

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA. RELACIÓN CON NIVELES SÉRICOS DE $\text{TNF}\alpha$ Y CONTENIDO INTRAHEPÁTICO DE HIERRO, UTILIZANDO RESONANCIA MAGNÉTICA 3 TESLA.

Jorge Luis González Cantero

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Jorge Luis González Cantero
ISBN: 978-84-1306-341-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/57486>

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a mis dos directores de tesis, por haberme permitido cumplir un sueño. A Jorge, por su ingenio para elaborar un diseño inteligente donde nada es fruto de la casualidad, sino del esfuerzo constante e incansable, como me lo ha transmitido en incontables ocasiones con su propio ejemplo. A José Luis, por darme todo el apoyo y absoluta libertad para desarrollar lo que en su día fue su ilusión. Sus consejos, su trabajo y su desinteresada dedicación han sido fundamentales para que este proyecto haya visto la luz.

También quiero mostrar mi gratitud hacia mis padres, mi mayor referente en la vida, por estar siempre a mi lado, por aconsejarme en las decisiones que voy tomando, porque a ellos les debo el haber llegado hasta donde estoy ahora. Gracias a mis hermanos, por su cariño y su confianza, a pesar de la distancia. La felicidad es un viaje en coche con vosotros.

A Cristina.

RESUMEN

Introducción

En las dos últimas décadas, el hígado graso no alcohólico (HGNA) se ha convertido en un creciente problema de salud pública en países desarrollados, y se ha relacionado no solo con la esteatohepatitis, la cirrosis hepática y el hepatocarcinoma, sino también con la enfermedad cardiovascular, obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y el síndrome metabólico, procesos éstos en los que alcanza una prevalencia del 60-90%, aun cuando también puede encontrarse en individuos no obesos y sin diabetes. En la actualidad, se acepta que el aumento del contenido de grasa hepática conlleva mayor riesgo de fallecimiento por enfermedad cardiovascular que por hepatopatía crónica y carcinoma hepatocelular. Se conoce que el HGNA es un factor de riesgo independiente de resistencia a la insulina, que es un conocido factor de riesgo cardiovascular. Aún persiste el debate de si la resistencia a la insulina precede o es consecuencia del HGNA. En general, se acepta que la resistencia a la insulina es causa de aumento de la concentración de triglicéridos intrahepáticos, y que el HGNA, una vez establecido, probablemente también contribuya al incremento de la resistencia a la insulina. Sin embargo, existe una gran variabilidad interpersonal en esta asociación, principalmente determinada por factores genéticos y ambientales no bien conocidos. Se ha sugerido que uno de estos factores ambientales podría ser el exceso del contenido intrahepático

de hierro. Tampoco se conocen los mecanismos patogénicos que podrían relacionar el exceso de triglicéridos intrahepáticos con la resistencia a la insulina. En este sentido, se ha señalado que el HGNA podría provocar un estado de inflamación crónica subclínica que contribuiría a precipitar o empeorar sus alteraciones metabólicas. Por otro lado, también se ha resaltado la necesidad de disponer de un método diagnóstico de HGNA que sea simple, inocuo, fácil de realizar en la población general en sujetos aparentemente sanos, y que tenga un reducido coste económico.

Objetivos

- Conocer la importancia relativa de la relación de la resistencia a la insulina con el HGNA, el perímetro abdominal y el índice de masa corporal (IMC) en individuos no diabéticos y no obesos.

- Conocer la influencia de la concentración intrahepática de hierro y de la posible inflamación crónica subclínica asociada al HGNA sobre la resistencia a la insulina.

- Conocer la precisión diagnóstica, sensibilidad y especificidad de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica para identificar individuos con HGNA utilizando Espectroscopia por Resonancia Magnética de protones (ERM-H¹) 3 Tesla como referencia de la concentración intrahepática de triglicéridos.

Métodos

Hemos realizado tres estudios transversales en sujetos sanos no diabéticos. Se utilizó Imagen por Resonancia Magnética (IRM) mediante secuencias T2 eco por gradiente para la cuantificación del hierro intrahepático, y ERM-H¹ 3 Tesla para la cuantificación de triglicéridos intrahepáticos. Se determinó la resistencia a la insulina mediante *Homeostatic Model Assessment* (HOMA-IR), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) sérico mediante *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) y la adiponectina sérica mediante *Radioimmunoassay* (RIA).

Resultados

La resistencia a la insulina se asoció de forma independiente con el HGNA, pero no con el perímetro abdominal ni el IMC. El contenido de triglicéridos intrahepáticos, los niveles séricos de TNF α y la edad fueron los únicos determinantes significativos de resistencia a la insulina. Los sujetos con HGNA tenían valores significativamente más elevados de niveles séricos de triglicéridos ($p < 0,001$), TNF α ($p < 0,003$), y de resistencia a la insulina ($p < 0,001$), así como niveles séricos inferiores de adiponectina ($p < 0,001$) y de HDL-Colesterol ($p < 0,001$).

El TNF α sérico se correlacionó de forma significativa y positiva con los triglicéridos intrahepáticos ($r: 0,28$; $p < 0,01$), pero no con el hierro intrahepático. La ALT sérica fue el mejor predictor de HGNA. El estudio de precisión

diagnóstica de la ALT sérica mostró que su valor de corte óptimo para el diagnóstico de HGNA es de 23 UI/L (AUC: 0,93; sensibilidad: 0,94; especificidad: 0,72).

Conclusiones

La resistencia a la insulina tiene mayor relación con el HGNA que con el perímetro abdominal y el IMC, tanto en individuos obesos como en los no obesos ni diabéticos. Existe un efecto sinérgico entre el HGNA y la sobrecarga de hierro intrahepático sobre la resistencia a la insulina, siendo el HGNA el que muestra un mayor impacto. Los niveles séricos elevados de TNF α podrían contribuir a la asociación entre HGNA y resistencia a la insulina. El incremento de triglicéridos intrahepáticos parece ser una condición necesaria para el desarrollo de sobrecarga intrahepática de hierro en sujetos no diabéticos sin hemocromatosis. La ALT sérica es un biomarcador sensible, simple y fiable de HGNA si el límite superior de la normalidad se establece en 23 UI/L, permitiendo identificar al 94% de los sujetos con HGNA con una especificidad del 72%.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. Hígado graso no alcohólico (HGNA).....	27
1.1.1. Concepto.....	27
1.1.2. Epidemiología.....	29
1.1.3. Etiopatogenia.....	30
1.1.3.1. Bases genéticas.....	31
1.1.3.2. Bases metabólicas.....	31
1.1.3.3. Teoría del <i>doble impacto</i> en la patogenia del HGNA.....	32
1.1.4. Clínica.....	35
1.1.5. Diagnóstico.....	38
1.1.5.1. Pruebas diagnósticas de precisión cuantitativa.....	39
1.1.5.2. Pruebas diagnósticas semicuantitativas.....	45
1.2. Resistencia a la insulina.....	47
1.2.1. Concepto.....	47
1.2.2. Epidemiología.....	49
1.2.3. Etiopatogenia.....	49
1.2.4. Consecuencias clínicas.....	51
1.2.5. Diagnóstico de resistencia a la insulina.....	55
1.2.6. Tratamiento de la resistencia a la insulina y sus consecuencias clínicas.....	59
1.3. Resistencia a la insulina. Su relación con el HGNA, IMC y perímetro abdominal.....	64
1.4. HGNA y resistencia a la insulina. Relación con el hierro intrahepático y sérico.....	67
1.5. Precisión diagnóstica de la ALT sérica como marcador de HGNA.....	69
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	71
3. OBJETIVOS.....	75
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
4.1. Población de estudio.....	81
4.2. Evaluación antropométrica.....	82
4.3. Análisis de laboratorio.....	82
4.4. Obtención de IRM y ERM-H ¹ 3 Tesla.....	83
4.4.1. Obtención de IRM para cuantificación de hierro intrahepático.....	83
4.4.2. Obtención de ERM-H ¹ para cuantificación de triglicéridos	

intrahepáticos.....	84
4.5. Postproceso de IRM y ERM-H ¹ 3 Tesla.....	85
4.5.1. Postprocesado de IRM para cuantificación de hierro intrahepático.....	85
4.5.2. Postprocesado de ERM-H ¹ para cuantificación de triglicéridos intrahepáticos.....	85
4.6. Análisis estadístico.....	86
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
5.1. Resultados del objetivo 1º: Resistencia a la insulina. Su relación con el HGNA, IMC y perímetro abdominal.....	91
5.1.1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos.....	91
5.1.2. Test de comparación de medias.....	92
5.1.3. Estudios de correlación.....	96
5.1.4. Estudios de regresión.....	97
5.2. Discusión del objetivo 1º: Resistencia a la insulina. Su relación con el HGNA, IMC y perímetro abdominal.....	97
5.3. Resultados del objetivo 2º: HGNA y resistencia a la insulina. Relación con el hierro intrahepático y TNF α sérico.....	100
5.3.1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos.....	100
5.3.2. Test de comparación de medias.....	101
5.3.3. Estudios de correlación.....	105
5.3.4. Estudios de regresión.....	107
5.4. Discusión del objetivo 2º: HGNA y resistencia a la insulina. Relación con el hierro intrahepático y TNF α sérico.....	108
5.5. Resultados del objetivo 3º: Precisión diagnóstica de la ALT sérica como marcador de HGNA.....	113
5.5.1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos.....	113
5.5.2. Test de comparación de medias.....	114
5.5.3. Estudios de correlación.....	115
5.5.4. Estudios de regresión.....	116
5.5.5. Curvas ROC y validez de la ALT sérica para el diagnóstico de HGNA.....	117
5.5.6. Cambios en variables metabólicas según la cantidad de triglicéridos intrahepáticos y valores séricos de ALT.....	119
5.6. Discusión del objetivo 3º: Precisión diagnóstica de la ALT sérica como marcador de HGNA.....	121
6. CONCLUSIONES.....	127
7. BIBLIOGRAFÍA.....	131

8. ANEXO.....	151
8.1. ARTÍCULO PRIMERO. Insulin resistance in lean and overweight non-diabetic Caucasian adults: Study of its relationship with liver triglyceride content, waist circumference and BMI.....	155
8.2. ARTÍCULO SEGUNDO. Insulin resistance and NAFLD: relationship with intrahepatic iron and serum TNF- α using 1H MR spectroscopy and MRI.....	172
8.3. ARTÍCULO TERCERO. Diagnostic accuracy of serum alanine aminotransferase as biomarker for nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in healthy subjects, using 3T MR spectroscopy.....	195

1. INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas, el hígado graso no alcohólico (HGNA) se ha convertido en un creciente problema de salud pública en países desarrollados, y se ha relacionado tanto con la esteatohepatitis, cirrosis hepática y hepatocarcinoma, como con la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y síndrome metabólico, en los que alcanza una prevalencia del 60-90%[1]. También puede encontrarse, aunque con menor prevalencia, en individuos no obesos y sin diabetes [2].

El HGNA es un reconocido factor de riesgo de resistencia a la insulina, DM2 [3] y de enfermedad cardiovascular [2,4] , que conlleva mayor riesgo de morbi-mortalidad por enfermedad cardiovascular que por hepatopatía crónica y carcinoma hepatocelular [5,6].

Aunque existe una clara asociación entre el aumento de grasa corporal, y resistencia a la insulina [7], parece ser que lo más determinante no es la cantidad total de grasa, sino su localización en distintos tejidos, de forma que esta compartimentalización de la grasa en tres regiones, subcutánea, visceral y/o hepática, es clave por su diferente relación con el desarrollo de proceso inflamatorio crónico y con la resistencia a la insulina. Así, la localización subcutánea parece conllevar menos consecuencias inflamatorias y metabólicas que las otras dos localizaciones [8–13].

La mayoría de trabajos publicados sobre HGNA han sido realizados en sujetos obesos o con síndrome metabólico, sin embargo, no existen estudios que analicen la influencia de la localización de la grasa corporal sobre la resistencia

Introducción

a la insulina en sujetos delgados o con sobrepeso. El conocimiento de estos datos permitiría catalogar con mayor precisión el riesgo metabólico de estos sujetos, aun cuando no sean obesos ni diabéticos.

Por otro lado, aún persiste el debate de si la resistencia a la insulina precede o es consecuencia del HGNA. En general, se acepta que la resistencia a la insulina es causa de aumento de la concentración de triglicéridos intrahepáticos, y que el HGNA, una vez establecido, probablemente también contribuya al incremento de la resistencia a la insulina [12,14,15]. Sin embargo, existe una gran variabilidad interpersonal en esta asociación, principalmente determinada por factores genéticos y ambientales. Se ha sugerido que uno de estos factores ambientales podría ser el exceso del contenido intrahepático de hierro [16,17]. Tampoco se conocen los mecanismos patogénicos que podrían relacionar el exceso de triglicéridos intrahepáticos con la resistencia a la insulina. En este sentido, se ha señalado que el HGNA podría provocar un estado de inflamación crónica subclínica que contribuiría a precipitar o empeorar sus alteraciones metabólicas [12].

Teniendo en cuenta la gran importancia que ha adquirido el HGNA en los últimos años, asociado a importantes factores de riesgo cardiovascular y a enfermedad hepática, se ha dado en considerarlo como la “la epidemia del siglo XXI”. Ante estos datos, se ha resaltado la necesidad de disponer de un método diagnóstico simple, inocuo, fácil de realizar en la población general en sujetos aparentemente sanos, y que tenga un reducido coste económico. En este

estudio, analizamos las posibilidades de utilización y la precisión diagnóstica de los niveles séricos de alanino aminotransaminasa (ALT) para identificar individuos con HGNA, utilizando como referencia la cuantificación de triglicéridos intrahepáticos con espectroscopia por resonancia magnética de protones (ERM-H¹) 3 Tesla.

A continuación, exponemos los conocimientos actuales sobre el HGNA y resistencia a la insulina, así como los factores que pueden intervenir en su interrelación, y sus consecuencias sobre factores de riesgo cardiometabólicos.

1.1. HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA)

1.1.1. Concepto

Se entiende por HGNA la acumulación excesiva de grasa en el hígado en ausencia de un consumo significativo de alcohol (superior a 30 g al día en hombres y a 20 g al día en mujeres) y de otras causas de esteatosis hepática secundaria expuestas en la tabla 1 [18].

Tabla 1. Causas de esteatosis hepática secundaria
Esteatosis macrovesicular
<ul style="list-style-type: none"> - Consumo excesivo de alcohol - Hepatitis C (genotipo 3) - Enfermedad de Wilson - Lipodistrofia - Nutrición parenteral - Abetalipoproteinemia - Medicamentos (p. ej., amiodarona, metotrexate, tamoxifeno, corticoesteroides)
Esteatosis microvesicular
<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Reye - Medicamentos (p. ej., valproato, antirretrovirales) - Fallo hepático agudo del embarazo - Síndrome de HELLP - Errores innatos del metabolismo (p. ej., deficiencia de LCAT, alteraciones en el almacenamiento de colesterol, enfermedad de Wolman)

La esteatosis hepática se ha venido definiendo tradicionalmente, utilizando biopsias hepáticas, como un contenido de grasa en el hígado superior a 5 mg por cada 100mg de tejido hepático (es decir, superior al 5%). Cuando en 2005 Lidia S Szczepaniak cuantificó el contenido de triglicéridos hepáticos mediante ERM-H¹ en 345 sujetos sin aparentes factores de riesgo de esteatosis hepática (no obesos, no diabéticos, mínimo consumo de alcohol, perfil analítico hepático normal y ausencia de enfermedad hepática conocida), el percentil 95 resultó ser 5,56%, muy próximo por tanto a la definición tradicional [19]. Desde entonces, el HGNA se define como un contenido de triglicéridos intrahepáticos igual o superior al 5,56% (mg de grasa / 100 mg de tejido hepático).

El concepto de HGNA incluye dos posibilidades: una es la esteatosis simple, es decir, el acúmulo de triglicéridos en el hígado; la otra es la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en la que junto a la esteatosis hay necrosis hepatocelular, inflamación y fibrosis, que puede progresar a cirrosis hepática y hepatocarcinoma [20].

El HGNA se considera que constituye la principal causa de elevación de transaminasas en países desarrollados [20,21] y la manifestación hepática del síndrome metabólico [22].

1.1.2. Epidemiología

El HGNA es la causa más frecuente de enfermedad hepática en países desarrollados [1,23]. Sin embargo, determinar su verdadera prevalencia constituye todo un reto difícil de superar, porque es un proceso asintomático y sobre todo por la dificultad que entraña su diagnóstico preciso, que se basa en la biopsia hepática o en la resonancia magnética. La ecografía hepática carece de una adecuada sensibilidad y especificidad [24,25]. La prevalencia de HGNA en la población general varía ampliamente, entre el 20% y el 40%. Esta variabilidad se debe a diferencias poblacionales, criterios de inclusión y, sobre todo, al método diagnóstico empleado. La prevalencia puede elevarse al 60-90% en poblaciones con obesidad, DM2 y/o síndrome metabólico [1,23], mientras que en sujetos delgados se estima en torno al 12%. El HGNA afecta por igual a

Introducción

hombres y a mujeres y parece ser más prevalente en poblaciones caucásicas e hispanoamericanas que en afroamericanos. También se han descrito asociaciones entre gemelos, lo que sugiere que hay factores genéticos que predisponen a su desarrollo [26,27].

Estudios de necropsias de sujetos no seleccionados de la población general, han puesto de manifiesto una prevalencia de esteatosis del 70% en pacientes obesos y del 35% en no obesos (que incluyen individuos delgados y con sobrepeso). Había signos de inflamación y fibrosis, consistentes con esteatohepatitis no alcohólica en el 18,5% de los obesos y en el 2,7% de los no obesos [28].

1.1.3. Etiopatogenia

En la actualidad, se acepta que la causa inicial del desarrollo del HGNA primario es la resistencia a la insulina asociada a exceso de depósitos de grasa corporal [14,29].

En la patogenia del HGNA pueden intervenir factores genéticos y/o metabólicos, siendo la obesidad, la DM2 y el síndrome metabólico los más determinantes. La mayoría de pacientes con HGNA no tienen un componente genético identificable [14,30].

1.1.3.1. Bases genéticas

Estudios de polimorfismos genéticos han puesto de manifiesto que pueden influir no sólo en la tendencia a acumular grasa en el hígado, sino también en las consecuencias clínicas del HGNA, determinando principalmente dos fenotipos diferentes: uno, con tendencia a desarrollar enfermedad hepática crónica; el otro, manifestado principalmente por resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. Así, algunos polimorfismos asociados al *patatin-like phospholipase domain-containing 3* (PNPLA3) confieren un mayor riesgo de desarrollo de esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis hepática y hepatocarcinoma, con poco efecto sobre la resistencia a la insulina, dislipemia y enfermedad cardiovascular [31–33]. También, estudios recientes muestran que otros polimorfismos genéticos (TM6SF2) se asocian a resistencia a la insulina, dislipemia, y enfermedad cardiovascular más que a esteatohepatitis y cirrosis [34].

1.1.3.2. Bases metabólicas

Como anteriormente hemos señalado, la mayor parte de los sujetos con HGNA no tienen un componente genético evidente o conocido, y se le denomina HGNA metabólico [14]. En estos individuos, la excesiva acumulación de triglicéridos intrahepáticos es una consecuencia del exceso de ingesta calórica asociado a incremento de grasa corporal. Estudios controlados, mediante sobrealimentación en voluntarios sanos, han puesto de manifiesto que

Introducción

la excesiva ingesta calórica da lugar inicialmente a incremento de grasa subcutánea, y cuando se supera su capacidad de almacenaje de triglicéridos, la grasa pasa a depositarse en otras regiones como hígado, peritoneo y otras vísceras. Estos trabajos también ponen de manifiesto que, junto al inicial aumento de grasa corporal, aparece la resistencia a la insulina, que contribuiría a la acumulación de grasa en hígado [35,36].

Algunos individuos suman los dos factores, genéticos y metabólicos, en ellos, el factor genético influenciará las consecuencias clínicas del HGNA, favoreciendo el desarrollo de esteatohepatitis y cirrosis hepática, o bien resistencia a la insulina, DM2 y enfermedad cardiovascular [37].

1.1.3.3. Teoría del *doble impacto* en la patogenia del HGNA

La patogenia del HGNA aún no está completamente aclarada, pero clásicamente se ha propuesto la teoría del doble impacto, tratando de explicar por qué se acumula grasa en el hígado y por qué puede progresar a esteatohepatitis.

