hay 1.5 veces más mujeres que varones en el estudio.

Entre los valores bioquímicos, el más comúnmente alterado ha sido la HDLc. Las transaminasas, sobre todo la GPT, han estado elevadas, lo que se relaciona con lesión hepática. Los valores promedio de la mayoría de parámetros bioquímicos evaluados estuvieron más alterados en varones.

## **5.2 Características histo-topográficas y morfométricas de la grasa blanca**

El fenotipo de obesidad central se asocia con incremento de grasa troncal, tanto visceral como subcutánea (Angulo, 2006). El riesgo metabólico (SM) y de complicaciones cardiovasculares que se producen en esta enfermedad se relaciona con el aumento sérico moderado aunque crónico de mediadores inflamatorios que se producen en la grasa (Wellen and Hotamisligil, 2003; Andersson et al., 2008; Clément and Vignes, 2009). Los productos liberados tras lipólisis de la grasa visceral drenan al hígado a través del sistema portal (Arner, 1998 y 2003) y pueden contribuir al desarrollo de lesiones hepáticas.

No hemos encontrado referencias en la literatura respecto a cuantificación de adipocitos en cortes histológicos de grasa subcutánea y su comparación con la obtenida en grasa visceral, tal y como lo hemos efectuado en este trabajo.

En algunos estudios aplican morfometría para medir el diámetro adipocitario en grasa visceral y subcutánea de obesos mórbidos (Canello et al., 2006). Otros realizan medidas del diámetro adipocitario utilizando un método morfométrico automatizado, previa digestión y aislamiento celular, en grasa subcutánea periumbilical (Tchoukalova et al., 2003), y otros determinan el área del adipocito con un método parecido al nuestro pero en grasa de otra localización (Chen and Farese, 2002).

Creemos que el recuento de adipocitos con una rejilla milimetrada, aunque puede tener ciertas limitaciones nos proporciona una buena aproximación al volumen adipocitario, ya que se correlaciona con los datos obtenidos tras la aplicación de técnicas morfométricas para calcular su diámetro.

En nuestra serie existe una correlación inversa fuerte en la GB de ambas localizaciones entre el nº de adipocitos y su diámetro. A mayor nº de adipocitos éstos presentan menor diámetro, por lo que podríamos deducir que el recuento adipocitario es un marcador indirecto de tamaño.

Hemos observado diferencias en el recuento entre adipocitos de GBvis y GBsub a favor de la primera, lo que podría ser interpretado como evidencia del menor tamaño de sus adipocitos, hecho similar a lo señalado cuando se aplica morfometría (Canello et al., 2006). Estos hallazgos estarían en concordancia con estudios que señalan que los adipocitos viscerales tienen un tamaño inferior al de los subcutáneos (Cinti, 2009a); la muerte de adipocitos se relaciona con su tamaño crítico, que, al ser inferior en los viscerales, explicaría la mayor morbilidad asociada a grasa visceral (Cinti, 2011).

En los últimos años se ha conocido que los macrófagos de la grasa son una fuente importante de mediadores inflamatorios, los cuales participan en los efectos sistémicos de la obesidad (Tordjman et al., 2009) y por tanto en el desarrollo de las enfermedades asociadas, entre ellas las lesiones hepáticas.

La densidad de macrófagos totales en grasa, expresado como porcentaje, se ha venido realizando desde hace una década, tras la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas (Weisberg et al, 2003; Canello et al, 2006; Harman-Boehm et al., 2007; Tordjman et al., 2012), pero no hemos encontrado coincidencias respecto a la metodología utilizada en este estudio.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son parecidos a los publicados en la literatura respecto al nº de macrófagos en GBvis, que es el doble que en grasa subcutánea (Canello et al., 2006); en nuestro caso el nº de macrófagos totales en GBvis es 1.4 veces mayor que en GBsub.

En condiciones de obesidad existe un aumento en el reclutamiento de macrófagos en el órgano adiposo (Maher et al., 2008), que muestran un cambio en el fenotipo presentando actividad fagocítica y disponiéndose en coronas (Zeyda and Stulnig, 2007). Las coronas macrofágicas se producen como respuesta ante la muerte de los adipocitos y se reconocen por la disposición de los macrófagos alrededor de los adipocitos (Canello et al., 2006; Dalmas et al., 2011); en nuestros casos son mas evidentes en GBsub que en GBvis.

No se ha observado asociación entre la expresión inmunohistoquímica de CD68 en los macrófagos totales y la concentración de su ARNm por RT-PCR; el mismo marcador



puede tener diferente significado: en el primer caso se utiliza para localizar macrófagos tanto dispersos como agrupados en coronas en las secciones titulares y valorar su densidad, mientras que en el segundo refleja la síntesis de esta glicoproteína ligada a los lisosomas en un volumen determinado de grasa.

Mientras que el nº total de macrófagos tisulares es superior en GBvis, la concentración de ARNm de CD68 es mayor en GBsub y tiene una correlación muy fuerte con CD11c, una molécula de adhesión expresada por los macrófagos con gran capacidad fagocítica, como los que se observan en las coronas macrofágicas. El predominio de coronas macrofágicas tisulares en GBsub quizás podría explicarse porque los adipocitos en esta localización son de mayor tamaño que los viscerales, existiendo más restos celulares a fagocitar que cuando se destruyen los adipocitos viscerales.

Los adipocitos subcutáneos segregan mayor cantidad de leptina y adiponectina que los viscerales, fenómeno también detectado en obesos mórbidos (Hube et al., 1996; Wajchenberg, 2000) y en nuestra serie. Pero en la obesidad se produce un incremento de los niveles séricos de leptina en proporción al IMC, postulándose el desarrollo de resistencia a la leptina por diversos mecanismos (Hosoi and Ozawa, 2009; Carter et al., 2013; Yadav et al., 2013), y disminución de adiponectina, sobre todo visceral, la cual ha sido interpretada como resultado de la disfunción adiposa que se produce en este proceso (Hernandez-Morante et al., 2008).

