



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**FACTORES ASOCIADOS A ESTEATOSIS HEPÁTICA
DIAGNOSTICADA POR ECOGRAFÍA EN NIÑOS Y
ADOLESCENTES OBESOS**

Ángela Salmerón Ruiz

Granada, 17 de diciembre de 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Ángela Salmerón Ruiz

ISBN: 978-84-9125-437-9

URI: <http://hdl.handle.net/10481/41766>



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**FACTORES ASOCIADOS A ESTEATOSIS HEPÁTICA
DIAGNOSTICADA POR ECOGRAFÍA EN NIÑOS Y
ADOLESCENTES OBESOS**

Ángela Salmerón Ruiz

Granada, 17 de diciembre de 2015

A mis padres

FACTORES ASOCIADOS A ESTEATOSIS HEPÁTICA DIAGNOSTICADA POR ECOGRAFÍA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS

Tesis Doctoral presentada por Ángela Salmerón Ruiz para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

Directores de Tesis

Dra. **ÁNGELES RUIZ EXTREMERA**, Profesora Titular de Pediatría del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Dr. **FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Dr. **ANGEL CARAZO GALLEGO**, Técnico Superior de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la doctorando Ángela Salmerón Ruiz en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio y concluida el 11 de noviembre de 2015.

Fdo. Ángela Salmerón Ruiz

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Dra. ÁNGELES RUIZ EXTREMERA, PROFESORA TITULAR DE PEDIATRÍA DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

CERTIFICA: Que la presente Tesis, titulada "**FACTORES ASOCIADOS A ESTEATOSIS HEPÁTICA DIAGNOSTICADA POR ECOGRAFÍA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS**", de la que es autora Dña. Ángela Salmerón Ruiz, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 11 de noviembre de 2015.

Fdo. Dra. Ángeles Ruiz Extremera

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

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

CERTIFICA: Que la presente Tesis, titulada **"FACTORES ASOCIADOS A ESTEATOSIS HEPÁTICA DIAGNOSTICADA POR ECOGRAFÍA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS"**, de la que es autora Dña. Ángela Salmerón Ruiz, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 11 de noviembre de 2015.

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

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

CERTIFICA: Que la presente Tesis, titulada **“FACTORES ASOCIADOS A ESTEATOSIS HEPÁTICA DIAGNOSTICADA POR ECOGRAFÍA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS”**, de la que es autora la Dña. Ángela Salmerón Ruiz, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 11 de noviembre de 2015.

Fdo. Dr. Ángel Carazo Gallego

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis directores de tesis Ángeles Ruíz Extremera, Javier Salmerón y Ángel Carazo por su inmensa paciencia durante este largo tiempo, y por despertar en mi el interés en la investigación. He aprendido a ser sistemática, a aplicar la lectura y el método científico a los problemas clínicos. Su ejemplo, dedicación y ánimo han sido fundamentales para llevar a cabo este trabajo.

A Alejandro Goicoechea Vera y a Juan Manuel Fernández por la ayuda a la hora de reclutar a los pacientes. A Maximiliano Garofano, radiólogo infantil, por la paciencia y dedicación a este trabajo. Al grupo de investigación CTS-227, por su participación en las determinaciones analíticas y elaboración de resultados.

Quiero mencionar a todos los miembros del Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, por compartir con vosotros el día a día de mi vida personal y profesional, por haberme enseñado tanto sobre la especialidad de forma tan generosa, y por haberme inculcado el concepto precioso y clásico de la visión clínica de la medicina.

Me gustaría dedicar un agradecimiento especial a mis padres y hermana por su cariño y comprensión durante todos los años de mi vida. A ellos les debo la visión de entrega a mi profesión y el procurar estar al servicio de mis pacientes.

A Iñaki, al pequeño Iña y a Olivia por todo su amor.

A todos los niños y sus familias, sin ellos esta tesis no tendría sentido

Abreviaturas

- 4-HNA: Hidroxinonenal
- AdipoR: Receptores Transmembrana de la Adiponectina
- AGL: Ácidos Grasos Libres
- ALT: Alanino Aminotransferasa
- AMA: Anticuerpor Antimitocondriales
- AMPK: Adenosin Monofosfato Protein Kinasa
- ANA: Anticuerpos Antinucleares
- APO C3: Apolipoproteína C3
- AST: Aspartato Aminotransferasa
- AVENA: Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes
- CEH: Células Estrelladas Hepáticas
- CMV: Citomegalovirus
- COX-2: Ciclooxygenasa Inducible por Citoquinas
- DC: Células Dendíticas
- DHEAS: Sulfato de Dehidroepiandrosterona
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- EHGNA: Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico
- EHNA: Esteatohepatitis No Alcohólica
- eNOS: Endotelial Óxido Nítrico Sintetasa
- ERNS: Especies Reactivas de Nitrógeno
- EROS: Especies Reactivas de Oxígeno
- GGT: Gamma Glutamil Transferasa
- GPx: Glutation Peroxidasa
- GRD: Glutation Reductasa
- GSH: Glutation Reducido
- GSSG: Glutation Oxidado
- GWAS: Genome Wide Association Studies
- H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
- HB: Hemoglobina
- HDL: Lipoproteínas de Alta Densidad
- HOMA: Índice de Evaluación del Modelo Homeostático
- IDF: Federación Internacional de Diabetes
- IL-1 β : Interleuquina-1 β
- IL-6: Interleuquina 6
- IMC: Índice de Masa Corporal
- INF γ : Interferon γ
- iNOS: Inducible Óxido Nítrico Sintetasa
- IOFT: International Obesity Task Force
- JAK2: Janus Activated Kinases
- KC: Células de Kupffer
- LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad

- MCP-1: Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1
- MDA: Malonildialdehído
- NADPH: Nicotin Adenina Dinucleótido Fosfato Reducida
- NHANES: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
- NNMT: Nicotinamida N Metil Transferasa
- nNOS: Neuronal Óxido Nítrico Sintetasa
- NO: Óxido Nítrico
- NOS: Óxido Nítrico Sintetasa
- O₂^{•-}: Anión Radical Superóxido
- ObR: Receptores Específicos de la Leptina
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ONOO⁻: Peroxinitrito
- PAD: Presión Arterial Diastólica
- PAS: Presión Arterial Sistólica
- PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
- PUFAs: Ácidos Grasos Poliinsaturados
- QTL: Quantitative Trait Loci
- RI: Resistencia a la Insulina
- RL: Radicales Libres
- ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
- SLR: Receptor Soluble de Leptina
- SM: Síndrome Metabólico
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SNP: Polimorfismo de Nucleótidos
- SOCS3: Supresores de la Señal de las Citoquinas 3
- SOD: Superóxido Dismutasa
- SRABP-1: Sterol Regulatory Element Binding Protein
- STAT: Signal Transducer Activators of Transcription
- sTNF α -R: Forma Soluble del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral α
- T3: Tiroxina
- T4: Triyodotiroinina
- TAB: Tejido Adiposo Blanco
- TG: Triglicéridos
- TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α
- TSH: Hormona Estimulante del Tiroides
- UCP3: Proteína Desacoplante Mitocondrial 3
- VHA: Virus de la Hepatitis A
- VHB: Virus de la Hepatitis B
- VHC: Virus de la Hepatitis C
- VLDL: Lipoproteínas de Muy Baja Densidad

Índice

1	INTRODUCCION.....	1
1.1	OBESIDAD	3
1.1.1	CONCEPTO DE OBESIDAD	3
1.1.2	ÍNDICE DE MASA CORPORAL O ÍNDICE QUELETET	6
1.1.3	PREVALENCIA DE OBESIDAD.....	6
1.1.4	ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD	10
1.1.5	INFLUENCIA DE LA OBESIDAD INFANTIL Y EN LA ADOLESCENCIA EN LA SALUD.....	13
1.2	RESISTENCIA A LA INSULINA Y SÍNDROME METABÓLICO EN NIÑOS Y ADOLESCENTES	14
1.2.1	CONCEPTOS	14
1.2.2	CUANTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA.....	17
1.2.3	COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A LA INSULINA (TABLA 3).....	18
1.3	TEJIDO ADIPOSO.....	20
1.3.1	ADIPOCITOQUINAS PRINCIPALES.....	24
1.4	ESTRÉS OXIDATIVO	35
1.5	ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHOLICA.....	39
1.5.1	CARGA GENÉTICA EN LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHOLICA	42
1.5.2	OTROS FACTORES ETIOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DE EHGNA	44
1.5.3	CLÍNICA DE EHGNA EN NIÑOS	51
1.5.4	DIAGNÓSTICO	51
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1	HIPÓTESIS.....	59
2.2	OBJETIVOS	59
2.2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	59
2.2.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	59

3	PACIENTES Y MÉTODOS	61
3.1	PACIENTES	63
3.1.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	63
3.1.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	64
3.2	MÉTODOS	64
3.2.1	METODOLOGÍA CLÍNICA	64
3.2.2	RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS	66
3.2.3	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	69
3.2.4	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	69
4	RESULTADOS.....	71
4.1	ANÁLISIS DESCRIPTIVO	73
4.1.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES.....	73
4.1.2	ANTECEDENTES PERINATALES Y TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA OBESIDAD	73
4.1.3	INSULINA, ÍNDICE HOMA Y PÉPTIDO C	74
4.2	ANÁLISIS BIVARIANTE	74
4.2.1	ANÁLISIS DE PARÁMETROS ESTUDIADOS EN TODOS LOS PACIENTES Y EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES	74
4.2.2	ESTUDIO DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA	77
4.2.3	INDICE HOMA Y ESTEATOSIS EN RELACIÓN A LA EDAD Y EL SEXO.....	79
4.2.4	ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	80
4.2.5	ESTUDIO DE TRANSAMINASAS.....	81
5	DISCUSION.....	87
6	CONCLUSIONES.....	95
7	ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES	99
7.1	ARTÍCULOS.....	101
7.2	COMUNICACIONES	101
8	BIBLIOGRAFÍA.....	103

Índice de figuras

- **FIGURA 1. ACCION DE LA INSULINA.....15**
- **FIGURA 2. CLASIFICACIÓN DE ADIPOQUINAS SEGUN SUS PRINCIPALES ACCIONES.....22**
- **FIGURA 3. ADIPOCITOQUINAS PRINCIPALES.....24**
- **FIGURA 4. ADIPONECTINA Y SU ESTRUCTURA.....31**
- **FIGURA 5. TEORÍA DEL DOBLE IMPACTO.....41**
- **FIGURA 6. PROGRESIÓN HGNA A EHNA.....42**
- **FIGURA 7. LIPOTOXICIDAD.....46**
- **FIGURA 8. INDICE HOMA EN RELACIÓN AL SEXO, EDAD Y ESTEATOSIS.....81**

Índice de tablas

- **TABLA 1. OBESIDAD INFANTIL.....8**
- **TABLA 2. PREVALENCIA SOBREPESO POR 100 HABITANTES.....9**
- **TABLA 3. COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A LA INSULINA.....19**
- **TABLA 4. EXPRESION DE ADIPOQUINAS EN TEJIDO CELULAR SUBCUTANEO Y GRASA VISCERAL.....21**
- **TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS.....75**
- **TABLA 6. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO SISTÉMICO, CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ADIPOQUINAS EN NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS...76**
- **TABLA7. CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS Y LA PRESENCIA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA..... 78**
- **TABLA 8. RESULTADOS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ADIPOQUINAS EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS Y PRESENCIA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA.....79**
- **TABLA 9. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y AUMENTO DE LA ALT.....82**
- **TABLA 10. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LAS CARACTERÍSTICA CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y ALT.....83**
- **TABLA 11. ESTRÉS OXIDATIVO Y ALT NORMAL Y AUMENTADA.....83**
- **TABLA 12. CITOQUINAS Y ADIPOQUINAS SEGÚN ALT NORMAL O AUMENTADA.....84**
- **TABLA 13. RESULTADOS DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS Y SEXO EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS SEGÚN ALT NORMAL O AUMENTADA.....85**
- **TABLA 14. RESULTADOS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ADIPOQUINAS EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS SEGÚN ALT NORMAL O AUMENTADA.....86**

1 INTRODUCCION

1.1 OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial, fruto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente

La obesidad infantil predispone a alteraciones del metabolismo hidrocarbonado (resistencia a la insulina y diabetes tipo 2), hipertensión, hiperlipemia, enfermedad hepática y renal y disfunción reproductiva. Esta condición incrementa el riesgo de obesidad en la vida adulta y de enfermedad cardiovascular[1].

La obesidad infantil es un trastorno complejo. Su prevalencia ha aumentado de manera tan significativa en los últimos años, que muchos lo consideran uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES) indica que la prevalencia de la obesidad está aumentando en todos los grupos de edad pediátrica, en ambos sexos, y en diversos grupos étnicos y raciales. Muchos factores, incluyendo la genética, el medio ambiente, el metabolismo, estilo de vida y hábitos alimenticios, se cree que desempeñan un papel en el desarrollo de la obesidad. Sin embargo, más del 90% de los casos son idiopáticos, menos del 10% se asocian a causas hormonales o genéticas.

1.1.1 CONCEPTO DE OBESIDAD

El concepto intuitivo de obesidad es la acumulación excesiva de tejido adiposo que conduce a un incremento en el riesgo presente y futuro de padecer patologías asociadas, así como de mortalidad[2]. Debido a que las complicaciones médicas graves de la obesidad, son menos comunes en niños y adolescentes que en adultos, y debido también a que los datos longitudinales sobre la relación entre el peso de la infancia y la morbilidad y mortalidad de adultos son más difíciles de interpretar, no existe una definición única y universal de la obesidad en la infancia y la adolescencia[1].

La cuantificación del contenido graso corporal del niño, necesaria para la definición de obesidad, puede ser realizada de forma directa y precisa mediante técnicas específicas (bioimpedanciometría, densitometría de absorción dual de rayos X (DEXA) o hidrodensitometría)[3]. Sin embargo, su limitada disponibilidad, duración y coste económico han hecho que, desde la perspectiva clínica, se universalice la estimación directa del contenido graso corporal mediante el empleo del índice de masa corporal (IMC) o índice Queletet[2].

Antes se definía la obesidad en niños y adolescentes cuando el peso partido por el peso medio para cada talla y sexo excedía de 120%, según gráficas británicas o americanas. Actualmente se define en función del IMC. Algunos investigadores han utilizado los términos sobrepeso, obesidad y obesidad mórbida para referirse a los niños y adolescentes cuyos pesos superiores a los esperados para las alturas en un 20%, 50% y 80-100%, respectivamente.

Los valores normales de IMC varía con la edad, sexo y estado puberal. En Estados Unidos definen la obesidad a partir del percentil 95 para el IMC en la infancia y la adolescencia de las gráficas de Must (obtenidas del estudio NHANES I “1er Estudio de Nutrición y Salud Nacional” y recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS)) o de las del centro para la prevención de enfermedades (CDC), basadas en los 5 estudios NHANES I a V realizados en Estados Unidos[4]. Estas tablas se han generado utilizando datos de la NHANES 1988-1994[5]. Mediante consenso de comités de expertos han recomendado que los niños y los adolescentes se consideran con sobrepeso u obesidad si el IMC supera el percentil 85 o 95, en las curvas generadas a partir de la 1963-1965 y 1966-1970 NHANES, o superior a 30 kg/m² a cualquier edad[6].

En Europa este umbral definitorio de obesidad sería el percentil 97 de las gráficas francesas de Rolland-Cachera (recomendadas por el Grupo Europeo de Obesidad Infantil)[4].

Tratando de unificar criterios en todo el mundo, la IOTF (*Internacional Obesity Task Force*) consiguió reunir a casi 200.000 niños y jóvenes de 0 a 25 años de edad mezclando seis estudios nacionales de diversos continentes (Estados

Unidos, Brasil, Reino Unido, Holanda, Hong Kong y Singapur) y se diseñaron las curvas de centiles para cada estudio que a la edad de 18 años pasaran por 25 y 30 kg/m², límites de definición de sobrepeso y obesidad en adultos. Las seis curvas se promediaron para obtener los puntos de corte específicos para cada sexo y edad de 2 a 18 años que definieran obesidad y sobrepeso en la infancia y adolescencia[7].

En nuestro medio, la Guía de Práctica Clínica para la Prevención y Tratamiento de la Obesidad Infanto-juvenil¹ postula como criterios para definir el sobrepeso y la obesidad los valores de los percentiles 90 y 97, respectivamente, específicos por edad y sexo de la distribución del IMC referido a los datos y curvas de Hernández et al del año 1988².

Existe evidencia de que un niño presenta un exceso de grasa corporal cuando su IMC supera el percentil 95 para su edad y sexo[8] y de que su definición óptima se obtiene aplicando, de forma más restrictiva, el punto de corte de +2 DE por encima del valor medio de este parámetro estimado en individuos de la misma población, edad y sexo[9], coincidiendo así con la propuesta de la OMS[10]. Teniendo en cuenta que el establecimiento de comorbilidades asociadas a la obesidad ocurre, con frecuencia, en etapas posteriores de la vida, tampoco existe consenso actualmente sobre la definición del concepto de obesidad mórbida en la infancia y adolescencia, proponiendo algunos autores los límites de +3 SDS de IMC o 200% del peso corporal ideal para la talla como posibles «puntos de corte» para definirla[2].

¹ Grupo de trabajo de la guía sobre la prevención y el tratamiento de la obesidad infantojuvenil. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinador. Guía de practica clínica sobre la prevención y el tratamiento de la obesidad infantojuvenil. Madrid: Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agencia d'íAvaluació de Tecnologia i Recerca Mediques; 2009. Guía de practica clínica: AATRM N.º 2007/25.

² Hernandez M, Castellet J, Narvaiza JL, Rincon JM, Ruiz I, Sanchez E, et al. In: Hernandez M, Fundacion F, Orbegozo, editors. *Curvas y tablas de crecimiento*. Madrid: Editorial Garsi;1988

1.1.2 ÍNDICE DE MASA CORPORAL O ÍNDICE QUELETET

El IMC, aunque es una medida imperfecta, refleja de forma continua la grasa corporal. Calculado como el peso (kg) dividido por la altura (m²), es indicativa, de forma fiable, del tamaño del cuerpo y puede ser fácilmente cuantificado en la clínica diaria. Muestra buena correlación con el contenido graso tanto en adultos como en niños[11],[12], si bien, su interpretación en términos de contenido graso corporal experimenta variaciones de acuerdo con el sexo, la edad, el grado de maduración en niños y adolescentes, siendo sus mayores limitaciones su incapacidad para discernir el grado de desarrollo de masa muscular y para informar respecto a la distribución del contenido graso entre los distintos depósitos corporales[4]. Pese a estas limitaciones, el empleo del IMC como estimación indirecta del contenido graso corporal es universal y, consecuentemente, la definición de obesidad, tanto en el adulto como en el niño, se ha formulado en relación a este índice. El IMC no ha sido utilizado constantemente o validado en niños menores de 2 años. Dado que el peso varía de forma continua en lugar de un modo gradual, la utilización de estos criterios arbitrarios es problemática y puede ser engañosa.

1.1.3 PREVALENCIA DE OBESIDAD

Es la enfermedad crónica más prevalente en la infancia y la adolescencia en los países occidentales. Constituye la epidemia del siglo XXI, como bien señala la OMS, debido a la intensidad con la que la incidencia y prevalencia del sobrepeso/obesidad se está incrementando en todos los rangos de edad, incluida la edad infantil [1, 13]. La OMS afirmó que en 2013 había 42 millones de niños con sobrepeso u obesidad en todo el mundo³.

³ <http://www.who.int/end-childhood/facts/es>

En Estados Unidos, país que lidera las cifras de prevalencia, el coste hospitalario anual por obesidad entre 6 y 17 años ha alcanzado los 127 millones de dólares.

El *National Health and Nutrition Examination Surveys* declaraba en 2012 (publicado en septiembre de 2014) una incidencia muy preocupante de obesidad en niños y adolescentes norteamericanos, estable desde 2009, existiendo una prevalencia de obesidad del 16.9% y de sobrepeso de 14.9%, existiendo diferencias por sexos (17,2 en niñas frente a 16,7 en niños en la prevalencia de obesidad), existiendo preferencia en determinadas razas, advirtiendo una cifra mayor de obesidad entre los negros mejicanos americanos, hispanos y raza negra no hispana[14].

En Europa se constata el mismo fenómeno, ya en 2005, el IOTF señalaba de forma clara a España e Inglaterra como los dos países desarrollados en donde más ha crecido y más crecerá la obesidad infantojuvenil en los próximos años.

En España, siguiendo los criterios del IOTF, se encuentra una de las prevalencias más altas de Europa, entre el 6 y el 15% según las regiones estudiadas. Según el estudio "enKid", que recoge niños de todas las comunidades españolas, la obesidad es más prevalente en el sexo masculino, entre 6 y 13 años de edad, en familias de menor nivel socioeconómico y educacional, hábitat urbano y sur de España (Andalucía y Canarias)[15]. Así lo han corroborado en un estudio realizado en Andalucía Oriental, en el que observan un 10% de niños por encima del percentil 97 del estudio enKid[16].

Asimismo, el estudio AVENA (Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes), desarrollado en el periodo 2000-2002 sobre una muestra de 2.320 adolescentes con edades comprendidas entre los 13 y los 18 años, demostró una prevalencia de sobrepeso mas obesidad del 25,7% y 19,1% en varones y mujeres, respectivamente[17].

Según el informe anual del Sistema Nacional de Salud 2012 (revisado en junio de 2015) se estima que la prevalencia de obesidad infantil (2 a 17 años), se ha mantenido relativamente estable desde 1987. Un 27,8% de esta población

padece obesidad o sobrepeso. De cada 10 niños 1 presenta obesidad y 2 sobrepeso, con proporción similar en ambos sexos y sin diferencias sustanciales respecto a 2006⁴ (frente al 4,9% de obesidad reportado por el estudio PAIDOS en el año 1984). Andalucía es la cuarta comunidad autónoma con mas prevalencia de sobrepeso infantil por cada 100 habitantes, con un ligero predominio en hombres.

Tabla 3. OBESIDAD INFANTIL

POBLACIÓN INFANTIL	AMBOS SEXOS	NIÑAS	NIÑOS
Normopeso/peso insuficiente	72.2%	73.5%	71%
Sobrepeso	18.3%	16.9%	19.5%
Obesidad	9.6%	9.6%	9.6%
OBESIDAD INFANTIL. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad/Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Salud de España, 2011/2012 (2013)			

⁴ Encuesta Nacional de Salud de España 2012. Ministerio de Sanidad y Consumo. Gobierno de España <http://www.mssi.gob/estadEstudios/edtadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/infSNS2012.pdf>

Tabla 4. PREVALENCIA SOBREPESO POR 100 HABITANTES (2 A 17 AÑOS)

2011			
	TOTAL	HOMBRES	MUJERES
Baleares	26.5	22.8	29.9
País Vasco	25.5	25.9	25
Galicia	23.8	27	20.3
Andalucía	21.3	24.2	18.4
Canarias	20.6	21.3	19.9
Castilla y León	20.3	20.9	19.6
Extremadura	19.8	15.9	23.5
Castilla la Mancha	19.6	20.7	18.4
España	18.3	19.5	16.9
Melilla	18	18.6	17
Asturias	17.2	15.2	19.9
Comunidad Valenciana	16.2	16.8	15.7
Madrid	16.2	17.8	14.6
Navarra	15.8	15.5	16.2
Murcia	15.1	19.2	9.8
Cataluña	14.4	15.1	13.6
Aragón	13.4	11.4	15.6
La Rioja	12.4	16.4	8.2
Cantabria	9.6	13.4	5.3
Ceuta	7.9	14	0
OBESIDAD INFANTIL. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad/Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Salud de España, 2011/2012 (2013)			

Estos datos, junto con el sustancial gasto sanitario atribuido a la obesidad y a sus patologías derivadas (estimado por el Ministerio de Sanidad y Consumo en el año 2012 en un 7% del gasto sanitario anual) han determinado la puesta en marcha de diversas iniciativas orientadas a la prevención y a la intervención terapéutica precoz en el niño afectado de obesidad, como fue la elaboración de

Guía de Práctica Clínica para prevención y el tratamiento de la obesidad infantojuvenil[8].