El **primer impacto** implica a la resistencia a la insulina como causa principal del acúmulo excesivo de grasa en el hígado. Se basa en la incapacidad de la insulina para ejercer sus funciones biológicas en el adipocito, favoreciendo la lipólisis, con la consiguiente liberación de ácidos grasos libres al plasma, lo que condiciona mayor aflujo de ácidos grasos al hepatocito. Además, la hiperinsulinemia asociada a la resistencia a la insulina, en el hepatocito estimula

la síntesis de ácidos grasos, inhibe su beta oxidación mitocondrial y reduce la síntesis de la apolipoproteína B100, componente de las *very low density lipoprotein* (VLDL), dificultando que los triglicéridos sean transportados fuera del hígado. Todos estos factores asociados contribuyen al acúmulo excesivo de triglicéridos intrahepáticos, es decir al desarrollo de HGNA, y se ha señalado que el principal de estos factores sería el hiperaflujo de ácidos grasos libres al hígado [38]. En este mecanismo patogénico, los adipocitos tendrían un papel central tanto en el desarrollo de la resistencia a la insulina como en el del HGNA por su capacidad para actuar como un órgano endocrino secretor de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α), leptina, resistina. En este sentido, la obesidad debe considerarse una entidad proinflamatoria, de forma que el hígado, así como otros tejidos, están expuestos a las citoquinas producidas en el tejido adiposo [12,39,40].

El “**segundo impacto**” comenzaría como consecuencia de las concentraciones intrahepáticas elevadas de ácidos grasos libres y la saturación de la beta-oxidación mitocondrial de los mimos. Así, mediante el estrés oxidativo y peroxidación lipídica, a través de un hiperaflujo de electrones a la cadena respiratoria mitocondrial, produciría un aumento de la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) que sería el causante de las lesiones inflamatorias típicas de la EHNA [39,41]. Los RLO estimulan la síntesis de citoquinas por distintos tipos celulares como son hepatocitos, adipocitos, y células de Kupffer debido a la acción de los RLO sobre factores de

Introducción

transcripción, fundamentalmente el factor nuclear $\text{k}\beta$ (NF- $\text{k}\beta$). Este factor se encuentra normalmente sintetizado y retenido de forma inactiva en el citoplasma celular unido a la proteína IKK. Los RLO tienen la capacidad de activar la enzima IKK β que desaclopará al NFK β de la IKK y, por tanto, el factor queda libre, migra al núcleo e inicia procesos de transcripción de citoquinas (TNF α , factor de crecimiento tumoral beta 1 [TGF- β 1], la interleucina 8, y otras citoquinas). Todo ello contribuiría a la necrosis hepatocitaria, con inflamación y fibrosis, que son los marcadores histológicos de la esteatohepatitis no alcohólica [39,41].

Otros factores implicados son los receptores del peroxisoma proliferante activado (PPAR) que pertenecen a la familia de los receptores nucleares, que controlan el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, la oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de la glucosa y la inflamación vascular asociada a aterogénesis. En el hígado, los PPAR están a concentraciones muy bajas y aumentan en modelos animales con resistencia a la insulina y esteatosis [42]. Activados por los ácidos grasos libres, los PPAR aumentan la beta oxidación. En pacientes con HGNA se han identificado algunas mutaciones en genes codificadores de estos receptores nucleares, por lo que también podrían estar implicados en su patogenia, y podrían explicar al menos en parte las diferentes consecuencias clínicas del HGNA en distintos individuos [41].

1.1.4. Clínica

El HGNA es una enfermedad silente o paucisintomática, cuyo diagnóstico se realiza a partir de pruebas rutinarias en las que se demuestran niveles elevados de enzimas hepáticas o de forma incidental a partir de pruebas de imagen realizadas por otros motivos o cuando la enfermedad evoluciona hasta producir complicaciones. La presencia de esteatohepatitis no alcohólica, no se diferencia por la clínica ni por la analítica de la esteatosis simple, e igualmente el desarrollo de cirrosis hepática puede ser asintomático en las fases iniciales, aunque en estadios avanzados muestra las manifestaciones clínicas, complicaciones y alteraciones analíticas de la cirrosis hepática en general.

- Exploración física

La mayoría de los pacientes con HGNA presentan una exploración física completamente normal; no obstante, en algunas ocasiones puede detectarse la presencia de hepatomegalia secundaria a la infiltración de grasa hepática. La prevalencia de hepatomegalia en pacientes con HGNA se encuentra en torno al 19-28% [43,44], aunque depende de la gravedad del HGNA y de la presencia de esteatohepatitis en la población estudiada. Como en otras hepatopatías crónicas, el desarrollo de cirrosis puede desencadenar la presencia de estigmas como el eritema palmar, las arañas vasculares, la ascitis, etc.

Introducción

- Hallazgos de laboratorio

Los pacientes con HGNA pueden tener elevaciones leves o moderadas en la aspartato aminotransferasa (AST) y en la ALT [45], aunque niveles normales de aminotransferasas no excluyen la existencia de HGNA [46]. La prevalencia real de transaminasas alteradas en el HGNA no se conoce con exactitud, ya que a muchos pacientes se les diagnostica precisamente por una alteración en las mismas. Cuando se encuentran elevadas, la AST y la ALT están entre 2 y 5 veces por encima del límite superior de la normalidad, con una relación AST/ALT menor de 1, al contrario que el hígado graso alcohólico, en el que dicha relación suele ser mayor de 2 [47,48].

La fosfatasa alcalina (FA) rara vez se altera. La gamma glutamil transpeptidasa (GGT) puede estar elevada entre 2 y 3 veces el límite superior de la normalidad. Los niveles séricos de albúmina y bilirrubina típicamente se encuentran dentro de la normalidad, pero pueden alterarse en pacientes que desarrollan cirrosis. Otras anomalías que pueden detectarse en pacientes con cirrosis incluyen un tiempo de protrombina alargado, trombocitopenia y neutropenia.

El HGNA también se asocia a niveles séricos descendidos de colesterol *high density lipoprotein* (HDL) y elevados de triglicéridos. No suele asociarse a modificaciones significativas en los valores séricos de colesterol *low density lipoprotein* (LDL). Los pacientes con HGNA suelen tener elevadas la

concentración de ferritina sérica o el índice de saturación de la transferrina [44,45]. Una ferritina sérica 1,5 veces mayor que el límite superior de la normalidad en pacientes con HGNA se asocia con una mayor gravedad de la enfermedad y, por tanto, de esteatohepatitis y con fibrosis hepática más avanzada [49].

- Manifestaciones extrahepáticas

Las consecuencias clínicas del HGNA afectan también a órganos extrahepáticos, ya que se asocia independientemente con un aumento tanto de la incidencia como de la prevalencia de enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica y DM2 [2]. El riesgo de desarrollar tales enfermedades extrahepáticas va en paralelo con la gravedad del HGNA, de forma que los pacientes con esteatohepatitis parecen tener un mayor riesgo de padecer estas enfermedades que los pacientes con esteatosis simple. Otros factores que influyen en este riesgo incluyen variaciones genéticas, la acumulación del tejido adiposo peritoneal, la dieta y la microbiota intestinal. En este sentido, estudios recientes sugieren que el HGNA podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon y osteoporosis, especialmente en hombres. Cabe destacar que la mejoría o resolución del HGNA se asocia con una reducción de la incidencia de DM2 y mejoría de la función renal, lo que apoya la hipótesis de causalidad y que sugiere que los tratamientos dirigidos a

Introducción

reducir la grasa en el hígado pueden reducir las complicaciones extrahepáticas. El conocimiento de estas asociaciones es importante en la práctica clínica, de forma que el manejo rutinario de los pacientes con HGNA debería incluir la valoración de factores de riesgo cardiovascular, DM2 y enfermedad renal crónica [2].

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de HGNA requiere que se cumplan los siguientes criterios[18]:

- Demostración de esteatosis hepática mediante pruebas de imagen o biopsia.
- Ausencia de un consumo excesivo de alcohol.
- Ausencia de otras causas de esteatosis hepática secundaria.
- Ausencia de otras enfermedades hepáticas crónicas.

Como se ha mencionado previamente, las alteraciones en las determinaciones bioquímicas, principalmente las transaminasas, suelen estar presentes, aunque no son ni necesarias ni suficientes para establecer el diagnóstico de HGNA. Estas pruebas de laboratorio son necesarias para valorar otras posibles enfermedades con las que realizar un diagnóstico diferencial.

Los hallazgos radiológicos a menudo son suficientes para realizar el diagnóstico de la enfermedad, siempre y cuando se hayan excluido otras causas

de esteatosis hepática, pero ninguna técnica de imagen permite diferenciar entre esteatosis simple y la esteatohepatitis no alcohólica. En este sentido, aunque la biopsia hepática no está indicada en la mayoría de los pacientes, en algunos casos puede ser necesaria si el diagnóstico no está claro o para evaluar el grado de lesión hepatocitaria; además es el único método disponible para diferenciar la esteatosis simple de la esteatohepatitis no alcohólica [24].

A continuación, describimos las distintas pruebas para el diagnóstico del HGNA, y las dividimos en dos grupos, unas son pruebas de precisión, que permiten cuantificar la concentración de triglicéridos intrahepáticos; las otras son pruebas semicuantitativas, que ofrecen una medida indirecta con ciertos límites en su sensibilidad y especificidad.

1.1.5.1. Pruebas diagnósticas de precisión cuantitativa

- Biopsia hepática

En 1883, Paul Ehrlich realizó la primera biopsia hepática en sujetos diabéticos para la determinación de glucógeno. Cuarenta años más tarde, en 1923, Bingel describió la primera biopsia percutánea con intención diagnóstica. Sheila Sherlock, considerada fundadora de la hepatología moderna, fue una de las pioneras en el uso de la biopsia hepática [50]. Hasta entonces era una mera herramienta para estudios de investigación [51]. En 1958, Menghini adaptó y

Introducción

desarrolló un método de biopsia hepática por aspiración en un segundo, lo que supuso la expansión de la técnica [52].

Existen dos tipos de esteatosis, macrovesicular y microvesicular. En la esteatosis microvesicular el núcleo del hepatocito está en el centro de la célula rodeado por numerosas vesículas grasas de pequeño tamaño. Este patrón es característico del hígado graso agudo del embarazo y del síndrome de Reye. Por el contrario, en la esteatosis macrovesicular se aprecian hepatocitos con un núcleo excéntrico empujado hacia la periferia por una única gran vacuola grasa. Este segundo patrón es el que corresponde tanto al HGNA como a la esteatosis de origen alcohólico [18].

Aunque clásicamente la biopsia era considerada la técnica diagnóstica de referencia, posee ciertos inconvenientes que limitan su utilización. Se trata de un procedimiento invasivo, que genera una considerable ansiedad en el paciente por las posibles consecuencias que pueda tener sobre sujetos que suelen ser asintomáticos. La tasa de complicaciones se sitúa en torno al 0.5% [53], siendo por tanto demasiado elevada para un método de screening o de diagnóstico en personas la mayoría asintomáticas. Otras de las limitaciones que presenta esta técnica son el elevado precio que implica (requiere ingreso hospitalario, habitualmente en hospital de día), la variabilidad intra e interobservador a la hora de analizar la muestra de biopsia y el sesgo de muestreo ya que la infiltración grasa no siempre es homogénea, con áreas afectadas y áreas respetadas [54].

- Imagen por Resonancia Magnética (IRM)

Otro método que permite diagnosticar la cantidad de depósitos grasos en el hígado es la IRM, la cual se considera una de las técnicas más sensibles que existen, [55] siempre y cuando no se empleen las secuencias convencionales spin eco (SE) [56]. Su fundamento se basa en el desplazamiento químico (*Chemical Shift*).

Los protones, al encontrarse en un campo magnético, giran (precesan) con distintas frecuencias según se encuentren en una molécula u otra (p. ej., triglicéridos vs. agua). Los protones de hidrógeno que se encuentran en las moléculas de los triglicéridos precesan todos a la misma frecuencia, pero más lentos que los protones que se encuentran en las moléculas de agua. Utilizando diferentes tiempos de eco (TE), se obtienen imágenes de “fase opuesta” y “en fase”. Cuando existe acúmulo de grasa en el hígado, éste pierde señal en las imágenes de fase opuesta [56], siendo esta pérdida de señal proporcional a la cantidad de grasa hepática. Aunque clásicamente se han utilizado secuencias eco por gradiente para este proceso, en los últimos años se vienen utilizando secuencias fast SE con saturación grasa, con lo que se evitan las susceptibilidades magnéticas que sufren las secuencias de eco por gradiente [57].

Estas técnicas, en su esquema más simplificado, consisten en adquirir dos imágenes con dos tiempos de eco diferentes. Una imagen se obtiene

Introducción

aplicando un determinado tiempo de eco cuando las dos poblaciones de protones (en agua y en grasa) están en fase y, por lo tanto, suman sus intensidades. Con el otro tiempo de eco, están en fase opuesta y las señales se restan, produciéndose una pérdida de señal en los vóxeles que contienen agua y grasa.

Estas secuencias tienen sus orígenes en el método que Dixon diseñó [58], el cual se basaba en la diferencia de fase, al igual que la fase-fase opuesta, y que recibe el nombre de *two-point Dixon chemical shift imaging*. Se obtienen dos imágenes, una en fase y otra en fase opuesta. En la descripción original se obtenían con la secuencia SE. La suma de estas imágenes proporciona una imagen en la que sólo se representa el agua, y con la sustracción sólo se representa la grasa. En aquella época, debido a una peor resolución temporal y a la ausencia de campos magnéticos suficientemente homogéneos, no pudo extenderse ampliamente. Conforme la tecnología lo ha ido permitiendo, se han ido acortando los tiempos de eco y los tiempos de repetición (TR), lo que ha permitido reducir el tiempo de adquisición y de este modo realizar el estudio durante una pausa de apnea. De esta forma se ha evolucionado desde el método original de Dixon con dos imágenes (*two-point Dixon*) hasta secuencias multieco con corrección por decaimiento T2*, pasando por métodos con tres imágenes (*three-point Dixon*) [59].

A pesar de todo ello, la IRM también tiene sus limitaciones entre las que se encuentran la multitud de secuencias y métodos Dixon empleados por los

distintos autores, que han producido resultados muy dispares y dependientes de cada equipo de IRM. Además, la cuantificación de la grasa hepática se ve limitada cuando ésta es inferior al 10-15% [60] y cuando existen depósitos de hierro en el hígado.

- Espectroscopia por resonancia magnética de protones (ERM-H¹)

La ERM-H¹ mide directamente la composición química de los tejidos en base a que cada uno tiene una frecuencia de precesión que puede separarse y medirse en el vóxel de interés [61] y actualmente constituye el método no invasivo más preciso para la cuantificación de triglicéridos intrahepáticos [62]. Un meta-análisis publicado en 2011 sobre 9.597 artículos sobre el tema concluye que debe considerarse como el método más preciso para el diagnóstico y cuantificación del contenido de grasa hepática [55]. Incluso se ha aplicado en estudios a la población general para determinar la prevalencia de esteatosis [19].

La ERM-H¹ ha demostrado excelente correlación con la biopsia hepática [55,61–63], y es capaz de monitorizar los cambios del contenido intrahepático de grasa de forma evolutiva en individuos sometidos a diferentes procedimientos de pérdida y ganancia de peso [64]. La ERM-H¹ se considera sensible para detectar una variación < 0,5% en la cantidad de grasa hepática [61]. Además la ERM-H¹, a diferencia de la IRM o la tomografía computerizada (TC), no se

Introducción

afecta por diversos factores de confusión como sobrecarga de hierro intrahepático, glucógeno o fibrosis hepática [65]. Para la cuantificación de los depósitos de grasa hepática se pueden utilizar varias secuencias. La secuencia PRESS (*point-resolved spectroscopy*) y la STEAM (*stimulated echo adquisición mode*) son las habituales. La secuencia PRESS es una secuencia multieco que usa pulsos de $90^\circ - 180^\circ - 180^\circ$, de disparo único, con un largo TE y TR que permite una magnífica determinación de metabolitos. La secuencia STEAM es una secuencia multieco que utiliza pulsos de $90^\circ - 90^\circ - 90^\circ$. PRESS tiene mejor relación señal/ruido que STEAM y es la más usada para determinar metabolitos (colina, glutamina, etc.). La cuantificación de la grasa hepática no necesita alta relación señal/ruido y como STEAM es menos sensible que PRESS a los errores por acoplamiento J, es más precisa para cuantificar la grasa hepática [66,67]. Los estudios se suelen hacer con técnica univóxel ya que con técnica multivóxel se prolonga demasiado el tiempo de adquisición [62].

La cuantificación de los triglicéridos hepáticos se calcula sumando al área bajo la curva espectral de los lípidos hepáticos de (0,9 - 3,0) partes por millón (ppm). Los resultados se muestran en forma de proporciones. Los valores que se obtienen son en forma de Fracción grasa (Fgrasa) que es el porcentaje de grasa del total del vóxel estudiado (que incluía agua y grasa): $Fgrasa = \frac{Grasa}{Grasa + Agua} \times 100$. Sus principales inconvenientes son la complejidad de su análisis y su disponibilidad para la práctica clínica.

1.1.5.2. Pruebas diagnósticas semicuantitativas

- Ecografía

La ecografía es un método diagnóstico no invasivo, con alta disponibilidad y de bajo coste económico. Por estos motivos, es la técnica más empleada para el diagnóstico de HGNA. Su base física se fundamenta en la mayor o menor propagación de las ondas acústicas por los tejidos, dependiendo del número de interfases que encuentran a su través. Un mayor número de interfases supone una mayor resistencia a la transmisión de las ondas y una mayor ecogenicidad (brillo).

La presencia de grasa en el hígado supone un incremento de la ecogenicidad del mismo, lo que el operador aprecia como un parénquima hepático más brillante, lo que condiciona una mala definición de las paredes de las ramas periféricas de la vena porta y del diafragma, así como una mayor atenuación acústica que no permite visualizar segmentos posteriores del hígado.

El diagnóstico ecográfico del HGNA basado en estos hallazgos permite clasificarlo en tres categorías:

- Grado I o Leve: Parénquima hepático más brillante que el parénquima renal.
- Grado II o Moderado: El brillo hepático impide visualizar las ramas periféricas de la vena porta.

Introducción

- Grado III o Avanzado: Impide la visión de segmentos posteriores hepáticos y/o del diafragma.

Esta clasificación está sujeta a errores, especialmente cuando la cantidad de grasa en el hígado es leve o moderada, y ha sido criticada por diversos autores porque al ser operador, equipo, y transductor dependiente es inadecuada para cuantificar los depósitos de grasa hepática debido a la gran variabilidad intra e inter observador [68,69]. Otro inconveniente es que la ecografía es ineficaz para la detección de depósitos grasos inferiores al 30% [68].

- Tomografía computerizada (TC)

Se han realizado numerosos estudios con la intención de estandarizar un método de TC que permita cuantificar la grasa hepática. Entre ellos, el más extendido ha sido el uso de la TC sin contraste intravenoso a partir de la medición de la atenuación del parénquima hepático mediante unidades Hounsfield (UH) [70]. El umbral se ha establecido en un valor de 48 UH [71,72], de forma que valores inferiores serían diagnósticos de esteatosis hepática. Otros métodos que implican la atenuación esplénica o, más recientemente, la TC de energía dual, se encuentran en fase de validación experimental y clínica [73,74].

El principal inconveniente de esta técnica radica en la necesidad de utilizar radiación ionizante, así como en la posibilidad de que interfieran en la medición otros factores como el depósito de hierro. Además, resulta

especialmente poco sensible para depósitos grasos leves y moderados [75]. Aquellos métodos que incluyen la utilización de contraste intravenoso añaden inconvenientes adicionales por la posibilidad de reacciones alérgicas y un mayor coste [76].

- **Elastografía**

Esta técnica, que se emplea para valorar el grado de fibrosis basado en la rigidez hepática, también se está desarrollando para valorar la esteatosis hepática [77]. Aun así, todavía son necesarios más estudios que demuestren que las mediciones por elastografía son válidas, reproducibles y asociadas con resultados clínicos relevantes.

1.2.RESISTENCIA A LA INSULINA

1.2.1. Concepto

La resistencia a la insulina se define como una disminución de los efectos biológicos de la insulina sobre los tejidos corporales [78].

La insulina es una hormona anabólica que tiene un papel fundamental en el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Dentro de sus principales funciones destaca la captación de glucosa en el músculo y tejido adiposo al favorecer la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la

Introducción

membrana celular. Permite sintetizar y almacenar glucógeno hepático y muscular, suprime la síntesis hepática de glucosa, inhibiendo la neoglucogénesis, y favorece la activación de la bomba Na/K ATPasa en el tejido adiposo y muscular. En el músculo, estimula la síntesis de proteínas, y, con la entrada de glucosa, permite sintetizar y almacenar glucógeno, y la utilización de glucosa como fuente de energía inmediata para la contracción muscular. En el tejido adiposo inhibe la lipólisis, con lo que frena la liberación de ácido grasos libres al torrente circulatorio y otros tejidos [78].