La adiponectina juega un papel importante en la adipogénesis y el almacenamiento de grasa en los tejidos adiposos. La expansión de la grasa en individuos sanos, mediada por la adiponectina, es un mecanismo esencial que mantiene a raya al síndrome metabólico (Ye and Scherer, 2013). Además tiene efecto antiinflamatorio sobre el órgano adiposo (al igual que sobre los macrófagos), por lo que podría contribuir al fenotipo de pacientes “obesos metabólicamente sanos”, los cuales tienen niveles desproporcionadamente altos de adiponectina en relación a su masa corporal.

### 5.3 Lesiones histológicas hepáticas.

La enfermedad del hígado graso no-alcohólico (EHGNA) ha pasado a ser la primera causa de enfermedad hepática en países industrializados (Cheung and Sanyal, 2009; Tiniakos et al., 2010), superando en incidencia a la hepatitis crónica por virus C. Uno de los factores asociados a este incremento es la obesidad, al afectar no solo a la población adulta, sino también de modo preocupante a la infantil (Odgen, 2006). Algunos autores incluyen a la EHGNA como un componente más de SM (Bruce and Byrne, 2009).

Los pacientes sometidos a cirugía bariátrica para el tratamiento de la obesidad mórbida han contribuido al conocimiento de la historia natural de la NAFLD, ya que durante la cirugía se han observado alteraciones macroscópicas hepáticas que han llevado a la realización de biopsias; ésto ha permitido conocer que no todos los pacientes con obesidad mórbida tienen lesiones de EHGNA (Ong et al., 2005). En 33 casos (21%) de esta serie no se ha observado esteatosis, dato necesario para el diagnóstico de EHGNA, y los que las presentan no siempre tienen expresión clínica del proceso (Ong et al., 2005; Caballero et al., 2012).

La prevalencia de las diferentes lesiones en EHGNA se ha estimado en 50-90% para el hígado graso, 20-30% para EHNA/fibrosis y 5% para la cirrosis (Hübscher, 2006); en obesos esta prevalencia varía según las series; para algunos autores (con  $IMC \geq 30$ ) la EHGNA está presente el 74% de casos y se incrementa hasta un 90% en obesos mórbidos ( $IMC \geq 40$ ), constituyendo un problema clínico emergente (Loguercio et al., 2001; Beymer et al., 2003; Clark JM, 2006); si la obesidad se asocia a DM-2, este riesgo es aún mayor (Tilg and Moschen, 2008). En esta serie no hemos podido estimar la prevalencia en ambas poblaciones de obesos mórbidos ya que su inclusión en el estudio ha estado condicionada por la calidad de las biopsias hepáticas y existencia de biopsias de grasa del mismo paciente.

Un problema importante en las publicaciones sobre EHGNA ha sido la falta de homogeneidad en los diagnósticos histopatológicos, lo que ha conducido a publicaciones con gran discordancia en cuanto al porcentaje de lesiones con distinta gravedad (Garcia

Monzón et al., 2000; Dixon et al., 2001). Tras la publicación del sistema de puntuación para la valoración lesional de la NAFLD, el “score” NAS (NAS: NAFLD Activity Score) o índice de actividad de Kleiner y la estadificación de la fibrosis (Kleiner et al., 2005), diseñados para su uso en ensayos clínicos, se empieza a resolver este problema.

En las biopsias infantiles o juveniles (pacientes menores de 18 años) se han diferenciado dos variantes histológicas principales de EHNA: tipo 1, similar a la del adulto (esteatosis, balonización y fibrosis pericelular), y tipo 2, mucho mas frecuente, caracterizada por inflamación y fibrosis portal, junto a esteatosis; asimismo se describe un tercer patrón, indeterminado o de superposición, menos frecuente (Schwimmer et al., 2005); este patrón de superposición de lesiones tipo 1 y tipo 2 se observa en un alto porcentaje de casos en algunas series de EHNA infantil publicadas con posterioridad (Carter-Kent et al., 2009).

Recientemente los valores 3 y 4 del “NAS score” han sido separados en 2 categorías (Brunt et al., 2009): EHNA-borderline con patrón de zona 3 y EHNA borderline con patrón de zona 1 (equivalente al tipo 2 pediátrico). Ante la observación de numerosos casos en esta serie con lesiones de EHNA-BORD, en las que mas del doble de casos tienen lesiones en zona portal (zona 1) (14%) frente a los de lesiones centrozonales (6%), así como un grupo no despreciable de biopsias con superposición de ambas (13%), decidimos aplicar una subdivisión parecida, pero añadiendo un tercer subtipo con lesiones de superposición (en zona 3 y zona 1), como el descrito en casos de EHNA infantil.

Nuestros resultados en esta serie de obesos mórbidos y en publicaciones previas de nuestro grupo (Caballero et al., 2012) no corroboran los hallazgos previos respecto a que las lesiones en zona 1 son raras en adultos (Brunt et al., 2009). Muchos de nuestros casos tienen lesiones denominadas en las biopsias infantiles EHNA-tipo2 (Schwimmer et al., 2005), que hemos incluido en la categoría EHNA-BORD o EHNA, dependiendo del “score” NAS.