1.1.4 ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

Una de las dificultades más importantes para el adecuado entendimiento de la obesidad infantil es que, bajo el denominador común de una acumulación excesiva de grasa corporal, subyacen etiologías y, por lo tanto, entidades patológicas radicalmente diferentes. El gran incremento de prevalencia de la obesidad infantil es debido al desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético propio del estilo de vida occidental. Sin embargo, existe un porcentaje de casos derivados de la existencia de alteraciones genéticas, endocrinológicas o sindrómicas subyacentes que, si bien es cuantitativamente limitado, crece de forma continuada al tiempo que lo hacen nuestros conocimientos fisiopatológicos de la obesidad infantil[2].

1.1.4.1 OBESIDAD EXÓGENA O COMÚN

La más frecuente de las entidades englobadas en la obesidad infantil. En ella, la coexistencia de una nutrición hipercalórica, con desequilibrios energéticos positivos durante periodos de tiempo (se estima que el desequilibrio debe rondar las 100/200 kcal/día en los niños[18]) e inadecuadamente estructurada (relación proteína-energía alterada, alimentación suplementada con aditivos tales como carbohidratos o grasas sin aumentar la proporción de proteínas) y de unos niveles reducidos de actividad física, propios del estilo de vida occidental actual, influidos a su vez por el poder adquisitivo de las familias[19], son determinantes. No obstante, existen estudios recientes que afirman que la vida sedentaria en la población infantil puede ser consecuencia de la obesidad y no causa (debido a la existencia de asociación mediante estudios transversales

que no implican causalidad), hallazgos que se derivan del poco impacto en la reducción de la obesidad con el cambio de actividad física incluso se cuestionan el papel de la actividad física como estrategia de prevención en la población infantil[20].

Se considera que existen determinados periodos críticos (intrauterino, neonatal, primeros meses de vida y adolescencia) en donde un cambio nutricional o en la dieta, puede tener efectos sobre la composición corporal y la función metabólica (aumento de peso, adipogénesis, hiperinsulinemia y expresión de genes obesogénicos)[21].

Se ha relacionado también con el destete precoz (destetados a los alimentos sólidos a los 4 meses)[22].

McGavock et al[23] demostraron que una baja capacidad cardiorrespiratoria y si esta baja actividad es continuada en el tiempo, se asocian significativamente con el aumento de peso y el riesgo de sobrepeso en niños de 6-15 años. El análisis de una cohorte de 902 niños en edad escolar mostró una mayor circunferencia de la cintura y desproporcionado aumento de peso durante 12 meses de seguimiento en aquellos niños con baja actividad cardiorrespiratoria. Los niños que reunían estas condiciones tenían 3,5 veces mayor riesgo de tener sobrepeso y era un factor independiente asociado a incremento del IMC.

Se ha sugerido también que la falta de sueño adecuado en los niños pequeños se asocia con el aumento del IMC. Esta observación es independiente de otras variables de confusión (por ejemplo, la actividad física)[24].

No todos los sujetos expuestos al mismo ambiente nutricional «obesogénico» y a similares limitaciones de actividad física desarrollan obesidad o lo hacen en similar grado. Esto es debido a que estos factores «exógenos» actúan sobre una base «endógena», la información genética propia de cada individuo, lo cual explicaría, al menos en parte, la gran heredabilidad familiar de la obesidad[25].

En los últimos años, los estudios de GWAS (Genome Wide Association Studies), que podríamos traducir como «estudios hologenómicos de asociación», han perseguido, mediante el estudio de extensas cohortes de sujetos afectados de

distintas patologías, hallar nuevos genes, QTL (quantitative trait loci) o haplotipos que permitan una mejor identificación del riesgo individual para el desarrollo de dichas enfermedades[26]. De acuerdo con la 12^a actualización del mapa genético para la obesidad publicada, existen 253 quantitative trait locus (QLT) para esta patología[27].

1.1.4.2 OBESIDAD MONOGÉNICA

Es consecuencia de la alteración de un único gen, ya sea por deficiencia, delección o mutación. Constituyen una minoría dentro de la población obesa infantil, siendo muy intensa y de inicio precoz. Se pueden sistematizar en tres grandes categorías:

- Patología en genes del sistema adipocito-hipotalámico (eje leptina-melanocortina).
- Receptor gamma para sustancias proliferadoras de peroxisomas-subunidad número 3, músculo-específica, de la fosfatasa 1.
- Patología en los genes asociados con el desarrollo del hipotálamo[2].

1.1.4.3 OBESIDAD ASOCIADA A SÍNDROMES POLIMALFORMATIVOS

Aunque existen múltiples síndromes polimalformativos asociados a la obesidad, los que con mayor frecuencia la presentan son los siguientes:

- Síndrome de Prader-Willi
- Pseudo hipoparatiroidismo
- Síndrome de Laurence-Moon-Biedl (Bardet-Biedl)
- Síndrome de Cohen
- Síndrome de Down
- Síndrome de Turner

1.1.4.4 OTRAS CAUSAS

Existen múltiples situaciones clínicas que condicionan obesidad, así como ciertos tratamientos con capacidad obesogénica.

Trastornos hormonales:

- Déficit de hormona de crecimiento
- Resistencia a hormona de crecimiento
- Hipotiroidismo
- Deficiencia de leptina o resistencia
- Exceso de glucocorticoides (Síndrome de Cushing)
- Pubertad precoz
- Síndrome de ovario poliquístico
- Tumores secretores de prolactina

Tratamientos

- Cortisol y glucocorticoids
- Sulfonil-ureas
- Antidepresivos tricíclicos
- Anticonceptivos orales
- Insulina
- Risperidona

1.1.5 INFLUENCIA DE LA OBESIDAD INFANTIL Y EN LA ADOLESCENCIA EN LA SALUD

Un niño obeso tiene un 80% de posibilidades de ser obeso a los 35 años. Esta predisposición, conocida como *"tracking"*, es más evidente en varones, obesos severos y antecedentes de obesidad en padres. A medida que aumenta la edad el riesgo se incrementa, así, un niño obeso de 5 a 9 años será un adulto obeso en

un 69% de los casos, si es obeso entre 10 y 14 años llega a tener un 83% de posibilidades[28].

El adolescente con sobrepeso, independientemente de su índice de masa corporal en la edad adulta (incluso en el caso de que adelgazara), tiene un riesgo relativo de 1,8 de mortalidad de cualquier causa y de 2,3 de causa cardiovascular entre los 68 y 73 años con respecto al adolescente con peso normal. El sobrepeso es predictor de riesgo para la salud sobre todo en la adolescencia, más que en la edad adulta[1].

Entre las complicaciones descritas de la obesidad, que ya se ponen de manifiesto en la infancia, destaca el síndrome metabólico, el síndrome de apnea del sueño, el asma, la colelitiasis, los problemas ortopédicos, los problemas psicológicos y la discriminación social y escolar. A los 6 años el niño ya ha captado el mensaje social de que ser gordo es malo[29].

1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA Y SÍNDROME METABÓLICO EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

1.2.1 CONCEPTOS

Como consecuencia del exceso de tejido adiposo es posible objetivar toda una serie de alteraciones en los diferentes órganos y sistemas.

La complicación metabólica más importante es el síndrome de resistencia a la insulina (RI) definido como la incapacidad de la insulina plasmática para, en concentraciones habituales, promover la captación periférica de glucosa, suprimir la gluconeogénesis hepática e inhibir la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lo que ocasiona un aumento de la producción de insulina, necesaria para mantener la homeostasis de la glucosa, que puede derivar en una intolerancia a los hidratos de carbono e, incluso, en una Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) cuando esta capacidad compensadora fracasa (FIG. 1).

La sensibilidad a la insulina varía entre una y diez veces en los sujetos sanos. Un 50% aproximadamente de esta variabilidad puede atribuirse a hábitos de vida (alimentación y actividad física) y el otro 50% a características genéticas. Las diferencias étnicas son también importantes, siendo la población de origen europeo la más sensible a la insulina. El sobrepeso y la obesidad (sobre todo la central) se asocian con resistencia a la insulina, aunque puede darse también en sujetos con peso normal[30].

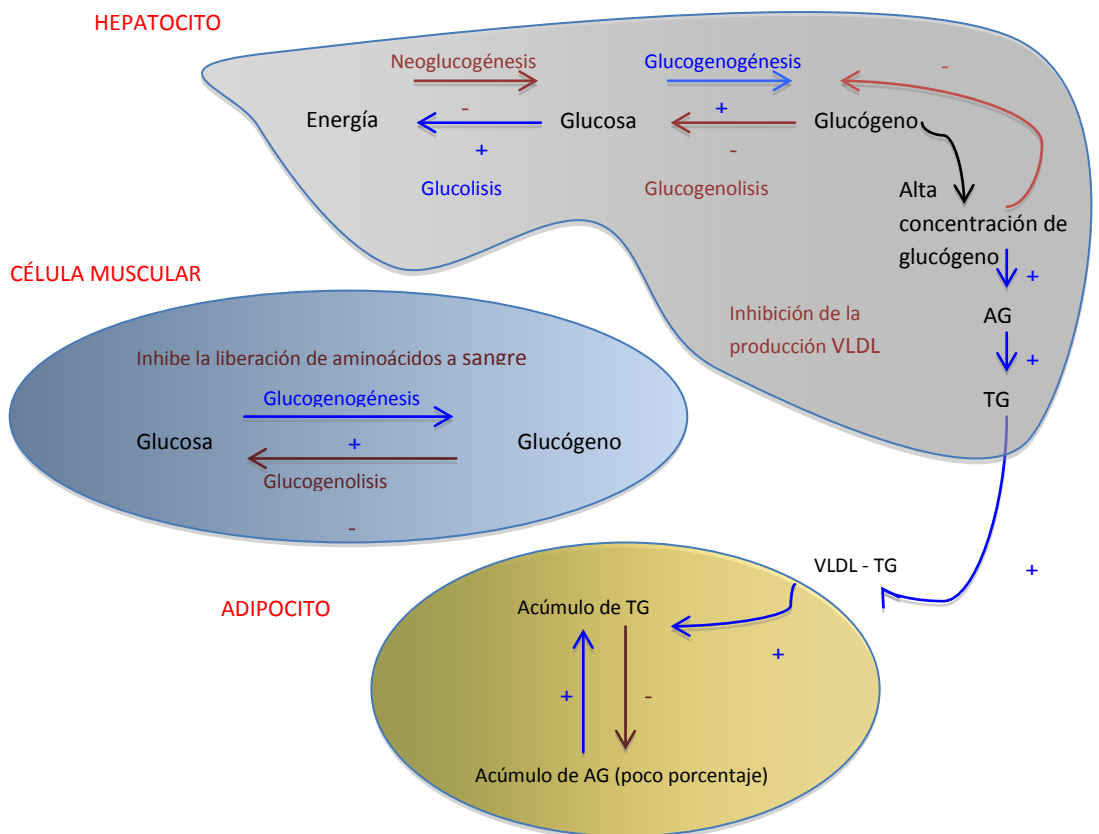


Figura 1 . ACCIÓN DE LA INSULINA

La RI se considera la base fisiopatológica de «una serie de variables relacionadas que tienden a coexistir en el mismo individuo y que pueden ser de enorme importancia en la génesis de la enfermedad coronaria, incluyen alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, de los lípidos e hipertensión arterial», conformando lo que definió Gerald Reaven en el año 1988 como el síndrome X[31]. Posteriormente, se han propuesto diferentes nombres para su denominación, de los cuales, el que se estableció con más firmeza fue el de síndrome metabólico (SM)⁵,[32] conocido como la agrupación de resistencia a la insulina, hipertensión, dislipemia y obesidad, cuya importancia radica en que ayuda a identificar individuos con riesgo de desarrollar DM2 y enfermedad cardiovascular. Las interrelaciones de sus elementos y el papel de la resistencia a la insulina no están del todo perfilados, pero parece ser la responsable primera del SM[33].

El SM en la pubertad fue definido por el *Panel de expertos del Programa de Educación Nacional de Colesterol de EEUU, adult treatment panel, III* y debe de cumplir al menos tres de estos cinco criterios: obesidad central con perímetro de cintura mayor del percentil 90 para la edad y sexo, triglicéridos por encima de 110 mg/dl, HDL-colesterol por debajo de 40 mg/dl, tensión arterial superior al percentil 90 para su edad y sexo y alteraciones del metabolismo hidrogenocarbonato (glucemia basal alterada o intolerancia hidrogenocarbonada).

Posteriormente, en el año 2007, la federación internacional de diabetes (IDF) postuló una modificación sobre los criterios de la ATP – III en donde existe un criterio sine quam non (circunferencia de cintura superior a las referencias proporcionadas para cada grupo étnico), como medida de obesidad central, junto con otras dos[34], por lo que según la IDF, los criterios formulados para el diagnóstico de SM en niños y adolescentes, junto con la presencia de obesidad abdominal como requisito fundamental, son[35, 36]:

- Edad de 6 a 10 años: el SM no puede ser diagnosticado, debiendo prestar atención individualizada a las comorbilidades presentes y a la historia

⁵ Muñoz-Calvo MT, Argente J. Síndrome metabólico. Rev EspPed. 2009;65:423—32.

- familiar, recomendando la reducción ponderal cuando el perímetro de cintura alcanza o supera el percentil 90 de las referencias por grupo étnico.
- Edad 10 a 16 años: cintura > p90 por grupo étnico junto con 2 o más de : triglicéridos (TG) > de 150 mg/dl, HDL < 40 mg/dl, presión arterial sistólica (PAS) > 130 mmHg, presión arterial diastólica (PAD) > 85 mmHg, glucemia en ayunas > 100 mg/dl o DM diagnosticada.
 - Edad igual o superior a 16 años: cintura > 94 cm para varones caucásicos y > 80 cm para mujeres caucásicas junto con 2 o más de : TG > de 150 mg/dl o en tratamiento específico, HDL < 40 mg/dl (varones) o < 50 mg/dl (mujeres), PAS > 130 mmHg, PAD > 85 mmHg o en tratamiento específico, glucemia en ayunas > 100 mg/dl o DM diagnosticada.

1.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Existen muchas formas de cuantificar la resistencia a la insulina, pero de ninguna se han definido los valores normales en las edades pediátricas. La característica que mejor la define es la existencia de glucemia normal con tasas de insulina elevadas. Parámetros analíticos basales como la insulinemia y el índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA) (insulina en ayunas en $\mu\text{U/mL}$ por glucosa en ayunas en mmol/L dividido por 22,5) proporcionan una aproximación válida a la magnitud del problema[37]. En un estudio español con adultos no diabéticos se calculó el percentil 90 de HOMA en 3,8[38] y este punto de corte se ha extrapolado a niños y adolescentes en muchas publicaciones. En otro estudio en nuestro país con niños de 7 a 16 años se establece el punto de corte en estas edades más bajo que en adultos, en 3,0[39]. La prevalencia de síndrome metabólico en niños y adolescentes varía entre 3 y 14%, según edad y definición que se utilice. Llega al 28% en los adolescentes con obesidad[40].

1.2.3 COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A LA INSULINA (TABLA 3)

Los individuos insulina resistentes permanecen normoglucémicos si su páncreas es capaz de responder segregando grandes cantidades de insulina y se hacen diabéticos cuando no pueden mantener este grado de hiperinsulinemia compensatoria por fracaso de las células beta. Se ha demostrado una aparición más reciente de la DM2 en sujetos que han sido obesos desde la infancia. En Estados Unidos, donde la obesidad infantil es epidémica, la intolerancia hidrocarbonada es muy prevalente en obesos (25% de niños prepúberes y 21% de púberes) y la DM2 aparece en el 4% de los adolescentes obesos[41].

Otra patología relacionada con la resistencia a la insulina es la hipertensión arterial (aumenta la absorción renal de sodio y la actividad adrenérgica y antagoniza la acción del óxido nítrico).

Aumento de dislipemia aterogénica, debido a que produce hipertrigliceridemia con aumento de colesterol-VLDL, descenso de colesterol-HDL, y partículas de LDL-colesterol más pequeñas, densas y aterogénicas, aumento de las apoB y apoCIII. Igualmente se observan niveles elevados de homocisteína, considerados factores de riesgo cardiovascular, pudiendo ser, en parte, los responsables. Por tanto, aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular (coronaria, cerebrovascular y periférica), primera causa de morbimortalidad en el mundo desarrollado[42].

Otras complicaciones tales como tendencia a la trombosis, estado proinflamatorio, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), hiperuricemia, hiperandrogenismo, talla alta, pseudoacromegalia y aumento de la incidencia de cáncer se relacionan a largo plazo con la resistencia a la insulina y síndrome metabólico[30].

Tabla 3. COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA OBESIDAD Y SÍNTOMAS MÁS CARACTERÍSTICOS.

COMORBILIDADES HORMONALES:	
<ul style="list-style-type: none"> - Eje hipotálamo-hipofiso-suprarrenal: <ul style="list-style-type: none"> - Aumento producción cortisol - Aclaramiento urinario - ACTH con incremento de testosterona y DHEA-S (adrenarquia prematura y maduración esquelética avanzada) - Eje somatotropo: <ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento aumentado para su edad cronológica (adecuado para la edad ósea) - Eje hipófiso-gonadal: <ul style="list-style-type: none"> - Disminución de SHBG (mayor biodisponibilidad de testosterona y estradiol) - Incremento de la aromatización de andrógenos a estrógenos (adelanto puberal en niñas, retraso puberal y ginecomastia en niños) - SOP en niñas adolescentes (acné, hirsutismo, irregularidad menstrual, resistencia a insulina) 	
COMORBILIDADES VASCULARES:	COMORBILIDADES RESPIRATORIAS:
<ul style="list-style-type: none"> - Disminución de la frecuencia y gasto cardíaco - Arritmias - HTA - Arteriosclerosis - Patología coronaria 	<ul style="list-style-type: none"> - Tendencia a hipoventilación (hipoxemia e hipercapnia) - Infecciones respiratorias - Disnea de esfuerzo - Asma - SAOS
COMORBILIDADES GASTROINTESTINALES:	COMORBILIDADES ORTOPÉDICAS:
<ul style="list-style-type: none"> - Esteatohepatitis no alcohólica - Litiasis biliares - Déficit de oligoelementos (hierro) 	<ul style="list-style-type: none"> - Compensadoras del exceso de peso (incurvación femoral, genu valgo) - Artropatías agudas y crónicas - Alteraciones de alineamiento y curvatura de columna vertebral - Enfermedad de Legg-Calvé-Perthes - Enfermedad de Blount (tibia vara)
COMORBILIDADES EMOCIONALES:	OTRAS COMORBILIDADES:
<ul style="list-style-type: none"> - Rechazo de la imagen corporal y alteraciones de la socialización - Ansiedad, estrés, depresión - Ingesta compulsiva: binge eating 	<ul style="list-style-type: none"> - Pseudotumor cerebri - Colecistitis - Pancreatitis - Intertrigo (infecciones locales) - Ectriación cutánea - Proteinuria por glomerulopatía (glomerulomegalia)
<p>ACTH: hormona corticotropa; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; SHBG: proteína transportadora de esteroides sexuales; SOP: síndrome de ovario poliquístico; SAOS: síndrome de apnea obstructiva del sueño.</p>	

1.3 TEJIDO ADIPOSO

La distribución anatómica de la grasa constituye un elemento ampliamente reconocido como factor determinante del riesgo de complicaciones asociadas con la obesidad. La adiposidad visceral supone un mayor riesgo de complicaciones metabólicas y cardiovasculares que la adiposidad subcutánea.

El tejido adiposo también puede diferenciarse morfológicamente y funcionalmente en tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo pardo o marrón. Los adipocitos pardos se especializan en la producción de calor a partir de su almacenamiento lipídico y se encuentran únicamente en mamíferos. Morfológicamente son multiloculares, contienen menos lípidos que los blancos, siendo particularmente ricos en mitocondrias. En humanos, el tejido adiposo pardo rodea el corazón y los grandes vasos durante la infancia, tendiendo a desaparecer con el tiempo, de forma tal que solo queda presente en los cojinetes grasos.

El TAB provee una reserva de combustible a largo plazo. En los mamíferos representa la principal reserva de energía y se distribuye en múltiples depósitos corporales, tanto interna como subcutáneamente, al igual que en ganglios linfáticos y en el músculo esquelético. Adicional al almacenamiento de combustible, actúa como aislante térmico y como protector de órganos[43]. En los individuos obesos se produce un aumento notable del TAB debido a hiperplasia o hipertrofia de los adipocitos. El TAB había sido considerado tradicionalmente como un reservorio energético pasivo, donde la energía se acumula en forma de triglicéridos durante periodos de consumo alimentario excesivo o es movilizada cuando el aporte calórico es insuficiente (en periodos de ayuno o ejercicio prolongado)[44]. Actualmente, es reconocido, que el tejido adiposo es un órgano endocrino productor de una amplia variedad de proteínas, denominadas colectivamente «adipocitoquinas»[45] (Fig 2) (leptina, adiponectina, visfatina, vaspina y citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL)-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α , entre otras)

(Tabla 4), con receptores específicos en el hipotálamo para regular el apetito y la saciedad. Estos factores pudieran favorecer la aparición de un estado proinflamatorio, de RI y/o de daño endotelial.

<i>TABLA 4. PREDOMINANT EXPRESSION OF DIFFERENT ADIPOKINES IN SUBCUTANEUS OR VISCERAL TISSUE</i>	
Subcutaneous	Visceral
Leptin	Tumor necrosis factor- α
Adiponectin	Visfatin
Retinol binding protein-4	Interleukin-6
Acylation stimulating protein	Interleukin-8
	Adipsin
	Plasminogen activator inhibitor-1
	Angiotensinogen
	Resistin
Marra F, Bertolani C: Adipokines in liver disease. <i>Hepatology</i> . 2009 Sep; 50(3):957-69	

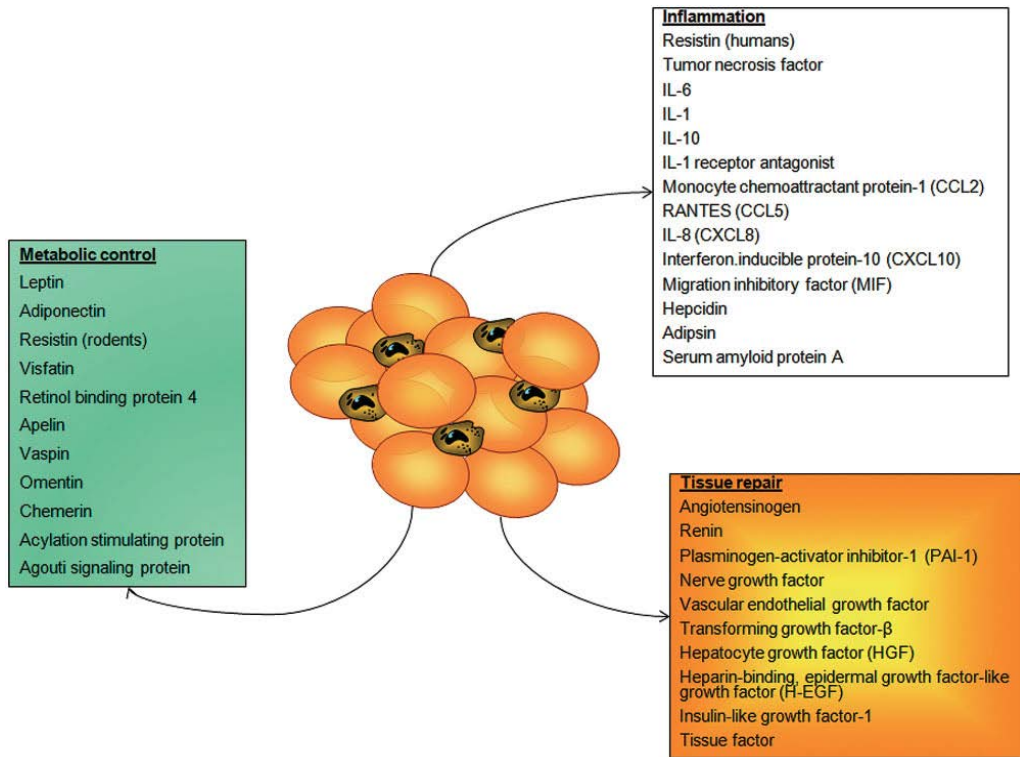


Figura 2.: ADIPOQUINAS (clasificación según acciones principales) Marra F, Bertolani C: Adipokines in liver disease. *Hepatology*. 2009 Sep; 50(3):957-69

Asimismo, se han aislado receptores en el adipocito para la mayoría de las hormonas hipofisarias e hipotalámicas, denominadas «adipotropinas», indicando en conjunto que existe un «diálogo endocrinológico» entre el adipocito y el sistema nervioso central, y viceversa[2] participando así en la regulación energética y en el metabolismo de los carbohidratos. Las citoquinas pro inflamatorias, como TNF- α e IL-6, en particular, parecen jugar un papel fundamental en la modulación de la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos y se han asociado con el desarrollo de RI en adultos[46]. Además, la glucosa induce el estrés oxidativo y el aumento del factor nuclear-KB

vinculante y aumenta la transcripción del factor nuclear - KB dependiente de genes pro inflamatorios (TNF- α e IL-6) [47, 48].