La respuesta disminuida a los efectos de la insulina se manifiesta principalmente en sus órganos diana, principalmente hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La resistencia a la insulina provoca una disminución de la captación de la glucosa por las células del músculo y del tejido adiposo, junto a una disminución en la producción hepática de glucógeno y un aumento en la producción y secreción hepática de glucosa, lo que tiende a provocar hiperglucemia. Este hecho conduce a un incremento en la secreción de insulina por las células β del páncreas para compensar los elevados niveles séricos de glucosa circulante, lo que se denomina hiperinsulinismo compensatorio, que constituye la característica bioquímica fundamental de la resistencia a la insulina [78,79]. En el tejido adiposo, la resistencia a la insulina favorece la liberación de ácidos grasos libres que tienden a depositarse en otros órganos como el hígado, peritoneo y otros.

1.2.2. Epidemiología

La prevalencia de la resistencia a la insulina en la población general sana permanece en gran medida desconocida debido a que en la mayoría de los casos es asintomática y su diagnóstico se basa en determinaciones que no son rutinarias. Se estima una prevalencia aproximada del 3% en individuos aparentemente sanos, que se eleva en sujetos que tienen algún componente del síndrome metabólico, sobre todo la obesidad abdominal y la intolerancia a la glucosa. Se conoce que el síndrome metabólico está presente en el 25% de la población mundial, y una elevada proporción de estos sujetos tienen resistencia a la insulina [80–82].

1.2.3. Etiopatogenia

Se acepta que la resistencia a la insulina es consecuencia de factores hereditarios y/o adquiridos. Las causas hereditarias incluyen mutaciones genéticas en receptores de la insulina, transportadores de glucosa y proteínas de señalización que son independientes del índice de masa corporal (IMC) [83].

La obesidad abdominal, también denominada central, es el principal factor de riesgo adquirido de resistencia a la insulina, que, asociada a factores genéticos predisponentes, puede conducir al desarrollo de DM2. Dentro de esta obesidad abdominal, la excesiva acumulación de grasa en el hígado, y la denominada adiposidad visceral, debida a la acumulación de grasa en

Introducción

peritoneo y mesenterio constituyen el principal factor de riesgo de resistencia a la insulina. Por otro lado, se acepta que el acúmulo de grasa subcutánea abdominal no tiene una asociación significativa con la resistencia a la insulina [12].

Múltiples estudios han tratado de identificar los responsables moleculares de la asociación entre obesidad abdominal y resistencia a la insulina, y aunque queda aún mucho por aclarar, se acepta que entre los principales factores que provocan resistencia a la insulina se encuentran: aumento de ácidos grasos libres, acúmulo de lípidos intracelulares, secreción de péptidos y citoquinas circulantes por los adipocitos, que incluyen $\text{TNF}\alpha$, interleuquina-6, RBP4, alteraciones en la expresión de la adipoquina protectora, adiponectina, y la inflamación crónica subclínica asociada a la obesidad, incluyendo la infiltración de macrófagos en los tejidos corporales con exceso de grasa [84–90]. Otras causas adquiridas de resistencia a la insulina incluyen sedentarismo, dieta hipercalórica no asociada a ejercicio físico, embarazo, la edad, infecciones y medicamentos [91].

Causas específicas de resistencia a la insulina:

- Edad: La edad puede ser causa de resistencia a la insulina principalmente a través de disminución de los receptores GLUT-4.
- Aumento de producción de antagonistas de la insulina: Puede ocurrir asociado a diferentes procesos como son: síndrome de Cushing, acromegalia, situaciones de estrés, traumatismos, cirugía, cetoacidosis

diabética, infecciones graves, insuficiencia renal crónica y cirrosis hepática. Las acciones de la insulina se encuentran influenciadas por otras hormonas de forma fisiológica. El incremento de hormonas contrarreguladoras como el glucagón, los glucocorticoides y las catecolaminas contribuyen a la resistencia a la insulina.

- **Medicamentos:** Los principales medicamentos que pueden favorecer resistencia a la insulina incluyen glucocorticoides, niacina, ciclosporina, medicación antirretroviral [92].
- **Tratamiento antiandrogénico:** Puede causar hipogonadismo y resistencia a la insulina [93].

1.2.4. Consecuencias clínicas

La resistencia a la insulina puede manifestarse de diversas formas dependiendo de la etiología y de su gravedad. Las consecuencias de la resistencia a la insulina asociadas a la obesidad incluyen:

- **Tolerancia alterada a la glucosa sin diabetes (glucemia basal: 100-125 mg/dl) y DM2.**

Las alteraciones en la homeostasis de la glucosa son variables y dependen de la etiología, gravedad y habilidad de las células β para responder a la resistencia a la insulina con un incremento en la secreción de insulina, lo que difiere ampliamente entre pacientes. Muchos pacientes con resistencia a la

Introducción

insulina relacionada con la obesidad tienen en un principio concentraciones normales o levemente elevadas de glucosa. Finalmente, en muchos casos las células β del páncreas no consiguen compensar la resistencia a la insulina, desarrollando hiperglucemia. Algunos pacientes desarrollan DM2 y pueden requerir insulina para controlar la hiperglucemia [94].

- **Desarrollo de dislipemia**

Las alteraciones lipídicas asociadas con la resistencia a la insulina afectan a todas las fracciones lipídicas. Se caracterizan por elevación de triglicéridos séricos, disminución de colesterol HDL y en menor medida aumento de colesterol LDL. Este patrón se correlaciona fuertemente con un elevado riesgo cardiovascular.

La apolipoproteína B (apo B) se asocia típicamente con el colesterol LDL; sin embargo, en caso de dislipemia asociada a resistencia a la insulina hay una sobreproducción de apo B y un incremento en la síntesis de triglicéridos VLDL en respuesta al aumento del aporte de ácidos grasos libres al hígado. Los niveles bajos de colesterol HDL suponen un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular. Además, las pequeñas partículas densas de LDL se suponen especialmente aterogénicas posiblemente por ser más propensas a la oxidación y por su mayor proporción de apo B. En comparación con los estados no insulín-resistentes, un nivel dado de colesterol LDL supone un mayor

número de pequeñas partículas densas LDL que contienen apo B y, a su vez, esto supone un aumento del riesgo [94].

- **Síndrome metabólico**

Su diagnóstico se basa en los siguientes 5 criterios de riesgo de DM2 y enfermedad cardiovascular [95]: obesidad abdominal (perímetro abdominal > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres), glucemia en ayunas ≥ 100 mg/dL, tensión arterial $\geq 130/80$ mmHg, triglicéridos séricos > 150 mg/dL (> 1,7 mmol/L), colesterol HDL < 40 mg/dL (< 1,0 mmol/L) en hombres y < 50 mg/dL (< 1,3 mmol/L) en mujeres. La definición precisa de síndrome metabólico varía según los criterios imprescindibles entre los 5 descritos. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera imprescindible la presencia de resistencia a la insulina, determinada mediante glucemia basal ≥ 100 mg/dL o test de sobrecarga de glucosa [96]. Por otro lado, el *Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III)* publicado en 2001 [97], requiere la presencia de al menos 3 de los 5 criterios. Finalmente, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) sugirió que debe ser imprescindible la presencia de obesidad central más 2 cualquiera de los otros criterios [98].

- **Desarrollo de HGNA**

La asociación de resistencia a la insulina con el HGNA se expone en el siguiente apartado (1.3. Resistencia a la insulina. Relación con el HGNA, IMC y perímetro abdominal).

- **Aterosclerosis subclínica o clínicamente manifiesta**

Se acepta que la principal consecuencia clínica de la resistencia a la insulina es la enfermedad cardiovascular de base arteriosclerótica, representada en su fase inicial y asintomática por la denominada aterosclerosis subclínica. En las fases más avanzadas, se manifiesta por enfermedad cardiovascular, cuyo principal representante es la enfermedad coronaria, y se incluyen también todas las enfermedades con base de aterosclerosis. En general, se puede afirmar que la mayoría de las consecuencias clínicas asociadas a la resistencia a la insulina, conducen al desarrollo de aterosclerosis [94].

- **Ciertos cánceres asociados a la obesidad e hiperinsulinismo**

La resistencia a la insulina con hiperinsulinemia compensatoria ha sido implicada en la etiología de algunos tipos de cánceres, incluyendo colon, endometrio, páncreas, renal, mama [2].

1.2.5. Diagnóstico de resistencia a la insulina

El diagnóstico de resistencia a la insulina en la mayoría de los pacientes se basa en hallazgos clínicos (p. ej., rasgos del síndrome metabólico): hiperglucemia, dislipemia, obesidad abdominal e hipertensión.

En algunos casos, puede ser útil cuantificar la resistencia a la insulina, como en pacientes obesos, ya que son los que se encuentran en un riesgo mayor de desarrollar DM2 y sus complicaciones [99], como es la enfermedad cardiovascular. La determinación y cuantificación de resistencia a la insulina permitiría identificar a los individuos con mayor riesgo metabólico-clínico, susceptibles de profilaxis o tratamiento.

▪ Métodos de diagnóstico de resistencia a la insulina

Todos ellos, se basan en que en la resistencia a la insulina existe aumento de niveles séricos de insulina que trata de compensar la tendencia a la hiperglucemia. Por ello, estos métodos utilizan dos variables: niveles séricos de glucosa y de insulina, pero recogidos en diferentes circunstancias. Destacamos los siguientes:

1.- Clamp o pinza hiperglucémica

Permite fundamentalmente cuantificar la capacidad de respuesta de las células β del páncreas.

Introducción

Básicamente, consiste en conseguir una concentración elevada de glucosa en plasma (125 mg/dL), que se mantiene constante mediante la infusión intravenosa de glucosa. La cantidad de glucosa que hay que administrar para mantener la glucemia elevada constante permite medir la respuesta de las células beta del páncreas. Requiere la canalización de dos vías venosas y tiene una duración de unas dos horas. Es un método complejo y laborioso, por lo que no se utiliza en la práctica clínica [100,101].

2.- Clamp o pinza hiperinsulinémica euglucémica

Permite fundamentalmente cuantificar la sensibilidad de los tejidos a la insulina.

Consiste en una infusión constante de insulina intravenosa, a un valor aproximado de 100 μ U/mL, y mantener constante la concentración de glucosa en sangre en aproximadamente 90 mg/dL mediante la infusión de glucosa intravenosa. La velocidad de infusión de glucosa administrada durante los últimos 30 minutos del test determina la sensibilidad de los tejidos a la insulina. Si se necesitan niveles altos de glucosa ($>7,5$ mg/min) para mantener la euglucemia, el resultado es de sensibilidad normal a la insulina. Cuando se necesitan niveles reducidos de infusión de glucosa ($< 4,0$ mg/min) indica resistencia a la insulina. Valores intermedios (4,0-7,5 mg/min) indican estado de pre-resistencia a la insulina y se denomina intolerancia a la glucosa.

Igual que el anterior, es un test complejo, considerado invasivo, de larga duración, por lo que no se realiza en la práctica clínica. Se considera el patrón de referencia o “patrón oro” con el que se compara la eficacia de otros métodos [100,101].

3.- Homeostatic Model Assessment (HOMA-IR)

Propuesto por Mathews y colaboradores en 1985 [102], es el método más utilizado para diagnosticar resistencia a la insulina en la población general. Se basa en la interacción entre la función celular β y la sensibilidad a la insulina en un modelo matemático, donde se utilizan las concentraciones basales de glucosa e insulina. El modelo se calibra con una función celular β de 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 de acuerdo con la siguiente fórmula [102] :

$$\text{HOMA-IR} = \frac{[\text{insulina plasmática en ayuno } (\mu\text{U/ ml}) \times \text{glucosa plasmática en ayuno (mmol/L)}]}{22,5}$$

El índice HOMA también puede utilizarse para evaluar la función de la célula β pancreática utilizando el siguiente modelo matemático:

$$\text{HOMA-}\beta = \frac{[20 \times \text{insulina plasmática en ayuno } (\mu\text{U/ ml})]}{[\text{glucosa plasmática en ayuno (mmol/L)} - 3,5]}.$$

Introducción

4.- Quantitative Insulin Check Index (índice QUICKI)

Se basa en un modelo logarítmico que también se calcula a partir de las concentraciones basales de glucosa e insulina mediante la siguiente ecuación [103]:

$$\text{QUICKI} = 1 / [(\log \text{ insulina plasmática en ayuno } (\mu\text{U/ml}) + \log \text{ glucosa plasmática en ayuno (mg/dl)})]$$

Con respecto a los niveles de correlación de HOMA y QUICKI vs. el clamp, se han publicado resultados variables. En general, las mayores correlaciones se han observado cuando estos índices son construidos a partir de 3 o más determinaciones de glucosa e insulina en muestras extraídas consecutivamente en intervalos de 5 a 10 minutos. Los coeficientes de correlación con el clamp oscilan entre 0,43 y 0,91 para QUICKI y de -0,53 y -0,91 para HOMA [104–107]. El índice HOMA ha sido el más utilizado en la práctica clínica [105]. Algunos estudios en adultos han sugerido puntos de corte desde 2,5 para el diagnóstico de resistencia a la insulina, aunque en otros el valor de HOMA suele ser más elevado.

5.- Curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO)

La CTGO se utiliza principalmente para evaluar tolerancia a la glucosa y no para diagnosticar resistencia a la insulina, aunque se han desarrollado

índices para medir sensibilidad a la insulina con mediciones obtenidas de la CTGO [108,109]. En 1999, Matsuda y DeFronzo propusieron un índice de sensibilidad a la insulina obtenido a partir de las determinaciones de glucosa e insulina derivadas de una CTGO. Este método se conoce como índice Matsuda-DeFronzo o índice de sensibilidad a la insulina compuesto (ISI-Compuesto), que se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación [110]:

$$\text{ISI-compuesto} = 10.000 \div \sqrt{[(\text{IPA} * \text{GPA}) * (\text{xGPC} * \text{xIPC})]}$$

donde IPA es la insulina plasmática en ayuno en $\mu\text{U}/\text{ml}$, GPA la glucosa plasmática en ayuno en mg/dl , xGPC es el promedio de la concentración de glucosa plasmática en todos los puntos de la curva y xIPC es el promedio de la concentración de insulina plasmática en todos los puntos de la curva. El ISI-Compuesto alcanza niveles de correlación aceptables con el clamp hiperinsulinémico ($r = 0,73$) [110,111].

1.2.6. Tratamiento de la resistencia a la insulina y sus consecuencias clínicas

El tratamiento de la resistencia a la insulina se enmarca en las recomendaciones y objetivos terapéuticos que el *Adult Treatment Panel III* realizó en 2001 y que fueron refrendadas por la *American Heart Association (AHA)*, el

Introducción

National Institutes of Health (NIH) y por las guías de práctica clínica de la *Endocrine Society* para el síndrome metabólico [112–115]:

- Tratamiento de las causas subyacentes (sobrepeso/obesidad e inactividad física) mediante el control del peso y el aumento de la actividad física.
- Tratamiento de la resistencia a la insulina (hipoglucemiantes orales).
- Tratamiento de los factores de riesgo cardiovasculares si persisten a pesar de las modificaciones en el estilo de vida (hipolipemiantes y antihipertensivos).

No existe evidencia de que prevenir la DM2 y la enfermedad cardiovascular sea tan efectivo como conseguir los objetivos anteriormente mencionados. Es posible tratar la resistencia a la insulina mediante fármacos que incrementan la acción de la insulina (p. ej., tiazolidinedionas y metformina); aun así, los ensayos clínicos no demuestran que tal opción terapéutica mejore los resultados en comparación con la reducción de peso y el ejercicio [116,117].

▪ **Modificación del estilo de vida**

La modificación agresiva en el estilo de vida centrada en la pérdida de peso y el aumento de la actividad física es el tratamiento de elección en el síndrome metabólico y resistencia a la insulina [118–120]. La importancia del control del peso para evitar la progresión de los componentes del síndrome metabólico ha sido previamente demostrada en estudios observacionales,

independientemente del IMC basal [121]. La reducción de peso óptima se consigue con un manejo multimodal que incluya dieta, ejercicio y, posiblemente, terapia farmacológica (p. ej., orlistat) [122,123].

A. Dieta

La mayoría de los pacientes con resistencia a la insulina tienen sobrepeso y una disminución del mismo que mejore la sensibilidad a la insulina es un objetivo importante de cualquier dieta. Se han recomendado los siguientes modelos dietéticos:

- Dieta mediterránea [124].
- Aproximaciones dietéticas contra la hipertensión (*The Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet*) [125].
- Comidas con un índice glucémico bajo [126].
- Dietas con alto contenido en fibra (>30g/día) [127].

B. Ejercicio

La práctica del ejercicio puede ser beneficiosa más allá de la pérdida de peso asociada dado que reduce selectivamente la grasa abdominal, al menos en mujeres [128]. Las guías actuales de actividad física recomiendan regímenes de ejercicio moderado y regular. La recomendación estándar de ejercicio es un mínimo de 30 minutos de

Introducción

intensidad moderada, aunque aumentar el nivel de actividad física parece que también potencia su efecto beneficioso [129].

La eliminación de grasa abdominal mediante liposucción no mejora la sensibilidad a la insulina ni los factores de riesgo de enfermedad coronaria, lo que sugiere que el balance energético negativo inducido por la dieta y el ejercicio son necesarios para lograr los beneficios que se consiguen con la pérdida de peso [130].

▪ **Prevención de la DM2**

Existen ensayos clínicos que han demostrado que las modificaciones en el estilo de vida pueden reducir significativamente el riesgo de desarrollar DM2 así como los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes de alto riesgo [117].

Tanto la metformina como las tiazolidinedionas (p. ej., pioglitazona) mejoran la tolerancia a la glucosa, en parte por el aumento en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la metformina es menos efectiva que el cambio intenso del estilo de vida en la prevención de la diabetes [117], aunque puede disminuir la incidencia de eventos finales relacionados con la diabetes (muerte súbita, hipoglucemias/hiperglucemias mortales, infarto de miocardio, angina, fallo cardíaco, ictus, fallo renal, amputación, retinopatía, ceguera monocular y cirugía de cataratas) [131].

No se recomienda la prevención farmacológica rutinaria de la diabetes, aunque la metformina podría ser considerada en ciertos individuos que tengan alteraciones tanto de la glucosa en ayunas como de la tolerancia a la glucosa.

- **Reducción del riesgo cardiovascular**

La reducción del riesgo cardiovascular incluye, además de la pérdida de peso y hacer ejercicio físico, el tratamiento de la hipertensión, el cese del hábito tabáquico, el control glucémico en pacientes con diabetes y la disminución de los niveles de colesterol sérico de acuerdo con las guías de recomendación [132].

A. Hipolipemiantes

El *Adult Treatment Panel III* estableció como objetivo de tratamiento un nivel sérico de colesterol LDL menor que 100 mg/dL (2,6 mmol/L) para la prevención secundaria en pacientes con DM2 [112], aunque estudios posteriores han sugerido objetivos más agresivos (<80 mg/dL) con un régimen que incluya la administración de estatinas.

B. Antihipertensivos

Existen argumentos a favor y en contra acerca de si el uso de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II) a modo de

antihipertensivos en pacientes con DM2 podrían también contribuir a la reducción de la resistencia a la insulina [133,134].

1.3.RESISTENCIA A LA INSULINA. SU RELACIÓN CON EL HGNA, IMC Y PERÍMETRO ABDOMINAL

La resistencia a la insulina es el precursor fisiopatológico de la DM2, y su relación con HGNA ha sido ampliamente estudiado en pacientes con obesidad, síndrome metabólico [7] y DM2 [3], sugiriéndose que el aumento de la grasa hepática puede ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de resistencia a la insulina, DM2 [3] y enfermedad cardiovascular [2,4]. Está bien documentado que los pacientes con HGNA mueren más frecuentemente por enfermedad cardiovascular que por enfermedad hepática crónica [5,6].

El HGNA ha sido estudiado extensamente usando no sólo ecografía sino también mediante biopsias hepáticas y ERM-H¹ en la obesidad y la diabetes [7]. Sin embargo, el HGNA ha sido poco estudiado en individuos no obesos [26,135]. La ERM-H¹ es el método de referencia no invasivo para la cuantificación de triglicéridos hepáticos [19,136] y ha sido ampliamente validado en estudios poblacionales [19] y ensayos clínicos [137]. Por el contrario, la ecografía es un método de imagen operador dependiente con una alta variabilidad inter e intraobservador [69] que ofrece una inadecuada sensibilidad y especificidad en casos de esteatosis leve o moderada [25,138].