Por todo ello, en este estudio hemos utilizado un nuevo sistema de categorización lesional (Caballero et al., 2012), ya que en el “score” NAS no se contempla de forma individualizada las biopsias que no tienen esteatosis, un dato que, como se ha señalado previamente, hemos visto ocurre en un 21% de esta serie; no podemos hablar de biopsias normales, ya que

algunas sí lo son, pero otras pueden mostrar algún grado de inflamación crónica, sobre todo portal. Por otro lado, las biopsias pertenecientes a la Categoría Diagnóstica 2 las subdividimos en otros 3 subtipos que reflejan la presencia de lesiones centroacinares (2A), en zona 1 acinar (2B) o combinación de ambas zonas (2C) (Caballero et al., 2012).

Los casos con esteatosis pero que no tienen suficientes alteraciones requeridas para el diagnóstico de EHNA los incluimos en la categoría diagnóstica 1 o HENA (con menos lesiones) y en la categoría 2 o EHNA-“borderline” (EHNA-BORD) para los que tienen lesiones más próximas a las de esteatohepatitis; han estado presentes en el 30 y 33% de nuestros casos, respectivamente.

Para el diagnóstico de EHNA se requiere la presencia de diversas lesiones indicadoras de actividad: esteatosis, balonización hepatocelular e inflamación lobulillar, las cuales han sido valoradas de modo semicuantitativo como base del grado de actividad de Kleiner o “score” NAS (Kleiner et al., 2005). Los criterios para su valoración como categoría se superponen a los anteriores.

El porcentaje de casos de EHNA o Categoría Diagnóstica 3 en este estudio (16%) se aproxima al de publicaciones recientes de nuestro grupo (Caballero et al., 2012) y es inferior al señalado en otros estudios sobre obesidad mórbida, en los que varía entre el 26% (Ong et al., 2005) y el 37% (Liew et al., 2006; Machado et al., 2006; Abrams et al., 2004); respecto a estas diferencias hay que señalar que en muchos trabajos anteriores se utilizaba el diagnóstico de EHNA como sinónimo de esteatosis, con y sin inflamación lobulillar acompañante, lo que ha dificultado la interpretación de los resultados publicados. Sin embargo no podemos extraer conclusiones respecto a la incidencia en este estudio, ya que la inclusión de casos ha estado condicionada por la calidad de las biopsias.

La esteatosis es la lesión histológica característica de EHGNA; suele denominarse de tipo macrovesicular o mixta (Brunt, 2009b; Tiniakos et al., 2010), si está constituida por hepatocitos con vesículas (droplets) grandes y pequeñas. Ésta ha sido la forma predominante en esta serie (79%). En el 69% de nuestros casos hemos apreciado esteatosis “multivesicular” (Caballero et al., 2012), también referida como esteatosis de vacuola pequeña (Tiniakos et al.,

2010), constituida por múltiples vacuolas de tamaño intermedio o pequeño, sin desplazamiento nuclear periférico.

El término de “esteatosis simple”, utilizado en muchos estudios clínicos para referirse a uno de los tipos de EHGNA, debería obviarse (Brunt, 2009b), ya que la esteatosis es una lesión suele acompañarse de algún grado de inflamación lobulillar, como ha sucedido en esas biopsias, en las que predomina el grado leve. Respecto a su significado, cuando no se acompaña de inflamación o fibrosis, permanece sin conocerse (Tiniakos et al., 2010).

Por el contrario, la esteatosis microvesicular pura también se caracteriza por la formación de múltiples vesículas pero de mucho menor tamaño y difíciles de individualizar, confiriéndole en ocasiones al hepatocito un aspecto espumoso o balonizado (Brunt, 2009b), con núcleo de situación central e indentado (Yeh and Brunt, 2007). Algunos estudios encuentran relación entre la esteatosis microvesicular en EHGNA y gravedad lesional (mayor grado de esteatosis, balonización, fibrosis, etc.) (Tandra et al., 2011). Algo parecido ocurre en esta serie con la esteatosis multivesicular. En nuestra serie es raro encontrar casos de EHNA que no presenten esteatosis multivesicular, lo mismo ocurre con la balonización. Respecto a la fibrosis, la mayor parte de biopsias con esteatosis multivesicular se encuentran en casos con estadios 1C y 2+3.

La inflamación lobulillar suele estar presente en biopsias de EHGNA (Yeh and Brunt, 2007), aunque su intensidad varía según la Categoría Diagnóstica y se utiliza para establecer el grado de actividad (NAS “score”). En nuestras biopsias, la mayoría de casos con inflamación lobulillar se diagnosticaron como EHNA-BORD y EHNA; en la mayor parte de las muestras sin fibrosis (estadio 0), tampoco se detectó inflamación lobulillar.

No hay que confundir la inflamación lobulillar con la presencia de PMN, muy característico de las biopsias obtenidas durante la cirugía y que suelen localizarse en área perivenular, este fenómeno, denominado hepatitis quirúrgica, ha sido atribuido a la manipulación del órgano o bien podría ser consecuencia de la liberación de citoquinas por la anestesia, lo que conduciría a la sobrevaloración de la inflamación lobulillar (Brunt, 2009b).

Este problema se puede obviar considerando la agrupación de PMN como parte de la respuesta inflamatoria únicamente si están dispuestos en torno a hepatocitos balonizados, fenómeno conocido como satelitosis (Brunt, 2009b); nosotros los hemos observado en los

casos de hepatitis quirúrgica alrededor de hepatocitos esteatósicos y en mucho mayor número, tanto en área perivenular como más alejados de esta zona en casos intensos, por lo que se han podido diferenciar sin dificultad, sobre todo con la utilización del anticuerpo anti-MPO que los identifica, de la verdadera inflamación lobulillar que acompaña a la esteatosis.

La inflamación portal es una alteración histopatológica no incluida en el NAS “score”, aunque si considerada en el estudio inicial (Kleiner et al., 2005) y en otros mas recientes del mismo grupo (Brunt et al., 2009); se había indicado que podía estar presente en biopsias de EHNA, en grado variable, acompañando a las otras alteraciones histopatológicas que la caracterizan (Brunt et al., 1999) y en obesos sometidos a cirugía bariátrica también (Abrams et al., 2004; Liew et al., 2006).