Por otro lado, la obesidad tiene una estrecha relación con la RI. Generalmente, la RI aumenta con el incremento del contenido de grasa corporal. Los ácidos grasos libres no esterificados (AGL) que se generan aumentan en plasma y se encuentran con un hígado y un músculo resistentes a la insulina. Esta mayor oferta de AGL en hígado conduce a: aumento de gluconeogénesis. Incremento en la producción de triglicéridos: aumento de VLDL, LDL, con efecto aterogénico. Disminución de HDL. Mayor producción de sustancias con actividad protrombótica como: Fibrinógeno, PAI₁. EHGNA por depósito de triglicéridos.

En músculo, se acumula tejido graso y se estimula la utilización de AGL como fuente de energía en lugar de glucosa (favorecido por la RI). Esta glucosa no utilizada a nivel muscular, sumada a la mayor producción de glucosa hepática, genera hiperglicemia. En respuesta a esto, el páncreas incrementa la secreción de insulina (hiperinsulinismo) que compensa la situación manteniendo una glucemia basal normal.

La activación de la inmunidad innata conduce a la liberación de citoquinas por células del sistema inmune (macrófagos, monocitos). Estas contribuyen a la acción protrombotica y proinflamatoria. Produce también cambios en las lipoproteínas plasmáticas, enzimas, proteínas transportadoras y receptores tanto en animales como en humanos, especialmente en estos últimos puede producir incremento de la síntesis hepática de VLDL, disminuir su aclaramiento, reducir los niveles de colesterol HDL y modificar su composición. Desde el punto de vista genético, una variedad de genes han sido asociados al desarrollo de síndrome metabólico: genes reguladores de lipólisis, termogénesis, metabolismo de la glucosa y del músculo. No se debe dejar de señalar la influencia de factores genéticos y ambientales sobre el peso al nacer; porque la subnutrición fetal puede ser negativa para el desarrollo de la función

de las células β pancreáticas y de los tejidos sensibles a la insulina cuya causa pudiera estar relacionada con la activación de genes vinculados a la RI.

Los factores ambientales son importantes modificadores sobre la expresión del síndrome metabólico, así la inactividad física promueve el desarrollo de obesidad y modifica la sensibilidad a la insulina en el músculo. Las dietas con alto contenido graso son desfavorables para el síndrome metabólico y contribuyen al desarrollo de hipertensión arterial y obesidad. Fármacos como corticoides, antidepresivos, antipsicóticos, antihistamínicos podrían tener como efecto adverso síndrome metabólico porque conducen a dos de sus características: obesidad e intolerancia a la glucosa.

1.3.1 ADIPOCITOQUINAS PRINCIPALES

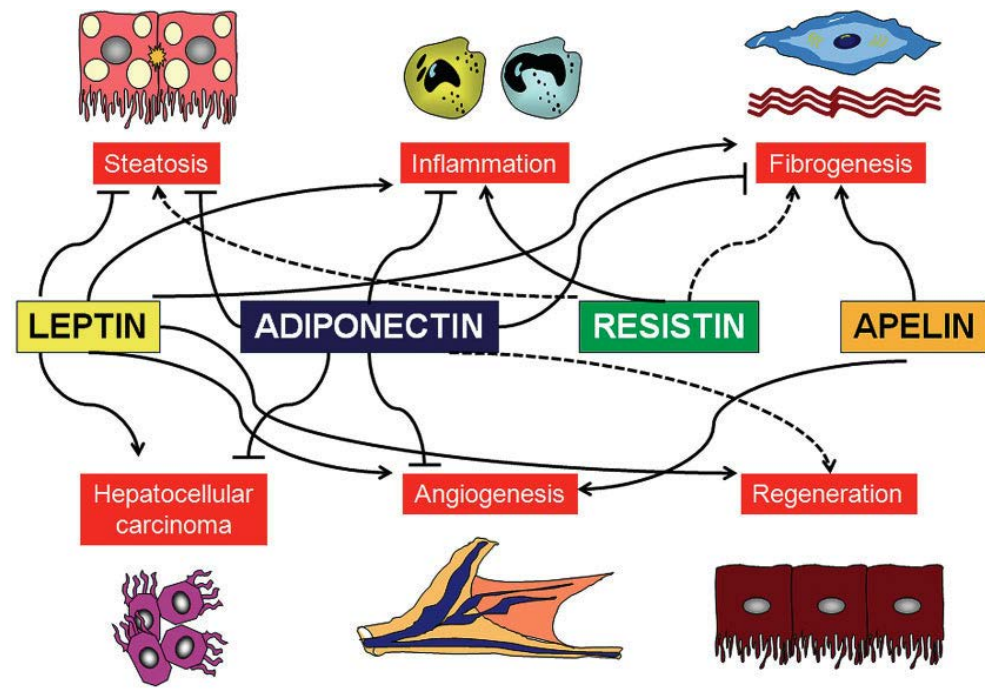


Figura 3. EFECTO ADIPOQUINAS EN LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y LA REGENERACIÓN DEL PARÉNQUIMA HEPÁTICO Marra F, Bertolani C: Adipokines in liver disease. Hepatology. 2009 Sep; 50(3):957-69

1.3.1.1 LEPTINA

La leptina es una hormona polipeptídica de 167 aminoácidos (16KDa.). Procede del griego leptos que significa delgado, también se le ha llamado hormona ob. Es producto de genes obesogénicos, secretada principalmente en el tejido adiposo y en menor medida por el estómago, intestino, placenta y testículos[49, 50]. Se descubrió en 1992 como la responsable del fenotipo de los ratones ob/ob, incapaces de sintetizar leptina, con hiperfagia y con una fuerte tendencia a la obesidad[51].

- **MECANISMO DE ACCIÓN**

La leptina es una hormona pleiotrópica, con múltiples acciones biológicas, relacionadas con la homeostasis energética.

La acción de la leptina es mediada por receptores específicos (ObR) presentes en la membrana plasmáticas de células del sistema nervioso central y en órganos periféricos (existen numerosos receptores hepáticos). Se han identificado 6 isoformas de receptores de leptina (ObRa – ObRf).

- ObRb: receptor implicado en la mayor parte de los efectos de la leptina mediante la transducción de señales, desde la membrana plasmática hasta el núcleo a través de la activación de JAK2 (Janus Activated Kinasas) y del sistema STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription).

- ObRe: receptor soluble para las formas complejas de leptina circulante, generado mediante rotura del receptor de membrana, encargado de regular la secreción de leptina (cuando aumenta disminuye la secreción de leptina)[50]

La secreción de leptina es proporcional a la masa grasa, a través de señales antiobesogénicas regula la ingesta de alimento (reprimiendo la sensación de hambre), tono simpático y el gasto energético en situaciones de exceso de energía a través de la vía hipotalámica. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la leptina atraviesa la barrera hematoencefálica. Se ha descrito una

disminución de la permeabilidad de dicha barrera a la hormona durante el fenómeno de “resistencia a leptina”, asociado a la edad y la obesidad[51].

- Acción metabólica: La leptina, tanto a nivel del SNC como de los tejidos periféricos, incrementa la termogénesis y la lipólisis[52]. Además, se ha descrito que la leptina inhibe la síntesis de insulina e incrementa la sensibilidad periférica a la misma[53].

- Maduración sexual, tanto central como periférica[54]. Los niños obesos presentan alteraciones tanto al inicio de la pubertad (que se adelanta) que podría estar relacionado con un incremento inusualmente temprano de la concentración de leptina[55, 56] .

- Hígado graso: En los ratones Ob/Ob se observa esteatosis hepática, suponiendo que la leptina ejerce una papel protector frente al hígado graso a través del sistema nervioso central (SNC) y directamente vía activación de la AMPK (adenosin monofosfato protein kinasa)[57, 58], igualmente en la lipodistrofia generalizada, otra condición del déficit de leptina, el aporte de esta mejora el hígado graso[59].

- Sistema inmune. La hormona tendría un importante papel modulando la actividad T-helper y podría estar implicada en la patofisiología de algunas enfermedades autoinmunes[60]. Igualmente se ha descrito, en modelos animales con déficit de leptina, una mayor susceptibilidad a la infección viral y bacteriana así como aumento de hepatotoxicidad y mortalidad tras la inyección de endotoxinas[61].

Adicionalmente presenta un papel protector en modelos animales con hígado alcohólico[62, 63].

- Papel profibrogénico[64] y regenerativo: debido a que en ratones Ob/Ob existe una disminución de fibrogénesis que se revierte con la administración de leptina pero no con la reducción de la ingesta se supone que presenta un fuerte papel profibrogénico[65] en donde intervienen muchos tipos de células. La leptina activa las células Kupffer (KC) y macrófagos y estimula a las células endoteliales para producir factor de crecimiento β [64].

Activa las células estrelladas hepáticas (CEH) (productoras de colágeno 1 que interviene en la fibrosis hepática) mediante el estímulo del ObRb[66]. Una vez activada la CEH contribuye a la expresión de leptina mientras que la disminución de la concentración de leptina en la CEH se asocia con un aumento de la concentración de adiponectina[67]. La leptina activa la NADPH (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducida) oxidasa y produce productos de la degradación de oxígeno, los cuales regulan la expresión de quimioquinas y la fagocitosis de cuerpos apoptóticos[68, 69]

Se desconoce si la resistencia a la leptina se acompaña de resistencia de las células no parenquimatosas hepáticas a la acción inflamatoria y fibrogénica de la leptina, en ratones con déficit de leptina existe alteración de la regeneración hepática, tanto tras la hepatectomía parcial como tras la administración de tóxicos[70, 71], sin embargo la administración de leptina exógena no consigue restaurar el parénquima lo que sugiere que la deficiencia crónica de leptina causa perturbaciones complejas en la capacidad de regeneración de los hepatocitos[72].

- La leptina se ha involucrado en el desarrollo de cáncer, tanto directamente como a través del aumento de la angiogénesis. Actúa sobre células endoteliales[73] regulando la expresión del factor de crecimiento endotelial por las CHE[74]. La disminución de la leptina se asocia con disminución de angiogénesis y de focos preneoplásicos en esteatohepatitis experimental[75].

En el hepatocarcinoma humano existe un aumento de la concentración de ObR, en el tumor pobremente diferenciado, con alta vascularización, existe mayor concentración de ObR, demostrando la relación leptina/ObR con la angiogénesis del hepatocarcinoma[76, 77].

La leptina promueve la proliferación, migración e invasión de las células de hepatocarcinoma[77] e induce proliferación y poder metastatizante en el colangiocarcinoma[78].

- **CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LEPTINA**

En general, la leptina se incrementa tras la ingesta y se reduce drásticamente en situación de ayuno prolongado[79].

La leptina inhibe la síntesis y secreción de insulina, mientras que la insulina estimula la secreción de leptina. Esta retroalimentación entre ambas hormonas ha sido denominada por algunos autores como el “eje adipoinsular”[53]. En niños no obesos, los niveles de leptina se correlacionan con los niveles de insulina, independientemente del índice de masa corporal[80].

El principal factor del que depende la concentración sérica de leptina es la cantidad de TAB, llegando a alcanzar concentraciones muy elevadas en obesos. En individuos no obesos, además del IMC, la edad, el sexo, la diabetes y la pubertad tienen gran influencia en la concentración sérica de leptina. En adultos no obesos, las mujeres presentan concentraciones superiores (hasta cuatro veces) a los hombres, incluso tras normalizarse con el IMC[81]. En niñas también se han descrito concentraciones superiores a los niños, correlacionadas con el IMC[82]. Durante la pubertad, la concentración sérica de leptina se incrementa, pero con diferencias importantes según el sexo. En niños la concentración de leptina se estabiliza hacia la mitad de la pubertad y decrece hacia el final de la misma. En cambio, en niñas la concentración de leptina se incrementa gradualmente hasta la completa maduración sexual y decrece únicamente cuando la pubertad ha finalizado[83].

- **RESISTENCIA A LA LEPTINA**

En animales no obesos, se ha observado que la adición de leptina exógena inhibe enormemente la sensación de hambre y provoca una reducción severa del volumen de tejido graso. En cambio, en modelos de animales obesos (tanto en obesidad inducida por la dieta como por alteraciones genéticas) la adición

exógena de leptina apenas tiene efecto, lo que indica la aparición de resistencia a leptina en condiciones de obesidad[84].

En animales no obesos, se ha observado la aparición de resistencia a leptina en relación a la edad. En animales viejos, la leptina suministrada directamente en el encéfalo tiene mucho más efecto que la suministrada de forma periférica, en cambio en animales jóvenes, no se observan diferencias[51]. Este dato lleva a pensar que la resistencia a leptina relacionada con la edad, en animales no obesos, se debe principalmente a una reducción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a la hormona.

La resistencia a la leptina observada en obesos tiene su origen tanto en la reducción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como en la represión de la expresión de los receptores, en el SNC y en tejidos periféricos[85-88] aunque hasta la fecha se desconocen los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno. Se ha especulado mucho sobre la posibilidad de que la resistencia a la leptina sea causa de obesidad, o bien consecuencia de la misma. Aunque aún no se puede responder a esta cuestión, algunos autores opinan que ciertos polimorfismos genéticos en los receptores de leptina pueden estar en el origen de una resistencia innata leve, tanto en déficits de transporte de leptina como en alteración de ObRb, incluyendo el aumento de expresión de los supresores de la señal de las citoquinas 3 (SOCS3), moléculas que inhiben la señal de la leptina[50] ya que empeoran la señal postreceptor y conducen a una disminución de la activación del AMPK[89], que se incrementaría considerablemente si el individuo desarrolla obesidad[90].

Algunos nutrientes pudieran tener un papel importante, ya que la fructosa induce hiperleptinemia y resistencia hepática de la leptina mediante la vía STAT3[91].

- **INFLUENCIA DE LA LEPTINA SOBRE LA APARICION DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN LA OBESIDAD**

Se ha propuesto que la resistencia a la leptina que desarrollan los individuos obesos en todos los tejidos, está relacionada con el desarrollo de diabetes. La disminución de receptores de leptina en las células β , secretoras de insulina, tendría como consecuencia la inhibición del eje “adipoinsular”, lo que provocaría hiperinsulinemia que, a la larga, contribuiría al DM2[92].

Numerosos trabajos han correlacionado, en individuos obesos, la concentración de leptina con el índice de masa corporal y con la resistencia a insulina medida mediante el índice HOMA[93]. Sin embargo los estudios que han tratado de relacionar la concentración de leptina con la presencia de DM2 en individuos no obesos, son contradictorios e inconcluyentes.

1.3.1.2 ADIPONECTINA

La adiponectina es un polipéptido de 247-aminoácidos que circula en concentraciones séricas relativamente altas (5,30 $\mu\text{g} / \text{mL}$), por lo que es la adipoquina más abundante y específica de tejido adiposo. Los adipocitos sintetizan y liberan la adiponectina en una serie de complejos o isoformas diferentes de orden superior que incluyen trímeros (bajo peso molecular), hexámeros (mediano peso molecular) y 18 meros (elevado peso molecular)[94-96] (figura 4).

Cada isoforma de adiponectina tienen funciones biológicas diferentes. La isoforma metabólicamente más activa y sensibilizadora de insulina es la de elevado peso molecular, es además la que más se reduce durante la obesidad. Las isoformas triméricas y hexaméricas parecen tener más influencia sobre el control de la saciedad, en el hipotálamo [94, 95].

Es secretada fundamentalmente por adipocitos maduros y de forma muy escasa por hepatocitos[97].

Los niveles de adiponectina varían de forma fisiológica según sexo, edad y origen étnico. En concreto, son mayores en las mujeres, a medida que incrementa la edad, y en las razas caucásicas en comparación con Asia o África [97].

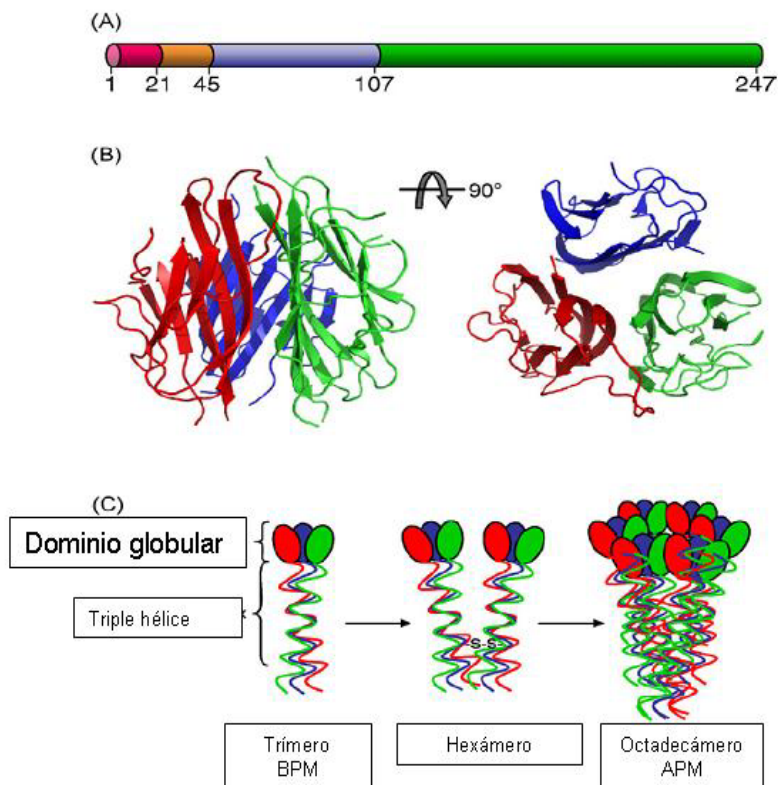


Figura 4. Adiponectina y su estructura. (A) dominio de la organización del protómero de adiponectina. Rojo: péptido señal, naranja: región variable; azul: región colágeno; verde: dominio globular. Los números indican los límites de la región. (B) estructura cristalografía que constituye un homotrímero dominio de adiponectina, conformado por la triple hélice del dominio de colágeno (C) Representación de oligomerización trimérica, hexamérica y octadecamérica de la adiponectina. La ubicación del enlace disulfuro responsable de la asociación se visualiza en el hexámero. Adaptado de [94].

Los niveles de adiponectina disminuyen de forma paradójica al incrementarse el volumen de tejido adiposo [98]. Los niveles de adiponectina sérica están relacionados de forma inversa con el IMC, la cantidad grasa corporal, los niveles séricos de insulina en ayunas y de triglicéridos. Los mecanismos moleculares implicados en la reducción de adiponectina en pacientes obesos no son del todo conocidos, aunque varios estudios sugieren una relación con el desarrollo de resistencia a insulina en adipocitos [99].

La adiponectina es un polipéptido con potente actividad anti-inflamatoria, antidiabética, antiaterogénica y sensibilizadora de la insulina. Por tanto, niveles bajos de adiponectina sérica se ha relacionado con RI y SM, lipodistrofia, síndrome de ovario poliquístico, hipertensión arterial, aterosclerosis y a la enfermedad cardiovascular, incluyendo el síndrome coronario agudo[97]. En la configuración de la RI, cada vez hay más evidencia del papel hepatoprotector de la adiponectina en hígado graso no alcohólico.

En el parénquima hepático, además posee actividad antifibrogénica y anti-inflamatoria, debido a que inhibe la actividad de los macrófagos hepáticos (KC), respectivamente [97]. En los hepatocitos presenta un importante papel antiapoptótico[97].

Debido a las razones anteriormente expuestas la adiponectina presenta un atractivo potencial terapéutico en el hígado graso no alcohólico.

- SEÑALIZACIÓN DE ADIPONECTINA:

Inicialmente, en 2003, se han descrito dos receptores transmembrana de la adiponectina (AdipoR1, AdipoR2)[95]. El receptor AdipoR1 es más abundante en el sistema músculo esquelético y AdipoR2 en el hígado [95]. Otro receptor adicional de membrana celular es la T-cadherina, pero carece de un dominio intracelular y su efecto en la señalización celular es desconocido [97].

En el hígado, a pesar de que la señalización postreceptor está por esclarecer, AdipoR1 inhibe la gluconeogénesis y aumenta la sensibilidad a la insulina mediante la activación de la vía de la AMPK (proteinkinasa del 5-AMP cíclico), mientras que AdipoR2 aumenta la captación de glucosa por la activación de la vía del receptor activado de proliferador de peroxisoma α (PPAR- α) [100].

- **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POST TRASLACIONAL DE LA ADIPONECTINA Y SUS RECEPTORES**

Estimulada por varios factores de transcripción implicados en adipogénesis, como PPAR, FoxO1 (Forkhead box protein O1), C / EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins) y SREBP, y es suprimido por la hipoxia, inflamación, represores de la transcripción, como NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) y CREB (cAMP response element-binding protein), y factores proinflamatorios como como TNF, IL-6 e IL-18. Cuando se altera la multimerización de la adiponectina se reducen sus niveles plasmáticos condicionando obesidad y resistencia a la insulina. Existen proteínas reticuloendoplasmáticas, como Ero1- α , ERp44 (Endoplasmic reticulum resident protein 44) y DSBA-L, que presenta un papel crítico en la regulación de la multimerización de la adiponectina y / o secreción, y podrían constituir posibles dianas terapéuticas para mejorar la sensibilidad a insulina y otros problemas asociados[96].

En tejido adiposo, muscular y hepático, los niveles de receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 están regulados en respuesta a cambios en las condiciones nutricionales, probablemente para modificar el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, sin embargo, hay datos contradictorios sobre esta teoría entre diferentes estudios en modelos de roedores [101, 102].

1.3.1.3 RESISTINA:

El péptido hormona resistina (o FIZZ3) es un factor de secreción producido en adipocitos y ha demostrado desempeñar un papel importante en la resistencia a la insulina inducida por la obesidad[94].

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

Los estudios que demuestran un papel causal de la resistina en la homeostasis de la glucosa se basan en modelos animales con alteraciones de los niveles de resistina sérica. En estos estudios la infusión o sobre-expresión de resistina conduce a la hiperglicemia, sobre todo por aumento de la producción de glucosa hepática[94]. Una de las vías moleculares que producen RI activada por resistina consiste en la amplificación de SOCS 3, que inhibe la unión IRS-PI3K (vía de señalización de insulina)[103].

La importancia de la acción de la resistina en los seres humanos es menos clara, ya que no todos los estudios informan acerca de un aumento en suero de la resistina en obesos con DM2[94], sin embargo, hay que señalar que el genotipo - 420G / G de la región promotora de resistina, se ha asociado con elevada transcripción de genes resistina, con aumento de los niveles de suero de resistina, que conducen a obesidad y RI.

A pesar del gran interés generado por el descubrimiento de resistina en 2001 y de que es una hormona importante en la regulación de varios tejidos y órganos, incluyendo el hipotálamo, los adipocitos y el hígado, son escasos los conocimientos acerca de las vías de señalización intracelular por la cual la resistina induce su efectos metabólico [94].

1.3.1.4 PROTEINA DE UNIÓN 4 DEL RETINOL:

La proteína de unión-4 del retinol es una molécula que causa resistencia sistémica a insulina secundaria a la alteración de la señalización de la insulina en el músculo y los adipocitos, y que conduce a la activación de la gluconeogénesis en el hígado[94].

Varios estudios han demostrado evidencias de correlación intensa tanto en roedores como en personas obesas entre los niveles séricos de la proteína de unión 4 del retinol y el síndrome metabólico[94].