Aunque existe una amplia literatura médica sobre la valoración del HGNA utilizando ERM-H¹ en sujetos obesos y diabéticos, no hemos encontrado publicaciones sobre el HGNA y resistencia a la insulina en individuos occidentales delgados (IMC 18,5–24,9 kg/m²) o con sobrepeso (IMC 25-30 kg/m²). De hecho, sólo existen dos estudios en sujetos occidentales delgados (IMC 18,5–24,9 kg/m²), y en éstos se utilizaron niveles séricos de aminotransferasas y/o ecografía para valorar el contenido de grasa hepática [26,27], que son dos métodos con los que es frecuente encontrar un elevado porcentaje de falsos negativos, dada la elevada proporción de individuos con HGNA con niveles “normales” de transaminasas (ALT < 40 UI) [7,139,140] y la pobre sensibilidad de la ecografía abdominal para detectar esteatosis leve (contenido de grasa hepático < 30%) [25,138]. Esto es de especial importancia en estudios de población no obesa, en los que existe una mayor proporción de individuos con esteatosis leve en comparación con estudios en sujetos obesos.

Por otro lado, el aumento de perímetro abdominal ha sido descrito como un importante factor de riesgo de resistencia a la insulina y de enfermedad cardiovascular. Esta obesidad, también denominada central, está constituida por dos componentes, la grasa subcutánea, sin significativa relación con la resistencia a la insulina, y la grasa visceral que ha demostrado ser factor de riesgo importante para ambos, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. Aunque el estudio óptimo de la grasa abdominal, subcutánea o visceral, se puede conseguir con TC o IRM, no se emplean de forma rutinaria

Introducción

por la radiación de la TC, y el elevado coste económico, así como la complejidad del postproceso. Por estos motivos, se ha estudiado la utilidad del perímetro abdominal como método indirecto y simple de medir la adiposidad visceral. Y aunque, en principio, pueda representar tanto la grasa visceral como la subcutánea, el perímetro abdominal ha sido descrito como el marcador más fiable de adiposidad visceral [141], existiendo una alta correlación entre ambos utilizando IRM [142].

En nuestro estudio, también valoramos la relación entre la resistencia a la insulina y el IMC, porque éste ha sido relacionado en estudios observacionales y epidemiológicos con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad por todas las causas, especialmente por enfermedad cardiovascular en todos los grupos poblacionales. Además, el IMC ha demostrado ser el mejor predictor independiente de volumen de tejido adiposo evaluado mediante tomografía computarizada en adultos de ambos sexos [143].

En resumen, existe escasa información sobre la resistencia a la insulina en individuos no obesos (delgados o con sobrepeso), y su posible relación con el contenido de grasa hepática, perímetro abdominal (como marcador de adiposidad visceral) e IMC.

1.4.HGNA Y RESISTENCIA A LA INSULINA: RELACIÓN CON EL HIERRO INTRAHEPÁTICO Y TNF α SÉRICO

Se conoce que la resistencia a la insulina se asocia con el HGNA, sin embargo, existe una amplia variación interpersonal, y la sobrecarga hepática de hierro ha surgido como un posible nuevo factor involucrado no solo en el desarrollo de HGNA sino también en su relación con la resistencia a la insulina [16,17].

Varios estudios que han empleado biopsias hepáticas para el diagnóstico de HGNA han observado sobrecarga de hierro en hígado en un tercio de adultos [144] y en un cuarto de los niños con HGNA [145]. En este sentido, estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el consumo excesivo de hierro con la dieta y el aumento de los depósitos corporales de hierro podrían incrementar el riesgo de DM2 [146]. Estudios de laboratorio y con animales de experimentación han demostrado que la sobrecarga férrica induce resistencia a la insulina [147–149], y un estudio en humanos concluyó que la disminución de la sensibilidad a la insulina en sujetos con HGNA podría deberse, al menos en parte, a la excesiva acumulación de hierro en el hígado [150]. Además, se ha observado que una reducción en el contenido total de hierro corporal mediante flebotomías mejora la resistencia a la insulina en pacientes con HGNA e hiperferritinemia [17,151], así como en los que tenían concentraciones de ferritina sérica normales [17,152].

Introducción

Sin embargo, dos grandes ensayos clínicos controlados sobre el impacto de la flebotomía en individuos con HGNA no demostraron mejoría en la resistencia a la insulina o en la esteatosis hepática [153,154], y un estudio con autopsias no encontró diferencias en el contenido de hierro hepático entre individuos con y sin DM2 [155].

Por tanto, y de acuerdo con los resultados publicados hasta la fecha, la relación entre el acúmulo de hierro en el hígado y la resistencia a la insulina permanece sin estar aclarada. Tampoco ha habido una conclusión definitiva sobre la relevancia patogénica de la asociación del HGNA y la sobrecarga férrica con la resistencia a la insulina. Nuestra hipótesis de estudio es que la inflamación crónica subclínica podría intervenir en la asociación de los triglicéridos intrahepáticos y/o hierro intrahepático con la resistencia a la insulina.

Con estos antecedentes, nuestro objetivo es estudiar la relación de la resistencia a la insulina con los triglicéridos intrahepáticos, cuantificados mediante ERM- H^1 3 Tesla, y el contenido hepático de hierro, determinado mediante resonancia magnética, analizando su posible relación con las concentraciones séricas de $TNF\alpha$, adiponectina y el perfil lipídico. Este estudio fue llevado a cabo en individuos no diabéticos para evitar la diabetes como posible factor de confusión.

1.5.PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA ALT SÉRICA COMO MARCADOR DE HGNA

El reconocimiento del HGNA como problema de salud pública, por su estrecha relación con la obesidad [156], DM2 [3], síndrome metabólico [22,157], resistencia a la insulina [7] y enfermedad cardiovascular [4,158,159] ha estimulado un creciente interés en la búsqueda de un marcador para identificar a individuos con HGNA en la población general.

Desde la confirmación en estudios clínicos y epidemiológicos de la frecuente asociación entre el aumento del contenido grasa hepática y elevación de ALT sérica, esta enzima ha sido propuesta como un biomarcador para el diagnóstico de HGNA [160]. Sin embargo, solo una proporción de pacientes con HGNA tienen elevados los niveles séricos de ALT [7,139,160–163], y dado que algunos individuos con HGNA pueden tener valores séricos de ALT dentro del rango actualmente considerado como “normal”, se ha sugerido que el límite superior de la normalidad del ALT debería ser reevaluado para facilitar la identificación de estos sujetos con HGNA [160,164].

En el año 2002, en un estudio de portadores del virus de la hepatitis C (VHC) y donantes de sangre, se propuso una disminución del límite superior de la normalidad de los niveles séricos de ALT a ≤ 30 UI/L en hombres y ≤ 19 UI/L en mujeres [165]. No se alcanzó consenso en esta propuesta [166].

Introducción

Existen estudios transversales recientes sobre la sensibilidad y especificidad de la ALT sérica como biomarcador de hígado graso [159,167–169]. Sin embargo, el diagnóstico de HGNA en estos estudios se basó exclusivamente en la imagen por ecografía abdominal y no se confirmó mediante biopsia hepática ni por ERM-H¹, *gold standard* no invasivo para la cuantificación de triglicéridos hepáticos [7,19,24,136,170], aunque como hemos señalado anteriormente, la ecografía hepática no es suficientemente sensible en casos de esteatosis leve o moderada, lo que permite sugerir que la prevalencia de HGNA en estos trabajos esté infraestimada [24,25,138].

Por tanto, en la actualidad, no hay información disponible sobre la verdadera precisión diagnóstica de la ALT sérica como biomarcador de HGNA en sujetos sanos ni sobre su posible relación con la resistencia a la insulina y otros factores de riesgo cardiometabólicos. En este sentido, no hemos encontrado publicaciones sobre la precisión diagnóstica, sensibilidad y especificidad de la ALT sérica para identificar individuos con HGNA usando ERM-H¹ 3 Tesla. Así pues, empleamos esta técnica para cuantificar el contenido en triglicéridos intrahepáticos en una muestra de individuos sanos, con el objetivo de evaluar la precisión, sensibilidad y especificidad de la ALT sérica como biomarcador de HGNA. También investigamos la relación del contenido de triglicéridos intrahepáticos y de los niveles séricos de ALT con factores de riesgo cardiometabólicos, incluyendo la resistencia a la insulina (HOMA-IR), adiponectina y perfil lipídico, entre otros.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

1. Se conoce que existe relación entre la obesidad y la resistencia a la insulina, pero se acepta que el principal determinante del desarrollo de resistencia a la insulina no es la cantidad de grasa corporal total, sino su distribución en diferentes tejidos: subcutáneo, peritoneal y hepático. La relativa importancia de esta “compartimentalización de la grasa” en el desarrollo de resistencia a la insulina no está completamente aclarada.

Planteamos una primera hipótesis de que la excesiva acumulación de grasa en el hígado podría ser más determinante que el perímetro abdominal, por el papel central del hígado en los procesos metabólicos de lípidos y glúcidos.

2. Por otro lado, se conoce que sujetos con el mismo grado de HGNA, pueden tener distintos niveles de resistencia a la insulina, lo que sugiere que otros factores parecen influir.

Nuestra hipótesis es que la presencia de inflamación crónica subclínica y/o el incremento de concentración de hierro intrahepático podría modificar el efecto de la grasa hepática sobre la resistencia a la insulina.

3. Finalmente, las importantes consecuencias cardiometabólicas del exceso de grasa corporal en general y del HGNA en particular, hace

Justificación e Hipótesis

necesario disponer de un método de screening sencillo de realizar, no invasivo, disponible en todos los medios, y de mínimo coste económico.

Planteamos la hipótesis de que la modificación del umbral actual de la normalidad de la ALT sérica, podría permitir establecer un valor de corte de ALT que identifique a los individuos con HGNA.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Ante las hipótesis planteadas, presentamos tres objetivos principales:

1. Conocer la importancia relativa de la relación de la resistencia a la insulina con el HGNA, perímetro abdominal e IMC en individuos no diabéticos y no obesos.
2. Conocer la influencia de la concentración intrahepática de hierro e inflamación crónica subclínica sobre el HGNA y resistencia a la insulina.
3. Conocer la precisión diagnóstica, sensibilidad y especificidad de la ALT sérica para identificar individuos con HGNA.

Estos objetivos han sido estudiados, desarrollados, y publicados en tres artículos científicos que presentamos en el anexo I.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio incluía adultos caucásicos no diabéticos, sanos, de entre 20 y 76 años. El tamaño muestral y sujetos de estudio son diferentes en los distintos artículos publicados, y se muestran de forma detallada en el apartado de resultados de esta tesis doctoral. Los participantes fueron reclutados consecutivamente entre individuos que acudían a la unidad de prevención de riesgos laborales de Granada para una revisión de salud anual de rutina. Los criterios de exclusión fueron: historia de ingesta etílica > 20 g en hombres y > 10 g en mujeres, basada en las respuestas a un cuestionario validado sobre consumo de alcohol y la confirmación de los resultados por un familiar; la presencia de marcadores serológicos de virus de la hepatitis B o C, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Wilson, cáncer, diabetes mellitus o enfermedad endocrina, cardíaca, renal o pulmonar; consumo de fármacos que puedan provocar esteatosis hepática (p. ej., corticoesteroides, amiodarona, metotrexato o tamoxifeno); IMC < 18,5 o ≥ 40 kg/m²; ser portador de marcapasos u otros dispositivos incompatibles con la resonancia magnética. La hemocromatosis fue excluida del siguiente modo: a los pacientes con niveles de ferritina sérica > 300 ng/mL para hombres, > 150 ng/mL para mujeres, y una saturación de transferrina > 45% se les realizó un screening de mutaciones del gen HFE. No encontramos homocigotos C282Y. Los genotipos HFE potencialmente predisponentes a la sobrecarga férrica fueron excluidos

(C282Y/H63D, H63D/H63D). El estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestro hospital. Todos los participantes recibieron información completa y otorgaron su consentimiento por escrito.

4.2. EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA

Todos los individuos reclutados para el estudio habían sido sometidos a una historia clínica completa, exploración física, análisis de sangre y una ecografía abdominal como parte de su revisión anual. Se recogieron datos sobre el peso y la altura, calculándose así el IMC. El perímetro abdominal se midió con una cinta métrica flexible situada en el punto medio entre el último reborde costal y la cresta ilíaca en bipedestación.

4.3. ANÁLISIS DE LABORATORIO

Las extracciones de sangre para el análisis se realizaron transcurridas al menos 8 horas de ayuno. Las concentraciones séricas de los distintos parámetros bioquímicos se determinaron mediante kits comerciales.

La ALT y AST séricas se determinaron mediante método cinético (Cobas, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), glucosa sérica, por método glucosa oxidasa (enzimático) (Roche/Hitachi Analytics systems, Roche Diagnostics GmbH), adiponectina por radioinmunoensayo, (Linco Research, St.

Charles, MO, USA), insulina sérica por *electrochemiluminescence immunoassay* (Elecsys 2010, Roche Diagnostics GmbH), TNF- α sérico por *human TNF-alpha enzyme-linked immunosorbent assay* (Biosource Europe, Nivelles, Belgium), colesterol sérico por método enzimático (Roche Diagnostics GmbH) y las concentraciones séricas de ferritina por *immunochemiluminescence* en el *Architect I2000 analyzer* (Abbott Laboratories SA, Madrid, Spain).

La resistencia a la insulina se calculó a partir del “*homeostasis model assessment method*” (HOMA-IR), del siguiente modo: $HOMA-IR = \text{insulina en ayunas (mU/L)} \times \text{glucemia en ayunas (mmol/L)} / 22,5$ [102]. La presencia de resistencia a la insulina se definió como unos valores de HOMA-IR por encima del percentil 95 de los sujetos delgados ($HOMA-IR > 2,8$). Los coeficientes de variación en los test bioquímicos variaron del 3,1 al 9,9%.

4.4. OBTENCIÓN DE IRM Y ERM-H¹ 3 TESLA

4.4.1. Obtención de IRM para cuantificación de hierro intrahepático

Se realizaron estudios multiparamétricos de IRM 3T descritos previamente usando un sistema de Philips Achieva (Royal Philips, Amsterdam, Netherlands) [171–173] para la determinación de hierro intrahepático.

Las imágenes de IRM hepática consistían en secuencias multi-eco de gradiente basadas en gradientes químicos (MECSE-MR), usando 12 ecos ($TE = 0,99$ a $8,69$; espaciado de eco = $0,7$ ms; $TR = 10$ ms) con un *flip angle* de 10° para

minimizar sesgos T1. El estudio completo del hígado se obtuvo en una única adquisición con respiración sostenida (34 cortes, dimensiones del vóxel de 3 x 3 mm, grosor de corte 7 mm, espaciado 0,3 mm, tamaño del vóxel reconstruido 2 x 2 mm, campo de visión 375 x 302 mm, factor de aceleración de imagen en paralelo 1,8, ancho de banda 2433 hercios por píxel) [172].

4.4.2. Obtención de ERM-H¹ para cuantificación de triglicéridos intrahepáticos

Se empleó un localizador en los tres planos del espacio para la planificación del estudio de ERM-H¹ 3 Tesla, obteniendo los espectros con la antena corporal del escáner y con monitorización de la respiración. Se seleccionó un único vóxel de 27 cm³ (30 x 30 x 30 mm) en el parénquima hepático normal del segmento VI, evitando el borde del hígado, el diafragma y las estructuras vasculares y biliares que pudiesen afectar a las mediciones. Todos los espectros se obtuvieron utilizando el método “*stimulated echo acquisition mode*” (STEAM) *single voxel* con una secuencia de pulsos 90° - 90° - 90°. El tiempo de repetición fue de 8000 ms para reducir los efectos T1 de saturación. La misma adquisición se repitió con tres tiempos de eco diferentes TE (20, 40 y 60 ms) para cuantificar el T2 de cada uno de los metabolitos analizados. Número de media de señales (NSA) de 4. Ancho de banda 2000 Hz.

4.5. POSTPROCESO DE IRM Y ERM-H¹ 3 TESLA

4.5.1. Postprocesado de IRM para cuantificación de hierro intrahepático

Las imágenes se exportaron como datos crudos para cuantificar las medidas R2* relacionadas con el hierro usando el software QLiver (QUIBIM, Valencia, España), que se basa en el análisis de mínimos cuadrados con el algoritmo de Levenberg-Marquardt. El valor del R2* se usó para estimar el contenido de hierro hepático según la media de tres regiones de interés (ROIs) dentro del lóbulo hepático derecho, excluyendo vasos [173].

La sobrecarga de hierro se definió por el percentil 95 del valor R2* en sujetos delgados ($R2^* > 75,7 \text{ seg}^{-1}$).

4.5.2. Postprocesado de ERM-H¹ para cuantificación de triglicéridos intrahepáticos

Las imágenes de espectroscopia se cuantificaban en la estación de post-proceso de Philips Extended MR WorkSpace, midiendo el área de los picos de agua y de grasa mediante un ajuste de la señal en el dominio de la frecuencia a un modelo combinado Gaussiano-Lorentziano. Las frecuencias de precesión son 4,67 ppm y 1,43 ppm para el agua y la grasa, respectivamente. El porcentaje de fracción grasa obtenido es un cociente entre los distintos metabolitos y se define como $FA / (FA+WA) \times 100$, donde FA es el área bajo el pico de la grasa y WA es el área bajo el pico del agua. El HGNA se definió como un contenido de

triglicéridos hepáticos > 5,56% (5,56 g de triglicéridos / 100 g de tejido hepático húmedo) como se ha propuesto anteriormente, usando el percentil 95 en sujetos delgados como referencia [19].

Todos los estudios de IRM y ERM-H¹ fueron interpretados por un radiólogo experimentado ciego a los resultados bioquímicos.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar (DE). El test de Kolmogorov-Smirnoff se empleó para comprobar la normalidad de las variables. Los valores de las medias se compararon entre grupos con el test de Student o el test de la U de Mann-Whitney y con el test de ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, según correspondiese. El test de chi cuadrado se usó para variables no continuas y para comparar porcentajes. Para las correlaciones se empleó el análisis de regresión lineal de Pearson (distribuciones normales) o el test de Spearman (distribuciones no normales). Para la evaluación de los principales predictores de las distintas variables estudiadas como resistencia a la insulina, HGNA, contenidos de triglicéridos intrahepáticos y sobrecarga de hierro intrahepático se emplearon análisis multivariantes de regresión tanto lineal como logística. Sólo las variables con $p < 0,05$ se incluyeron en los modelos finales.

Para el tercer objetivo, se utilizaron estudios de precisión diagnóstica y análisis de curvas ROC (*receiver operating characteristics*) para conocer, de una forma más global, la calidad de la ALT como método diagnóstico de esteatosis hepática. Mediante el gráfico de curva ROC se representa la relación entre la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos ("1 - especificidad") como una función del nivel de corte de la ALT como marcador diagnóstico de esteatosis hepática en nuestra población de estudio. Las curvas ROC ayudan a demostrar cómo el incremento o disminución del punto de corte, que define a la ALT como positivo, afecta al equilibrio entre la identificación correcta de los sujetos con esteatosis (verdaderos positivos) y la denominación incorrecta como positivos de los sanos (falsos positivos). El área bajo la curva ROC muestra una expresión del potencial diagnóstico de la ALT independiente de la población de pacientes y podría utilizarse para comparar con las otras variables. Para completar el estudio de precisión diagnóstica de la ALT, se calcularon sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

El programa informático SPSS versión 22 (IBM SPSS Inc., Chicago IL) fue empleado para el análisis estadístico de los resultados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1º:

Resistencia a la insulina. Su relación con el HGNA, IMC y perímetro abdominal.

5.1.1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos

La muestra final de estudio incluyó a 113 adultos con una edad media \pm DE = 45,1 \pm 10,2 años (rango 25-70 años). Su información antropométrica y bioquímica se muestra en la tabla 2.

Table 2. Anthropometrical and biochemical parameters in lean and overweight Caucasian individuals.