La inflamación portal en EHGNA ha sido interpretada de muy diversas formas; algunos la consideran una lesión asociada a otra patología concurrente, sobre todo cuando es desproporcionada respecto a la inflamación lobulillar (Brunt, 2009b; Hübschner et al., 2006); también es referida en casos de EHNA intensos, tanto en adultos como en niños (Brunt et al., 2009), o después de respuesta a tratamiento de la obesidad (médico o quirúrgico), aunque su causa es desconocida (Brunt, 2010).

Ha estado presente en muchos casos de nuestra serie (78%), aunque con frecuencia tiene carácter focal, hecho descrito en una publicación previa de nuestro grupo (Caballero et al., 2012), al igual que en niños obesos (Schwimmer et al., 2005), distribuyéndose en las distintas Categorías Diagnósticas, aunque el grupo más numeroso se observa en la Categoría EHNA-BORD (29%) y dentro de ella en el subtipo 2B (14%).

La importancia de la inflamación portal se debe a su asociación con fibrosis avanzada (Brunt et al., 2009). Por el contrario, en nuestros casos el mayor porcentaje se da en estadios poco avanzados (1C) (40%), ya que la inflamación está acompañada de fibrosis. Todo ello nos sugiere que quizá sea una característica que acompaña a la obesidad, pudiendo estar condicionada por los mediadores liberados por la grasa visceral abdominal (Arner 2003), mas que ser consecuencia de la pérdida de peso previa a la cirugía; de hecho más de la mitad (59%) de los casos sin esteatosis (Categoría No-EHGNA) también tienen inflamación portal, por lo general leve. En nuestros pacientes, de los 33 casos sin esteatosis, casi la mitad (16) presentaron inflamación portal.

Por otro lado, la fibrosis, consecuencia de las lesiones citadas, se consigna aparte como Estadio, igual que en las hepatitis crónicas (Brunt et al., 1999; Kleiner et al., 2005). Los pacientes con Estadio 1 de fibrosis, que se subdividen en 1A y 1B -fibrosis perivenular leve o moderada y 1C -fibrosis portal-periportal (Kleiner et al., 2005), los hemos considerado en 2 subgrupos teniendo en cuenta la distribución pero no el grado de fibrosis (Caballero et al., 2012), debido a la existencia de un grupo considerable de biopsias en Estadio 1C en este estudio; el reducido nº de casos en estadio 1A nos ha llevado a agruparlos con el 1B, dado que ambos tienen la misma zona afectada por la fibrosis.

En esta serie, la mayoría de las biopsias estaban en estadio 1 (78 casos -48%-), subtipo 1C (fibrosis portal) (63 casos -39%-), mientras que no hemos observado ningún caso de cirrosis (estadio 4) y solo 10 biopsias (6%) en estadio 3.

La fibrosis portal se ha descrito en casos de NASH infantil (Schwimmer et al., 2005; Carter-Kent et al., 2009), al igual que en paciente obesos (Abrams et al., 2004; Caballero et al., 2012), acompañada de inflamación en esta misma localización; su incidencia es baja (5%) en pacientes con EHGNA (Chalasani et al., 2008) y podría no estar relacionada con esta enfermedad, sino con otras peculiaridades de pacientes sometidos a cirugía bariátrica (Yeh and Brunt, 2007), tales como la reducción de peso previa a la cirugía o al hecho de que las biopsias son de zona subcapsular del lóbulo izquierdo (Brunt, 2009b).

No obstante, estudios en obesidad mórbida que comparan lesiones en biopsias obtenidas de lóbulo derecho e izquierdo (Larson et al., 2007) encuentran diferencias mínimas en algunas

lesiones, entre las que se incluye la fibrosis portal. En nuestro estudio las biopsias del HUSC procedían del lóbulo izquierdo, aunque la fibrosis portal, presente en el 68% de las biopsias, siempre ha estado acompañada de inflamación crónica o de fibrosis en otras localizaciones, no existiendo casos con fibrosis portal aislada.

Ya que la mayoría de los pacientes referidos en algunas series de EHGNA infantil son obesos (Schwimmer et al., 2005), no es extraño que los obesos mórbidos estudiados aquí presenten lesiones similares respecto al patrón lesional de inflamación y/o fibrosis portal/perportal, así como el reducido número de casos con hialina de Mallory. Una diferencia de nuestra serie de biopsias con las infantiles es que la esteatosis muestra en muchos casos localización centrozonal y es de tipo mixto, con predominio de la forma multivesicular.



## **5.4 Correlaciones clínico-patológicas**

El recuento total de adipocitos ha sido inferior en los varones (por lo que su diámetro es mayor), tanto en GBvis como en GBsub, aunque sólo con diferencias significativas en GBvis. Estos resultados se relacionan con parámetros bioquímicos más alterados.

En situaciones de obesidad se produce hipertrofia adipocitaria que se relaciona con hiperinsulinemia, Ins-R y riesgo de DM2, así como de alteración funcional de la GB (Arner et al., 2010). En nuestra serie se ha observado relación entre parámetros metabólico-bioquímicos y antropométricos con el recuento y diámetro adipocitario, de modo que a medida que aumentan sus valores o la alteración está presente, menor es el recuento de adipocitos (mayor es su tamaño).