1.4 ESTRÉS OXIDATIVO

Durante el metabolismo normal de la célula, se producen radicales libres (RL) que se eliminan del medio por el sistema de defensa antioxidante. La principal fuente de RL de la célula es la mitocondria, que da lugar a grandes cantidades de anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que rápidamente se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 se transforma en agua gracias a la glutathion peroxidasa (GPx), que utiliza glutathion reducido (GSH) como cofactor, transformándose este último en glutathion oxidado (GSSG). El GSH es fundamental para el mantenimiento del estado redox de la célula, por eso es fundamental su regeneración una vez que se utiliza para descomponer el H_2O_2 . De su regeneración se encarga la glutathion reductasa (GRd), que utiliza NADPH como cofactor, que se transforma en NAD^+ . En el estrés oxidativo se produce un desequilibrio en el sistema de sustancias prooxidantes/RL con predominio de estos últimos[103]. Los altos niveles de RL conducen a daño en lípidos, proteínas y DNA. El hidroxinonenal (4-HNA) y el malonildialdehído (MDA) son marcadores del daño oxidativo inducido a macromoléculas lipídicas, los grupos carbonilo y la nitrotirosina son marcadores del daño oxidativo

inducido a proteínas y la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina se considera como marcador del daño oxidativo al DNA.

Los RL $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , además de otros, se denominan especies reactivas de oxígeno (EROs). También existen las llamadas especies reactivas de nitrógeno (ERNs), entre las que se encuentran el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), producto de reacción del NO y el $O_2^{\cdot-}$. El NO se sintetiza por la óxido nítrico sintetasa (NOS), la cual puede existir en tres isoformas denominadas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Dos de ellas, nNOS y eNOS son dependientes de calcio, se expresan de forma constitutiva en la célula y son responsables de la producción de bajos niveles de NO (fisiológicos) durante cortos periodos de tiempo. La iNOS, sin embargo, es independiente de calcio y no se expresa, en la mayoría de los tejidos, en condiciones normales. La iNOS es una enzima relacionada con los procesos de inflamación a través de la formación de $ONOO^-$ y su expresión se puede inducir por citoquinas tales como Interleuquina-1 β (IL-1 β), TNF α o Interferony (INF γ) en células del sistema inmune, como los macrófagos[104].

La obesidad se considera como una enfermedad inflamatoria crónica con un descenso en las defensas antioxidantes y un aumento de los marcadores de estrés oxidativo en sangre e hígado. Existen estudios que afirman que la obesidad “per se”, sin hiperinsulinemia, se asocia a un estado redox reducido[103]. En los muy escasos trabajos realizados en niños parece existir un aumento de la actividad de la GPx[105].

El tejido adiposo está compuesto de adipocitos y la fracción estromovascular, que incluye macrófagos. Los adipocitos segregan las llamadas adipoquinas, entre las que se incluyen leptina, adiponectina, visfatina, IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1). Los macrófagos, por su parte, segregan TNF α , IL-6, MCP-1, resistina y adiposina. En el obeso, el aumento de tejido adiposo conduce a un aumento en la secreción de leptina y otros factores conduce a un aumento del número de macrófagos infiltrados y por tanto un

aumento en la producción de TNF α , que a su vez da lugar a un aumento en la producción de leptina y otras citoquinas inflamatorias, mientras que se produce un descenso de adiponectina. El incremento en la secreción de leptina y/o descenso en la producción de adiponectina también puede contribuir a la acumulación de macrófagos activados creándose un círculo vicioso con producción de más citoquinas inflamatorias (TNF α , IL-1, IL-6)[106]. Se ha visto que MCP-1 y TNF α alteran el adipocito aumentando su RI señalando una vez más que la RI relacionada con la obesidad podría ser, al menos en parte, una enfermedad inflamatoria crónica iniciada en el tejido adiposo[107]. La RI en el adipocito limita la captación de glucosa por el mismo, produciéndose un aumento de la glucemia, lo que a su vez induce un aumento de la secreción de insulina pancreática.

En adipocitos, la resistencia a insulina produce un aumento de la actividad de la lipasa sensible a hormona, produciéndose un aumento en los niveles de AGL en sangre. Estos AGL pueden entrar en el hígado donde pueden ser oxidados en la mitocondria para formar ATP o esterificados para producir TG para su almacenamiento. En el hígado, la hiperinsulinemia induce expresión de SREB-1c, lo que da lugar a la activación de todos los genes lipogénicos, con lo que aumenta el contenido de AGL que pueden seguir las dos vías que señalamos antes. Al mismo tiempo, la hiperglucemia activa ChREBP, que activa transcripcionalmente piruvato quinasa y todos los genes lipogénicos. SREB-1c y ChREBP, están activando toda la maquinaria para transformar la glucosa en ácidos grasos. Como consecuencia de esto aumenta el malonil-coa, que inhibe CPT-1, la proteína responsable para el transporte de ácidos grasos a la mitocondria. En definitiva, aumenta el contenido de ácidos grasos en el hígado, por la entrada desde la periferia y la síntesis de novo a partir de la glucosa[104].

El aumento de AGL en el hígado da lugar a defectos en la CTE, lo que produce un aumento de RL. Debido a esto, los ácidos grasos se acumulan en el citosol, lo

que hace que se metabolicen en peroxisomas y microsomas, aumentando aún más los niveles de RL. Esto, a su vez, hace que aumente la oxidación de lípidos y los metabolitos resultantes de esto, MDA y 4-HNE, que pueden aumentar, a su vez, los efectos del estrés oxidativo. Por ejemplo, MDA y 4-HNE producen una disminución en el contenido de GSH, aumentan la producción de TNF α , promueven el influjo de células proinflamatorias en el hígado, y activan las CEH, conduciendo a deposición de colágeno, fibrosis y la continuación de la respuesta inflamatoria. Todo esto conduce a necrosis del hepatocito, inflamación y fibrosis en el hígado, todas las características histológicas de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)[108].

La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina incrementando la oxidación hepática de ácidos grasos. La adiponectina también tiene acción antiinflamatoria suprimiendo la producción hepática de TNF α . La adiponectina exógena dada a ratones con EHNA promueve la pérdida de peso y mejora la resistencia a la insulina, la esteatosis y la inflamación. Los niveles de adiponectina en un grupo de niños con EHNA fue significativamente más bajo que en el grupo control. Estos niveles séricos de adiponectina podrían ser un marcador precoz de EHNA en niños obesos[109].

Las últimas investigaciones muestran una estrecha relación entre la iNOS y resistencia a la insulina. El simple hecho de inflamación en adipocitos implica liberación de NO por la iNOS de los macrófagos activados. La mayoría de los inductores de resistencia a la insulina incrementan la expresión de la iNOS. Los inhibidores de iNOS previenen la resistencia a la insulina inducida por lipolisacáridos en ratas. No se conoce como la iNOS causa o aumenta la resistencia a la insulina[110]. Las citoquinas estimulan la expresión tanto de la iNOS como de la isoforma de la ciclooxigenasa inducible por citoquinas (COX-2). La expresión de COX-2 da lugar a una sobreproducción de prostaglandinas inflamatorias y tromboxanos. Además, el NO producido por la iNOS estimula

directamente la actividad de las isoformas de COX, incrementando aún más la producción excesiva de mediadores inflamatorios.

1.5 ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHOLICA

La EHGNA es una entidad clínica que se caracteriza por la presencia de un acumulo de grasa en los hepatocitos, que puede asociarse con fenómenos necroinflamatorios con o sin fibrosis, sin que medie en su desarrollo el estímulo del alcohol u otra causa hepática conocida. Fue descrita por primera vez en 1980 por Ludwig y cols tras encontrar esteatosis hepática en un grupo de pacientes no consumidores de alcohol[111]. Es un problema clínico emergente entre la población obesa[112] y es probablemente la causa más frecuente de enfermedad hepática en la edad pediátrica.

Esta entidad incluye un amplio espectro de lesiones hepáticas que van desde la simple esteatosis hepática sin inflamación, en donde existe acumulo de grasa en los hepatocitos por encima de los existentes fisiológicamente (<5%), a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que puede presentar distintos grados de inflamación y fibrosis, y la resultante cirrosis hepática[113, 114]. Aunque este síndrome tiene una etiología multifactorial, la obesidad es el factor que se asocia de forma más consistente[112].

La EHGNA es a día de hoy la causa más común de enfermedad hepática crónica, tanto en niños como en adultos en los países occidentales, convirtiéndose en una epidemia[115, 116], en particular existe un alarmante aumento de niños afectados por EHGNA con datos de prevalencia que oscilan desde 7,6% en la población pediátrica general hasta el 34,2% en jóvenes obesos o con sobrepeso[117].

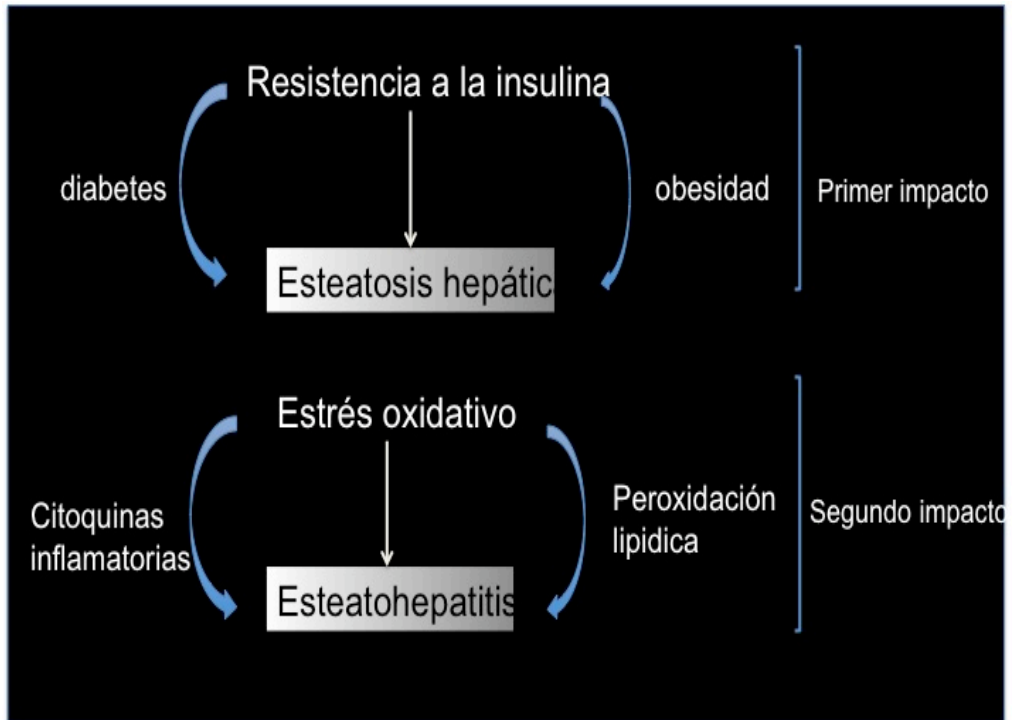
En la edad pediátrica se asocia con SM, obesidad abdominal (central), dislipemia (hipertrigliceridemia y/o hipercolesterolemia) y RI, por lo que la EHGNA se considera la manifestación hepática del SM, incluso, no existe un acuerdo sobre si la EHGNA contribuye al SM o viceversa[118].

En la actualidad se señala al EHGNA como la enfermedad hepática más común en Norteamérica entre los adolescentes, generalmente con sobrepeso. Muchos detalles referentes a la EHGNA en niños son desconocidos, incluyendo la manera exacta en que el EHNA pediátrico difiere del adulto.

Una gran parte de niños con síndrome metabólico y EHNA no se diagnostican, pudiendo en la adolescencia presentar un curso rápido de la enfermedad hacia formas más severas (cirrosis), de hecho existen datos epidemiológicos que ponen de manifiesto un aumento espectacular de la incidencia de SM en adolescentes urbanos principalmente debido a la sobrealimentación y el sedentarismo[119].

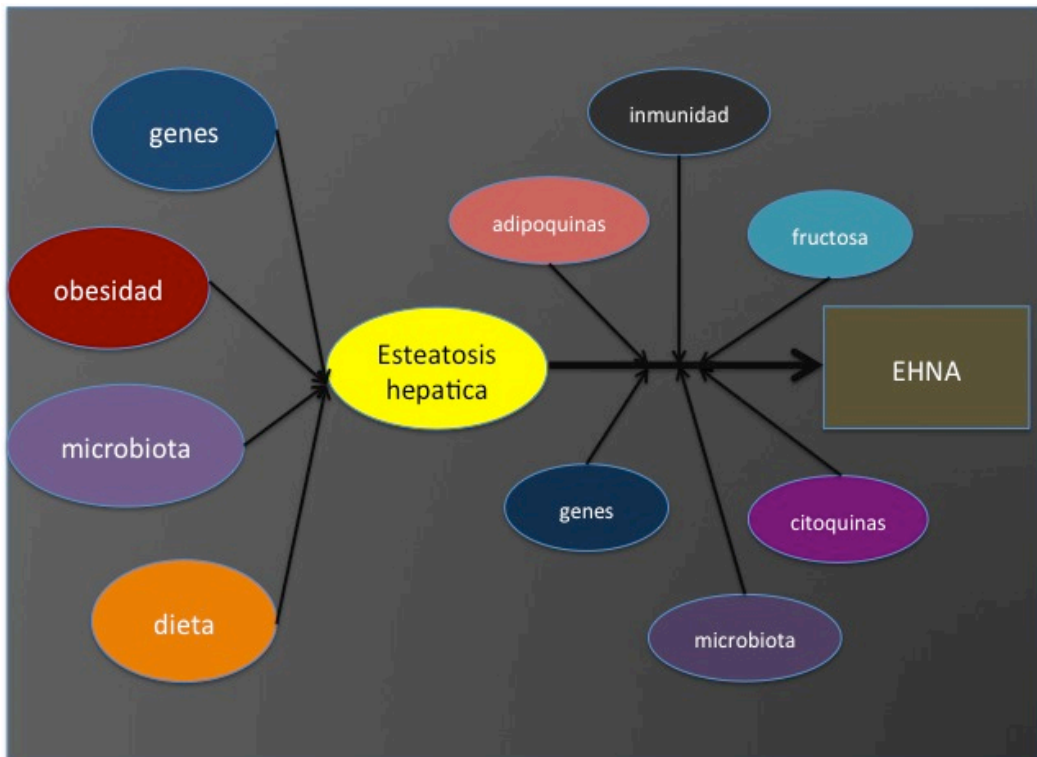
Aunque el EHGNA está casi universalmente presente en los individuos obesos, no todos progresan a EHNA, del mismo modo, que se puede ser no obeso físicamente y presentar EHNA. Esto implica que la progresión a EHNA es multifactorial.

Originalmente en la patogenia del EHNA se postuló la hipótesis de múltiples impactos (FIGURA 5 y 6) de forma que el primer impacto lo constituye los AGL que condicionan esteatosis (histológicamente < 5%), de esta forma el hígado es más susceptible a impactos secundarios como la acción de adipoquinas, estrés oxidativo y la respuesta inmune que provocan posteriormente, conduciendo a EHNA y a fibrosis avanzada, por tanto la RI puede actuar, a la vez como primer y segundo impacto[116, 120]

Figura 5. TEORÍA DEL DOBLE IMPACTO

La esteatosis o primer impacto se produce como consecuencia de la acumulación de los lípidos en el hígado, mientras la mayoría de los lípidos se almacenan en forma de TG, existen otros metabolitos lipídicos como los ácidos grasos, colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos que también son acumulados.

Figura 6. PROGRESIÓN HGNA A EHNA



1.5.1 CARGA GENÉTICA EN LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHOLICA

La variabilidad que existe en la gravedad de la enfermedad y la tasa de progresión sugieren que exista un componente genético. La esteatosis hepática se considera una enfermedad poligenética con afectación de múltiples loci, existen estudios que han demostrado que los indios asiáticos tiene una predisposición genética a la acumulación de grasa hepática a pesar de tener un IMC normal debido a la tendencia de presentar mayor grasa visceral[121].

El locus principal 22q13 que alberga al gen PLPLA3, la existencia de un polimorfismo de nucleótidos (SNP) rs738409 mostró una asociación con EHGNA a través de GWAS[122, 123], esta expresión es significativamente mayor en diversas etnias. Este SNP se encuentra situado en el tercer exón del gen y es expresado principalmente por el hígado y el tejido adiposo, está involucrado en la hidrólisis de TG introduciendo una sustitución de aa Isoleucina a Metionina (I148M) que suprime la función. El polimorfismo PNPLA-I148M se ha demostrado que asocia aumento de necroinflamación, esteatosis severa y fibrosis[124]. Otros polimorfismos rs738409 está presente en pacientes con EHGNA y mayor cifra de insulina en ayunas, resistencia a la insulina y elevación de transaminasas[125]. Aunque no existe suficiente evidencia científica existen estudios que afirman que el genotipo GG rs738409 PNPLA3 homocigoto presentan un riesgo 5 veces superior para el desarrollo de hepatocarcinoma[126].

Igualmente el polimorfismo PLPLA3 S453, presente en población afroamericana, se ha asociado con presentar menor contenido de grasa hepática suponiendo por lo tanto riesgo más bajo de EHNA[127].

Otros GWAS identifican variaciones genéticas comunes en o cerca de LYPLAL1, PPP1R3B, NCAN y GCKR, las cuales están presentes frecuentemente en población europea, y están relacionados con esteatosis en EHNA y fibrosis[122] y variaciones en FDST1, COL13A1, EFCAB4B, PZP como el loci causante de esteatosis, grado de actividad de EHNA, grado de fibrosis, inflamación lobular y niveles de alanina aminotransferasa (ALT), presentes en población caucásica.

Igualmente se han demostrado varios loci que confieren protección o susceptibilidad para EHGNA, esteatosis o rápida progresión de esta, como SCAP rs2101247 disminuye el riesgo de EHGNA en mujeres con SM[128], aunque los mecanismos de este no están claros todavía. SNPS rs2276736, rs3772630 y rs3772627 confieren protección para HGNA en población india[129]. En contra alteraciones en el gen de la proteína desacoplante mitocondrial 3 (UCP3)[130],

gen SRABP-1C (sterol regulatory element binding protein)[131], proteína adaptadora APPL1 y 2[132], gen nicotinamida N metil transferasa (NNMT)[133] y el gen SOD2 confieren susceptibilidad[134].

Otro gen implicado en EHGNA es el gen de la proteína transportadora de la Apolipoproteína C3 (APO C3), presenta variantes alélicas (c-482T, T-455C o ambas) en población no asiática está relacionada con incremento de EHGNA y con RI[135].

1.5.2 OTROS FACTORES ETIOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DE EHGNA

1.5.2.1 LÍPIDOS Y LIPOTOXICIDAD

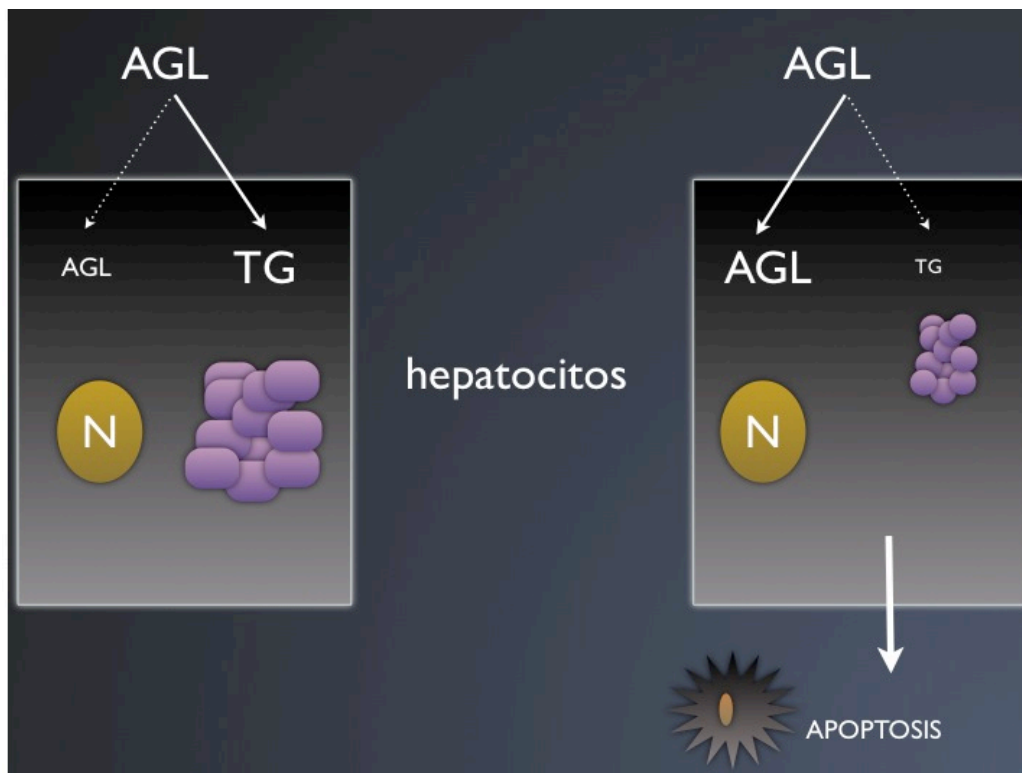
La composición en la dieta de lípidos juega un importante papel en EHGNA, no todos los lípidos actúan de similar manera, de forma que existen dos tipos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs): n-6 PUFA como ácido linoléico y araquidónico y n-3 PUFA como el ácido alfa linoléico, ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico. Los n-6 presentan capacidad de producir eicosanoides proinflamatorios, sin embargo los n-3 presentan actividad anti inflamatoria condicionando disminución de la lipogénesis y disminución de la esteatosis[136]. Existen estudios que demuestran que una alta proporción entre n6:n3 en los hepatocitos y en la circulación están asociados con la severidad de EHGNA[137].

La lipotoxicidad es el mecanismo mayor por el que se produce disfunción del hepatocito y progresión de la EHGNA, condicionada por el exceso de AGL en sangre con tasas altas que provocan un desbalance en la proporción de estos en relación a los TG que normalmente se encuentran en los hepatocitos. En pacientes con EHGNA se produce una sobrecarga lipídica hepática,

principalmente por la existencia de una liberación continua de AGL desde la circulación sanguínea hacia el hígado. Los AGL atraviesan la membrana plasmática de los hepatocitos por difusión o gracias a una proteína transportadora (CD36 o caveolin-1), además existe otra vía de producción de AGL a través de la lipogénesis de la glucosa en el hígado. Este aumento de la concentración de AGL intrahepatocitarios se compensa por un incremento de su β -oxidación mitocondrial y a través de la exportación de los TG en forma de VLDL[138]. Esta acumulación de TG en los hepatocitos actúa como un mecanismo protector frente a la toxicidad inducida por sus metabolitos (lipotoxicidad)[138].

Existen estudios experimentales en ratones que demuestran que la viabilidad del hepatocito depende de este mecanismo protector, así la incubación de AGL insaturados en los hepatocitos, produce una importante acumulación de TG sin afectar a la viabilidad de la célula, mientras que la incubación de AGL saturados, produce una menor acumulación de triglicéridos y como consecuencia se produce la activación de la apoptosis celular, produciendo la muerte del hepatocito (FIGURA 7).

Figura 7. LIPOTOXICIDAD



1.5.2.2 RESISTENCIA A LA INSULINA

La obesidad y el SM son factores de riesgo tanto para EHGNA como para la EHNA[139]. En población asiática se ha demostrado la existencia de pacientes que no presentaban síndrome metabólico pero si RI y EHNA. La obesidad central se postuló como el principal factor en la patogenia de EHNA. Existen estudios con EHNA demostrada con biopsia que postulan la correlación no solo de la grasa abdominal, sino también del resto de la grasa corporal, en la severidad de la enfermedad[140].

1.5.2.3 FRUCTOSA

Es un isómero de la glucosa cuyo uso se ha incrementado como edulcorante artificial sustitutivo a la sacarosa por su menor precio. Mediante la proteína facilitadora del transporte de la glucosa (GLUT 5) se absorbe en el intestino delgado llegando al hígado a través de la vena porta en donde se produce la fosforilación del carbono produciendo 3 metabolitos intermediarios[141].

La fructosa puede producir hepatotoxicidad indirecta agravando el síndrome metabólico y aumentando los niveles de TG y disminuyendo los de HDL-colesterol. Además los metabolitos de la fructosa causan depleción de ATP induciendo estrés metabólico[140]. La ingesta de altos niveles de fructosa condiciona alteración de la flora intestinal provocando activación del eje intestino hígado e induce bajas endotoxemias que predisponen a EHGNA.

Existen estudios que han demostrado que un aumento del consumo de fructosa se relacionan con aumento de la circunferencia de la cintura y del tejido adiposo visceral sin cambio en el total de grasa corporal[142].