	Lean n=55	Overweight n=58	p<
Sex (m/f)	28/27	31/27	NS
Age (years)	41.35 \pm 10.29	46.25 \pm 11.08	0.05
Body Mass Index (Kg/m ²)	23.52 \pm 1.75	27.53 \pm 1.44	0.001
Waist Circumference (cm)	85.03 \pm 8.12	97.34 \pm 10.20	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	13.02 \pm 6.65	18.29 \pm 8.43	0.01
Cholesterol (mg/dl)	191.42 \pm 37.15	194.28 \pm 44.16	NS
LDL (mg/dl)	108.85 \pm 29.91	115.59 \pm 37.98	NS
HDL (mg/dl)	66.59 \pm 14.28	53.77 \pm 13.78	0.05
Triglycerides (mg/dl)	76.12 \pm 39.34	117.35 \pm 77.64	0.05
Serum AST (IU/L)	31.21 \pm 14.89	23.96 \pm 6.31	NS
Serum ALT (IU/L)	30.62 \pm 23.22	30.77 \pm 10.11	NS
Serum GGT (IU/L)	37.05 \pm 58.75	70.22 \pm 32.89	0.05
Glucose (mg/dl)	92.05 \pm 11.27	102.40 \pm 19.05	NS
Fasting serum insulin (μ U/ml)	8.16 \pm 5.01	9.80 \pm 4.37	NS
HOMA-IR	3.51 \pm 2.33	4.93 \pm 2.96	NS
TNF- α (pg/ml)	148.97 \pm 41.27	160.34 \pm 40.38	NS
Adiponectin (μ g/ml)	13.25 \pm 8.16	10.98 \pm 5.82	0.05

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NS, non-significant; TNF- α , tumor necrosis factor- α . Data are expressed as means \pm standard deviation.

p value: the chi-square test for non-continuous variables and the unpaired Student's two-tailed t-test or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate, for continuous variable

Resultados y Discusión

Según el test de Kolmogorov-Smirnoff, las únicas variables que mostraban una desviación significativa de la normalidad fueron el contenido de triglicéridos intrahepáticos ($p < 0,01$) y el HOMA-IR ($p < 0,001$).

5.1.2. Test de comparación de medias

Se presentan en las tablas 2, 3 y 4. Como se aprecia en la tabla 2, hubo diferencias significativas entre los individuos delgados y con sobrepeso en el IMC, el perímetro abdominal y el contenido de triglicéridos hepáticos.

Table 3. Anthropometrical and biochemical parameters of non-obese Caucasian individuals according to the presence of NAFLD.

	No NAFLD n=58	NAFLD n=55	p<
Sex (m/f)	27/31	32/23	0.05
Age (years)	42.05±10.16	47.59±10.24	0.01
Body Mass Index (Kg/m ²)	24.87±2.71	27.28±2.27	0.001
Waist Circumference (cm)	87.65±11.68	98.91±9.88	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	2.37±1.39	28.94±13.82	0.001
Cholesterol (mg/dl)	192.26±43.30	194.54±40.39	NS
LDL-C (mg/dl)	112.86±35.07	114.43±36.03	NS
HDL-C (mg/dl)	61.23±14.91	51.73±15.14	0.01
Triglycerides (mg/dl)	85.81±65.75	130.50±70.09	0.01
Serum AST (IU/L)	21.86±8.02	29.05±11.05	0.01
Serum ALT (IU/L)	20.05±6.97	41.30±18.14	0.001
GGT (IU/L)	27.91±24.23	56.19±53.74	0.01
Glucose (mg/dl)	94.86±15.44	105.89±50.28	NS
Fasting serum insulin (µU/ml)	5.92±2.20	12.91±6.90	0.001
HOMA-IR	2.47±1.04	6.73±4.10	0.001
TNF-α (pg/ml)	150.62±27.41	163.32±53.04	NS
Adiponectin (µg/ml)	14.81±8.60	7.57±7.06	0.001

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NS, non-significant; TNF-α, tumor necrosis factor-α. Data are expressed as means ± standard deviation.
p value: the chi-square test for non-continuous variables and the unpaired Student's two-tailed t-test or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate, for continuous variables.

Como se observa en la tabla 3, los valores medios de edad, IMC, perímetro abdominal y concentraciones séricas de ALT, AST, GGT, triglicéridos, insulina en ayunas y HOMA-IR fueron significativamente mayores, y los valores de adiponectina y colesterol HDL fueron significativamente menores en sujetos con HGNA respecto a los sujetos sin HGNA. En comparación con el grupo de delgados con HGNA, el grupo de sobrepeso con HGNA mostraron niveles significativamente mayores de HOMA-IR, contenido de triglicéridos hepáticos, perímetro abdominal, IMC y triglicéridos séricos y significativamente menores de adiponectina y colesterol HDL (tabla 4).

Table 4. Anthropometrical and biochemical parameters in lean and overweight Caucasian individuals according to the presence of NAFLD.

	Lean without NAFLD n=30	Lean with NAFLD n= 25	Overweight without NAFLD n=28	Overweight with NAFLD n=30
Age (years)	39.71±7.30	43.00±12.81	44.27±12.04	48.24±9.61 ^a
Sex (m/f)	14/16	14/11 ^a	13/15	18/12 ^{a,c}
Body Mass Index (Kg/m ²)	22.59±1.61	23.46±1.96	27.06±1.41 ^{d,e}	28.00±1.46 ^{c,d,e}
Waist Circumference (cm)	81.19±8.74	88.86±7.95 ^a	93.82±10.9 ^d	100.86±9.07 ^{c,d,e}
Hepatic Triglycerides (%)	2.15±1.34	23.90±11.91 ^{d,f}	2.60±1.43	33.98±15.24 ^{d,e,f}
Cholesterol (mg/dl)	189.24±41.02	193.60±32.22	195.14±46.15	193.43±41.87
LDL-C (mg/dl)	108.71±31.61	109.00±28.22	116.82±38.41	114.36±37.09
HDL-C (mg/dl)	68.80±13.33	64.38±15.59	58.23±13.93	49.31±13.69 ^{c,d,e}
Triglycerides (mg/dl)	72.05±37.86	80.20±41.57	98.95±83.14	135.75±70.70 ^{b,d}
Serum AST (IU/L)	23.10±10.46	39.33±17.60 ^d	20.68±4.62 ^e	27.24±8.71 ^{c,a}
Serum ALT (IU/L)	19.38±7.93	41.86±38.59 ^d	20.68±6.02 ^e	40.87±17.44 ^{f,d}
Serum GGT (IU/L)	26.29±24.02	47.81±40.16 ^d	29.45±24.90 ^e	111.00±89.54 ^{c,a}
Fasting Glucose (mg/dl)	90.71±6.12	93.40±16.23	98.82±18.19	105.99±20.29 ^a
Fasting Insulin (µU/ml)	5.62±2.16	10.70±7.60 ^a	6.20±2.27 ^b	13.41±6.96 ^{d,f}
HOMA-IR	2.26±0.96	4.75±3.46 ^{d,f}	2.68±1.10	7.18±4.22 ^{b,d,f}
TNF-α (pg/ml)	146.54±24.41	151.40±67.27	154.51±30.04	166.17±50.17 ^a
Adiponectin (µg/ml)	14.24±9.05	12.27±8.08 ^{a,c}	15.35±7.15	6.61±4.58 ^{d,e,f}

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNF-α, tumor necrosis factor-α. Data are expressed as means with standard deviation (SD).

^a p< 0.05 vs. Lean-without-NAFLD; ^b p< 0.05 vs. Lean-with-NAFLD; ^c p< 0.05 vs. Overweight-without-NAFLD; ^d p< 0.001 vs. Lean- without-NAFLD; ^e p< 0.001 vs. Lean-with-NAFLD; ^f p< 0.001 vs. Overweight-without-NAFLD.

^{a-f} p value: chi-square test for non-continuous variables and one-way ANOVA for continuous variables followed by the Tukey multiple-comparison test

Resultados y Discusión

En el grupo sin HGNA, la única diferencia significativa entre los sujetos con sobrepeso respecto a los delgados fue la presencia de un mayor perímetro abdominal y mayor IMC en los primeros. Finalmente, el grupo de delgados con HGNA tuvo unos niveles significativamente mayores de triglicéridos intrahepáticos, HOMA-IR, insulina en ayunas, AST y ALT y menores de adiponectina, que el grupo de sobrepeso sin HGNA.

Como puede apreciarse en la figura 1, los cambios de HOMA-IR y de niveles de adiponectina sérica iban en paralelo con los cambios en el contenido intrahepático de triglicéridos en todos los grupos.

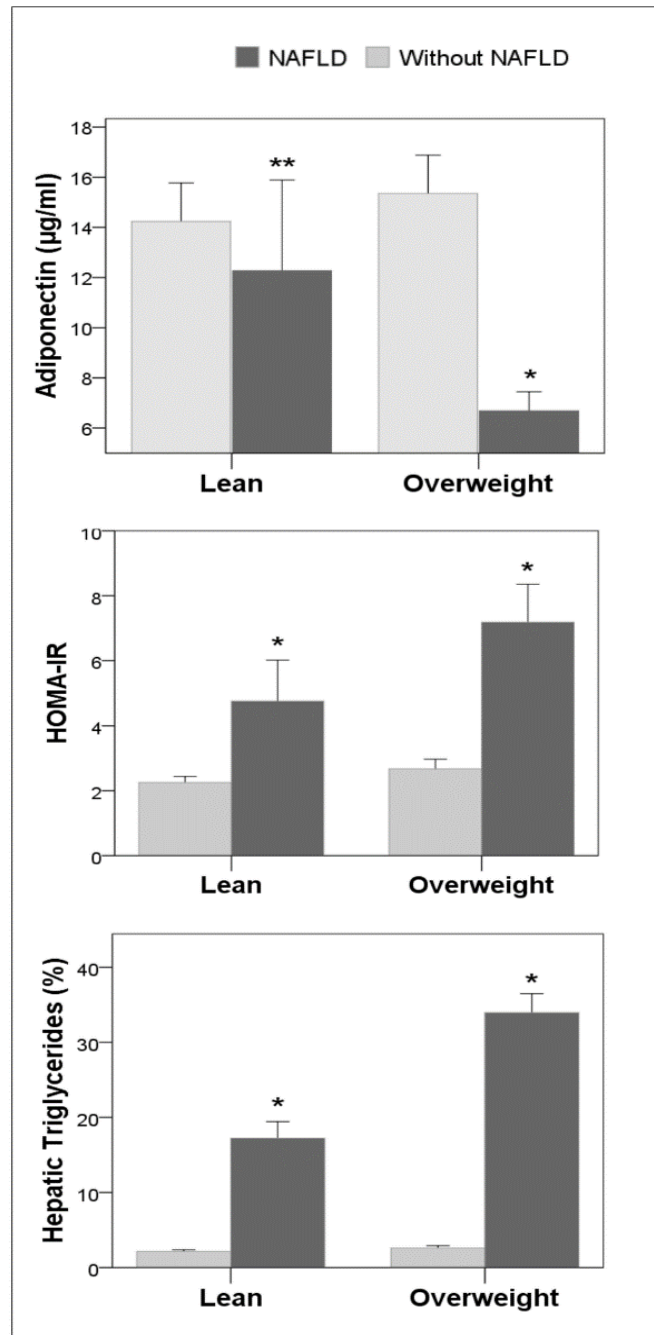


Fig. 1. Comparison of HOMA-IR, serum adiponectin level and hepatic triglyceride content between lean and overweight groups with and without NAFLD. Changes in HOMA-IR and serum adiponectin level paralleled changes in hepatic triglyceride content.

*: $p < 0.001$ versus all other groups.

** : $p < 0.05$ versus lean- and overweight-without NAFLD groups.

5.1.3. Estudios de correlación

▪ **Correlaciones de HOMA-IR**

El HOMA-IR se correlacionaba de forma significativa y fuertemente positiva con el contenido de triglicéridos intrahepáticos ($r:0,76$; $p<0,0001$); así mismo, se hallaron otras correlaciones no tan fuertes pero significativas con el perímetro abdominal ($r:0,52$; $p<0,001$), el IMC ($r:0,48$; $p<0,01$), la edad ($r:0,49$; $p<0,01$) y las concentraciones séricas de ALT ($r:0,3$; $p<0,03$). El HOMA-IR tenía correlación significativa e inversa con la adiponectina sérica ($r:-0,47$; $p<0,01$) y colesterol HDL ($r:-0,46$; $p<0,02$).

▪ **Correlaciones del contenido intrahepático de triglicéridos**

El contenido intrahepático de triglicéridos se correlacionaba de forma positiva y altamente significativa con el HOMA-IR ($r:0,76$; $p<0,0001$), insulina sérica ($r:0,71$; $p<0,0001$) y niveles séricos de ALT ($r:0,63$; $p<0,001$). Hallamos también correlación significativamente positiva con el perímetro abdominal ($r:0,48$; $p<0,01$), el IMC ($r:0,39$; $p<0,01$), y los triglicéridos séricos ($r:0,41$; $p<0,01$); mientras que se relacionaba de forma significativa e inversa con las concentraciones de adiponectina sérica ($r:-0,01$; $p<0,46$) y de colesterol HDL ($r:-0,39$; $p<0,01$).

5.1.4. Estudios de regresión

En el estudio de regresión múltiple por pasos hacia atrás sobre los principales determinantes de resistencia a la insulina (HOMA-IR), el contenido intrahepático de triglicéridos fue el determinante más importante (coeficiente $B=0,16$; $ES=0,017$; $p<0,01$); además, la edad también fue significativa (coeficiente $B=0,06$; $ES=0,019$; $p<0,05$). Ninguna otra variable alcanzó significación estadística ($p<0,05$).

El estudio de regresión logística binaria de las variables predictoras de HGNA mostró que sus principales determinantes fueron el HOMA-IR (coeficiente $B=2,9$; $ES=1,5$; $p<0,01$) y los niveles séricos de ALT (coeficiente $B=0,55$; $ES=0,25$; $p<0,032$). Sólo se muestran las variables significativas ($p<0,05$).

5.2. DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 1º:

Resistencia a la insulina. Su relación con el HGNA, IMC y perímetro abdominal.

Este estudio pone de manifiesto que la resistencia a la insulina se asocia con el HGNA más que con el perímetro abdominal o el IMC, y revela que la concentración intrahepática de triglicéridos es el principal predictor de resistencia a la insulina en individuos no diabéticos y no obesos. Éste es el primer trabajo publicado sobre la importancia relativa del HGNA, perímetro

Resultados y Discusión

abdominal e IMC en relación con la resistencia a la insulina y otros factores de riesgo cardio-metabólicos en individuos no obesos, empleando ERM-H¹ 3T para la cuantificación de la grasa intrahepática. En nuestro estudio, el grupo de individuos delgados con HGNA tenía más resistencia a la insulina que el grupo de sobrepeso sin HGNA, a pesar de que estos últimos tenían un perímetro abdominal y un IMC significativamente mayores, lo que indica que el acúmulo excesivo de triglicéridos intrahepáticos está más relacionado con la resistencia a la insulina que el perímetro abdominal o el IMC. Además, no hemos encontrado diferencias en la resistencia a la insulina o en otros factores de riesgo metabólicos entre los sujetos sin HGNA, ya fuesen delgados o con sobrepeso, los cuales únicamente se diferenciaban por su perímetro abdominal e IMC. Sin embargo, nuestros resultados también ponen de manifiesto la existencia de una asociación tanto del perímetro abdominal como del IMC con la resistencia a la insulina y factores de riesgo cardiometabólicos, aunque menos relevante que la hallada para el HGNA. Una publicación previa en sujetos obesos ha descrito resultados similares en mujeres pero no en hombres; esta discrepancia con nuestros hallazgos podría explicarse porque ellos utilizaron TC abdominal para el diagnóstico de HGNA, y por la inclusión de sujetos obesos [174]. Además, nuestro análisis de regresión múltiple mostró que el contenido de triglicéridos intrahepáticos fue el principal determinante de resistencia a la insulina, incluso ajustando para sexo y edad, mientras que ni el perímetro abdominal ni el IMC fueron predictores significativos, lo que apoya

el concepto descrito en la literatura médica de *individuo normopeso pero metabólicamente obeso*. Es decir, sujetos con IMC normal pero con factores de riesgo para el desarrollo de DM2, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular [175]. Estudios previos han sugerido que la resistencia a la insulina, junto a niveles séricos descendidos de adiponectina y colesterol HDL, y valores elevados de triglicéridos plasmáticos, representan un posible nexo de unión entre el HGNA y la enfermedad vascular aterosclerótica en sujetos obesos [176]. Nuestros resultados sustentan esta propuesta y la validan en individuos no obesos, pues hemos observado que la adiponectina sérica, las anomalías del perfil lipídico y la resistencia a la insulina se asociaban significativamente con el incremento en los triglicéridos intrahepáticos.

Entre las limitaciones de nuestro estudio incluimos un potencial sesgo de selección de participantes, en cuanto a que los individuos que acuden a un control anual rutinario pueden estar más preocupados por su salud que la población general. Además, no fue posible investigar la progresión natural de la resistencia a la insulina debido a la naturaleza transversal del estudio. El tamaño muestral permitió una potencia estadística adecuada, pero se requieren otros estudios con mayor tamaño muestral para confirmar nuestros hallazgos.

Entre las fortalezas, destacamos el empleo de ERM-H¹ 3T para la cuantificación de la grasa intrahepática, el reclutamiento prospectivo de los pacientes, los estrictos criterios de exclusión y la recogida de todas las mediciones bioquímicas y radiológicas en un período de 48 horas.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran que la resistencia a la insulina y factores de riesgo cardiometabólicos están especialmente asociados al HGNA, más que al perímetro abdominal o IMC en individuos no obesos ni diabéticos. La concentración intrahepática de triglicéridos es el principal predictor, junto con la edad, de resistencia a la insulina en individuos no diabéticos y no obesos.

5.3. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2º:

HGNA y resistencia a la insulina. Relación con el hierro intrahepático y TNF α sérico.

5.3.1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos

La muestra final de este estudio comprendía 104 individuos sin diabetes mellitus. En la tabla 5, se muestra la información antropométrica y analítica de todos los participantes y las características de los individuos según la presencia o ausencia de HGNA.

Table 5. Characteristics of participants in total and as classified by hepatic triglyceride content.

	Total participants	NAFLD		p
	n=104	Absent (42.31%)	Present (57.69%)	
		n= 44	n= 60	
Sex (m/f)	59/45	19/25	40/20	0.017
Age (years)	45.11±10.03	41.64±8.89	47.65±10.11	0.002
Body Mass Index (Kg/m ²)	27.81±4.31	25.26±3.42	29.71±3.92	0.001
Waist Circumference (cm)	97.25±14.38	88.02±12.06	104.26±11.88	0.001
Cholesterol (mg/dl)	195.27±41.69	192.36±42.87	197.40±41.03	0.545
HDL-C (mg/dl)	55.35±15.64	61.45±15.17	50.87±14.53	0.001
LDL-C (mg/dl)	117.59±37.33	112.89±34.91	121.03±38.93	0.274
Triglycerides (mg/dl)	110.86±71.40	85.20±65.12	130.00±70.36	0.001
Serum AST (IU/L)	26.04±9.89	22.00±7.86	29.00±10.23	0.001
Serum GGT (IU/L)	41.50±37.81	28.32±23.94	51.17±43.06	0.001
Serum ALT (IU/L)	34.75±22.64	19.98±6.91	45.58±24.05	0.001
Fasting Glucose (mg/dl)	92.54±9.36	91.66±6.52	93.19±11.00	0.377
Fasting Insulin (μU/ml)	9.37±6.18	6.26±2.55	13.72±7.15	0.001
HOMA-IR	2.17±1.52	1.41±0.61	3.24±1.78	0.001
Serum Fe (μg/dl)	93.67±35.68	86.16±34.65	99.35±35.75	0.090
Ferritin (ng/mL)	142.36±128.84	70.42±68.25	197.09±137.49	0.001
Transferrin saturation (%)	24.86±12.37	18.00±10.64	27.50±12.32	0.150
Hepatic Iron R2* (s ⁻¹)	57.95±18.38	47.68±10.82	66.21±19.11	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	10.87±10.20	2.54±1.45	16.99±9.51	0.001
TNF-α (pg/ml)	164.29±42.98	150.53±31.35	174.39±47.58	0.003
Adiponectin (μg/ml)	11.07±9.09	15.47±9.53	7.84±7.28	0.001

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNF-α, tumor necrosis factor-α.
p: comparison between absence *versus* presence of NAFLD.

5.3.2. Test de comparación de medias

La tabla 6 muestra que los sujetos con HGNA, en comparación con los individuos sin HGNA, tenían valores significativamente más elevados de edad, IMC, perímetro abdominal, HOMA-IR, niveles séricos de ALT, glucosa, insulina y TNFα, y valores significativamente menores de adiponectina y

Resultados y Discusión

colesterol HDL séricos. Se observó esta misma tendencia en la comparación entre individuos con y sin sobrecarga férrica hepática (tabla 6), salvo por la ausencia de diferencias significativas en las concentraciones séricas de TNF α y colesterol HDL.