Hemos visto asociación significativa entre el nº de adipocitos/mm<sup>2</sup> tanto en localización visceral como en subcutánea y las lesiones hepáticas, con recuentos más altos en casos con Categoría lesional 0 y recuentos más bajos en casos con EHNA (Categoría lesional 3), lo que no ha sido publicado previamente; es posible que los adipocitos de GBvis estén más hipertróficos cuando las lesiones hepáticas sean más severas. Algo similar sucede si lo que valoramos es la intensidad de la esteatosis e inflamación lobulillar, lo que resulta lógico ya que son 2 de los 3 cambios evaluados para realizar el “score” NAS. Algo similar ocurre con los Estados de fibrosis de Kleiner tanto en GBvis como en GBsub. Los recuentos más altos se producen en ausencia de fibrosis.

Por el contrario los adipocitos tienen menor diámetro en biopsias con Categoría lesional 0 (No-EHGNA), en ausencia de esteatosis, de inflamación lobulillar y de fibrosis, pero solo se han obtenido resultados significativos en GBvis.

El nº de macrófagos en la GBvis se ha relacionado con el IMC y con las lesiones hepáticas en pacientes obesos (Canello et al, 2006; Zeyda et al., 2007; Tordjman et al, 2009); algunos autores señalan que en GBvis existe doble nº que en la subcutánea (Canello et al., 2006), existiendo correlación con lesiones fibroinflamatorias hepáticas solo para los macrófagos de grasa mesentérica (Canello et al., 2006; Tordjman et al., 2009).

El nº de macrófagos en la GB subcutánea ha sido menos estudiado que en GBvis; trabajos recientes señalan que la grasa subcutánea profunda, que se parece a la visceral, tiene mayor cantidad de macrófagos que la superficial, correlacionándose su nº con la severidad de las lesiones hepáticas (Tordjman et al., 2012).

Sólo hemos obtenido asociación significativa entre macrófagos totales y las Categorías Diagnósticas hepáticas o los Estadios de fibrosis en GBsub, aunque en GBvis se observa tendencia al incremento de la densidad de macrófagos totales a medida que aumenta la gravedad lesional. Este hecho probablemente estaría mejor definido aumentando el número de casos, ya que algunas muestras de grasa no se han podido evaluar (mostraban artefactos por fijación prolongada).

En nuestro estudio las coronas macrofágicas se comportan de forma similar al recuento del nº de macrófagos totales en relación con las Categorías Diagnósticas y los Estadios de fibrosis, obteniendo diferencias significativas únicamente en GBsub.

Como se ha comentado previamente, si los adipocitos tiene mayor tamaño que los viscerales, es lógico que el nº de coronas macrofágicas en GBsub haya sido superior en los varones, ya que en ellos los adipocitos tienen mayor diámetro.

Tanto la densidad macrofágica total como la de coronas, se han correlacionado solo con algunos parámetros antropométricos y bioquímicos, como por ejemplo entre el IMC y densidad macrofágica en GBsub, hecho que ya ha sido descrito en el caso de GBvis (Canello et al., 2006; Zeyda et al., 2007; Tordjman et al., 2009).

En un estudio realizado en pacientes con patología cardíaca e IMC elevado pero sin llegar al de la obesidad mórbida (promedio de 29), tras la aplicación de técnicas de RT-PCR para valoración de leptina y adiponectina en grasa epicárdica y subcutánea, no se han observado diferencias según el sexo en la concentración de ambas adipoquinas en grasa subcutánea, pero sí en la epicárdica (Iglesias et al, 2006), la cual ha sido equiparada con la grasa visceral (Cinti, 2009a).

En nuestro estudio si hemos observado diferencias relacionadas con el sexo de los pacientes, ya que solo las mujeres tienen mayores concentraciones tisulares de

adiponectina que los hombres en GSub, mientras que en éstos es la leptina visceral la que alcanza mayor concentración, lo que podría relacionarse con el efecto inhibitor de la testosterona sobre la producción de adiponectina sugerido en la literatura (Wang et al., 2008) o con el efecto estimulante de la insulina sobre la síntesis de adiponectina en ciertos depósitos (en relación con la expresión tisular de PPAR $\gamma$ ) como se indica en otros estudios realizados en cultivos de grasa (Hernández-Morante et al., 2008).

En relación al incremento en la concentración sérica de leptina a medida que aumenta el IMC (Czaja, 2004; Brunt, 2007a; Antuna-Puente et al., 2008; Monga and Behari, 2009), no lo hemos apreciado en su determinación tisular, aunque sí hemos visto correlación con el HOMA-IR, PC e ICC en su localización visceral.

En cuanto a la adiponectina, que disminuye en obesos con IR o DM2 (Gesta et al., 2007; Antuna-Puente et al., 2008), solo hemos podido apreciar tendencia a la disminución si el paciente tiene SM o DM-2. También se ha descrito reducción en presencia de EHGNA (Tilg and Moschen, 2008) pero no cuando existe fibrosis (Wang et al., 2008); nosotros, por el contrario, hemos apreciado disminución de la adiponectina en GSub a medida que progresa la fibrosis.

Cuando observamos las características clínicopatológicas de esta serie de pacientes llama la atención que los pertenecientes a la Categoría 0 (No-EHGNA) son predominantemente mujeres, sin DM-2 ni hipertrigliceridemia, pocos casos con SM (2 casos), y parámetros bioquímicos dentro de la normalidad, excepto para los valores de HDLc, que aunque en los pocos casos en los que no está alterada la mayoría se encuentran en la Categoría 0, no se demuestran diferencias significativas y para valores normales de LDLc que se distribuyen de manera más o menos homogénea entre las distintas Categorías Diagnósticas. Este grupo podría ser casi comparable al descrito por Lemieux et al. (2000) como obesos “metabólicamente sanos” y por analogía podríamos denominarlos obesos mórbidos “metabólicamente casi sanos”.

La subdivisión de la Categoría 2 (EHNA-BORD) en otras 3 no nos ha permitido demostrar correlaciones clínico-analíticas de los 3 subgrupos, a pesar del doble del porcentaje de casos en 2B y 2C respecto a 2A. Sería interesante poder demostrar si este último subgrupo comparte características con algunos de los otros y en ese caso debería ser referido en los informes anatomopatológicos.