Los efectos directos de la toxicidad de la fructosa pueden ser debidos a la acumulación en el hepatocito de fructosa 1 fosfato que condiciona productos finales de glicación avanzada, 17 veces más rápido que la glucosa, provocando inflamación y fibrosis mediante estrés oxidativo y síntesis de citoquinas (TNF- α e IL-6) por medio de la activación de las CEH[143].

1.5.2.4 INMUNIDAD

En el hígado se encuentran células linfoides que son fenotípicamente y funcionalmente distintas que sus homólogas en la circulación periférica y en otros órganos (Células B, natural Killer, CD4+ y CD8+), dentro de las células no linfoides las KC y las células dendríticas (DC) juegan un papel fundamental en la respuesta inmune.

La EHNA condicionan que se expresen tipos inmaduros de DC en respuesta a la estimulación de lipopolisacáridos de bacterias intestinales condicionando la secreción de citoquinas inflamatorias y contribuyendo a empeorar la enfermedad[144].

La inmunidad innata es el factor más importante en la inflamación del parénquima en las enfermedades hepáticas como la EHNA, está mediada por inmunidad innata que incluyen neutrófilos, macrófagos (KC), natural Killer y natural Killer T.

Las KC, derivadas de los monocitos, son la mayor población de macrófagos hepático, durante la lesión hepática se produce la diferenciación rápida de monocitos hacia KC siendo indistinguible de las verdaderas KC[145]. Se encuentran situadas en los sinusoides hepáticos por lo que son las primera células que contactan con inmunorreactivos exógenos, fagocitándolos y expresando antígenos de estos, condicionando la producción de mediadores pro inflamatorios tales como citoquinas, prostaglandinas, óxido nítrico y productos intermediarios de las **especies reactivas de oxígeno (ROS)**. Las KC tienen un papel significativo en el control de procesos inflamatorios e inmunológicos por lo que una dieta alta en grasa aumenta las KC y el estado proinflamatorio. Además se produce sobreactivación de las células NKT y muerte celular condicionando la producción de EHNA[146].

1.5.2.5 CITOQUINAS

La síntesis de citoquinas (IL-6, TNF- α) están involucradas en alteraciones inflamatorias y metabólicas de las fases más tempranas de la lesión hepática y condicionan la síntesis de otras citoquinas que, de forma conjunta, inducen migración celular e inician procesos de curación incluyendo la fibrosis[147]. Se ha encontrado relación entre los niveles de TNF- α (aumentado tanto el receptor como la forma soluble en hígado y tejido adiposo) y EHNA. Igualmente se ha demostrado que la IL-6 condiciona RI a través de la regulación de SOCS3 y la supresión de estos en ratones obesos condiciona sensibilización a insulina[148].

En seres humanos se ha demostrado niveles elevados de IL6, RI y aumento del estrés oxidativo en pacientes con EHGNA (incluso mayores que en hepatitis virales crónicas)[149].

1.5.2.6 ADIPONECTINA /VISFATINA / LEPTINA

La adiponectina es una hormona sintetizada por los adipocitos con función anti inflamatoria a través de la secreción de citoquinas anti inflamatorias (IL-10), sus niveles están disminuidos en EHNA.

La visfatina es una adipocitoquina expresada y secretada por tejido adiposo visceral. Su producción está regulada por citoquinas (IL-6, TNF- α) y lipopolisacáridos de la flora intestinal, además presentan acción paracrina provocando sobre el tejido visceral acción proadipogénica y lipogénica, por lo que la sobre expresión de visfatina condiciona la diferenciación de células preadipocitarias a adipocitos maduros y promueve la acumulación de grasa a través de la activación del transporte de insulina[150].

La leptina es una hormona que condiciona una retroalimentación negativa en los adipocitos, presenta acción lipostática. Los niveles de leptina se correlacionan directamente con la gravedad de EHGNA y con la progresión EHNA, en donde los niveles de leptina están elevados independientemente del IMC[151].

1.5.2.7 FLORA MICROBIOTA INTESTINAL

Existe evidencia que relaciona la flora intestinal con la progresión de EHGNA a EHNA, a través del eje intestino-hígado de forma que productos bacterianos tales como el ADN, lipopolisacáridos y peptidoglicanos llegan al hígado a través del sistema portal y activan receptores de superficie celular que como resultado desencadenan inflamación, transducción de señales inflamatorias y fibrosis[152]. Se ha demostrado que la flora intestinal en pacientes obesos (mayor porcentaje de firmicutes) es distinta que la presente en sujetos con normopeso (mayor porcentaje de bacteroides). La barrera mucosa actúa como filtro para el paso de estos, existen estudios que demuestran un aumento de permeabilidad intestinal y de proliferación bacteriana en pacientes con EHGNA y EHNA[153].

Además las bacterias producen etanol endógeno aumentando el estrés oxidativo y la inflamación hepática[154].

1.5.3 CLÍNICA DE EHGNA EN NIÑOS

Esta enfermedad suele ser poco expresiva porque los pacientes suelen estar asintomáticos o presentar manifestaciones inespecíficas, como astenia o molestias en hipocondrio derecho.

En la exploración física, pueden presentar hepatomegalia (33-55%) y acantosis nigricans (36-49%), siendo éste último un hallazgo descrito solamente en niños.

La acantosis nigricans, consiste en un engrosamiento e hiperpigmentación de la piel, de localización intertriginosa, que ha sido considerada como un marcador de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina[155].

Otros signos, como son la esplenomegalia, la presencia de borde duro en el hígado, eritema palmar y teleangiectasias, sugieren la presencia de una enfermedad hepática avanzada con evolución cirrótica.

1.5.4 DIAGNÓSTICO

1.5.4.1 EXAMEN CLÍNICO:

Hay una correlación significativa entre el grado de esteatosis hepática y el índice cintura/cadera, señalando la importancia de la grasa intraabdominal o visceral como predictor del hígado graso que es un precursor del EHNA[114].

1.5.4.2 PRUEBAS DE LABORATORIO:

Los estudios de laboratorio en el EHNA muestran una elevación moderada (2-4 veces por encima de lo normal) de los niveles séricos de transaminasas en el 70-100% de los casos, con una razón AST/ALT<1 en la mayoría de los casos, cuando este índice se invierte sugiere la presencia de patología avanzada. Los niveles de albúmina, bilirrubina y el tiempo de protrombina son normales a menos que exista cirrosis. Es frecuente la hipertrigliceridemia, y los niveles de ferritina están elevados en el 53-62% de los casos. En adultos pueden existir anticuerpos antinucleares a títulos bajos[114, 156].

1.5.4.3 TÉCNICAS DE IMAGEN:

La ecografía es la técnica más asequible y económica para detectar depósitos grasos en el hígado, además de ser la primera técnica de elección a utilizar, a pesar de que su sensibilidad decrece para discernir gravedad entre los distintos grados de EHNA[157, 158].

A pesar de que la biopsia hepática es el único método eficaz para el diagnóstico de esta entidad, en la práctica clínica es todavía motivo de controversia cuando está indicada su realización. Esto se debe a que, en general los pacientes se encuentran asintomáticos, el pronóstico en la mayoría de los casos es bueno, no existe un tratamiento bien establecido, y que la biopsia es una técnica con un coste económico y no se encuentra exenta de complicaciones. Muchos hepatólogos sólo recomiendan la biopsia en pacientes con enzimas hepáticas persistentemente anormales una vez eliminados otros factores de riesgo[159].

- **ECOGRAFÍA EN MODO B**

La ecografía es la técnica más asequible y económica para detectar depósitos grasos en el hígado, además de ser la primera técnica de elección a utilizar, a pesar de que su sensibilidad decrece para discernir gravedad entre los distintos grados de EHNA[157, 158].

Valora la presencia de grasa de forma subjetiva, dividiendo los grados de esteatosis en cuatro de forma cualitativa:

Grado 0, normal: ecogenicidad homogénea y similar a la corteza renal o a bazo.

Grado 1, leve: aumento de ecogenicidad leve, ligeramente superior a corteza renal o a bazo.

Grado 2, moderado: aumento difuso de la ecogenicidad con mala visualización del diafragma o ramas portales.

Grado 3, severa: aumento de ecogenicidad que impide la visualización de diafragma ni de ramas portales.

El principal problema es que es explorador dependiente y no distingue entre esteatosis y fibrosis[160].

- **RM MORFOLÓGICA CUALITATIVA**

Se basa en técnicas de desplazamiento químico para diferenciar entre la densidad de protones de grasa y de agua del hígado. Secuencias en FASE(F) y OPUESTO DE FASE(OF). El hígado normal tiene la misma IS en F y OF mientras que cuando hay esteatosis la IS cae en OF.

- **RM CUANTITATIVA**

Se basa también en técnicas de desplazamiento químico mediante el cálculo de la fracción de densidad de protones de grasa en el hígado y fracción de densidad de protones de grasa. Es un marcador estandarizado y reproducible y parece ser el más objetivo en la cuantificación de la grasa hepática. Es una ratio que surge de dividir la cantidad de protones de grasa móviles entre la suma de la densidad de protones de grasa y agua móviles. Ha mostrado resultados prometedores en niños comparándolo con la biopsia. Requiere un postproceso con algoritmos específicos y software para cálculo automático que no está disponible en todos los equipos actualmente. Se postula que los niveles normales en niños son 5-6% aunque todavía está por establecer.

- **ESPECTRO-RM**

Es el método no invasivo más exacto para cuantificar la cantidad de grasa hepática y se usa como valor de referencia en muchos estudios. Muestra el espectro del hígado con los picos producidos por el agua y la grasa. En condiciones normales el pico de agua es dominante y se encuentra en 4,7 ppm y el de la grasa suele distribuirse en varios picos muy pequeños que no se suelen ver. Cuando hay esteatosis el pico dominante es el de la grasa. Sin embargo no está ampliamente disponible y estudia sólo porciones del hígado. Además la adquisición y análisis es compleja, consume mucho tiempo de máquina y postproceso y sólo está disponible en determinados centros especializados en investigación. Por eso no hay muchas esperanzas en que esta técnica tenga una amplia implantación y en niños no hay apenas estudios[160-162].

- TÉCNICAS PARA MEDIR FIBROSIS:

FIBROSCAN

O elastografía de transición: mide la rigidez del hígado en kPa. Tiene limitaciones en un 5% de los pacientes, sobre todo en casos de obesidad y ascitis. Tiene también algunas desventajas técnicas como una profundidad de medida fija y que no se ve en qué zona se toma la medida. Los valores normales están entre 6,5 y 7 kPa. Tiene alta S y E en la distinción entre fibrosis leve y severa[163].

ELASTOSONOGRAFIA

(ARFI, Shear wave, según las casas comerciales: Siemens y GE) La técnica es un método para cuantificar virtualmente la rigidez hepática con un software integrado en un ecógrafo convencional. Consiste en emitir un tren de pulsos cortos de alta energía y frecuencia de repetición baja con un transductor modificado. Los pulsos alteran mecánicamente el tejido y provocan ondas que producen microdesplazamientos locales perpendiculares a la dirección de los pulsos acústicos. Permite medir la velocidad de propagación de las ondas, un parámetro biológico considerado análogo a la elasticidad de los tejidos, expresado en m/s. Existe un aumento en la velocidad conforme aumenta el grado de fibrosis. Con esta técnica es difícil distinguir entre niños sanos y con estadios precoces de fibrosis (F0-F1). Pero sí permite discriminar entre niños con fibrosis establecida (>F2) de fibrosis leve (F1). Podrían definirse dos zonas de seguridad en las que sin necesidad de biopsia la fibrosis hepática puede cuantificarse con sensibilidad o especificidad elevadas. Hasta 1,23 m/s la sensibilidad es muy alta. De 1,24 m/s a 1,62 m/s, es una zona de incertidumbre. A partir de 1,62 m/s la especificidad es muy alta.

Los estudios sobre la utilidad de esta técnica en el seguimiento de la enfermedad hepática crónica en los niños son escasos pero con resultados prometedores usando el Fibroscan y la biopsia hepática como referentes.

La esteatosis no se relaciona con la velocidad de propagación de las ondas, aunque algunos artículos dicen que disminuye la velocidad, pero la actividad necroinflamatoria sí de forma significativa.

Es una nueva herramienta con ventajas probadas en adultos. La exactitud diagnóstica es similar a la del Fibroscan, de hecho se plantea como una alternativa, pero tiene ventajas añadidas: puede usarse en pacientes con espacios intercostales pequeños, con ascitis y con obesidad mórbida[164].

ELASTO-RM

Mide también la elasticidad de los tejidos midiendo la velocidad de las ondas. Es superior en la evaluación de la fibrosis ya que la obesidad no es una limitación y permite estudiar el hígado entero. Sin embargo los datos son muy escasos por su baja disponibilidad y sus altos costes que limitan su uso en la práctica clínica siendo necesario realizar estudios para valorar esta técnica en niños[165].

Para la realización de todas las técnicas de resonancia magnética se necesitan tiempos largos de máquina, haciéndola poco práctica en la clínica diaria, además en niños es necesario sedación y anestesia con bastante frecuencia.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La EHGNA es un problema clínico emergente entre la población obesa. Esta entidad incluye un amplio espectro de lesiones hepáticas que van desde la simple esteatosis hepática sin inflamación, a la EHNA con la posible evolución a cirrosis hepática.

Aunque este síndrome tiene una etiología multifactorial, la obesidad es el factor que se asocia de forma más consistente. Muchos detalles referentes a la EHGNA en niños son desconocidos, incluyendo los mecanismos implicados en su desarrollo, habiendo asumido los mismos mecanismos que en el adulto. La mayoría de las publicaciones incluyen pacientes de rango de edad muy amplio y analizan los resultados sin diferenciar a niños y adolescentes.

Nuestra hipótesis se basa en la idea de que los mecanismos implicados en la EHGNA es distinta en niños y adolescentes.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Conocer en pacientes obesos si la prevalencia de esteatosis hepática es distinta en los niños prepúberes frente a los adolescentes.

2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Identificar factores de riesgo: familiares, somatométricos, metabólicos y bioquímicos (citoquinas, estrés oxidativo) que diferencien a los niños y adolescentes obesos con y sin esteatosis.
- Conocer qué factores influyen en los pacientes obesos con y sin aumento de transaminasas.

3 PACIENTES Y MÉTODOS

Diseño de estudio: Estudio de cohortes prospectivo.

Ámbito de estudio Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

3.1 PACIENTES

La cohorte de pacientes está compuesta por 157 niños y adolescentes españoles, entre 4-15 años de edad.

3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todos los sujetos de estudio tenían un IMC o índice de Quetelet superior al percentil 95 según la edad y el sexo, usando las bases de datos de referencia para el IMC de niños españoles⁶. Los pacientes fueron incluidos en la cohorte de forma consecutiva cuando fueron remitidos a la consulta de endocrinología Pediátrica con diagnóstico de obesidad, según las “Curvas de Referencia para la Tipificación Ponderal de la población infantil y juvenil” del grupo colaborativo AEP-SENC-SEEDO (Asociación Española de Pediatría y Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad) del año 2002.

- Los participantes en el estudio no consumían alcohol o medicaciones esteatogénicas.
- Aceptación de participar en el estudio con la firma del Consentimiento informado

⁶ Hernández M, Sánchez E, Sobradillo B. Curvas y tablas de crecimiento. In: Argente J, Carrascosa A, Gracia R, eds. Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia. 2nd ed. Barcelona: Doyma; 2000:1441-99.

3.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Fueron excluidos del estudio a los niños que recibían medicación o tenían otra enfermedad asociada o no a la obesidad que pudiera alterar el índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA-IR) o propiciar la esteatosis hepática. Como por ejemplo, los pacientes tratados con corticoides, presencia de diabetes tipo I, déficit de alfa-1-antitripsina, hepatitis infecciosa o síndrome de Wilson.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 METODOLOGÍA CLÍNICA

3.2.1.1 ANAMNESIS

Se recogió en la historia clínica del paciente los antecedentes familiares de obesidad, diabetes tipo 2 (en primer o segundo grado), alteración del metabolismo lipídico o de enfermedad hepática, edad, sexo, grupo étnico, peso al nacer, duración de la lactancia materna, consumo de fármacos o tóxicos, hábito tabáquico o consumo de alcohol en adolescentes.

Se preguntó por la presencia de síntomas especialmente dolor abdominal no específico o fatiga.

3.2.1.2 EXPLORACIÓN

Se registraron las siguientes variables clínicas: peso, talla, índice de masa corporal (peso en kilogramos/altura en metros cuadrados), presión arterial

sistólica y diastólica, presencia de acantosis nigricans, hepatomegalia o esplenomegalia.

El peso se obtuvo con una báscula clínica (precisión de 100 g) con el niño desnudo o en ropa interior pero descalzo, colocado sobre el centro de la báscula sin apoyarse en sitio alguno, comprobándose periódicamente la escala con un peso conocido.

La talla se tomó con un estadiómetro (modelo Holtain, amplitud 840-2060 mm) con precisión de 0.1 cm, estando el niño de pie, descalzo y erecto, con sus talones, nalgas y parte media superior de la espalda en contacto con la guía vertical de medición. Los tobillos juntos, los brazos colocados con las palmas hacia dentro, y la cabeza levantada cómodamente, procurando un plano imaginario entre el borde inferior de la órbita y conducto auditivo externo.

Con el fin de comparar los valores de IMC en todas las edades y sexos, se calculó la puntuación del IMC z-score[7].

3.2.1.3 MÉTODO DIAGNÓSTICO DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA

A 127 pacientes se le practicó una ultrasonografía hepática para definir la presencia de hígado graso por un experto radiólogo, usando un aparato Toshiba Powervisión 6000 scanner (Toshiba Medical, Otawara, Japan) con un transductor de 3,5-6 MHz.

El radiólogo desconocía las condiciones clínicas y analíticas de los pacientes. Los parámetros usados por el radiólogo para el diagnóstico de esteatosis fueron: evidencia de hiperecogenicidad difusa del hígado en relación a los riñones, atenuación ecográfica y pobre visualización de los vasos intrahepáticos y diafragma[160]. Como control de calidad un 10% de los sujetos fueron reevaluados y el coeficiente de variación de los resultados fue inferior al 1%.

3.2.2 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

3.2.2.1 RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas después de 10 horas de ayuno y divididas en tubos de plasma y suero. Para la determinación de parámetros bioquímicos, la sangre fue procesada y analizada por los métodos de rutina en el laboratorio general del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Para cada paciente se determinó, glucosa (miligramos por decilitro), insulina (microunidades por mililitro), TG (miligramos por decilitro), colesterol total (miligramos por decilitro), LDL colesterol (miligramos por decilitro), HDL colesterol (Miligramos por decilitro), ALT (unidades por litro), AST (unidades por litro) y gamma glutamil-transferasa (GGT) (unidades por litro).

El Índice HOMA-IR (Homeostasis model assesment, modelo homeostático con datos basales) fué calculado según la siguiente fórmula: $\text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa (mmol/L)} / 22,5$.

Se congelaron 2ml de suero a -80°C para estudio de los niveles de adipocinas, TNF- α receptor soluble de TNF- α y los marcadores de estrés oxidativo.

En todos los niños con aumento de transaminasas se amplió el estudio para excluir otras enfermedades metabólicas, víricas o autoinmunes capaces de provocarla (hepatitis vírica, enf. Wilson, fibrosis quística, déficit de alfa-1-antitripsina, estudio del metabolismo del hierro, función tiroidea y autoanticuerpos).

3.2.2.2 ANÁLISIS DE LA MUESTRA HEMATOLÓGICA

- Los parámetros hematológicos se determinaron con el analizador ISAZA COULTER S-PLUS JR. Los parámetros bioquímicos mediante el analizador

automático HITACHI 717 (Boehringer Mannheim) siguiendo los métodos habituales de nuestro hospital.

- En los niños con ALT elevada se determinaron los anticuerpos antinucleares (ANA) y antimitocondriales (AMA) mediante el analizador automático Atom[®] (inmunofluorescencia indirecta) con células Hep-2 para ANA y con antígenos presentes en hígado, riñón y estómago de rata para los AMA. Los marcadores del Virus de la hepatitis A (VHA) y Virus de la hepatitis b (VHB) por enzimoimmunoensayo convencional (Abbott), CMV (Instituto Berhing). El Virus de la hepatitis C (VHC) mediante ELISA3 (Ortho), RIBA3 (Chiron). Las hormonas tiroideas mediante inmunoensayo competitivo para la triyodotironina (T₄) total y tiroxina (T₃) libre y un test inmunométrico para la hormona estimulante del tiroides (TSH) (IMMULITE 2000[®]). La alfa-fetoproteína mediante enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA Axsym[®] AFP).
- La **determinación de la concentración en suero de las citoquinas** se midieron en plasma. La adiponectina (nanogramos por mililitro), leptina (nanogramos por mililitro), TNF- α (picogramos por mililitro), IL-6 (picogramo por mililitro), y MCP-1 (picogramo por mililitro) se midieron por Luminex 100 Sistema Integrado de 2,3 software en los 200 Bio-Plex Sistema (Bio-Rad, Austin, TX). Los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La forma soluble de TNF- α receptor (sTNF α -R) se determinó por inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (Bender Med Systems, Viena, Austria). No se detectó reactividad cruzada con TNF humano- α (<1 ng / ml) o TNF-beta (<100mg/ml). El receptor soluble de leptina (SLR) se determinó por ELISA (Enzo Ciencias de la Vida, de Plymouth Meeting, PA). La determinación de los niveles de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) se realizó mediante ELISA (IBL-International, de Hamburgo, Alemania).

- **Los marcadores de estrés oxidativo** fueron analizados en muestras simples de sangre. Para la determinación de los niveles de nitritos, las muestras de plasma fueron desproteinizadas y los sobrenadantes se utilizaron para medir la cantidad de nitrito mediante la reacción de Griess a 550 nm, en un lector de microplacas (TRIAD serie, Dynex Technologies, Chantilly, VA)[166]. Las concentraciones se calcularon de acuerdo con una curva estándar y expresada en nanomoles por mililitro. Para la actividad específica de la GPx eritrocitaria y GRD, los eritrocitos se lisaron y se utiliza sobrenadantes. Las actividades específicas se midieron después de la oxidación de los NADPH durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro UV (Thermo Spectronic, Biomate3, Rochester, NY)ⁱ.

La actividad de ambas enzimas se expresa en nanomoles por miligramo de hemoglobina (HB). Las formas GSH y GSSG se determinó en el lisado de células sanguíneas. Ambos GSH y GSSG se midieron mediante un método fluorométrico que fue ligeramente modificado[167]. Las muestras se incubaron con ophthalaldehydo y se midió la fluorescencia en un lector de placas espectrofluorómetro (TRIAD Series, Dynex Technologies). Usando una curva normal de concentraciones conocidas de GSH para el procesamiento de las muestras. Para medir la concentración de GSSG, los sobrenadantes se preincubaron con N-etilmaleimida, y luego se alcalinizó con NaOH. Se midió la fluorescencia y las concentraciones de GSSG se calcularon de acuerdo con una curva estándar. Los niveles de GSH y GSSG se expresan en nanomoles por miligramo de HB.

3.2.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Ciento cincuenta y siete niños y adolescentes obesos fueron incluidos en el estudio. Los sujetos fueron clasificados según la situación puberal de la siguiente manera: Grupo 1-pacientes sin signos de madurez sexual de acuerdo con los niveles de DHEAS (59 niños); grupo 2-pacientes diferentes estadios de Tanner⁷ y con altos niveles de DHEAS (98 adolescentes). Para el estudio de los factores asociados con esteatosis hepática, cada paciente se clasificó de acuerdo con la ausencia o presencia de esteatosis hepática detectada por ecografía.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico para Ciencias Sociales (SPSS 15.0, SPSS Inc, Chicago, IL).

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de muestras independientes para comparar las variables con distribución normal, mientras que para las variables sin distribución normal se usó la prueba de Mann-Whitney. Las correlaciones lineales se calcularon por el Coeficiente de correlación de Pearson. El grado de asociación se determinó mediante el cálculo de la odds ratio (OR) y su intervalo de confianza del 95% (IC del 95%) por medio Regresión logística. El criterio de significación estadística fue $p < 0,05$.

3.2.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se desarrolló de acuerdo con la última versión de la Declaración de Helsinki y los requerimientos locales. Antes de la inclusión del

⁷ Tanner JM. Growth at Adolescence. Oxford, UK, Blackwell Scientific; 1962: 28-39

primer sujeto de estudio, el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital San Cecilio.

El modelo de consentimiento informado genérico puede encontrarse como Anexo I.