	Hepatic Iron Overload		p
	Absent (84.79%)	Present (15.21%)	
	N= 88	n= 16	
Sex (m/f)	52/36	9/7	0.899
Age (years)	43.81 \pm 10.14	54.00 \pm 7.05	0.001
Body Mass Index (Kg/m ²)	27.22 \pm 4.47	29.06 \pm 2.10	0.038
Waist Circumference (cm)	95.27 \pm 15.06	103.14 \pm 4.26	0.050
Cholesterol (mg/dl)	194.51 \pm 44.24	198.64 \pm 32.30	0.431
HDL-C (mg/dl)	54.92 \pm 15.57	51.50 \pm 15.49	0.453
LDL-C (mg/dl)	117.45 \pm 39.23	118.86 \pm 29.74	0.625
Triglycerides (mg/dl)	106.85 \pm 70.18	145.43 \pm 80.82	0.040
Serum AST (IU/L)	25.88 \pm 10.51	28.79 \pm 8.93	0.101
Serum GGT (IU/L)	40.08 \pm 39.92	45.00 \pm 30.12	0.150
Serum ALT (IU/L)	32.09 \pm 20.22	49.43 \pm 33.35	0.007
Fasting Glucose (mg/dl)	92.31 \pm 8.66	94.57 \pm 11.63	0.493
Fasting Insulin (μ U/ml)	7.84 \pm 4.83	21.45 \pm 4.54	0.002
HOMA-IR	1.81 \pm 1.23	5.06 \pm 1.20	0.003
Serum Fe (μ g/dl)	92.73 \pm 35.01	115.22 \pm 40.32	0.101
Ferritin (ng/mL)	133.18 \pm 115.34	285.52 \pm 178.05	0.011
Transferrin saturation (%)	23.75 \pm 11.32	37.90 \pm 5.23	0.104
Hepatic Iron R2* (s ⁻¹)	52.01 \pm 11.65	91.05 \pm 13.07	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	7.63 \pm 6.70	19.97 \pm 10.84	0.001
TNF- α (pg/ml)	162.98 \pm 37.26	159.98 \pm 36.05	0.728
Adiponectin (μ g/ml)	11.87 \pm 9.56	5.96 \pm 4.08	0.023

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

La sobrecarga de hierro hepática estaba presente en el 26,6% (16/60) de los individuos con HGNA y en el 0% (0/44) de los que no tenían HGNA.

Table 7. Characteristics of participants classified by insulin resistance (n=104).

	Insulin Resistance		p
	Absent (75%) n= 78	Present (25%) n= 26	
Sex (m/f)	39/39	15/11	0.620
Age (years)	38.50±7.52	51.75±9.46	0.001
Body Mass Index (Kg/m ²)	25.59±3.64	31.45±4.51	0.001
Waist Circumference (cm)	87.49±11.98	107.50±10.65	0.000
Cholesterol (mg/dl)	183.33±39.46	197.50±35.61	0.284
HDL-C (mg/dl)	58.19±14.17	48.17±13.86	0.035
LDL-C (mg/dl)	109.53±39.12	122.75±32.46	0.194
Triglycerides (mg/dl)	76.77±35.07	129.67±57.36	0.003
Serum AST (IU/L)	26.86±12.65	25.42±3.92	0.431
Serum GGT (IU/L)	27.83±22.94	52.08±44.59	0.008
Serum ALT (IU/L)	28.03±16.99	38.17±11.07	0.008
Fasting Glucose (mg/dl)	89.43±8.26	96.42±7.05	0.018
Fasting Insulin (µU/ml)	6.30±2.62	18.58±4.23	0.001
HOMA-IR	1.42±.65	4.42±1.07	0.001
Serum Fe (µg/dl)	88.18±32.62	106.67±41.21	0.204
Ferritin (ng/mL)	95.17±88.33	215.06±148.84	0.009
Transferrin saturation (%)	16.97±4.64	40.20±13.72	0.083
Hepatic Iron R2* (s ⁻¹)	47.53±9.44	67.20±17.49	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	5.71±6.87	16.85±10.91	0.001
TNF-α (pg/ml)	162.24±49.37	191.32±52.39	0.051
Adiponectin (µg/ml)	17.21±10.03	11.40±10.75	0.043

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

La tabla 7 muestra las comparaciones de valores medios entre los individuos con y sin resistencia a la insulina, mostrando que las medias de edad, IMC, perímetro abdominal, hierro intrahepático, triglicéridos hepáticos y concentraciones séricas de ALT, triglicéridos, insulina, ferritina y TNFα fueron

Resultados y Discusión

significativamente mayores, y los valores séricos de adiponectina sérica y colesterol HDL fueron significativamente menores, en los participantes con resistencia a la insulina respecto a los que no la tenían.

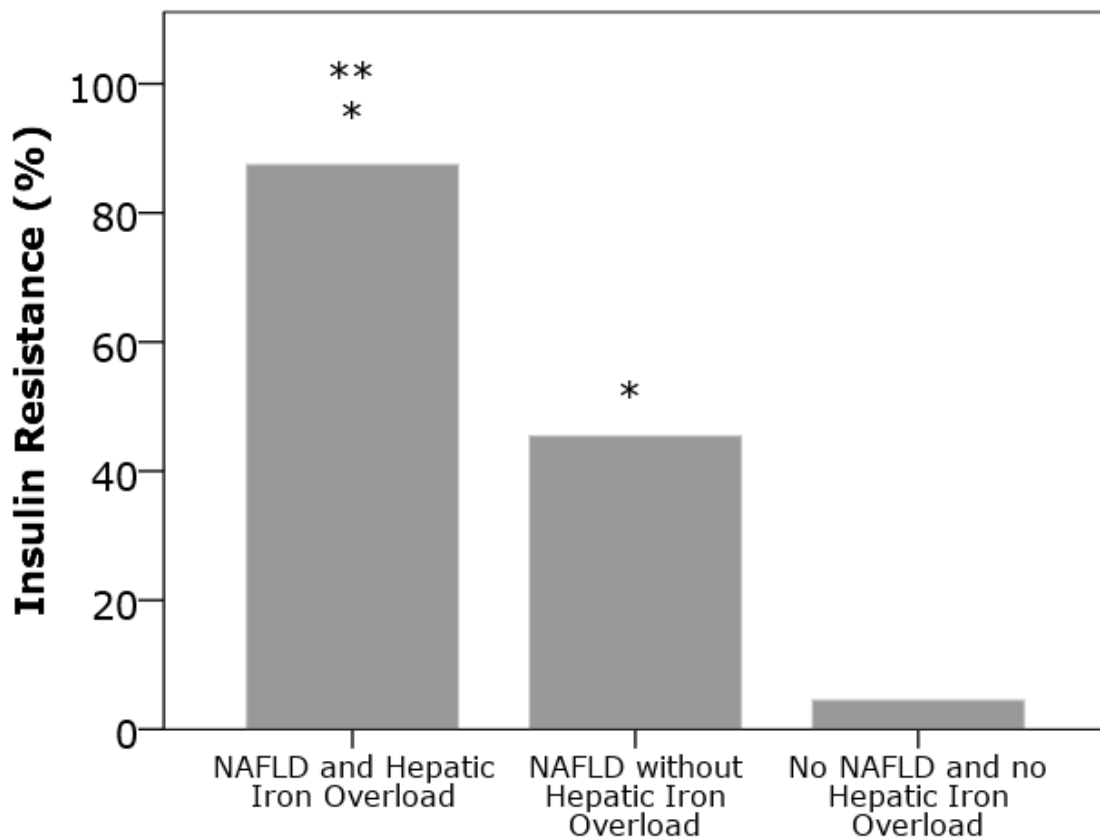


Fig. 2. Percentage of participants with insulin resistance in the different groups. No participant had Hepatic Iron Overload without NAFLD (0/44).

** $p < 0.001$ versus "No NAFLD and no Hepatic Iron Overload"

* $p < 0.01$ versus "NAFLD without Hepatic Iron Overload" or versus "No NAFLD and no Hepatic Iron Overload".

La figura 2 representa la proporción de participantes con resistencia a la insulina en los distintos grupos, se aprecia que estaba presente en el 4,54% (2/44) de los que no tenían ni HGNA ni sobrecarga de hierro hepático, en el 45,45% (20/44) de los que tenían HGNA sin sobrecarga férrica hepática y en el

87,5% (14/16) de los que tenían tanto HGNA como sobrecarga de hierro hepático.

5.3.3. Estudios de correlación

▪ **Correlaciones de HOMA-IR**

El HOMA-IR se correlacionaba de forma significativa y positiva con el contenido de triglicéridos intrahepáticos ($r:0,56$; $p<0,001$), el contenido de hierro intrahepático ($r:0,52$; $p<0,001$), la edad ($r:0,63$; $p<0,001$), el perímetro abdominal ($r:0,64$; $p<0,001$), el IMC ($r:0,60$; $p<0,001$) y las concentraciones séricas de ferritina ($r:0,28$; $p<0,05$), ALT ($r:0,27$; $p<0,05$) y triglicéridos ($r:0,38$; $p<0,05$), mientras que se relacionaba de forma significativa e inversa con las concentraciones de adiponectina sérica ($r:-0,35$; $p<0,01$).

▪ **Correlaciones del contenido de triglicéridos intrahepático**

El contenido intrahepático de triglicéridos se relacionaba positiva y significativamente con el HOMA-IR ($r:0,56$; $p<0,001$), contenido de hierro hepático ($r:0,57$; $p<0,001$), edad ($r:0,33$; $p<0,01$), perímetro abdominal ($r:0,59$; $p<0,001$), IMC ($r:0,56$; $p<0,001$) y concentraciones séricas de ferritina ($r:0,42$; $p<0,01$), ALT ($r:0,78$; $p<0,001$), TNF α ($r:0,28$; $p<0,01$) y triglicéridos ($r:0,34$; $p<0,01$), e inversamente con la adiponectina sérica ($r:-0,41$; $p<0,001$) y el colesterol HDL ($r:-0,3$; $p<0,02$).

▪ **Correlaciones del contenido de intrahepático de hierro**

El contenido intrahepático de hierro se correlacionaba de forma significativa y positiva con el HOMA-IR ($r:0,52$; $p<0,001$), el contenido de triglicéridos hepáticos ($r:0,57$; $p<0,001$), edad ($r:0,50$; $p<0,001$), perímetro abdominal ($r:0,49$; $p<0,001$), IMC ($r:0,39$; $p<0,01$) y concentraciones séricas de ferritina ($r:0,62$; $p<0,001$), ALT ($r:0,47$; $p<0,001$) y triglicéridos ($r:0,26$; $p<0,05$), mientras que se relacionaba de forma significativa e inversa con los niveles séricos de adiponectina ($r:-0,45$; $p<0,001$) y colesterol HDL ($r:-0,22$; $p<0,05$).

▪ **Correlaciones del TNF α**

Las concentraciones séricas de TNF α se correlacionaban de forma significativa y positiva con el contenido de triglicéridos intrahepáticos ($r:0,28$; $p<0,01$), perímetro abdominal ($r:0,38$; $p<0,02$), IMC ($r:0,39$; $p<0,02$) y concentraciones séricas de ALT ($r:0,2$; $p<0,05$) y triglicéridos ($r:0,22$; $p<0,03$), mientras que se relacionaba de forma significativa e inversa con los valores séricos de adiponectina ($r:-0,23$; $p<0,04$) y colesterol HDL ($r:-0,51$; $p<0,001$).

▪ **Correlaciones de la ferritina sérica**

Las concentraciones de ferritina sérica se correlacionaban de forma significativa y positiva con el HOMA-IR ($r:0,28$; $p<0,05$), contenido de triglicéridos intrahepáticos ($r:0,42$; $p<0,01$), contenido de hierro intrahepático ($r:0,62$; $p<0,001$), edad ($r:0,26$; $p<0,01$), perímetro abdominal ($r:0,54$; $p<0,001$), IMC ($r:0,38$; $p<0,001$) y concentraciones séricas de ALT ($r:0,62$; $p<0,001$) y triglicéridos ($r:0,22$; $p<0,02$), mientras que se relacionaba de forma significativa e

inversa con los niveles séricos de adiponectina sérica ($r:-0,50$; $p<0,001$) y de colesterol HDL ($r:-0,38$; $p<0,001$).

5.3.4. Estudios de regresión por pasos hacia atrás sobre los principales determinantes de las siguientes variables:

▪ **Resistencia a la insulina (HOMA-IR)**

El contenido de triglicéridos intrahepáticos fue el predictor más importante de resistencia a la insulina (coeficiente $B=0,14$; $ES=0,44$; $p<0,003$). La edad (coeficiente $B=0,09$; $ES=0,03$; $p<0,009$) y el $TNF\alpha$ sérico (coeficiente $B=0,04$; $ES=0,03$; $p<0,047$) también fueron significativos. Ninguna otra variable alcanzó la significación estadística ($p<0,05$).

▪ **Contenido de triglicéridos intrahepáticos**

El contenido de hierro hepático fue el predictor más importante (coeficiente $B=0,29$; $ES=0,08$; $p<0,0001$) de la concentración intrahepática de triglicéridos. La concentración sérica de $TNF\alpha$ también fue significativa (coeficiente $B=0,04$; $ES=0,02$; $p<0,032$). Sólo se muestran las variables significativas ($p<0,05$).

▪ **Contenido de hierro intrahepático**

El contenido de triglicéridos intrahepático fue el predictor más importante (coeficiente $B=0,98$; $ES=0,25$; $p<0,0001$) de la concentración de hierro intrahepático. La concentración sérica de ferritina también fue significativa

(coeficiente $B=0,03$; $ES=0,013$; $p<0,03$). Ninguna otra variable alcanzó la significación estadística ($p<0,05$).

5.4. DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 2º:

HGNA y resistencia a la insulina. Relación con el hierro intrahepático y TNF α sérico.

En este estudio realizado en individuos sin DM2, la resistencia a la insulina se asociaba estrechamente con el contenido de triglicéridos intrahepáticos y, en menor medida, con el contenido de hierro intrahepático, existiendo una evidente sinergia entre ambos. Las concentraciones séricas elevadas de TNF α parecen contribuir a la asociación entre el HGNA y la resistencia a la insulina. Hemos observado sobrecarga intrahepática de hierro en un tercio de los individuos con HGNA y en ninguno de los que no tenían HGNA, lo que sugiere que el incremento de triglicéridos intrahepáticos parece ser determinante para el desarrollo de sobrecarga hepática de hierro en pacientes sin DM2 y sin hemocromatosis.

Se ha debatido ampliamente sobre si la resistencia a la insulina es causa o consecuencia del HGNA y, en la actualidad, se acepta que la resistencia a la insulina es causa, y también parece ser consecuencia del HGNA una vez establecido [12,14,15]. Se conoce que la asociación entre el exceso de grasa intrahepática y la resistencia a la insulina presenta una considerable

variabilidad interpersonal, principalmente atribuible a factores genéticos y ambientales [14]. Entre estos últimos, se incluye la sobrecarga férrica, que ha sido implicada en la patogénesis de la resistencia a la insulina [148,177,178], lo que está de acuerdo con nuestros hallazgos, que ponen de manifiesto una mayor concentración de hierro intrahepático en los sujetos que tienen resistencia a la insulina, respecto a los que no la tienen, así como una correlación significativa y positiva entre el hierro intrahepático y los valores de HOMA-IR. Sin embargo, la cantidad de hierro intrahepático no resultó ser un determinante independiente de resistencia a la insulina en nuestro estudio, aunque sí parece jugar un papel, ya que hemos observado la presencia de resistencia a la insulina en el 45,45% de los individuos con HGNA sin sobrecarga hepática de hierro, y en el 87,5% de los individuos que tenían tanto HGNA como sobrecarga hepática de hierro. Estos hallazgos sugieren que la resistencia a la insulina se asocia de forma más fuerte y significativa con el HGNA que con la sobrecarga hepática de hierro, y que existe cierta sinergia entre ellos, en relación a la presencia de resistencia a la insulina. Además, el contenido de triglicéridos intrahepático sí fue un determinante significativo de resistencia a la insulina en los análisis de regresión, al contrario que el hierro intrahepático, lo que apoya una mayor implicación del HGNA en la resistencia a la insulina. En cuanto al nexo patogénico entre el HGNA, el hierro intrahepático y la resistencia a la insulina, nuestra hipótesis de estudio era que un incremento en los triglicéridos intrahepáticos y/o en el hierro intrahepático

podría contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina a través de cambios en la secreción de citoquinas, que suelen estar presentes en enfermedades hepáticas crónicas [179,180] y en el HGNA [15,140] como expresión de inflamación subclínica. Resultó interesante descubrir en nuestro estudio, que las concentraciones séricas de TNF α fueron más elevadas en los pacientes con HGNA que en los pacientes sin HGNA, así como en los pacientes con resistencia a la insulina frente a los que no la tenían; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los que tenían y los que no tenían sobrecarga de hierro intrahepático. Además, los valores séricos de TNF α se correlacionaban positivamente con el contenido de triglicéridos intrahepáticos, pero no con el contenido de hierro intrahepático, y así mismo observamos en el análisis de regresión, que el TNF α es el principal determinante tanto de HGNA como de resistencia a la insulina. En conjunto, estos datos sugieren que las concentraciones séricas de TNF α podrían tener un papel en la asociación entre la resistencia a la insulina y el HGNA. También hemos podido comprobar que las concentraciones séricas de TNF α ejercían una influencia negativa sobre la adiponectina sérica y el perfil lipídico. Por lo que hemos podido comprobar, éste es el primer estudio publicado sobre la relación de triglicéridos intrahepáticos y hierro intrahepático con la resistencia a la insulina y las concentraciones séricas de TNF α en individuos sin DM2. No tenemos una explicación definitiva para el posible efecto negativo de la acumulación de hierro intrahepático sobre la resistencia a la insulina; sin embargo, la ausencia

de asociación con el TNF α sérico sugieren que la inflamación crónica subclínica no parece estar asociada al hierro intrahepático, si bien no se puede descartar un posible efecto derivado del estrés oxidativo [181].

Se conoce que la ferritina sérica no es únicamente un marcador de los depósitos de hierro corporales, sino también un biomarcador de inflamación, y sus concentraciones elevadas se han asociado con resistencia a la insulina [182]. Nuestros resultados, refuerzan la idea de que las concentraciones séricas de ferritina en pacientes con HGNA constituyen un marcador del contenido de hierro intrahepático, más que de inflamación subclínica [183]. Como se ha señalado previamente, distintos estudios clínicos han arrojado resultados discordantes acerca de la relación entre el incremento de los depósitos de hierro corporales y de la ferritina sérica con la DM2 [155,184,185], así como del efecto de la flebotomía sobre la resistencia a la insulina [17,151,153,154]. Estas diferencias pueden ser explicadas, al menos en parte, por nuestros hallazgos de que menos de un tercio de los individuos con HGNA tenían sobrecarga hepática de hierro y de que un incremento del hierro en el hígado parece desempeñar un papel menor en el desarrollo de resistencia a la insulina, aunque podría influir de forma variable en algunos sujetos. Así pues, se podría especular que sólo un subgrupo de pacientes con HGNA podrían beneficiarse de la flebotomía como tratamiento de la resistencia a la insulina.

Entre las limitaciones del estudio podemos incluir su diseño transversal, y la ausencia de biopsias hepáticas e información histológica, aunque ningún

Resultados y Discusión

paciente padecía enfermedad hepática evidente en ecografía o en RM, ni nuestro objetivo fue el estudio de lesión hepatocitaria. Además, aunque el tamaño muestral ofrecía una potencia estadística adecuada, se precisan más estudios con muestras más amplias para reproducir nuestros hallazgos.

Las fortalezas del estudio incluyen la utilización de RM para cuantificar el contenido de hierro hepático y ERM-H¹ 3T para medir el contenido de triglicéridos hepáticos, así como la adopción de estrictos criterios de exclusión, como la presencia de DM2 y enfermedades hepáticas para evitar posibles factores de confusión. Además, todas las mediciones antropométricas, bioquímicas y de imagen se recogieron en un período de 48 horas.

En conclusión, nuestros resultados indican que la resistencia a la insulina se encuentra íntimamente relacionada con el contenido de triglicéridos intrahepáticos y en menor medida con el contenido de hierro intrahepático. Parece existir una sinergia entre el HGNA y la sobrecarga de hierro hepática en su relación con la resistencia a la insulina, siendo el HGNA el que muestra un mayor impacto sobre ésta. Los niveles séricos elevados de TNF α podrían contribuir a la asociación entre HGNA y resistencia a la insulina. El incremento en los triglicéridos intrahepáticos parece ser determinante para el desarrollo de sobrecarga hepática de hierro en sujetos no diabéticos sin hemocromatosis.

5.5.RESULTADOS DEL OBJETIVO 3º: Precisión diagnóstica de la ALT sérica como marcador de HGNA.

5.5.1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos

La muestra final de estudio incluyó a 129 adultos con una edad media \pm DE 45,7 \pm 10,2 años (rango 20-76 años). Los datos antropométricos se muestran en la tabla 8 y los resultados bioquímicos se muestran en la tabla 9.