Hemos observado diferencias en las lesiones hepáticas dependiendo del sexo. La mayoría de pacientes con EHNA son varones, mientras que, como hemos comentado anteriormente, en las mujeres predomina la ausencia de lesiones de EHGNA, al igual que la Categoría 2A (EHNA-BORD con lesiones centrozonales).

En nuestros casos algunos parámetros antropométricos y de SM, (sobre todo el PC, ICC, DM-2, HOMA-IR, HDLc y TG) se han asociado de modo significativo con las lesiones hepáticas, tanto con el grado de actividad como con los Estadios de fibrosis.

Los valores medios de los parámetros antropométricos y metabólico-bioquímicos determinados, excepto LDLc, aumentan conforme es más grave la Categoría Diagnóstica lesional, por lo que estos parámetros, cuando están alterados, se relacionan con las distintas Categorías Diagnósticas. Algo similar ocurre con la esteatosis (grado) y con la presencia del subtipo multivesicular e inflamación portal.

En relación a los Estadios de fibrosis, la mayoría de pacientes sin fibrosis o con fibrosis en estadio 1C son mujeres y los más avanzados ocurren en varones. Cuando se comparan los valores antropométricos y metabólico-bioquímicos de los pacientes con fibrosis en estadio 1C, se aprecia tendencia a presentar valores promedios menos alterados que en los pacientes con biopsias en estadio 1A+B.

De gran interés para profundizar en la biopatología de la NAFLD sería conocer los cambios histológicos que marcan la transición entre lesión sin o con enfermedad, lo que sería imposible si se prescinde de la realización de biopsias hepáticas, hecho sugerido en la literatura por diversos autores.

## **6. CONCLUSIONES**

- 1- El recuento adipocitario/mm<sup>2</sup> de superficie en grasa blanca visceral y subcutánea de esta población de obesos mórbidos se puede utilizar como indicador de su tamaño, ya que se correlaciona con otros métodos que hemos utilizado (morfometría) para medir el diámetro; su relación con la intensidad de las lesiones hepáticas nos sugiere que podría considerarse como marcador indirecto de gravedad lesional, especialmente en su localización visceral.
- 2- Nuestros resultados respecto a la mayor concentración de las adipoquinas leptina y adiponectina en GBsub que en GBvis confirman los de estudios previos, aunque, si consideramos el sexo de los pacientes, solo es aplicable a la adiponectina en mujeres, lo que puede relacionarse con el efecto de algunas hormonas sobre esta adipoquina.
- 3- La expresión de CD68 en macrófagos de la grasa blanca tiene diferente significado según la metodología empleada para su detección; las dos técnicas utilizadas en este estudio son complementarias, ya que han permitido valorar su morfología y funcionalidad.
- 4- La densidad de macrófagos totales titulares y la concentración de la citoquina inflamatoria Il-6, más elevadas en grasa visceral que en la subcutánea, apoya su papel como cofactor etiopatogénico lesional hepático.
- 5- La densidad de coronas macrofágicas tisulares, superior en grasa subcutánea, junto con la mayor concentración de la molécula de adhesión CD11c a este nivel, creemos que podrían ser indicadores de mayor destrucción (recambio) de adipocitos en esta localización, lo que está condicionado por su tamaño, aunque también podrían contribuir al desarrollo de lesiones hepáticas.
- 6- Nuestro porcentaje de biopsias hepáticas en cada Categoría Diagnóstica lesional no representa su incidencia real en las dos áreas hospitalarias estudiadas, ya que la inclusión final de casos en este trabajo ha estado condicionada por la calidad de las biopsias junto con la disponibilidad de grasa del mismo paciente para estudio.
- 7- La separación de las biopsias hepáticas de pacientes con obesidad mórbida en Categorías Diagnósticas lesionales nos ha permitido reconocer un grupo de pacientes sin

esteatosis (Categoría 0) con un perfil clínico-metabólico característico (mujeres, sin diabetes ni hipertrigliceridemia y escaso porcentaje de casos con síndrome metabólico) que podría ser la contrapartida de los pacientes denominados en la literatura como obesos “metabólicamente sanos” (Lemieux et al., 2000), de los que se diferencian porque pueden mostrar HDLc alterada.

8-Debido a la alta prevalencia de algunas lesiones histológicas hepáticas (inflamación portal y la esteatosis multivesicular), en los pacientes obesos de nuestro entorno, podrían ser consideradas como una característica morfológica identificativa de este subgrupo etiopatogénico de EHGNA del adulto.

9- Aportamos una alta prevalencia en esta serie de dos subtipos de esteatohepatitis no alcohólica-“borderline” (Categorías 2B y 2C) caracterizados por afectación porto-periportal y centrozonal-portal, respectivamente, que son poco frecuentes en EHGNA del adulto.

10- Las biopsias hepáticas con fibrosis en Estadio 1 deberían separarse en otros dos que reflejan una topografía lesional diferente: centrozonal (1A+B) o portal/periportal (1C), ésta última es muy común en nuestros casos y se asocia con inflamación portal, lo que constituye otra característica diferencial de las biopsias hepáticas en los obesos de nuestro entorno.

11- El sexo de los obesos mórbidos en esta serie actúa como un factor adverso sobre las características histológicas hepáticas, ya que los varones muestran Categorías Diagnósticas lesionales más intensas y Estadios de fibrosis más avanzados que las mujeres, lo que puede ser parcialmente explicado por el mayor tamaño de los adipocitos en la grasa blanca visceral y el perfil de adipo-citoquinas liberadas en ella.