Los investigadores fueron los responsables de obtener el consentimiento informado FIRMADO, para los sujetos participantes. Los pacientes mayores de 12 años y todos los padres de los sujetos de estudio firmaron el consentimiento informado después de recibir una hoja de información explicando el objeto del estudio. Los consentimientos informados se firmaron por duplicado (original para el investigador y copia para el sujeto participante (padres/tutores).

Confidencialidad de los datos. En todas las fases del estudio se respetó lo establecido por la Ley de Protección de Datos. Se mantuvo la confidencialidad de todos los datos de carácter personal, los cuales quedaron anonimizados en la base de datos central, que, además, ha estado protegida por una contraseña que sólo era conocida por el personal autorizado implicado en el estudio.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

4.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 157 niños obesos de ellos, 78 (49,7%) eran niñas y 79 (50,3%) niños, con una media de edad de 10,7 años \pm 2,4 (entre 4 y 15 años). La media del índice de masa corporal fue de 28,6 \pm 3,7 (entre 22 y 44) y la media del IMC-z-score corregido por edad y sexo fue de 2,23 \pm 0,03 (entre 1,7 y 4). Solamente 2 (1,9%) niños tenían acantosis nigricans, 6 (5,7%) niños tenían hepatomegalia y de ellos 5 eran niños y una niña. Al valorar los antecedentes familiares de diabetes o trastornos lipídicos: 55 (37,4%) no tenían antecedentes, el resto, 34 tenían antecedentes de diabetes (21,8%) en la familia, 28 trastornos lipídicos (18,4%) o ambos en 35 pacientes (22,4%). No fue recogido en 5 pacientes (3.18 %)

4.1.2 ANTECEDENTES PERINATALES Y TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA OBESIDAD

El 90% de los pacientes incluidos en el estudio tuvieron un peso normal al nacer (2500-4000g), el 4,7% tuvo un peso inferior a 2500g y el 5,3% pesó más de 4000g. El 65% recibió lactancia materna exclusiva con una media en meses de 4,03 \pm 3. El resto se alimentó con lactancia artificial o mixta. El tiempo de evolución de la obesidad pudo ser recogido en 134 niños con una media de 5,7 \pm 2,8 años.

4.1.3 INSULINA, ÍNDICE HOMA Y PÉPTIDO C

El 71,3% de los niños tenían un Péptido C superior a 2, presentando una correlación positiva con las cifras de insulina (Rho de Spearman = 0,800 y un valor de $p < 0,001$), del índice HOMA (Rho de Spearman = 0,789 y un valor de $p < 0,001$) y con la edad de los pacientes (Rho de Spearman = 0,518 y un valor de $p < 0,001$).

4.2 ANÁLISIS BIVARIANTE

4.2.1 ANÁLISIS DE PARÁMETROS ESTUDIADOS EN TODOS LOS PACIENTES Y EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES

El resto de las variables estudiadas se muestran en la tabla 5 y 6 en los niños y adolescentes obesos. Los niños (G1) eran más obesos que los adolescentes y las tasas de colesterol total eran más altas. En el grupo de adolescentes, la insulina, glucosa y el índice HOMA fueron significativamente más altos con respecto a los niños.

Las variables asociadas de forma significativa con el estrés oxidativo y citoquinas están representadas en la tabla 6. GPx, la fracción $TNF\alpha/RTNF\alpha$, el receptor soluble de la leptina (SLR) y la adiponectina están más elevadas en el grupo 1, mientras que la leptina y la leptina libre están más elevadas en el grupo 2. SLR presenta una correlación negativa con la leptina en el todos los pacientes (Coeficiente de correlación de Pearson -344; $p < 0,01$).

Tabla 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS

Características	Total n=157	G 1 n=59	G 2 n=98	P
Género masculino: n (%)	79 (50)	30 (51)	49 (50)	0,921
DHEAS	129 ± 6	71,5 ± 4	162 ± 7	0,001
IMC (z-score)	2,23 ± 0,03	2,4 ± 0,4	2,1 ± 0,2	0,001
Años de obesidad	5,7 ± 0,2	4,6 ± 2	6,3 ± 3	0,684
Glucosa (mg/dL)	84 ± 0,7	81,5 ± 1,1	85 ± 0,8	0,022
Insulina (μU/mL)	15,8 ± 0,8	11,5 ± 0,8	17 ± 1	0,001
Péptido C (mg/dL)	3,3 ± 0,6	2,1 ± 0,1	4 ± 1	0,143
Índice HOMA	3,1 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,5 ± 0,2	0,001
Colesterol total (mg/dL)	163 ± 2,9	172 ± 4,5	157 ± 3,7	0,004
Triglicéridos (mg/dL)	87 ± 3,8	91 ± 3	85 ± 4,3	0,320
LDL-C (mg/dL)	98 ± 2,3	101 ± 3,7	95 ± 3	0,227
HDL-C (mg/dL)	50,5 ± 0,8	52 ± 1,3	50 ± 1	0,225
Bilirrubina total (mg/dL)	0,36 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,011
Apolipoproteína A (mg/dL)	132,5 ± 1,7	135 ± 2,8	131 ± 2,2	0,252
Apolipoproteína B 100 (mg/dL)	68 ± 1,9	69 ± 4,1	67 ± 2	0,784
ALT (UI/L)	23 ± 1	24 ± 1,6	23 ± 1,2	0,583
AST (UI/L)	25 ± 0,9	28 ± 1	24 ± 1,2	0,024
GGT (U/L)	15 ± 0,6	14,8 ± 0,7	15 ± 0,6	0,672

ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; BMI: índice de masa corporal; DHEA: dehidroepiandrosterona sulfato; GGT: gamma glutamiltransferasa; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HOMA-RI: índice de evaluación del modelo homeostático; LDL: lipoproteínas de alta densidad. Grupo 1, 59 niños; grupo 2, 98 adolescentes. Los resultados están expresados como media ± DE. En negrita se encuentran aquellas p estadísticamente significativas.

Tabla 6. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO SISTÉMICO, CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ADIPOQUINAS EN NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS

Parámetro	Total n=157	G 1 N=59	G 2 n=98	P
GSH(nmol/mg HB)	4,8 ± 0,1	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	0,742
GSSG(nmol/mg HB)	1,0 ± 0,06	0,99 ± 0,07	1,0 ± 0,07	0,925
GST(nmol/mg HB)	5,9 ± 0,13	5,7 ± 0,2	5,9 ± 0,17	0,461
GSSG/GSH	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,08	0,925
GPx (nmol/mg HB)	36,0 ± 0,9	39,2 ± 1,4	34,5 ± 1,2	0,015
GRd (nmol/mg HB)	2,5 ± 0,08	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,190
LPO (nmol/mL)	8,5 ± 0,23	8,6 ± 0,4	8,3 ± 0,3	0,527
Nitritos (nmol/mL)	8,7 ± 0,3	9 ± 0,5	8,5 ± 0,4	0,357
RTNFα (pg/mL)	1,90 ± 0,08	1,80 ± 0,1	2,03 ± 0,1	0,190
TNFα (pg/mL)	7,7 ± 0,4	7,4 ± 0,6	7,8 ± 0,5	0,618
TNFα/ RTNFα	4,9 ± 0,4	5,5 ± 0,8	4,5 ± 0,3	0,001
MCP-1 (pg/mL)	448 ± 34	390 ± 37	484 ± 49	0,183
Leptina (ng/mL)	25,8 ± 1,1	22,4 ± 1,6	27,9 ± 1,6	0,024
SLR (ng/mL)	16,3 ± 0,6	19,8 ± 0,9	14,6 ± 0,6	0,001
Índice leptina libre (FLI)	20 ± 1,4	14,5 ± 2	22,2 ± 1,8	0,005
IL6 (pg/mL)	11,6 ± 1,8	14,6 ± 3,8	9,9 ± 1,7	0,199
Resistina (pg/mL)	53,9 ± 5	52,8 ± 6,6	54,6 ± 7,1	0,864
Adiponectina (ng/mL)	83,9 ± 1,9	89,7 ± 2,6	80,4 ± 2,6	0,019

GPx: glutatión oxidasa; GRd: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; HB: hemoglobina; IL: interleuquina; MCP: proteína quimiotáctica de monocitos; SLR: receptor soluble de leptina; TNF-α: factor de necrosis tumoral-α; TG: glutatión total. Grupo 1, 59 niños; grupo 2, 98 adolescentes. Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas.

4.2.2 ESTUDIO DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA

La presencia de esteatosis hepática fue evaluada en 127 pacientes (51 en el grupo 1 y 76 en el grupo 2) y los sujetos que presentaron esteatosis fueron 57 con una prevalencia del 44,9%, no encontrando diferencias respecto a la edad o el sexo. En el grupo 1 presentaron esteatosis 20/51 (39,2%) frente a 37/76 (48,7%) en el grupo 2.

En la Tabla 7 y 8 se muestran las variables asociadas con esteatosis hepática y las diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En la tabla 7 están representadas el IMC (z-score) y la bioquímica sanguínea. En el grupo 1, el HDL-C fue más bajo en los niños con esteatosis. En el grupo 2 los factores asociados con la esteatosis fueron: mayor niveles de insulina, de índice HOMA, péptido C, ALT, AST y triglicéridos.

El resto de parámetros bioquímicos estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 7. CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS Y LA PRESENCIA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA

	G1			G 2		
	No esteatosis N=31 (61%)	Esteatosis N=20 (39%)	P	No esteatosis N=39 (51,3%)	Esteatosis N=37(48,7%)	P
IMC (z score)	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,06	0,999	2,08 ± 0,03	2,2 ± 0,04 ##	0,019
ALT UI/L	22 ± 1,4	27,4 ± 3,9	0,135	19,5 ± 1,1	27,5 ± 2,6	0,007
AST UI/L	26,1 ± 1,2	29 ± 2,1	0,203	21,7 ± 0,8	26 ± 2,7	0,007
GGT UI/L	15,4 ± 1,3	14 ± 0,9	0,453	14,6 ± 1	15,6 ± 0,9#	0,476
Hierro (µg/mL)	84 ± 5,6	69 ± 6	0,089	83,2 ± 5	79,06 ± 4#	0,533
HDL-C (mg/dL)	54,4 ± 1,7	48,5 ± 1,7	0,026	50 ± 1,6	48 ± 1,7	0,427
Triglicéridos (mg/dL)	82 ± 8,4	98 ± 14	0,302	75,3 ± 6,2	95,2 ± 7,6	0,047
Hombres, n(%)	14 (54)	12 (46)		21 (52,5)	19 (47,5)	
Mujeres, n(%)	17 (68)	8 (32)	0,392	18 (50)	18 (50)	1.000
Insulina (µU/mL)	12 ± 1,3	11,2 ± 1,1	0,668	13,3 ± 0,83	22,7 ± 2,1###	0,001
Péptido C (mg/dL)	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,738	2,5 ± 0,1	6,5 ± 2,0###	0,043
HOMA-RI	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,2	0,999	2,7 ± 0,2	4,7 ± 0,5###	0,001

La presencia de esteatosis hepática fue evaluada en 127 sujetos. Grupo 1, 51 niños; grupo 2, 76 adolescentes. Las diferencias estadísticamente significativas entre esteatosis en grupo 1 y grupo 2 se encuentran marcadas como (##) (P<0.010) y (###) (P<0.001). Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HOMA-RI: índice de evaluación del modelo homeostático .

En la tabla 8 se muestran los marcadores de estrés oxidativo y la medida de los niveles de adipoquinas. En el grupo 1 los niños con esteatosis muestran niveles elevados de GSSG y resistina y un descenso de la actividad específica de GRd y de GPx. En el grupo 2, los adolescentes con esteatosis tienen niveles mayores de GSSG, GST, del índice GSSG/GST y de leptina. La GPx y el receptor soluble de la leptina fueron más bajos en el grupo de pacientes adolescentes con esteatosis. Al comparar estas variables entre los dos grupos con esteatosis, los adolescentes fueron menos obesos pero tenían mayores niveles de insulina, índice HOMA y péptido C (Tabla7) y menores tasas de SLR y adiponectina que los niños obesos con esteatosis (Tabla 8).

Tabla 8. RESULTADOS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ADIPOQUINAS EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS Y PRESENCIA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA

	G1			G 2		
	No esteatosis	Esteatosis	P	No esteatosis	Esteatosis	P
	N=31	N=20		N=39	N=37	
GSSG (nmol/mg HB)	0.78 ± 0.06	1.13 ± 0.15	0.028	0.8 ± 0.06	1.2 ± 0.14 [#]	0.013
GSHT (nmol/mg HB)	5.5 ± 0.3	5.9 ± 0.4	0.421	5.4 ± 0.2	6.3 ± 0.3	0.014
GSSG/GSH	0.19 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.228	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.028
GPx (nmol/mg HB)	40.7 ± 1.5	35.8 ± 4	0.052	38.1 ± 1.6	32.6 ± 2	0.035
GRd (nmol/mg HB)	2.8 ± 0.1	2.3 ± 0.2	0.017	2.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.081
Resistin (ng/mL)	45.4 ± 6.5	72.4 ± 15	0.036	56.5 ± 15	57.3 ± 8.3	0.963
Leptin (ng/mL)	22 ± 2	24.1 ± 3	0.547	23.6 ± 1.6	30.8 ± 2.8	0.026
SLR (ng/mL)	20.7 ± 1.3	19.1 ± 1.6	0.442	16 ± 1	13.4 ± 0.8 ^{###}	0.048
Adiponectin (ng/mL)	87.7 ± 4.2	94.1 ± 2.8	0.267	84.7 ± 3.7	76.7 ± 4.6 ^{###}	0.178

La presencia de esteatosis hepática fue evaluada en 127 sujetos. Grupo 1, 51 niños; grupo 2, 76 adolescentes. Las diferencias estadísticamente significativas entre esteatosis en grupo 1 y grupo 2 se encuentran marcadas como (##) (P<0.010) and (###) (P<0.001). Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas. GPx: glutatión oxidasa; GRd: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; HB: hemoglobina; SLR: receptor soluble de la leptina.

4.2.3 INDICE HOMA Y ESTEATOSIS EN RELACIÓN A LA EDAD Y EL SEXO

Como se observa en la figura 8, la asociación entre el Índice HOMA y esteatosis, difiere en relación a la edad y el sexo. En el grupo 1, no hay diferencias entre los niños y las niñas con y sin esteatosis en el HOMA, en el grupo 2 los valores son superiores en ambos sexos pero sobretodo en varones con esteatosis.

El incremento del índice HOMA en adolescentes (Tabla 5) es fundamentalmente de los varones. En relación a la glucosa todos los sujetos de estudio tenían una normoglicemia en ayunas (nivel de glucosa en ayunas inferior a 110mg/dL).

Por tanto el incremento del índice HOMA es a expensas de un incremento de insulina. Finalmente hay una correlación entre la edad y el HOMA (Coeficiente de correlación de Pearson 0,511; $p < 0,001$) pero no entre el índice HOMA y los años de obesidad.

4.2.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante mostró que el descenso en la actividad de GRd fue el único factor independiente relacionado con la esteatosis en el Grupo 1 (odds ratio [OR] 0,165; 95% IC: 0,03 –0,84; $P=0,030$); también, el análisis muestra una tendencia a que el incremento de los niveles de resistina está relacionado con la esteatosis con un valor de $p=0,064$ cercana a la significación (OR 3,9; 95% IC: 0,958–15,874). El resto de marcadores inflamatorios no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

En el grupo 2 los factores independientes relacionados con la esteatosis fueron el incremento de GSSG (OR 6,8; 95% IC: 1,6–28,7; $P=0,010$) y del HOMA-IR (OR 1,9; 95% IC: 1,17–3,1; $P=0,009$). Al comparar la esteatosis entre el grupo de niños y adolescentes, el único factor independiente encontrado fue los niveles mayores de HOMA en el grupo 2 (OR 2,45; 95% IC: 1,4–4,3; $P=0,002$).

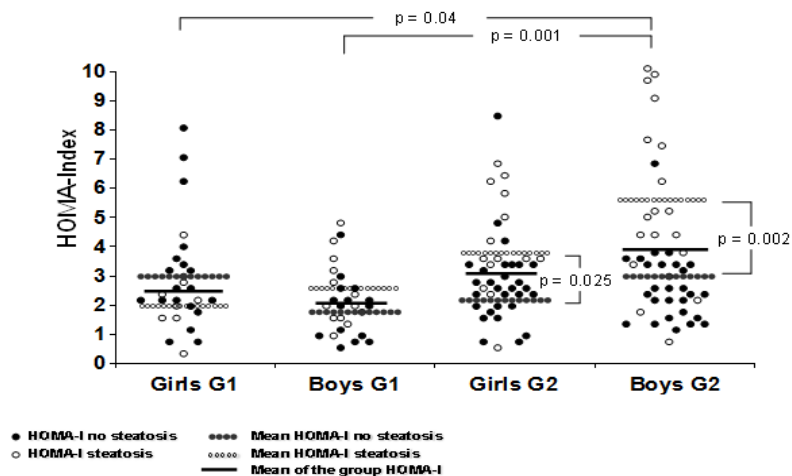


Figura 8. HOMA-IR en relación al sexo y esteatosis. Los sujetos han sido clasificados en 4 grupos según el sexo y al grupo al que pertenecían (niños G1; adolescentes G2). Los puntos negros representa el índice HOMA-RI en sujetos sin esteatosis hepática y los puntos blancos representan el índice HOMA-RI en sujetos con esteatosis. La media del índice HOMA-RI está representada como una línea horizontal en cada grupo. Media HOMA-RI en todos los pacientes (—), media HOMA-RI en pacientes con esteatosis (o.....). La media HOMA-RI en niños del grupo G2 presenta diferencias estadísticamente significativas con el grupo de niños G1 (P=0.001) y las niñas del grupo G1(P=0.040). La media del índice HOMA-RI en sujetos con esteatosis hepática difiere significativamente de los sujetos sin esteatosis en los niños del grupo G2 (P=0.002) y niñas del grupo G2 (P=0.025).

4.2.5 ESTUDIO DE TRANSAMINASAS.

4.2.5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES Y AUMENTO DE LA ALT

En la tabla 9, se recogen los resultados. Solamente 18 (12%) de los pacientes presentaron aumento de la ALT con predominio en los niños 13 (72%) y 5 (28%) niñas con un valor de $p = 0,056$. Las características de los pacientes con aumento de ALT frente a los que tenían unas tasas normales, fueron: mayor índice HOMA, mayor IMC-z-score, triglicéridos, AST, péptido C y esteatosis hepática con menores tasas de HDL-C.

Tabla 9. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y AUMENTO DE LA ALT

	ALT Normal (n = 128)	ALT Aumentada (n = 18)	
Sexo: niño, n (%)	63 (49)	13 (72)	0,056
Edad de los pacientes (años)	10,8 ± 2	10,2 ± 2	0,352
DHEAS	130 ± 6	117 ± 11	0,361
IMC (Z score)	2,21 ± 0,3	2,41 ± 0,4	0,026
Peso al nacer g	3376,3 ± 594,1	3167,06 ± 517,7	0,170
Antecedentes fam. n (%)	78/122 (64)	7/16 (44)	0,119
Insulina (µU/mL)	14,44 ± 8,3	18,27 ± 13,6	0,304
Índice HOMA-RI	2,98 ± 1,7	3,86 ± 2,8	0,011
Colesterol total (mg/dL)	163,2 ± 33,3	159,56 ± 49,1	0,763
HDL-C (mg/dL)	51,01 ± 9,3	45,93 ± 11,2	0,050
Triglicéridos (mg/dL)	82,37 ± 42,5	117,61 ± 53,9	0,015
Apolipoproteína A (mg/dL)	132,82 ± 17,6	128,83 ± 29,4	0,604
GGT (UI/L)	14,61 ± 5,7	16,76 ± 5,6	0,149
AST (UI/L)	23,11 ± 5,5	39,61 ± 19,5	0,002
AST/ALT > 1	88/128 (69)	4/14 (22)	0,001
Peptido C (mg/dL)	2.69± 1.4	9.45± 22.4	0,001
Esteatosis n(%)	44/106 (41,5)	10/15 (67)	0,06

La alanina transferasa (ALT) fue evaluada en 146 pacientes. Grupo ALT normal con 128 sujetos y Grupo ALT aumentada con 18 pacientes. Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas. DEHAS: Dehidroepiandrosterona sulfato ;IMC: índice de masa corporal (z score); HOMA-RI: índice de evaluación del modelo homeostático; HDL-C: lipoproteína de alta densidad; GGT: gamma glutamiltransferasa; AST: aspartato aminotransferasa

El análisis multivariante mediante regresión logística mostró que de los parámetros analizados solamente la AST y los triglicéridos fueron variables independientes (Tabla 10).

Tabla 10. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LAS CARACTERÍSTICA CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y ALT

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
AST	0,261	0,058	20,313	1	0,001	1,298	1,159	1,455
Trigliceridos	0,018	0,007	6,5	1	0,011	1,018	1,004	1,032
Constante	-11,1	2,161	26,376	1	0,000	0		

4.2.5.2 PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y AUMENTO DE ALT

En la Tabla 11 se analiza el comportamiento de los parámetros de estrés oxidativo entre los pacientes con ALT normal y aumentada, evidenciando que se encuentran más elevados en los pacientes que tienen la ALT aumentada, en cambio la GPx y GRd esta disminuida.

Tabla 11. ESTRÉS OXIDATIVO Y ALT NORMAL Y AUMENTADA

	ALT Normal (n = 128)	ALT Aumentada (n = 18)	P
GSSG(nmol/mg HB)	0,96 ± 0,5	1,17 ± 0,4	0,095
GSH(nmol/mg HB)	4,64 ± 1,2	5,58 ± 0,9	0,007
GSHT(nmol/mg HB)	5,61 ± 1,3	6,75 ± 1,2	0,003
GSSG/GSH	0,22 ± 0,1	0,20 ± 0,06	0,220
GPx (nmol/mg HB)	36,59 ± 10	34,97 ± 11,4	0,010
GRd (nmol/mg HB)	2,58 ± 0,8	2,33 ± 1	0,001
NITRITOS	8,7 ± 2,7	8,9 ± 2,9	0,837

La alanino transferasa (ALT) fue evaluada en 146 pacientes. Grupo ALT normal con 128 sujetos y Grupo ALT aumentada con 18 pacientes. Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas.

4.2.5.3 ESTUDIO DE ADIPOQUINAS, CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ALT

En la mayoría de los parámetros analizados no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, solamente la resistina se

encontraba más alta en el grupo de ALT aumentada y una tendencia a mayor adiponectina en el mismo grupo con diferencias casi significativas (Tabla 4)

Tabla 12. Citoquinas Y ADIPOQUINAS SEGÚN ALT NORMAL O AUMENTADA

	ALT Normal (n = 128)	ALT Aumentada (n = 18)	P
Leptina (ng/mL)	25,39± 13,5	28,40 ± 12,4	0,389
SLR (ng/mL)	16 ± 5,6	20,1 ± 6,7	0,023
Resistina (pg/mL)	50,02 ± 60	79,37 ± 60	0,037
Adiponectina (ng/mL)	82,87 ± 24,3	92,24 ± 20,2	0,082
TNFα receptor (pg/mL)	0,52 ± 0,05	0,55 ± 0,09	0,835
TNFα soluble (pg/mL)	1,86 ± 0,6	1,97 ± 0,51	0,492
TNFα libre (pg/mL)	1,33 ± 0,73	1,41 ± 0,62	0,688
MCP1 (pg/mL)	5,83 ± 0,68	6 ± 0,62	0,336
IL6 ((pG/mL)	1,6 ± 1,1	1,9 ± 1,2	0,406

La alanino transferasa (ALT) fue evaluada en 146 pacientes. Grupo ALT normal con 128 sujetos y Grupo ALT aumentada con 18 pacientes. Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas.

4.2.5.4 ESTUDIO DE NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS SIN Y CON AUMENTO DE TRANSAMINASAS

En la tabla 13 Y 14 se muestran los resultados del comportamiento de las variables bioquímicas y del estrés oxidativo y citoquinas respectivamente. En el grupo de niños los factores relacionados con aumento de ALT fue menor tasa de glucosa y apolipoproteína A y HDL-C, así como aumento de la AST. En los adolescentes el aumento de ALT se relaciona con la esteatosis mayor IMC (z score), insulina HOMA, triglicéridos, AST, GGT y péptido C. Al valorar las diferencia entre los niños con ALT elevadas del grupo 1 y 2, en el grupo 1 los niños con esteatosis eran más obesos pero en el grupo de adolescentes tenían mayores tasa de glucosa, insulina, HOMA, GGT y péptido C (Tabla 13)

Tabla 13. RESULTADOS DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS Y SEXO EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS SEGÚN ALT NORMAL O AUMENTADA.