Table 8. Anthropometric variables in subjects classified according to liver fat content

	Liver fat content (%) by ¹ H-MRS				
	≤ 5.56 No NAFLD (n = 54)	> 5.56 Total NAFLD (n = 75)	5.56-25 Mild (n = 29)	25-50 Moderate (n = 34)	> 50 Severe (n = 12)
Age (year)	43.10 \pm 10.90	48.37 \pm 9.79	47.50 \pm 10.77	48.41 \pm 9.89	49.24 \pm 8.93
Sex (males /females)	28/26	46/29 ^c	16/13	22/12	8/4
BMI (kg/m ²)	25.41 \pm 3.43	29.81 \pm 4.01 ^a	28.82 \pm 4.42 ^b	30.26 \pm 3.30 ^a	30.21 \pm 4.15 ^a
Waist circumference (cm)	89.1 \pm 12.3	104.53 \pm 11.6 ^a	100.18 \pm 14.53 ^b	105.4 \pm 8.64 ^a	107.86 \pm 10.99 ^a

¹H-MRS, proton magnetic resonance spectroscopy; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; BMI, body mass index
a: p<0.001 versus no NAFLD; b: p<0.01 versus no NAFLD; c: p<0.05 versus no NAFLD

Table 9. Biochemical variables in subjects classified according to liver fat content quantified by ¹H-MRS.

	Liver fat content (%) by ¹ H-MRS				
	≤ 5.56 No NAFLD (n = 54)	> 5.56 Total NAFLD (n = 75)	5.56-25 Mild (n = 29)	25-50 Moderate (n = 34)	> 50 Severe (n = 12)
AST (IU/L)	22.02 \pm 7.74	29.37 \pm 10.85 ^a	28.14 \pm 12.32	28.94 \pm 10.60 ^c	31.53 \pm 9.65 ^b
ALT (IU/L)	20.89 \pm 6.77	46.92 \pm 25.17 ^a	41.77 \pm 27.89 ^a	44.12 \pm 18.65 ^a	56.57 \pm 29.14 ^a
GGT (IU/L)	27.8 \pm 23.53	52.33 \pm 45.26 ^a	38.37 \pm 19.48	51.65 \pm 34.81 ^b	65.36 \pm 67.19 ^b
ALP (IU/L)	60.92 \pm 17.10	69.53 \pm 21.22 ^b	69.81 \pm 23.69	70.77 \pm 21.41	67.30 \pm 18.97
Cholesterol (mg/dl)	194.44 \pm 41.90	198.65 \pm 40.93	185.29 \pm 37.38	201.87 \pm 43.62	207.91 \pm 38.33
HDL cholesterol (mg/dl)	61.22 \pm 14.88	51.14 \pm 14.26 ^a	57.38 \pm 15.83	46.47 \pm 13.21 ^a	51.63 \pm 11.73 ^b
LDL cholesterol (mg/dl)	113.98 \pm 34.68	120.77 \pm 37.34	108.90 \pm 31.90	129.03 \pm 43.89	120.84 \pm 25.56
Triglycerides (mg/dl)	86.89 \pm 64.5	149.48 \pm 57.60 ^a	101.78 \pm 47.54	152.73 \pm 69.94 ^a	195.80 \pm 55.39 ^b
Blood glucose (mg/dL)	93.94 \pm 9.10	104.87 \pm 11.34	97.95 \pm 11.66	105.75 \pm 10.32	112.33 \pm 12.10
Fasting Insulin (μ U/mL)	6.26 \pm 2.50	14.17 \pm 7.25 ^a	11.83 \pm 5.07 ^b	14.07 \pm 3.72 ^a	18.20 \pm 7.63 ^a
HOMA-IR	2.61 \pm 11.30	7.41 \pm 4.78 ^a	5.08 \pm 2.43	7.74 \pm 5.62 ^a	10.41 \pm 3.39 ^{a, c}
Adiponectin (μ g/mL)	15.46 \pm 9.37	7.32 \pm 6.76 ^a	10.36 \pm 9.63	6.10 \pm 4.55 ^a	6.01 \pm 4.67 ^{a, c}
TNF- α (pg/ml)	1.52 \pm 0.32	1.71 \pm 0.45 ^b	1.75 \pm 0.66	1.72 \pm 0.35	1.63 \pm 0.31

¹H-MRS, proton magnetic resonance spectroscopy; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; ALP, alkaline phosphatase; HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; LDL cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

a: p<0.001 versus no NAFLD; b: p<0.05 versus no NAFLD; c: p<0.05 versus mild NAFLD

Resultados y Discusión

Setenta y cinco de los participantes (58,13%) fueron diagnosticados de HGNA, clasificados como leve (29 casos), moderado (34 casos) o grave (12 casos); los 54 individuos restantes no tenían HGNA, es decir, su contenido de grasa hepática era inferior a 5,56% (5,56 mg de triglicéridos /100 mg de tejido hepático).

5.5.2. Test de comparación de medias

Como se muestra en las 8 y 9, los valores medios de IMC, perímetro abdominal, HOMA-IR, ALT, AST, GGT, FA, triglicéridos séricos, TNF α e insulinemia basal fueron más elevados en los individuos con HGNA que en los sujetos sin HGNA ($p < 0,001$ excepto para FA y TNF α que fue $p < 0,05$). Únicamente, los valores séricos de colesterol HDL y adiponectina fueron significativamente menores en los individuos con HGNA respecto a aquellos sin HGNA ($p < 0,001$). Los tests de comparaciones múltiples entre las distintas categorías de HGNA mostraron diferencias estadísticamente significativas únicamente para la ALT, el HOMA-IR y la adiponectina entre individuos con esteatosis grave vs. leve ($p < 0,05$).

5.5.3. Estudios de correlación

▪ **Correlaciones del contenido de triglicéridos intrahepáticos**

El contenido de triglicéridos hepáticos se correlacionaba de forma significativa y altamente positiva con las concentraciones séricas de ALT ($r:0,58$; $p<0,001$) (figura 3), AST ($r:0,32$; $p<0,01$), GGT ($r:0,31$; $p<0,01$), el perímetro abdominal ($r:0,54$; $p<0,001$), el IMC ($r:0,48$; $p<0,001$), la insulinemia basal ($r:0,57$; $p<0,001$), el HOMA-IR ($r:0,57$; $p<0,001$) y los triglicéridos séricos ($r:0,35$; $p<0,01$); mientras que se relacionaba de forma significativa e inversa con las concentraciones séricas de adiponectina ($r:-0,43$; $p<0,001$) y de colesterol HDL ($r:-0,32$; $p<0,01$).

▪ **Correlaciones de los niveles séricos de ALT**

Como puede apreciarse en la figura 3, los niveles séricos de ALT se correlacionaban positivamente con el contenido de triglicéridos intrahepáticos ($r:0,58$; $p<0,001$), el HOMA-IR ($r:0,32$; $p<0,01$), insulinemia basal ($r:0,31$; $p<0,01$), triglicéridos séricos ($r:0,18$; $p<0,05$), perímetro abdominal ($r:0,25$; $p<0,01$) e IMC ($r:0,25$; $p<0,01$), mientras que se relacionaba inversamente con las concentraciones séricas de adiponectina ($r:-0,35$; $p<0,01$) y colesterol HDL ($r:-0,32$; $p<0,01$).

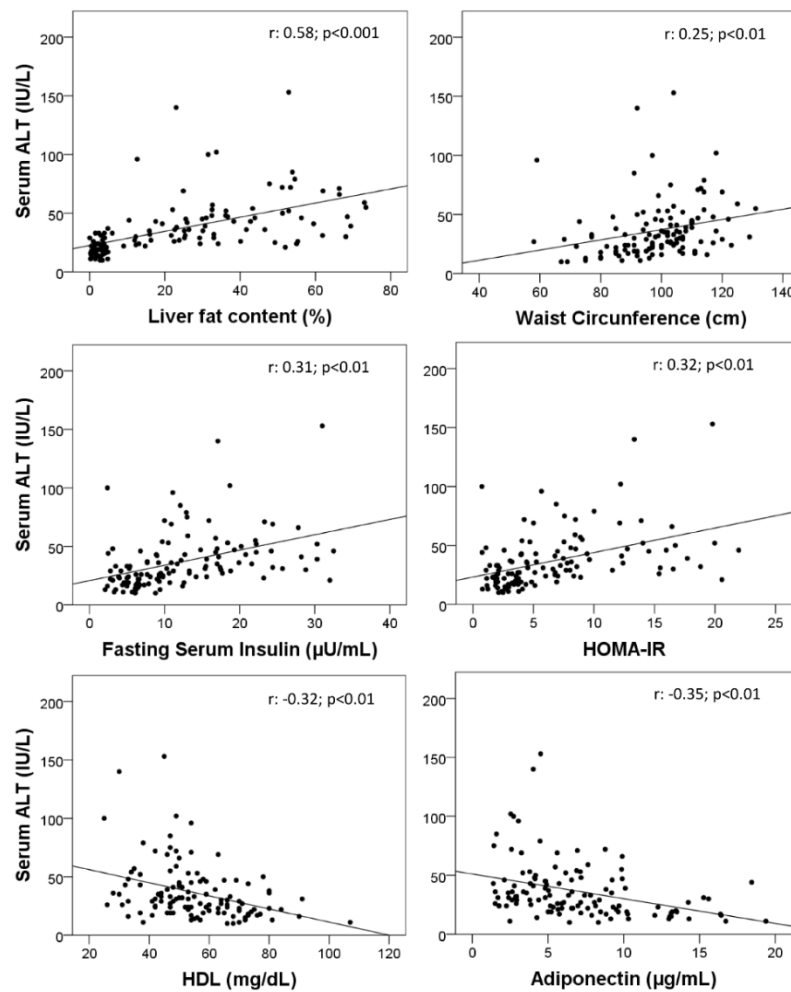


Fig. 3. Correlation of serum ALT with: liver fat content, waist circumference, HOMA-IR, and serum levels of fasting insulin, adiponectin, and HDL-cholesterol. ALT=alanine aminotransferase, HDL=high-density lipoprotein, HOMA-IR=Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance.

5.5.4. Estudios de regresión

El estudio de regresión múltiple por pasos hacia atrás sobre los principales determinantes de contenido de triglicéridos intrahepáticos mostró que la concentración sérica de ALT fue la variable independiente más significativa (coeficiente $B=1,367$; $ES=0,121$; $p < 0,01$); así mismo, el HOMA-IR también fue significativo (coeficiente $B=1,160$; $ES=0,075$; $p < 0,04$).

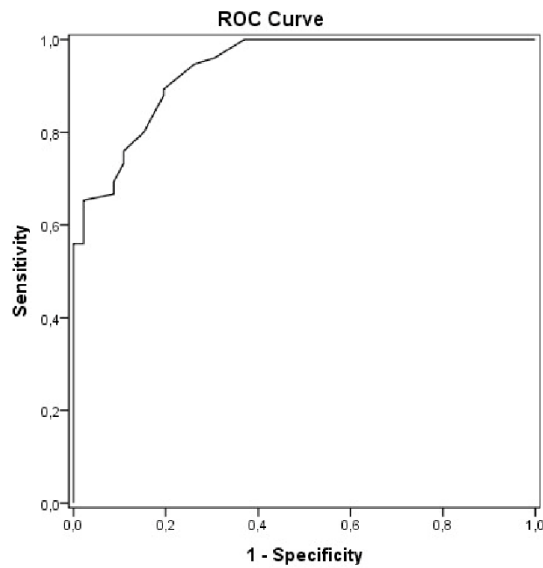


Fig. 4. Receiver-operating characteristic curve of sensitivity plotted against 1-specificity of serum ALT to identify subjects with liver fat content greater than 5.56% quantified by proton magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) 3T. ALT=alanine aminotransferase, $^1\text{H-MRS}$ =proton magnetic resonance spectroscopy.

5.5.5. Curvas ROC y precisión de la ALT sérica para el diagnóstico de HGNA

Se crearon curvas ROC para evaluar la precisión de la concentración sérica de ALT como predictor independiente de un contenido de grasa hepática mayor de 5,56% (figura 4).

El área bajo la curva (AUC) fue de 0,93 (intervalo de confianza al 95%: 0,89-0,97) y el punto de corte óptimo de la ALT fue de 23 UI/L, con una sensibilidad de 0,94, una especificidad de 0,72, un VPP de 0,82 y un VPN de 0,90. El análisis por sexos mostró un valor óptimo de la ALT para identificar individuos con HGNA de 24 UI/L para hombres (AUC:0,92; sensibilidad:0,95;

Resultados y Discusión

especificidad:0,67) y de 21 UI/L para mujeres (AUC:0,94; sensibilidad:0,96; especificidad:0,76).

La figura 5 muestra que el 48% de los individuos con niveles de ALT inferiores a 40 UI/L tenían HGNA y que éstos tenían valores significativamente mayores de HOMA-IR e insulinemia basal, y significativamente menores de adiponectina y colesterol HDL en comparación con individuos sin HGNA.

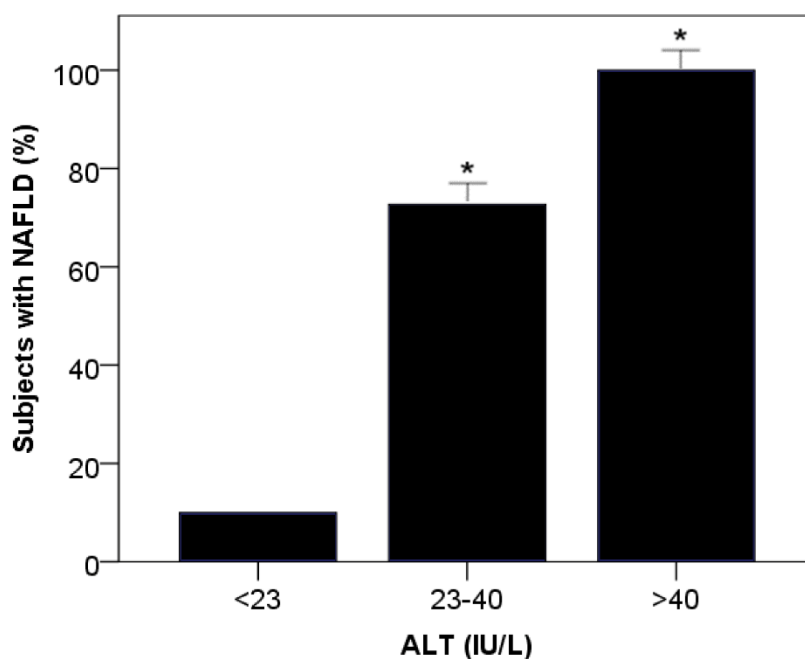


Fig. 5. Percentage of subjects with NAFLD in the different ALT categories. * $p < .001$ versus no NAFLD. ALT=alanine aminotransferase, NAFLD=nonalcoholic fatty liver disease.

Únicamente cuatro individuos con niveles de ALT inferiores a 23 UI/L tenían HGNA. Se apreció una AUC inferior para los otros parámetros analizados: IMC 0,82; perímetro abdominal 0,84; GGT 0,74 y AST 0,76.

5.5.6. Cambios en variables metabólicas según la cantidad de triglicéridos intrahepáticos y valores séricos de ALT

Como se muestra en la figura 6, los cambios observados en los parámetros antropométricos y bioquímicos (perímetro abdominal, HOMA-IR, insulinemia basal, adiponectina, triglicéridos séricos y colesterol HDL) en las distintas categorías de HGNA (sin, leve, moderado o grave) fueron paralelos a los cambios observados de estos parámetros antropométricos y bioquímicos en los distintos niveles séricos de ALT.

Resultados y Discusión

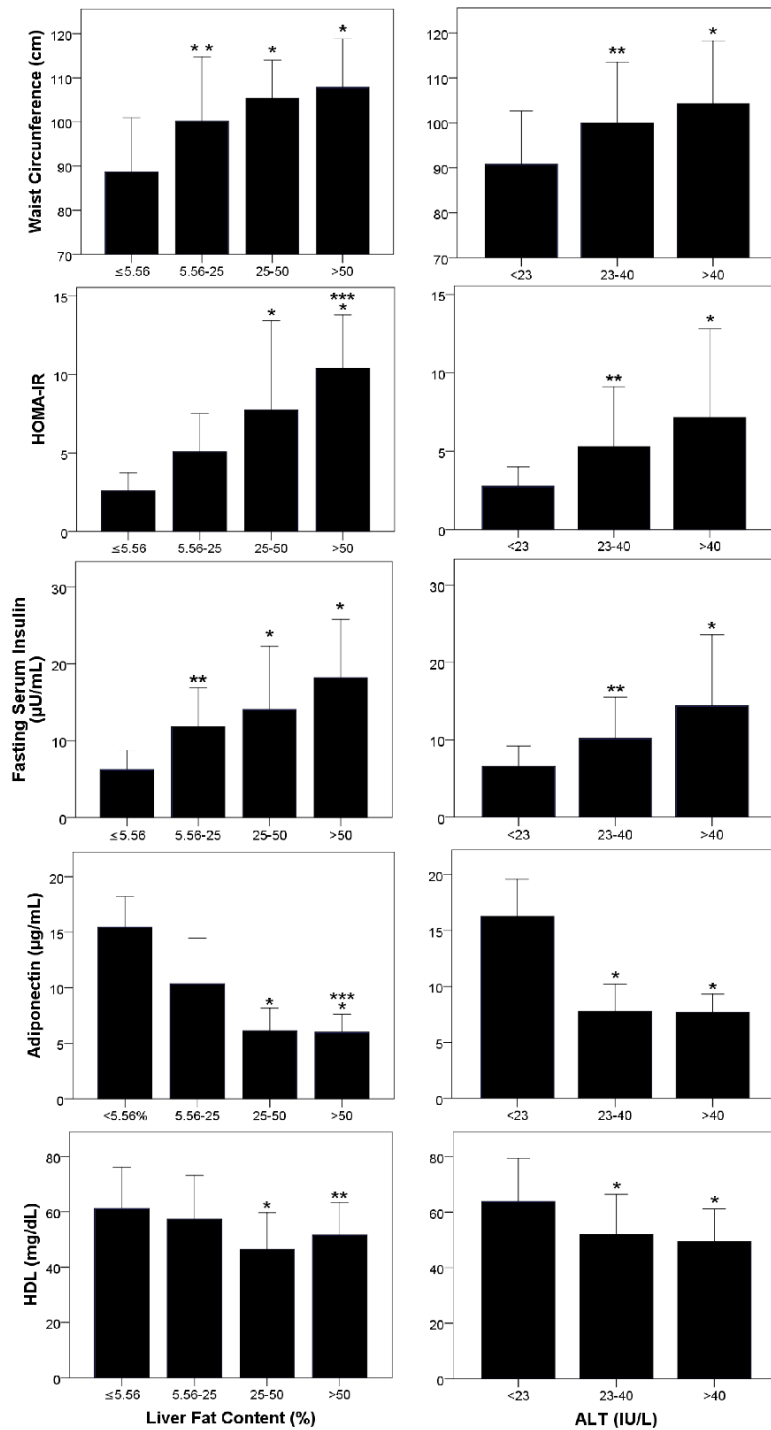


Fig. 6. Metabolic variables changes according to both liver fat content and ALT categories. Data are presented as means \pm SD. * $p < .001$ versus no NAFLD; † $p < .01$ versus no NAFLD; ‡ $p < .05$ versus mild NAFLD. ALT=alanine aminotransferase, NAFLD=nonalcoholic fatty liver disease.

5.6.DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 3º:

Precisión diagnóstica de la ALT sérica como marcador de

HGNA.

En nuestro estudio, los niveles séricos de ALT, con umbral de la normalidad corregido a 23 UI/L permitieron la identificación de la mayoría de los participantes con HGNA.

Los sujetos con HGNA tenían niveles séricos más elevados de ALT, HOMA-IR, insulinemia basal y triglicéridos y menores de adiponectina y colesterol HDL en comparación con los que no tenían HGNA, lo que concuerda con publicaciones previas en poblaciones seleccionadas de individuos obesos o pacientes diabéticos [7,176,186,187]. Nuestros hallazgos ponen de manifiesto que los niveles séricos de ALT podrían sugerir el grado de contenido de grasa intrahepática, ya que existen diferencias significativas en los valores séricos de ALT entre sujetos con HGNA leve y los que no tienen HGNA, así como entre los que tienen HGNA grave vs leve. También hemos observado que tanto las concentraciones séricas de ALT como el contenido de triglicéridos intrahepáticos se correlacionaron de forma positiva con el HOMA-IR, la insulinemia basal y los triglicéridos séricos, y de forma inversa con la adiponectina sérica y el colesterol HDL. El paralelismo observado en los cambios de los diferentes parámetros metabólicos en las distintas categorías de HGNA y de ALT apoya la posible relación de ambos con la resistencia a la

Resultados y Discusión

insulina y otros factores de riesgo metabólicos. Este hallazgo en individuos sanos también coincide con resultados obtenidos en poblaciones seleccionadas de pacientes con DM o síndrome metabólico [160–163,188].