12- La comparación de las dos poblaciones de obesos mórbidos incluidas en el estudio no revela grandes diferencias clínico-patológicas que no puedan ser atribuidas al azar; algunas de las discrepancias observadas pueden ser explicadas por la calidad de preservación de determinadas biopsias.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2004; 40:475-83.

Anderson JM, Lowe J. Histometry and image analysis. En: Bancroft JD, Stevens A, eds. *Theory and practice of histological techniques*. London: Churchill Livingstone, 1990:597-618.

Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. *Diabetes-Metab Res* 2008; 24:595-603.

Angulo P. Non alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-31.

Angulo P. EHGNA, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 2006; 130:1848-52.

Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard J-P. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008;34:2-11.

Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B; Grupo Colaborativo SEEDO. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:460-6.

Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem*. 2010;110:564-72.

Arner P. Not all fat is alike. *Lancet*. 1998;351:1301-2.

Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrin Met*. 2003;14:137-45.

Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, Arner P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 2010;9:105-9.

Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, 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.

Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006;6:1-28.

Beymer C, Kowdley KV, Larson A, Edmonson P, Dellinger EP, Flum DR. Prevalence and predictors of asymptomatic liver disease in patients undergoing gastric bypass surgery. *Arch Surg* 2003;138:1240-4.

Brooks JSJ, Perosio PM. Adipose tissue. In: *Histology for Pathologists*. Mill SE Eds. 4th Ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2012, 179-210.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-52.

Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: ommon origins of a multifactorial disorder. *Postgrad Med J* 2009;85:614–21.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.

Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16.

Brunt EM . Non-alcoholic fatty liver disease. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD Editors. *MacSween's Pathology of the Liver* (5th ed.) London: Churchill Livingstone, Elsevier; 2007a, p.367-97.

Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Modern Pathol* 2007b;20(supl 1):S40-S8.

Brunt EM. What's in a Name? *Hepatology* 2009a;50:663-7.

Brunt EM. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2009b; 13:533-44.

Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Unalp A, Behling CE, Lavine JE, et al. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (EHGNA): a histologic marker of advanced EHGNA-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 2009;49:809-20.

Caballeria J, Rodés J. Esteatohepatitis no alcohólica. *Med Clin (Barc)* 2003;120:670-5.

Caballero T, Gila A, Sánchez-Salgado G, Muñoz de Rueda P, León J, Delgado S, Muñoz JA, Caba-Molina M, Carazo A, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Histological and immunohistochemical assessment of liver biopsies in morbidly obese patients. *Histol. Histopathol.* 2012; 27: 459-66.

Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Bar Hen A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clément K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 2006; 55:1554-61.

Carazo A, León J, Casado J, Gila A, Delgado S, Martín A, Sanjuan L, Caballero T, Muñoz JA, Quiles R, Ruiz-Extremera A, Alcázar LM, Salmerón J. Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase 1. *Obes Surg.* 2011; 21:492-500.

Carter-Kent C, Yerian LM, Brunt EM, Angulo P, Kohli R, Ling SC, et al. Nonalcoholic steatohepatitis in children: a multicenter clinicopathological study. *Hepatology* 2009; 50: 1113-20.

Carter S, Caron A, Richard D, Picard F. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging*. 2013;8:829-44.

Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:1175-83.

Chang YC, Chang TJ, Lee WJ, Chuang LM. The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism*. 2010;59:93-9.

Chen HC and Farese RV. Determination of adipocyte size by computer image analysis. *J Lipid Res* 2002;43:986-89).

Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:230-7.

Cinti S. Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. *Proc Nutr Soc*. 2009a Nov;68(4):340-9.

Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009b Nov;297(5):E977-86.

Cinti S. Between brown and white: Novel aspects of adipocyte differentiation *Annals of Medicine*, 2011;43:104–115.

Clark JM . The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006;40(3 Suppl 1):S5-10.

Clément K, Vignes S. Inflammation, adipokines et obésité. *Rev Med Interne* 2009; 30:824-32.

Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:545-63.

Czaja, MJ. Liver Injury in the Setting of Steatosis: Crosstalk Between Adipokine and Cytokine. *Hepatology* 2004, 40:19-22.

Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011; 32:307-14.

Day CP, James O. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology* 1998; 114:842–45.

Després JP. What is "metabolically healthy obesity"?: from epidemiology to pathophysiological insights. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:2283-5.

Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in the human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148:293-300.

Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100.

Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes* 2008;32:283–91.

Ducharme NA, Bickel PE. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 2008;149:942-9.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.

Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1093-103.

Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:124-8.

Federico A, D'Aiuto E, Borriello F, Barra G, Gravina AG, Romano M, De Palma R. Fat: a matter of disturbance for the immune system. *World J Gastroenterol*. 2010; 16:4762-72.

Flier JS, Maratos-Flier E. Biología de la obesidad. En: *Harrison Principios de Medicina Interna*, (Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, Eds). 17ª edición, cap. 74, 2007 [<http://www.harrisonmedicina.com> ]

Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006;39:7-20.

Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280:E827-47.

Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol*. 2008;456:1-22.

Frühbeck G, Becerril S, Sáinz N, Garrastachu P, García-Velloso MJ. BAT: a new target for human obesity? *Trends Pharmacol Sci*. 2009; 30:387-96.

Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, Naruko T, Itabe H, Kawada N, Caldwell SH, Ueda M. Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:893-901.

Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinonara Y. Lipid droplets : a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 2008; 130:263-279.

García-Monzón C, Martín-Pérez E, Iacono O, Fernández-Bermejo M, Majano P, Apolinario A, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000;33:716-24.

Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health (NIH) consensus development conference statement 1991 March 25-27;9(1). *Am J Clin Nutr* 1992;55(2 Suppl):615S-19S.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010; 327:656-61.

Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131:242-56.

Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol*. 1998;149:685-8.

Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006; 354:2552-63.