Variables ALT	G1			G2		
	ALT normal 48 (86)	ALT aumentada 8 (14)	P	ALT normal 80(89)	ALT aumentada 10 (11)	p
Total n (%)						
Hombre n (%)	23 (79,3)	6 (20,7)	0,15	40 (85,1)	7 (14,9)	0,198
Mujer n (%)	25 (92,6)	2 (7,4)		40 (93)	3 (7)	
BMI (Z score)	2,43± 0,3	2,49± 0,7	0,809	2,09 ± 0,2	2,35 ± 0,2**	0,003
Peso al nacimiento (g)	3370±665	3107±443	0,313	3372 ± 564	3209 ± 629	0,367
Glucosa (mg/dL)	82,4 ± 8	76,1 ± 7	0,05	84,3 ± 8	87,2 ± 8**	0,301
Insulina (µU/mL)	11,6±6	10,93±8	0,786	16 ± 9	25 ± 14**	0,05
HOMA-IR	2,4±1,3	2,2±1,8	0,777	3,3 ± 1,9	5,3 ± 2,2**	0,05
Cholesterol Total (mg/dL)	173,1± 29,8	165,4 ± 61,8	0,748	157,4 ± 35	154,4 ± 39	0,829
HDL-C (mg/dL)	52,4± 9,6	44,3 ± 9,9	0,05	51 ± 10	47,1 ± 13	0,441
Trigliceridos (mg/dL)	88,4± 52	111,13 ± 55,2	0,263	79 ± 35	123 ± 55	0,05
Apolipoprotein A (mg/dL)	138,5 ± 16	114,6 ± 16	0,002	130 ± 18	140,5 ± 28	0,32
Apolipoproteina B (mg/dL)	70,2 ± 18	63,2 ± 23	0,496	68 ± 15	65,2 ± 20	0,742
GGT (UI/L)	14,9 ± 6	14,4 ± 3	0,815	14,7 ± 5	19 ± 6*	0,03
AST (UI/L)	25,3 ± 5,1	40,6 ± 10	0,004	24 ± 5,04	39 ± 24	0,05
Peptide C (mg/dL)	2,1 ± 0,8	2,06 ± 0,6	0,893	3,1 ± 1	15,8 ± 3,5**	0,05
Steatosis n(%)	16/42 (38)	4/7 (57)	Ns	28/64 (44)	6/8 (75)*	0,09

Los parámetros bioquímicos fueron evaluados en 56 sujetos del grupo 1 (niños), de los cuales 48 presentaban ALT normal y 8 aumentada. En el grupo 2 (adolescentes) se evaluó a 90 sujetos, de los cuales 10 presentaban cifras normales de ALT y 10 aumentadas. Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas.

Tabla 14. RESULTADOS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ADIPOQUINAS EN LOS NIÑOS Y ADOLESCENTES OBESOS SEGÚN ALT NORMAL O AUMENTADA

	G1			G 2		
	ALT normal 48 (86)	ALT aumentada 8 (14)	P	ALT normal 80(89)	ALT aumentada 10 (11)	P
GSSG (nmol/mg HB)	0,95 ± 0,4	1,1 ± 0,42	0,028	0,96 ± 0,6	1,3 ± 0,4	0,248
GSH (nmol/mg HB)	4,53 ± 1,3	5,53 ± 0,84	0,025	4,72 ± 1,1	5,63 ± 1	0,045
GSHT (nmol/mg HB)	5,5 ± 1,4	6,64 ± 1,2	0,050	5,6 ± 1,3	6,8 ± 1,3	0,022
GSSG/GSH	0,22 ± 0,15	0,19 ± 0,05	0,998	0,22 ± 0,1	0,22 ± 0,06	0,129
GPx (nmol/mg HB)	39,1 ± 9,8	39,01 ± 10	0,976	35 ± 10	31,4 ± 12	0,355
GRd (nmol/mg HB)	2,69 ± 0,7	2,4 ± 0,8	0,373	2,5 ± 0,8	2,27 ± 1,2	0,581
Resistín (ng/mL)	47,8 ± 4	88,4 ± 8	0,034	51,5 ± 5	71,3 ± 8	0,410
Leptín (ng/mL)	22,2 ± 12	24,4 ± 12	0,647	27,3 ± 1,3	32 ± 2,8	0,340
SLR (ng/mL)	15,3 ± 5,3	12,4 ± 10	0,630	22,1 ± 1,5	21,1 ± 2###	0,887
Adiponectín (ng/mL)	86,8 ± 20	101,6 ± 3,1	0,001	80,5 ± 2,5	83,8 ± 2,5 ##	0,713

Se evaluó el estrés oxidativo y adipoquinas en 56 sujetos del grupo 1 (niños), de los cuales 48 presentaban ALT normal y 8 aumentada. En el grupo 2 (adolescentes) se evaluó a 90 sujetos, de los cuales 10 presentaban cifras normales de ALT y 10 aumentadas. Los resultados están expresados en media ± DE. En negrita se expresan aquellas p estadísticamente significativas.

Al valorar el estrés oxidativo y las citoquinas (Tabla 14), en el grupo 1 el aumento de ALT se relacionó con mayores tasas de GSSG, GSH, GSHT, resistina y adiponectina. En los adolescentes (grupo 2) solamente el aumento de GSHT resultó mas alto que en los que no tenían aumento de transaminasas. Al comparar el grupo 1 y 2 con aumento de transaminasas, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el SLR, los adolescentes (grupo 2) tenían mas receptor y menos adiponectina.

Análisis multivariante del aumento de ALT en niños y adolescentes

En los niños no entra ningún parámetro en la ecuación. En los adolescentes la mayor tasa de triglicéridos fue el único factor independiente relacionado con el aumento de ALT $\hat{\delta} = 1,04$; CI 95% (1,01;1,08) $p=0.002$. El HOMA más elevado mostró diferencias casi significativa $\hat{\delta} = 1,33$; CI 95% (0,96;1,83) $p = 0,09$. El resto de parámetros de estrés oxidativo y citoquinas no fueron significativos.

5 DISCUSSION

Pocos estudios han analizado los factores asociados a la enfermedad de hígado graso no alcohólico en sujetos obesos, comparando la edad prepuberal con el período puberal. El objetivo de nuestro estudio fue analizar, en una cohorte de niños y adolescentes obesos, la asociación de la esteatosis hepática con una serie de parámetros que incluyen los datos bioquímicos, citoquinas proinflamatorias, adipocinas y marcadores de estrés oxidativo sistémico. Los resultados obtenidos destacan diferencias en los factores asociados a la esteatosis hepática en niños y adolescentes obesos.

Aunque los pacientes fueron incluidos consecutivamente en nuestro cohorte por la presencia de un IMC por encima del percentil 95, el grupo de niños fueron más obesos que los adolescentes (Tabla 5). Estas diferencias en el grado de obesidad, junto con variaciones en otros parámetros (Tablas 5 y 6), son probablemente una consecuencia de los cambios fisiológicos que se producen durante la pubertad. Se ha descrito en la literatura la presencia de niveles elevados de leptina durante el periodo de la pubertad, ya que la concentración de leptina está implicada en la maduración sexual, y de forma más evidente en adolescentes obesos[55, 56], en correlación negativa con su receptor soluble.[50, 168, 169]

La prevalencia esteatosis hepática encontrada en nuestra cohorte está de acuerdo con los resultados publicados anteriormente[170-173] (Tabla 5), en artículos más recientes se demuestran prevalencias ligeramente inferiores[117]. Tampoco hemos encontrados diferente prevalencia entre los sexos. Aunque muchos estudios han informado de un predominio masculino entre los niños y adolescentes obesos que presentaban esteatosis hepática[170, 171], otros no han observado tales diferencias[174]. Estas discrepancias están probablemente relacionados con las diferencias ambientales y genéticas entre las cohortes.

Los factores asociados en este estudio con esteatosis hepática en adolescentes obesos se han descrito como factores determinantes para la obesidad

adulta[99, 120, 144, 175, 176]; e incluyen alteraciones de lípidos, IMC, HOMA - IR, la actividad de aminotransferasa, los niveles de leptina, y estrés oxidativo (Tabla 7 y 8). La esteatosis hepática en niños obesos se asocia únicamente con los niveles de estrés oxidativo y de resistina. Por otra parte, aunque los niveles de aminotransferasa fueron normales en la mayor parte de nuestra muestra, el aumento de ALT y AST en adolescentes obesos con esteatosis (Tabla 7) sí constituye una manifestación temprana de potencial enfermedad hepática grave.

El papel del HOMA-IR en el desarrollo de esteatosis merece una atención especial (Tabla 7, Fig. 8), porque la resistencia a la insulina se cree que es un proceso clave en el origen y la progresión de EHGNA durante la obesidad[175-177]. Sin embargo, en nuestro estudio el HOMA- IR se asoció con la esteatosis hepática sólo en el grupo de adolescentes. Se puede argumentar que los pacientes sin esteatosis pero con un HOMA-IR elevado podrían presentar una esteatosis hepática leve, que no es detectable por ecografía. También observamos varios pacientes con esteatosis pero con bajo HOMA-IR (Fig. 8), sin embargo, esta situación es rara en pacientes adultos con obesidad mórbida. Otra consideración es que los sujetos con esteatosis hepática pueden tener resistencia a la insulina de bajo grado desarrollada en los tejidos del hígado y tejido adiposo sin ninguna repercusión en el HOMA -IR sistémico.

En modelos animales, se ha comunicado resistencia local pero no sistémica a la insulina[178]. También es posible que en la esteatosis hepática desarrollada por el grupo de niños no juegue ningún papel significativo la resistencia a la insulina. Sin embargo, está claro que la relación entre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática en niños obesos no es lo mismo que en los adultos. Un estudio anterior (relativo a una cohorte italiana) tiene comunicado una correlación entre la esteatosis hepática y HOMA-IR entre los sujetos prepúberes[173]. Esta cohorte presenta una media de valores de HOMA-IR (3,16) y marcadas diferencias en relación con la esteatosis; estos resultados difieren de los encontrados en el presente estudio. En nuestra opinión, debido a

la naturaleza transversal de ambos estudios, la causalidad no puede ser determinada de forma inequívoca.

La media de los valores de HOMA-IR en otras cohortes de niños prepuberales obesos están de acuerdo con nuestros resultados, es decir, 1,8 en una cohorte española[179] y 2,4 en una inglesa[180]. Además, este último artículo informó de un aumento del HOMA-IR durante la progresión de la pubertad, especialmente en los niños.

En nuestro estudio, el estrés oxidativo resultó ser un proceso relevante en el desarrollo de esteatosis hepática en niños y adolescentes (Tabla 8). La disminución de la actividad específica de GPx y GRd observadas en pacientes con esteatosis podrían explicarse como consecuencia de daño oxidativo en la síntesis de estas enzimas. De hecho, estudios previos han reportado una disminución en actividad de radicales libres de eritrocitos de enzimas de barrido en situaciones de estrés oxidativo elevado[181, 182]. La sobreproducción de radicales libres se cree que es un factor relevante relacionado con el origen y la posterior progresión de la enfermedad de hígado graso[183]. Las principales fuentes del estrés oxidativo celular son el retículo endoplasmático y la mitocondria[184, 185]. La disfunción mitocondrial en la obesidad está estrechamente relacionado con dietas hipercalóricas[186], y un artículo sugirió que esta disfunción se produce incluso antes de la aparición de resistencia a la insulina durante el desarrollo del hígado graso no alcohólico[187]. De acuerdo con estos hallazgos, los antioxidantes han sido considerados como posibles opciones en el tratamiento del hígado graso no alcohólico, pero los resultados hasta la fecha no han sido muy satisfactorios[188, 189].

Otro hallazgo en el presente estudio que ilustra la particularidad de los niños, se registró en el aumento de los niveles de resistina en pacientes con esteatosis (Tabla 7). La resistina se caracterizó inicialmente en roedores como una adipoquina relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina (de ahí su nombre)[190]; sin embargo, en los seres humanos, es también expresada por

las células inmunitarias que se infiltra en el tejido adiposo, el hígado y otros tejidos[191]. Aunque la resistina en humanos ha sido relacionada con los procesos de estrés oxidativo e inflamación[192, 193], nosotros no encontramos correlacion con los marcadores proinflamatorios o de estrés oxidativo. El papel de la resistina en la fisiopatología en humanos está poco clara; de hecho, el receptor de la resistina celular aún no ha sido clonado.

Todos los estudios están sujetos a un cierto grado de sesgo, y el cuidado debe por tanto, estar orientado a ser especialmente cuidadoso con las conclusiones extraídas. En nuestro caso, el sesgo de selección fue controlado por la inclusión consecutiva de los sujetos en la cohorte y al excluir a los pacientes con tratamientos farmacológicos o con patologías, excepto la obesidad, que podría propiciar esteatosis hepática. Los sujetos fueron clasificados como niños o adolescentes utilizando 2 métodos: etapas de Tanner y los niveles de DHEAS; por consiguiente, podemos afirmar que prácticamente todos los incluidos en el grupo 1 son niños en situación prepuberal.

Una posible sesgo de clasificación es el método usado para diagnosticar hígado graso. En la actualidad, los métodos no invasivos, tales como la tomografía computarizada, resonancia magnética o ecografía, se utilizan para evaluar los cambios esteatósicos en el hígado[194], pero ninguno de estos métodos puede realmente sustituir la biopsia de hígado, por lo que sigue siendo el criterio estándar. Consideraciones éticas impiden el diagnóstico de hígado graso no alcohólico mediante biopsia hepática, especialmente en pacientes con transaminasas normales. Mediante ultrasonido no es posible detectar esteatosis si la cantidad de grasa en el hígado es menor del 30%[195]. De hecho, el concepto de hígado graso que se utiliza en nuestro estudio debe entenderse como "esteatosis detectada por ultrasonido". Las técnicas actuales de resonancia magnética y elastoultrasonografía ofrecen la posibilidad de evaluar de forma cuantitativa la presencia de infiltración grasa hepática, pero son técnicas, a día de hoy, no validadas en niños, a la espera de más estudios concluyentes[160, 164, 165]

La naturaleza del método utilizado para evaluar resistencia a la insulina también podría influir en las conclusiones extraídas. El HOMA-IR es un método sustituto que no siempre puede reemplazar los enfoques basados en la prueba de tolerancia a la glucosa. Sin embargo, se ha correlacionado satisfactoriamente con la prueba de tolerancia a la glucosa en niños y adolescentes con glucemia normal[196].

La EHGNA es muy común en adultos, hasta el punto que puede ser la enfermedad crónica del hígado más común en Estados Unidos[159]. En este país la prevalencia de EHGNA es del 20% (rango del 14 al 39%) y la de EHNA del 2% (rango del 1,2 al 4,8%). La prevalencia de EHGNA se incrementa a un 74% en personas obesas y hasta un 90% en personas con obesidad mórbida. Otras asociaciones comunes son la diabetes mellitus tipo 2 y la hiperlipémia.

Los datos actuales señalan que niños con edades comprendidas entre 5 y 15 años pueden verse afectados, y que los niños desarrollan EHNA con más frecuencia que las niñas[197, 198] (a diferencia de los adultos donde las mujeres padecen la enfermedad con más frecuencia, aunque estudios más recientes señalan que los hombres pueden afectarse en la misma proporción[156, 199]).

Los estudios de laboratorio en el EHNA muestran una elevación moderada (2-4 veces por encima de lo normal) de los niveles séricos de transaminasas en el 70-100% de los casos y es frecuente la hipertrigliceridemia.

En la cohorte de nuestro estudio la prevalencia de aumento de ALT fue del 12% con una tendencia ($p = 0,056$) casi significativa a ser mas prevalente en niños (73%) frente a 37% en niñas.

La adiposidad central, la hiperleptinemia y la hiperinsulinemia son los principales factores que determinan la asociación entre sobrepeso y elevación de la ALT sérica[200] pudiendo jugar la leptina un papel crucial en la fibrogénesis del EHNA. El EHNA pediátrico es una seria complicación de la obesidad infantil, habiéndose documentado casos de cirrosis.

Se considera que la EHNA es la manifestación hepática del SM en adultos y puede estar asociado también con EHNA en niños. Aunque se ha comunicado que la RI está presente virtualmente en todos los casos de EHNA (98%)[201, 202], incluso en niños obesos antes de la pubertad y adolescentes. Nuestros resultados concuerdan con los descritos cuando se analizan los factores en todos los niños mostrando relación entre el aumento de la ALT y el metabolismo de la glucosa alterado, también se encuentran mayores tasas de leptina, adiponeptina y resistina pero cuando se analizan por separado los niños prepúberes y los adolescentes, solamente presentan RI este último grupo. Por lo que en los pequeños el metabolismo de la glucosa no está alterado. Hay alteraciones comunes por incremento de estrés oxidativo en ambos y el grupo 1 presenta también mayores niveles de resistina y adiponectina.

En conclusión los factores implicados en el aumento de ALT en niños prepúberes es distinto a los adolescentes.

En nuestra opinión, las limitaciones antes mencionadas no son tan importantes como para invalidar la principal conclusión de nuestro estudio, a saber, que los factores asociados con hígado graso no alcohólico difieren entre niños obesos y adolescentes. Por otra parte, nuestros resultados proporcionan nuevas perspectivas para la investigación futura, tales como el papel preciso de la resistina y el HOMA-IR en los sujetos obesos prepúberes. Por último, la significativa relevancia del estrés oxidativo en la esteatosis sugiere la posible participación de factores hereditarios implicados en la producción y la compactación de los radicales libres.

6 CONCLUSIONES

El análisis y discusión crítica del conjunto de observaciones y resultados experimentales contenidos en esta memoria nos ha permitido formular las siguientes conclusiones

- **En el estudio de hígado graso no alcohólico (EHGNA), las conclusiones son:**

1. Los paciente obesos en edad pediátrica tienen una prevalencia de esteatosis del 45%, parecida en niños y adolescentes.
2. Los factores asociados con esteatosis hepática en adolescentes obesos están muy relacionados con los descritos en la obesidad de los adultos e incluyen aumento de triglicéridos, mayor IMC y alteraciones en el metabolismo de la glucosa, puesto de manifiesto por mayores tasas de insulina, índice HOMA y péptido C. Muestran también mayores tasa de transaminasas, de los niveles de leptina, y estrés oxidativo. En cambio existe una disminución en el receptor soluble de la leptina, evidenciando ya cierto grado de resistencia a la leptina.
3. Los factores asociados con la esteatosis hepática en niños obesos prepúberes, son distintos a los obesos adolescentes, ya que se asocia únicamente con los niveles de estrés oxidativo y de resistina.
4. La resistencia a la insulina medida por el índice HOMA se comporta igual en niños y en niñas prepúberes con y sin esteatosis. Igual sucede con el grupo de adolescentes pero, aunque no aparecen diferencias entre sexo, sí que influye en los adolescentes con esteatosis y de forma más evidente en los niños.

- **En el estudio de los factores relacionados con el aumento de ALT:**

5. El 12% de la población obesa de nuestra cohorte tiene aumento de transaminasa con una tendencia a ser más frecuente en niños que en niñas y con mayor IMC.

6. Los factores implicados en el aumento de transaminasas en la población de estudio global se relacionan con alteraciones en el metabolismo de la glucosa (mayor Índice HOMA, péptido C, triglicéridos y disminución de HDL-C), mayor estrés oxidativo y mayores tasas de RSL y resistina.
7. En el grupo de niños prepúberes se relaciona con incremento de estrés oxidativo, resistina y adiponectina en cambio en los adolescentes las diferencias se encuentran en las alteraciones del metabolismo de la glucosa y estrés oxidativo.

CONCLUSIÓN FINAL

Aunque la prevalencia de esteatosis y de aumento de ALT en niños y adolescentes obesos es parecida, los factores asociados a su desarrollo son distintos. Predominando en adolescentes las alteraciones del metabolismo de la glucosa y en ambos aumento del estrés oxidativo

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados proporcionan nuevas perspectivas para la investigación futura ya que los mecanismos por los que se desarrolla la esteatosis en los niños prepúberes no están claros y son muy distintos a los adolescentes y a los descritos en adultos. El papel de la resistina y la medida de la resistencia a la insulina por otros métodos distintos al HOMA deberían ser clarificados.

Por último, la significativa relevancia del estrés oxidativo en los resultados en ambos grupos sugiere la posible participación de factores hereditarios, entre otros.

7 ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

7.1 ARTÍCULOS

- Ruiz-Extremera Á, Carazo Á, Salmerón Á, León J, Casado J, Goicoechea A, Fernandez JM, Garofano M, Ocete E, Martín AB, Pavón E, Salmerón J. Factors associated with hepatic steatosis in obese children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53(2):196-201. Doi: 10.1097/MPG.0b013e3182185ac4. PubMed PMID: 21788762.

7.2 COMUNICACIONES

- A Ruíz-Extremera, A Goicoechea, A Salmerón, J León, A Carazo, J Casado, JM Fernandez García, M Garofano, E Ocete, A Martín, P Muñoz de Rueda, J Salmerón. Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo (EO) y citoquinas en la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) en la obesidad infatil. XXXIII Congreso Nacional Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. 20-22 Febrero de 2008. Madrid. *Gastroenterología y Hepatología.* Volumen 31; 131, Extraordinario 1, Febrero 2008.
- Ruiz Extremera A, Carazo A, Salmerón Ruiz A, Casado J, Leon J, Fernández JM, Garófano M, Ocete E, Gila A, Sanjuán L, Salmerón J. La esteatosis hepática en niños obesos prepúberes no está relacionada con la resistencia a la insulina (RI). XXXIV Congreso de la Asociación Española para el estudio del Hígado. Póster. Madrid. 25-27 Febrero 2009.
- A. Ruiz Extremera, A. Carazo Gallego, A. Salmerón Ruiz, J. Casado, J. León, J.M. Fernández, M. Garofano, E. Ocete, A. Gila, L. Sanjuán, J. Salmerón. The liver steatosis in pre-puberal obese children is not related to the resistance to insulin. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver. Copenhagen, Denmark. Póster. April 22-26, 2009.

- A Salmerón Ruiz, A Ruiz Extremera, A Carazo, M Garófano, J Salmerón. Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo (EO) y citoquinas en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) diagnosticada por ecografía en la obesidad infantil. 31 congreso de la SERAM. Granada. Junio de 2012

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM: **The epidemiology of obesity.** *Gastroenterology* 2007, **132**(6):2087-2102.
2. Martos-Moreno GA, Argente J: **[Paediatric obesities: from childhood to adolescence].** *An Pediatr (Barc)* 2011, **75**(1):63 e61-23.
3. Wells JC, Fewtrell MS: **Measuring body composition.** *Archives of disease in childhood* 2006, **91**(7):612-617.
4. Speiser PW, Rudolf MC, Anhalt H, Camacho-Hubner C, Chiarelli F, Eliakim A, Freemark M, Gruters A, HersHKovitz E, Iughetti L *et al*: **Childhood obesity.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005, **90**(3):1871-1887.
5. Fiore H, Travis S, Whalen A, Auinger P, Ryan S: **Potentially protective factors associated with healthful body mass index in adolescents with obese and nonobese parents: a secondary data analysis of the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994.** *Journal of the American Dietetic Association* 2006, **106**(1):55-64; quiz 76-59.
6. Flegal KM, Ogden CL, Wei R, Kuczmarski RL, Johnson CL: **Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index.** *The American journal of clinical nutrition* 2001, **73**(6):1086-1093.
7. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH: **Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey.** *BMJ* 2000, **320**(7244):1240-1243.
8. Freedman DS, Wang J, Maynard LM, Thornton JC, Mei Z, Pierson RN, Dietz WH, Horlick M: **Relation of BMI to fat and fat-free mass among children and adolescents.** *Int J Obes (Lond)* 2005, **29**(1):1-8.
9. Reilly JJ: **Descriptive epidemiology and health consequences of childhood obesity.** *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2005, **19**(3):327-341.
10. de Onis M, Blossner M: **The World Health Organization Global Database on Child Growth and Malnutrition: methodology and applications.** *International journal of epidemiology* 2003, **32**(4):518-526.
11. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS: **Inter-relationships among childhood BMI, childhood height, and adult obesity: the Bogalusa Heart Study.** *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2004, **28**(1):10-16.
12. Martos-Moreno GA, Barrios V, Martinez G, Hawkins F, Argente J: **Effect of weight loss on high-molecular weight adiponectin in obese children.** *Obesity (Silver Spring)* 2010, **18**(12):2288-2294.
13. **Obesity prevalence among low-income, preschool-aged children - United States, 1998-2008.** *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2009, **58**(28):769-773.

14. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM: **Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2012, **307**(5):483-490.
15. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Perez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Pena Quintana L: **[Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998-2000)].** *Medicina clinica* 2003, **121**(19):725-732.
16. Soriguer F, Garcia-Garcia E, Santiago P, Millon MC: **[Childhood obesity in East Andalusia, Spain].** *Medicina clinica* 2005, **125**(19):756-757.
17. Moreno LA, Mesana MI, Fleta J, Ruiz JR, Gonzalez-Gross M, Sarria A, Marcos A, Bueno M: **Overweight, obesity and body fat composition in spanish adolescents. The AVENA Study.** *Annals of nutrition & metabolism* 2005, **49**(2):71-76.
18. Butte NF, Ellis KJ: **Comment on "Obesity and the environment: where do we go from here?".** *Science* 2003, **301**(5633):598; author reply 598.
19. Samani-Radia D, McCarthy HD: **Comparison of children's body fatness between two contrasting income groups: contribution of height difference.** *Int J Obes (Lond)* 2011, **35**(1):128-133.
20. Froberg A: **"Couch-potatoeism" and childhood obesity: The inverse causality hypothesis.** *Preventive medicine* 2015, **73**:53-54.
21. Moreno LA, Rodriguez G: **Dietary risk factors for development of childhood obesity.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2007, **10**(3):336-341.
22. Huh SY, Rifas-Shiman SL, Taveras EM, Oken E, Gillman MW: **Timing of solid food introduction and risk of obesity in preschool-aged children.** *Pediatrics* 2011, **127**(3):e544-551.
23. McGavock JM, Torrance BD, McGuire KA, Wozny PD, Lewanczuk RZ: **Cardiorespiratory fitness and the risk of overweight in youth: the Healthy Hearts Longitudinal Study of Cardiometabolic Health.** *Obesity (Silver Spring)* 2009, **17**(9):1802-1807.
24. Carter PJ, Taylor BJ, Williams SM, Taylor RW: **Longitudinal analysis of sleep in relation to BMI and body fat in children: the FLAME study.** *BMJ* 2011, **342**:d2712.
25. Svensson V, Jacobsson JA, Fredriksson R, Danielsson P, Sobko T, Schioth HB, Marcus C: **Associations between severity of obesity in childhood and adolescence, obesity onset and parental BMI: a longitudinal cohort study.** *Int J Obes (Lond)* 2011, **35**(1):46-52.
26. Pare G: **Genome-wide association studies--data generation, storage, interpretation, and bioinformatics.** *Journal of cardiovascular translational research* 2010, **3**(3):183-188.
27. Rao KR, Lal N, Giridharan NV: **Genetic & epigenetic approach to human obesity.** *The Indian journal of medical research* 2014, **140**(5):589-603.

28. Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF: **Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence.** *The American journal of clinical nutrition* 2002, **76**(3):653-658.
29. Reilly JJ, Methven E, McDowell ZC, Hacking B, Alexander D, Stewart L, Kelnar CJ: **Health consequences of obesity.** *Archives of disease in childhood* 2003, **88**(9):748-752.
30. Ten S, Maclaren N: **Insulin resistance syndrome in children.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004, **89**(6):2526-2539.
31. Reaven GM: **Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988.** *Nutrition* 1997, **13**(1):65; discussion 64, 66.
32. Moya M: **[Comorbid states in paediatric and adolescent obesity. A simplified approach to their diagnosis: the metabolic syndrome].** *An Pediatr (Barc)* 2011, **74**(5):289-292.
33. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH: **Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994.** *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2003, **157**(8):821-827.
34. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: **The metabolic syndrome--a new worldwide definition.** *Lancet* 2005, **366**(9491):1059-1062.
35. Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S: **The metabolic syndrome in children and adolescents.** *Lancet* 2007, **369**(9579):2059-2061.
36. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S: **The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report.** *Pediatric diabetes* 2007, **8**(5):299-306.
37. Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, Stern MP, Miettinen H: **A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study.** *Diabetes care* 1996, **19**(10):1138-1141.
38. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R: **[Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population].** *Medicina clinica* 2001, **117**(14):530-533.
39. Tresaco B, Bueno G, Pineda I, Moreno LA, Garagorri JM, Bueno M: **Homeostatic model assessment (HOMA) index cut-off values to identify the metabolic syndrome in children.** *Journal of physiology and biochemistry* 2005, **61**(2):381-388.
40. Tapia Ceballos L, Lopez Siguero JP, Jurado Ortiz A: **[Prevalence of metabolic syndrome and its components in obese children and adolescents].** *An Pediatr (Barc)* 2007, **67**(4):352-361.
41. Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, Savoye M, Rieger V, Taksali S, Barbetta G *et al*: **Prevalence of impaired glucose**

- tolerance among children and adolescents with marked obesity.** *The New England journal of medicine* 2002, **346**(11):802-810.
42. Fernandez-Real JM, Ricart W: **Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome.** *Endocrine reviews* 2003, **24**(3):278-301.
43. Rosen ED, Spiegelman BM: **Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis.** *Nature* 2006, **444**(7121):847-853.
44. Palomer X, Perez A, Blanco-Vaca F: **[Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease].** *Medicina clinica* 2005, **124**(10):388-395.
45. Beltowski J: **Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue.** *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2003, **9**(2):RA55-61.
46. Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H: **Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors.** *Diabetologia* 2002, **45**(6):805-812.
47. Aljada A, Friedman J, Ghanim H, Mohanty P, Hofmeyer D, Chaudhuri A, Dandona P: **Glucose ingestion induces an increase in intranuclear nuclear factor kappaB, a fall in cellular inhibitor kappaB, and an increase in tumor necrosis factor alpha messenger RNA by mononuclear cells in healthy human subjects.** *Metabolism: clinical and experimental* 2006, **55**(9):1177-1185.
48. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P: **Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects.** *Diabetes* 2003, **52**(12):2882-2887.
49. Shklyaev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpance PJ *et al*: **Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(24):14217-14222.
50. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H: **Mechanisms of leptin action and leptin resistance.** *Annual review of physiology* 2008, **70**:537-556.
51. Zhang Y, Scarpance PJ: **Circumventing central leptin resistance: lessons from central leptin and POMC gene delivery.** *Peptides* 2006, **27**(2):350-364.
52. Friedman JM, Halaas JL: **Leptin and the regulation of body weight in mammals.** *Nature* 1998, **395**(6704):763-770.
53. Kieffer TJ, Habener JF: **The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2000, **278**(1):E1-E14.
54. Shimizu F, Matsuzaki T, Iwasa T, Tanaka N, Minakuchi M, Kuwahara A, Yasui T, Furumoto H, Irahara M: **Transition of leptin receptor expression during**

- pubertal development in female rat pituitary.** *Endocrine journal* 2008, **55**(1):191-198.
55. Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK: **Effects of obesity on growth and puberty.** *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2005, **19**(3):375-390.
56. Kaplowitz PB: **Link between body fat and the timing of puberty.** *Pediatrics* 2008, **121 Suppl 3**:S208-217.
57. Andreelli F, Foretz M, Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Pillot B, Bado A, Tronche F, Mithieux G *et al*: **Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin.** *Endocrinology* 2006, **147**(5):2432-2441.
58. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC: **Adipokines and insulin resistance.** *Mol Med* 2008, **14**(11-12):741-751.
59. Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, Kleiner DE, Gorden P: **Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy.** *Hepatology* 2005, **41**(4):753-760.
60. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O: **Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation.** *Nature clinical practice Rheumatology* 2007, **3**(12):716-724.
61. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM: **Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(6):2557-2562.
62. Tomita K, Azuma T, Kitamura N, Tamiya G, Ando S, Nagata H, Kato S, Inokuchi S, Nishimura T, Ishii H *et al*: **Leptin deficiency enhances sensitivity of rats to alcoholic steatohepatitis through suppression of metallothionein.** *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2004, **287**(5):G1078-1085.
63. Balasubramanian V, Murugaiyan G, Shukla R, Bhonde RR, Nalini N: **Leptin downregulates ethanol-induced secretion of proinflammatory cytokines and growth factor.** *Cytokine* 2007, **37**(1):96-100.
64. Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T *et al*: **Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat.** *Gastroenterology* 2002, **122**(5):1399-1410.
65. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR: **Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury.** *Journal of hepatology* 2002, **37**(2):206-213.
66. Marra F: **Leptin and liver tissue repair: do rodent models provide the answers?** *Journal of hepatology* 2007, **46**(1):12-18.
67. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA: **The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver**

- fibrosis and stellate cell biology. *The American journal of pathology* 2005, **166**(6):1655-1669.**
68. De Minicis S, Candelaresi C, Marzioni M, Saccomano S, Roskams T, Casini A, Risaliti A, Salzano R, Cautero N, di Francesco F *et al*: **Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo.** *Gut* 2008, **57**(3):352-364.
69. Jiang JX, Mikami K, Shah VH, Torok NJ: **Leptin induces phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells via a Rho guanosine triphosphatase-dependent mechanism.** *Hepatology* 2008, **48**(5):1497-1505.
70. Leclercq IA, Field J, Farrell GC: **Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury.** *Gastroenterology* 2003, **124**(5):1451-1464.
71. Yang S, Lin HZ, Hwang J, Chacko VP, Diehl AM: **Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition?** *Cancer research* 2001, **61**(13):5016-5023.
72. Leclercq IA, Sempoux C, Starkel P, Horsmans Y: **Limited therapeutic efficacy of pioglitazone on progression of hepatic fibrosis in rats.** *Gut* 2006, **55**(7):1020-1029.
73. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ *et al*: **Biological action of leptin as an angiogenic factor.** *Science* 1998, **281**(5383):1683-1686.
74. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K *et al*: **Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells.** *Hepatology* 2005, **42**(6):1339-1348.
75. Kitade M, Yoshiji H, Kojima H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kaji K, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Asada K *et al*: **Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats.** *Hepatology* 2006, **44**(4):983-991.
76. Ribatti D, Belloni AS, Nico B, Di Comite M, Crivellato E, Vacca A: **Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma.** *Peptides* 2008, **29**(9):1596-1602.
77. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA: **Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells.** *Cancer research* 2007, **67**(6):2497-2507.
78. Fava G, Alpini G, Rychlicki C, Saccomanno S, DeMorrow S, Trozzi L, Candelaresi C, Venter J, Di Sario A, Marzioni M *et al*: **Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth.** *Cancer research* 2008, **68**(16):6752-6761.
79. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, Myint M, Caro JF: **Responses of leptin to short-term fasting and refeeding**

- in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 1996, **45**(11):1511-1515.**
80. Malmstrom R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Jarvinen H: **Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM.** *Diabetologia* 1996, **39**(8):993-996.
81. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V: **Sexual dimorphism in plasma leptin concentration.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997, **82**(2):579-584.
82. Morales A, Wasserfall C, Brusko T, Carter C, Schatz D, Silverstein J, Ellis T, Atkinson M: **Adiponectin and leptin concentrations may aid in discriminating disease forms in children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes.** *Diabetes care* 2004, **27**(8):2010-2014.
83. Apter D: **The role of leptin in female adolescence.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003, **997**:64-76.
84. Wilsey J, Zolotukhin S, Prima V, Scarpace PJ: **Central leptin gene therapy fails to overcome leptin resistance associated with diet-induced obesity.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2003, **285**(5):R1011-1020.
85. Munzberg H, Myers MG, Jr.: **Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance.** *Nature neuroscience* 2005, **8**(5):566-570.
86. Bingham NC, Anderson KK, Reuter AL, Stallings NR, Parker KL: **Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome.** *Endocrinology* 2008, **149**(5):2138-2148.
87. Liu ZJ, Bian J, Liu J, Endoh A: **Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver.** *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2007, **39**(7):489-494.
88. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS: **Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity.** *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**(12):1827-1832.
89. Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC: **Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism.** *Hepatology* 2008, **48**(5):1506-1516.
90. Scarpace PJ, Zhang Y: **Elevated leptin: consequence or cause of obesity?** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2007, **12**:3531-3544.
91. Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC: **Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats.** *Hepatology* 2007, **45**(3):778-788.

92. Seufert J: **Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function.** *Diabetes* 2004, **53 Suppl 1**:S152-158.
93. Widjaja A, Stratton IM, Horn R, Holman RR, Turner R, Brabant G: **UKPDS 20: plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997, **82(2)**:654-657.
94. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR: **Adipose tissue as an endocrine organ.** *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **316(2)**:129-139.
95. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR: **Adiponectin: more than just another fat cell hormone?** *Diabetes care* 2003, **26(8)**:2442-2450.
96. Liu M, Liu F: **Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin.** *The Biochemical journal* 2010, **425(1)**:41-52.
97. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E: **The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease.** *Diabetes, obesity & metabolism* 2010, **12(5)**:365-383.
98. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoaka K *et al*: **Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.** *Biochemical and biophysical research communications* 1999, **257(1)**:79-83.
99. Marra F, Bertolani C: **Adipokines in liver diseases.** *Hepatology* 2009, **50(3)**:957-969.
100. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T *et al*: **Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.** *Nature medicine* 2007, **13(3)**:332-339.
101. Bullen JW, Jr., Bluher S, Kelesidis T, Mantzoros CS: **Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2007, **292(4)**:E1079-1086.
102. Beylot M, Pinteaur C, Peroni O: **Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats.** *Metabolism: clinical and experimental* 2006, **55(3)**:396-401.
103. Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A *et al*: **Novel resistin promoter polymorphisms: association with serum resistin level in Japanese obese individuals.** *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2004, **36(8)**:564-570.
104. Rao CV: **Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention.** *Mutation research* 2004, **555(1-2)**:107-119.
105. Mandato C, Lucariello S, Licenziati MR, Franzese A, Spagnuolo MI, Ficarella R, Pacilio M, Amitrano M, Capuano G, Meli R *et al*: **Metabolic, hormonal, oxidative, and inflammatory factors in pediatric obesity-related liver disease.** *The Journal of pediatrics* 2005, **147(1)**:62-66.

106. Wellen KE, Hotamisligil GS: **Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue.** *The Journal of clinical investigation* 2003, **112**(12):1785-1788.
107. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA *et al*: **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.** *The Journal of clinical investigation* 2003, **112**(12):1821-1830.
108. Browning JD, Horton JD: **Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **114**(2):147-152.
109. Punthakee Z, Delvin EE, O'Loughlin J, Paradis G, Levy E, Platt RW, Lambert M: **Adiponectin, adiposity, and insulin resistance in children and adolescents.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006, **91**(6):2119-2125.
110. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M: **Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(14):14203-14211.
111. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: **Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.** *Mayo Clinic proceedings* 1980, **55**(7):434-438.
112. Garcia-Monzon C, Martin-Perez E, Iacono OL, Fernandez-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, Larranaga E, Moreno-Otero R: **Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity.** *Journal of hepatology* 2000, **33**(5):716-724.
113. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S: **Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants.** *Nutrition reviews* 2002, **60**(9):289-293.
114. Roberts EA: **Nonalcoholic steatohepatitis in children.** *Current gastroenterology reports* 2003, **5**(3):253-259.
115. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM: **Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2011, **34**(3):274-285.
116. Nobili V, Svegliati-Baroni G, Alisi A, Miele L, Valenti L, Vajro P: **A 360-degree overview of paediatric NAFLD: recent insights.** *Journal of hepatology* 2013, **58**(6):1218-1229.
117. Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JP, Lawlor DA, Fraser A: **The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *PloS one* 2015, **10**(10):e0140908.
118. Alisi A, Feldstein AE, Villani A, Raponi M, Nobili V: **Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2012, **9**(3):152-161.

119. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, Mietus-Snyder ML: **Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism.** *Circulation* 2009, **119**(4):628-647.
120. Day CP, James OF: **Steatohepatitis: a tale of two "hits"?** *Gastroenterology* 1998, **114**(4):842-845.
121. Petersen KF, Dufour S, Feng J, Befroy D, Dziura J, Dalla Man C, Cobelli C, Shulman GI: **Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(48):18273-18277.
122. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, Eiriksdottir G, Garcia ME, Launer LJ *et al*: **Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits.** *PLoS genetics* 2011, **7**(3):e1001324.
123. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, Yasui K, Saibara T, Hashimoto E, Kawanaka M *et al*: **Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese.** *PloS one* 2012, **7**(6):e38322.
124. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ: **The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2010, **52**(3):894-903.
125. Bhatt SP, Nigam P, Misra A, Guleria R, Pandey RM, Pasha MA: **Genetic variation in the patatin-like phospholipase domain-containing protein-3 (PNPLA-3) gene in Asian Indians with nonalcoholic fatty liver disease.** *Metabolic syndrome and related disorders* 2013, **11**(5):329-335.
126. Liu YL, Patman GL, Leathart JB, Piguat AC, Burt AD, Dufour JF, Day CP, Daly AK, Reeves HL, Anstee QM: **Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma.** *Journal of hepatology* 2014, **61**(1):75-81.
127. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH: **Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease.** *Nature genetics* 2008, **40**(12):1461-1465.
128. Sun S, Wang M, Song H, Wu T, Wei H, He S, Ding Z, Ji G: **SCAP gene polymorphisms decrease the risk of nonalcoholic fatty liver disease in females with metabolic syndrome.** *Journal of genetics* 2013, **92**(3):565-570.
129. Zain SM, Mohamed Z, Mahadeva S, Rampal S, Basu RC, Cheah PL, Salim A, Mohamed R: **Susceptibility and gene interaction study of the angiotensin II**

- type 1 receptor (AGTR1) gene polymorphisms with non-alcoholic fatty liver disease in a multi-ethnic population.** *PloS one* 2013, **8**(3):e58538.
130. Xu YP, Liang L, Wang CL, Fu JF, Liu PN, Lv LQ, Zhu YM: **Association between UCP3 gene polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease in Chinese children.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2013, **19**(35):5897-5903.
131. Musso G, Bo S, Cassader M, De Michieli F, Gambino R: **Impact of sterol regulatory element-binding factor-1c polymorphism on incidence of nonalcoholic fatty liver disease and on the severity of liver disease and of glucose and lipid dysmetabolism.** *The American journal of clinical nutrition* 2013, **98**(4):895-906.
132. Barbieri M, Esposito A, Angellotti E, Rizzo MR, Marfella R, Paolisso G: **Association of genetic variation in adaptor protein APPL1/APPL2 loci with non-alcoholic fatty liver disease.** *PloS one* 2013, **8**(8):e71391.
133. Sazci A, Ozel MD, Ergul E, Aygun C: **Association of nicotinamide-N-methyltransferase gene rs694539 variant with patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Genetic testing and molecular biomarkers* 2013, **17**(11):849-853.
134. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hiroi M, Enzan H *et al*: **Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis.** *Journal of hepatology* 2004, **40**(5):781-786.
135. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, Dziura J, Lifton RP, Shulman GI: **Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease.** *The New England journal of medicine* 2010, **362**(12):1082-1089.
136. Seki H, Tani Y, Arita M: **Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1.** *Prostaglandins & other lipid mediators* 2009, **89**(3-4):126-130.
137. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J: **Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.** *Clin Sci (Lond)* 2004, **106**(6):635-643.
138. Goldberg IJ, Ginsberg HN: **Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology* 2006, **130**(4):1343-1346.
139. Sinn DH, Gwak GY, Park HN, Kim JE, Min YW, Kim KM, Kim YJ, Choi MS, Lee JH, Koh KC *et al*: **Ultrasonographically detected non-alcoholic fatty liver disease is an independent predictor for identifying patients with insulin resistance in non-obese, non-diabetic middle-aged Asian adults.** *The American journal of gastroenterology* 2012, **107**(4):561-567.
140. Choudhary NS, Duseja A, Kalra N, Das A, Dhiman RK, Chawla YK: **Correlation of adipose tissue with liver histology in Asian Indian patients with**

- nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).** *Annals of hepatology* 2012, **11**(4):478-486.
141. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH: **The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2010, **7**(5):251-264.
142. Ibrahim MM: **Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.** *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2010, **11**(1):11-18.
143. Leung C, Herath CB, Jia Z, Goodwin M, Mak KY, Watt MJ, Forbes JM, Angus PW: **Dietary glycotoxins exacerbate progression of experimental fatty liver disease.** *Journal of hepatology* 2014, **60**(4):832-838.
144. Rana D, Duseja A, Dhiman RK, Chawla Y, Arora SK: **Maturation defective myeloid dendritic cells in nonalcoholic fatty liver disease patients release inflammatory cytokines in response to endotoxin.** *Hepatology international* 2013, **7**(2):562-569.
145. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW *et al*: **A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.** *Science* 2012, **336**(6077):86-90.
146. Tang T, Sui Y, Lian M, Li Z, Hua J: **Pro-inflammatory activated Kupffer cells by lipids induce hepatic NKT cells deficiency through activation-induced cell death.** *PloS one* 2013, **8**(12):e81949.
147. Tilg H, Diehl AM: **Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.** *The New England journal of medicine* 2000, **343**(20):1467-1476.
148. Hotamisligil GS: **Inflammation and metabolic disorders.** *Nature* 2006, **444**(7121):860-867.
149. Kumar A, Sharma A, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, Kohli KK, Bhansali A: **Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis.** *Journal of clinical and experimental hepatology* 2013, **3**(1):12-18.
150. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H *et al*: **Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin.** *Science* 2005, **307**(5708):426-430.
151. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, Erdil A, Yaman H, Saka M, Deveci MS, Bagci S, Gulsen M, Karaeren N *et al*: **Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *The American journal of gastroenterology* 2000, **95**(12):3584-3589.
152. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Carteni M, Nardone G: **Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease.** *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2012, **22**(6):471-476.

153. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI: **Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.** *Nature* 2006, **444**(7122):1022-1023.
154. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Gill SR: **Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH.** *Hepatology* 2013, **57**(2):601-609.
155. Arslan N, Buyukgebiz B, Ozturk Y, Cakmakci H: **Fatty liver in obese children: prevalence and correlation with anthropometric measurements and hyperlipidemia.** *The Turkish journal of pediatrics* 2005, **47**(1):23-27.
156. Reid AE: **Nonalcoholic steatohepatitis.** *Gastroenterology* 2001, **121**(3):710-723.
157. Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD: **Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis.** *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986, **292**(6512):13-15.
158. Mathiesen UL, Franzen LE, Aselius H, Resjo M, Jacobsson L, Foberg U, Fryden A, Bodemar G: **Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrosis in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases.** *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2002, **34**(7):516-522.
159. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP: **Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research.** *Hepatology* 2002, **35**(4):746-752.
160. Koplay M, Sivri M, Erdogan H, Nayman A: **Importance of imaging and recent developments in diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease.** *World journal of hepatology* 2015, **7**(5):769-776.
161. Ozcan HN, Oguz B, Haliloglu M, Orhan D, Karcaaltincaba M: **Imaging patterns of fatty liver in pediatric patients.** *Diagn Interv Radiol* 2015, **21**(4):355-360.
162. Zand KA, Shah A, Heba E, Wolfson T, Hamilton G, Lam J, Chen J, Hooker JC, Gamst AC, Middleton MS *et al*: **Accuracy of multiecho magnitude-based MRI (M-MRI) for estimation of hepatic proton density fat fraction (PDFF) in children.** *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 2015, **42**(5):1223-1232.
163. Goldschmidt I, Streckenbach C, Dingemann C, Pfister ED, di Nanni A, Zapf A, Baumann U: **Application and limitations of transient liver elastography in children.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2013, **57**(1):109-113.
164. Pico Aliaga SD, Muro Velilla D, Garcia-Marti G, Sanguesa Nebot C, Marti-Bonmati L: **[Acoustic radiation force impulse imaging elastography is efficacious in detecting hepatic fibrosis in children].** *Radiologia* 2015, **57**(4):314-320.
165. Mansoor S, Collyer E, Alkhoury N: **A comprehensive review of noninvasive liver fibrosis tests in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease.** *Current gastroenterology reports* 2015, **17**(6):23.

166. Verdon CP, Burton BA, Prior RL: **Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite.** *Analytical biochemistry* 1995, **224**(2):502-508.
167. Hissin PJ, Hilf R: **A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.** *Analytical biochemistry* 1976, **74**(1):214-226.