Guo Y, Cordes KR, Farese RV Jr, Walther TC Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci*. 2009; 122:749-752.

Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1995;1:953-6.

Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klöting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:2240-7.

Hernandez-Morante JJ, Milagro FI, Lujan JA, Martinez JA, Zamora S, Garaulet M. Insulin effect on adipose tissue (AT) adiponectin expression is regulated by the insulin resistance status of the patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 69:412-417.

Hosoi T, Ozawa K. Possible involvement of endoplasmic reticulum stress in obesity associated with leptin resistance. *J Med Invest.* 2009;56:296-8.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-7.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.

Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG, Hauner H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res.* 1996;28:690-3

Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 2006;49:450-65.

Iglesias MJ, Eiras S, Piñeiro R, López-Otero D, Gallego R, Fernández AL, Lago F, González-Juanatey JR. Gender differences in adiponectin and leptin expresión in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery. *Rev Esp Cardiol.* 2006;59:1252-60.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006;116:1784-92.



Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res.* 2010;51:468-71.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.

Larter CZ, Farrell GC. Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat?. *J Hepatol* 2006;44:253-61.

Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Alméras N, Bergeron J, Gaudet D, Tremblay G, Prud'homme D, Nadeau A, Després JP. Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation.* 2000;102:179-84.

Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998;21:2191-2.

Liew PL, Lee WJ, Lee YC, Wang HH, Wang W, Lin YC. Hepatic histopathology of morbid obesity: concurrence of other forms of chronic liver disease. *Obes Surg* 2006;16:1584-93.

Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol* 2001;35:568-74.

Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; 45, 600-6.

Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008;48:670-8.

Maher JJ. Trunk fat as a determinant of liver disease. *Gastroenterology*. 2010; 138:1244-6.

Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in EHGNA progression. *J Mol Med* 2009;87:679-95.

Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-5.

Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009;50:957-69.

Martinez-Pomares L, Platt N, McKnight AJ, da Silva RP, Gordon S. Macrophage membrane molecules: markers of tissue differentiation and heterogeneity. *Immunobiology*. 1996;195:407-16.

Monga SPS, Behari J. Molecular basis of liver diseases. In: Coleman WB, Tsongalis GJ eds. *Molecular Pathology. The molecular basis of human diseases*. London: Elsevier; 2009, p.395-419.

Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:63-70.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958-969.

Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, Mancini E, Marchetti G, Bonotti A, et al. Pattern of expression of adiponectin receptors in human liver and its relation to nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2009;19:467-74.

Newschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006;295:1549-55.

Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y, Fujita A, Fujimoto T. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791:399-407.

Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72:219-46.

Olofsson S-O, Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Borén J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1791:448-458.

Ong JP, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2005;15:310-5.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:85-97.

Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005;42:928-40.

Rabinowitz SS, Gordon S. Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med*. 1991;174:827-36.

Rahmouni K, Haynes WG. Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins. *Bioessays* 2001;23:1095-9.

Ramesh S, Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2005;42(supl 1):S2-S12.

Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ.

Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791:408-18.

Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucosa homeostasis. *Nature* 2006;444:847-53.

Ross MH, Pawlina W. Tejido adiposo. En: *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5ª Ed., Panamerica: Madrid, 2007, 258-267.

Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:46-53.

Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005; 2: 103-11.

Schäffler A, Schölmerich J, Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol*. 2007; 28:393-9.

Schernthaner G, Morton JM. Bariatric surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31(Suppl 2):S297-S302.

Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ et al. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:641-9.

Shelley-Fraser G, Borley NR, Warren BF, Shepherd NA. The connective tissue changes of Crohn's disease. *Histopathology*. 2011 Oct 18. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03911.x. [Epub ahead of print]

Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, Nakamura S, Nabemoto S, Takeshita Y, et al. Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism*. 2007;56:1478-85.

Shimizu M, Tanaka T, Moriwaki H. Obesity and hepatocellular carcinoma: targeting obesity-related inflammation for chemoprevention of liver carcinogenesis. *Semin Immunopathol.* 2013;35:191-202.

Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* 2001;345:1345-6.

Simpson F, Whitehead JP. Adiponectin--it's all about the modifications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:785-8.

Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology.* 2010;51:1820-32.

Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, Vuppalanchi R, Cummings OW, Unalp-Arida A, Wilson LA, Chalasani N; NASH Clinical Research Network (NASH CRN). Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2011;55:654-9.

Tchoukalova YD, Harteneck DA, Karwoski RA, Tarara J, Jensen MD. A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *J Lipid Res.* 2003;44:1795-801.

Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:291-302.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;6:772-83.

Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010; 5:145-71.

Tordjman J, Poitou C, Hugol D, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K. Association between omental adipose tissue macrophages and liver

histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol.* 2009; 51:354-62.

Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm.* 2009:831670. Epub 2009 Jun 3  
[ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753129>].

Valenti L, Fracanzani AL, Fargion S. The immunopathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: two triggers for one disease ?. *Semin Immunopathol* 2009;31: 359-69.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21:697-738.

Walther TC, Farese RV Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791:459-66.

Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J.* 2008; 409:623-33.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1785-8.

Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE, Harrison LC. Pro-Inflammatory CD11c<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> Adipose Tissue Macrophages Are Associated With Insulin Resistance in Human Obesity. *Diabetes* 2010;59:1648–56.

Wolf G. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev.* 2007; 65:251-6.

Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta.* 2013; 417:80-4.

Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005; 436:356-62.

Yang X, Smith U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia* 2007; 50:1127-39.

Ye R, Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? *Mol Metab.* 2013; 2:133-141.

Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007;128:837-47.

Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Eng J Med* 2004;351:1106

Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 2007; 15; 112:61-7.

Zimmet P, Alberti K, Serrano Ríos M. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Rev Esp Cardiol* 2005; 58:1371-6.