Por otro lado, se conoce que la adiponectina tiene un efecto protector sobre el riesgo cardiometabólico en distintas poblaciones [189]. Nosotros hemos observado que los niveles de adiponectina eran inferiores en los sujetos con HGNA, y se relacionaban estrechamente y de forma inversa con los valores de triglicéridos intrahepáticos, concentraciones séricas de ALT y valores de resistencia a la insulina, por lo que sugerimos que la ALT podría ser un marcador de riesgo cardiometabólico, como previamente se ha descrito en pacientes obesos [189].

La elevación de niveles séricos de TNF α se han descrito en pacientes con enfermedad hepática crónica de distintas etiologías [179,180], incluyendo el HGNA [190]. En nuestro estudio, los valores séricos de TNF α fueron superiores en individuos con HGNA vs. sin HGNA, lo que podría sugerir que el sistema del TNF α se encuentra activado en el HGNA.

Por otro lado, se ha demostrado que los valores de ALT en suero no pueden ser usados como predictores de esteatohepatitis no alcohólica ni para diferenciar entre esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica [7,166]. Un estudio reciente sobre la gravedad de la enfermedad hepática en pacientes con HGNA usando ERM-H¹ y biopsias hepáticas encontró que los niveles elevados de ALT se correlacionaban fuertemente con el contenido de grasa intrahepática

pero no con la inflamación o la fibrosis hepática [7]. Por ello, se ha propuesto que la ALT sérica podría ser un buen indicador de HGNA [7] y un predictor de alteraciones cardiometabólicas, pero no de una posible progresión a esteatohepatitis o a cirrosis hepática [160,163]. Sin embargo, hasta la fecha, la mayoría de estudios sobre sensibilidad y especificidad de la ALT sérica como biomarcador de HGNA se diseñaron con objeto de identificar casos de esteatohepatitis [166,191]. Además, la mayoría de los trabajos publicados han evaluado la presencia de HGNA usando únicamente ecografía abdominal [24,25,168,169,192][24,25], y los índices matemáticos que se han desarrollado para detectar el HGNA no han demostrado ser útiles para la práctica clínica rutinaria en la población general debido a su alta complejidad [193]. Nuestro estudio ofrece la primera descripción acerca de la sensibilidad, especificidad y precisión diagnóstica de la ALT sérica como biomarcador de HGNA en individuos sanos de la población general empleando ERM-H¹ para la cuantificación de triglicéridos intrahepáticos y evitando factores de confusión como la DM2.. Además, las curvas ROC presentaron un AUC de 0,93 y mostraron que un valor sérico de ALT ≥ 23 UI/L predecía la presencia de HGNA con una sensibilidad de 0,94 y una especificidad de 0,72. El 48% de nuestros sujetos con ALT inferior a 40 UI/L (valor actualmente considerado límite de la normalidad) tenían HGNA, y estos individuos tenían niveles significativamente mayores de HOMA-IR y menores de adiponectina y colesterol HDL, en comparación con aquellos con niveles de ALT inferiores a 23

Resultados y Discusión

UI/L. Estos hallazgos apoyan la propuesta de reducir el umbral de la normalidad para la ALT sérica [160,164]. Sólo el 10% de los participantes con ALT inferior a 23 UI/L tenían HGNA, lo que sugiere que este valor de corte identificaría a la gran mayoría de individuos con esteatosis hepática. La detección de HGNA es importante para permitir un asesoramiento sobre el riesgo de resistencia a la insulina, DM2 y enfermedad cardiovascular.

Las limitaciones del estudio incluyen la relativamente alta proporción de participantes con HGNA, posiblemente porque la mayoría de los candidatos que tenían análisis de sangre normales estaban menos dispuestos a participar que los que tenían niveles de ALT elevados. También debe tenerse presente que se trata de un estudio transversal basado en determinaciones bioquímicas en un único momento puntual en cada participante, por lo que no se ha podido valorar la progresión del HGNA. Se necesitarían más estudios con muestras mayores y con una cohorte de validación independiente para verificar nuestros hallazgos en un grupo distinto de individuos.

La principal fortaleza de este estudio es el empleo de ERM-H¹ 3 Tesla para cuantificar el contenido de triglicéridos hepáticos, así como los estrictos criterios de exclusión. Además, todas las mediciones antropométricas, bioquímicas y de imagen se recogieron en un período de 48 horas.

En conclusión, la ALT sérica es un biomarcador sensible, simple y fiable de HGNA si el límite superior de la normalidad se establece en valores inferiores. Así, en nuestro estudio, un umbral de ALT de 23 UI/L identificó al

94% de los sujetos con HGNA, los cuales podrían tener un mayor riesgo cardiometabólico. La identificación de estos individuos permitiría proporcionar consejos clínicos apropiados. El bajo coste y amplia disponibilidad de esta prueba haría posible su aplicación rutinaria en atención primaria.

6. CONCLUSIONES

1. La concentración intrahepática de triglicéridos es el principal predictor, junto con los niveles séricos de TNF α y la edad, de resistencia a la insulina.
2. El HGNA tiene una mayor asociación con la resistencia a la insulina que el perímetro abdominal y el IMC.
3. La resistencia a la insulina se encuentra íntimamente relacionada con el contenido de triglicéridos intrahepáticos y en menor medida con el contenido de hierro intrahepático.
4. Existe una sinergia entre el HGNA y la sobrecarga hepática de hierro en su relación con la resistencia a la insulina, siendo el HGNA el que muestra un mayor impacto.
5. Los niveles séricos de TNF α elevados podrían contribuir a la asociación entre HGNA y resistencia a la insulina.
6. El incremento de triglicéridos intrahepáticos parece tener un papel determinante en el desarrollo de sobrecarga hepática de hierro en sujetos no diabéticos y sin hemocromatosis.
7. La ALT sérica es un biomarcador simple y sensible de HGNA si el límite superior de la normalidad se establece en 23 UI/L, lo que permitiría identificar a la mayoría de sujetos con HGNA.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Vernon G, Baranova a., Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274–85.
- [2] Adams LA, Anstee QM, Tilg H, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut* 2017;66:1138–53.
- [3] Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009;29:113–9.
- [4] Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010;363:1341–50.
- [5] Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology* 2005;129:113–21.
- [6] Rafiq N, Bai C, Fang YUN, Srishord M, Mccullough A, Gramlich T, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *YJCGH* 2009;7:234–8.
- [7] Maximos M, Bril F, Portillo Sanchez P, Lomonaco R, Orsak B, Biernacki D, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2015;61:153–60.
- [8] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860–7.
- [9] Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111–7.
- [10] Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219–46.
- [11] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793–801.
- [12] Caprio S, Perry R, Kursawe R. Adolescent Obesity and Insulin Resistance: Roles of Ectopic Fat Accumulation and Adipose Inflammation. *Gastroenterology* 2017;152:1638–46.
- [13] Shulman GI. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *N Engl J Med* 2014;371:1131–41.
- [14] Gastaldelli A. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause

- or consequence of NAFLD? *Clin Sci* 2017;131:2701–4.
- [15] Gonzalez-Cantero J, Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL. Insulin resistance in lean and overweight nondiabetic Caucasian adults: Study of its relationship with liver triglyceride content, waist circumference and BMI. *PLoS One* 2018;13.
- [16] Huth C, Beuerle S, Zierer A, Heier M, Herder C, Kaiser T, et al. Biomarkers of iron metabolism are independently associated with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the KORA F4 study. *Eur J Endocrinol* 2015;173:643–53.
- [17] Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, et al. Iron Depletion by Phlebotomy Improves Insulin Resistance in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hyperferritinemia: Evidence from a Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1251–8.
- [18] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67:328–57.
- [19] Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E462–8.
- [20] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012;142:1592–609.
- [21] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison S a. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820–32.
- [22] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844–50.
- [23] Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* 2011;140:124–31.

- [24] Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol* 2009;51:433–45.
- [25] Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *J Hepatol* 2009;51:1061–7.
- [26] Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)* 2012;91:319–27.
- [27] Feldman A, Eder SK, Felder TK, Kedenko L, Paulweber B, Stadlmayr A, et al. Clinical and Metabolic Characterization of Lean Caucasian Subjects With Non-alcoholic Fatty Liver. *Am J Gastroenterol* 2017;112:102–10.
- [28] Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990;12:1106–10.
- [29] Alam S, Mustafa G, Alam M, Ahmad N. Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2016;7:211–7.
- [30] Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Semin Liver Dis* 2015;35:270–90.
- [31] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461–5.
- [32] Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1209–17.
- [33] Liu Y-L, Patman GL, Leathart JBS, Pigué A-C, Burt AD, Dufour J-F, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014;61:75–81.
- [34] Kahali B, Liu Y-L, Daly AK, Day CP, Anstee QM, Speliotes EK. TM6SF2: catch-22 in the fight against nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease? *Gastroenterology* 2015;148:679–84.
- [35] Cuthbertson DJ, Steele T, Wilding JP, Halford JC, Harrold JA, Hamer M, et al. What have human experimental overfeeding studies taught us about adipose tissue expansion and susceptibility to obesity and

- metabolic complications? *Int J Obes* 2017;41:853–65.
- [36] Knudsen SH, Hansen LS, Pedersen M, Dejgaard T, Hansen J, Hall G Van, et al. Changes in insulin sensitivity precede changes in body composition during 14 days of step reduction combined with overfeeding in healthy young men. *J Appl Physiol* 2012;113:7–15.
- [37] Bril F, Barb D, Portillo-Sanchez P, Biernacki D, Lomonaco R, Suman A, et al. Metabolic and histological implications of intrahepatic triglyceride content in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2017;65:1132–44.
- [38] Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 2015;7:9453–74.
- [39] Pérez-Aguilar F. [Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis]. *Gastroenterol Hepatol n.d.*;28:396–406.
- [40] Sanyal AJ, Campbell–Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183–92.
- [41] Diehl AM. IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Liver Physiol* 2002;282:G1–5.
- [42] Pérez Aguilar F, Benlloch S, Berenguer M, Beltrán B, Berenguer J. Non-alcoholic statohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications. *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:628-39; 440-8.
- [43] Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol n.d.*;6:161–3.
- [44] Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356–62.
- [45] Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103–9.
- [46] Mofrad P. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003;37:1286–92.
- [47] Cohen JA, Kaplan MM. The SGOT/SGPT ratio--an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979;24:835–8.

- [48] Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1018–22.
- [49] Kowdley K V., Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:77–85.
- [50] Hodgson H. Sheila Sherlock's legacy. *Lancet* 2002;359:460.
- [51] Sherlock S. ASPIRATION LIVER BIOPSY. *Lancet* 1945;246:397–401.
- [52] MENGHINI G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* 1958;35:190–9.
- [53] Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol* 1986;2:165–73.
- [54] Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005;128:1898–906.
- [55] Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol* 2011;21:87–97.
- [56] Pilleul F, Chave G, Dumortier J, Scoazec J-Y, Valette P-J. Fatty infiltration of the liver. Detection and grading using dual T1 gradient echo sequences on clinical MR system. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:1143–7.
- [57] Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley F V. Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques--initial experience. *Radiology* 2005;237:507–11.
- [58] Dixon WT. Simple proton spectroscopic imaging. *Radiology* 1984;153:189–94.
- [59] Glover GH, Schneider E. Three-point Dixon technique for true water/fat decomposition with B0 inhomogeneity correction. *Magn Reson Med* 1991;18:371–83.
- [60] Hussain HK, Chenevert TL, Londy FJ, Gulani V, Swanson SD, McKenna BJ, et al. Hepatic fat fraction: MR imaging for quantitative measurement and display--early experience. *Radiology* 2005;237:1048–55.

Bibliográfia

- [61] Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 1994;12:487–95.
- [62] Cassidy FH, Yokoo T, Aganovic L, Hanna RF, Bydder M, Middleton MS, et al. Fatty Liver Disease: MR Imaging Techniques for the Detection and Quantification of Liver Steatosis. *RadioGraphics* 2009;29:231–60.
- [63] Machann J, Thamer C, Schnoedt B, Stefan N, Haring H-U, Claussen CD, et al. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized 1H-MR spectroscopy. *Magn Reson Med* 2006;55:913–7.
- [64] Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, Ash S, Ali A, Osland EJ, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 2008;28:937–45.
- [65] Lall CG, Aisen AM, Bansal N, Sandrasegaran K. Nonalcoholic fatty liver disease. *AJR Am J Roentgenol* 2008;190:993–1002.
- [66] Hamilton G, Middleton MS, Bydder M, Yokoo T, Schwimmer JB, Kono Y, et al. Effect of PRESS and STEAM sequences on magnetic resonance spectroscopic liver fat quantification. *J Magn Reson Imaging* 2009;30:145–52.
- [67] Reeder SB, Cruite I, Hamilton G, Sirlin CB. Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 2011;34:729–49.
- [68] Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745–50.
- [69] Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and Intraobserver Variability in the Sonographic Assessment of Fatty Liver. *Am J Roentgenol* 2007;189:W320–3.
- [70] Kodama Y, Ng CS, Wu TT, Ayers GD, Curley SA, Abdalla EK, et al. Comparison of CT methods for determining the fat content of the liver. *AJR Am J Roentgenol* 2007;188:1307–12.
- [71] Bydder GM, Chapman RW, Harry D, Bassan L, Sherlock S, Kreef L. Computed tomography attenuation values in fatty liver. *J Comput Tomogr* 1981;5:33–5.
- [72] Yajima Y, Narui T, Ishii M, Abe R, Ohtsuki M, Goto Y, et al. Computed tomography in the diagnosis of fatty liver: total lipid content and computed tomography number. *Tohoku J Exp Med* 1982;136:337–42.

- [73] Hyodo T, Yada N, Hori M, Maenishi O, Lamb P, Sasaki K, et al. Multimaterial Decomposition Algorithm for the Quantification of Liver Fat Content by Using Fast-Kilovolt-Peak Switching Dual-Energy CT: Clinical Evaluation. *Radiology* 2017;283:108–18.
- [74] Hyodo T, Hori M, Lamb P, Sasaki K, Wakayama T, Chiba Y, et al. Multimaterial Decomposition Algorithm for the Quantification of Liver Fat Content by Using Fast-Kilovolt-Peak Switching Dual-Energy CT: Experimental Validation. *Radiology* 2017;282:381–9.
- [75] Ma X, Holalkere N-S, Kambadakone R A, Mino-Kenudson M, Hahn PF, Sahani D V. Imaging-based quantification of hepatic fat: methods and clinical applications. *Radiographics* 2009;29:1253–77.
- [76] Panicek DM, Giess CS, Schwartz LH. Qualitative assessment of liver for fatty infiltration on contrast-enhanced CT: is muscle a better standard of reference than spleen? *J Comput Assist Tomogr* n.d.;21:699–705.
- [77] Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan J-G, Mi Y-Q, de Lédinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* 2017;66:1022–30.
- [78] Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005;26:19–39.
- [79] Epstein FH, Moller DE, Flier JS. Insulin Resistance — Mechanisms, Syndromes, and Implications. *N Engl J Med* 1991;325:938–48.
- [80] Sarti C, Gallagher J. The metabolic syndrome. *J Diabetes Complications* 2006;20:121–32.
- [81] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* 2016;133:447–54.
- [82] Moadab MH, Kelishadi R, Hashemipour M, Amini M, Poursafa P. The prevalence of impaired fasting glucose and type 2 diabetes in a population-based sample of overweight/obese children in the Middle East. *Pediatr Diabetes* 2010;11:101–6.
- [83] Knowles JW, Xie W, Zhang Z, Chennamsetty I, Assimes TL, Paananen J, et al. Identification and validation of N-acetyltransferase 2 as an insulin sensitivity gene. *J Clin Invest* 2016;126:403–403.
- [84] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87–91.
- [85] Björntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis*

Bibliográfia

- n.d.;10:493–6.
- [86] Fiorenza CG, Chou SH, Mantzoros CS. Lipodystrophy: pathophysiology and advances in treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:137–50.
- [87] Ziemke F, Mantzoros CS. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* 2010;91:258S–261S.
- [88] Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C, et al. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4823–31.
- [89] Fargnoli JL, Fung TT, Olenczuk DM, Chamberland JP, Hu FB, Mantzoros CS. Adherence to healthy eating patterns is associated with higher circulating total and high-molecular-weight adiponectin and lower resistin concentrations in women from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1213–24.
- [90] Blüher M, Williams CJ, Klötting N, Hsi A, Ruschke K, Oberbach A, et al. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes Care* 2007;30:3110–5.
- [91] Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation* 2008;117:754–61.
- [92] van Raalte DH, Brands M, van der Zijl NJ, Muskiet MH, Pouwels PJW, Ackermans MT, et al. Low-dose glucocorticoid treatment affects multiple aspects of intermediary metabolism in healthy humans: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 2011;54:2103–12.
- [93] Yu I-C, Lin H-Y, Sparks JD, Yeh S, Chang C. Androgen receptor roles in insulin resistance and obesity in males: the linkage of androgen-deprivation therapy to metabolic syndrome. *Diabetes* 2014;63:3180–8.
- [94] Eddy D, Schlessinger L, Kahn R, Peskin B, Schiebinger R. Relationship of Insulin Resistance and Related Metabolic Variables to Coronary Artery Disease: A Mathematical Analysis. *Diabetes Care* 2009;32:361.
- [95] Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1978–85.
- [96] Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of

- diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–53.
- [97] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults E and T of HBC in A. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA J Am Med Assoc* 2001;285:2486–97.
- [98] Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469–80.
- [99] Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018;6:361–9.
- [100] Martínez Basila A, Maldonado Hernández J, Alarcón ML, Mardia D, Alarcón L. Diagnostic methods of insulin resistance in a pediatric population pediatric theMe. vol. 68. n.d.
- [101] Matsuda M. Measuring and estimating insulin resistance in clinical and research settings. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:79–86.
- [102] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [103] Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2402–10.
- [104] Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J, Elberg J, Parikh SJ, Yanovski JA. Indices of insulin action, disposal, and secretion derived from fasting samples and clamps in normal glucose-tolerant black and white children. *Diabetes Care* 2002;25:2081–7.
- [105] Schwartz B, Jacobs DR, Moran A, Steinberger J, Hong C-P, Sinaiko AR. Measurement of insulin sensitivity in children: comparison between the euglycemic-hyperinsulinemic clamp and surrogate measures. *Diabetes Care* 2008;31:783–8.
- [106] Gungor N, Saad R, Janosky J, Arslanian S. Validation of surrogate

Bibliográfia

- estimates of insulin sensitivity and insulin secretion in children and adolescents. *J Pediatr* 2004;144:47–55.
- [107] Uwaifo GI, Parikh SJ, Keil M, Elberg J, Chin J, Yanovski JA. Comparison of insulin sensitivity, clearance, and secretion estimates using euglycemic and hyperglycemic clamps in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2899–905.
- [108] Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and Liver Insulin Resistance Indexes Derived From the Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes Care* 2007;30:89–94.
- [109] Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2001;24:539–48.
- [110] Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999;22:1462–70.
- [111] Abdul-Ghani MA, Williams K, DeFronzo RA, Stern M. What Is the Best Predictor of Future Type 2 Diabetes? *Diabetes Care* 2007;30:1544–8.
- [112] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–97.
- [113] Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Cleeman JI, Kahn RA, American Heart Association, et al. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 2004;109:551–6.
- [114] Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735–52.
- [115] Rosenzweig JL, Ferrannini E, Grundy SM, Haffner SM, Heine RJ, Horton ES, et al. Primary prevention of cardiovascular disease and type 2 diabetes in patients at metabolic risk: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3671–89.
- [116] Meigs JB. The metabolic syndrome. *BMJ* 2003;327:61–2.
- [117] Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM,

- Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393–403.
- [118] Magkos F, Yannakoulia M, Chan JL, Mantzoros CS. Management of the metabolic syndrome and type 2 diabetes through lifestyle modification. *Annu Rev Nutr* 2009;29:223–56.
- [119] Bassi N, Karagodin I, Wang S, Vassallo P, Priyanath A, Massaro E, et al. Lifestyle modification for metabolic syndrome: a systematic review. *Am J Med* 2014;127:1242.e1-10.
- [120] Bozkurt B, Aguilar D, Deswal A, Dunbar SB, Francis GS, Horwich T, et al. Contributory Risk and Management of Comorbidities of Hypertension, Obesity, Diabetes Mellitus, Hyperlipidemia, and Metabolic Syndrome in Chronic Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2016;134:e535–78.
- [121] Lloyd-Jones DM, Liu K, Colangelo LA, Yan LL, Klein L, Loria CM, et al. Consistently stable or decreased body mass index in young adulthood and longitudinal changes in metabolic syndrome components: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Circulation* 2007;115:1004–11.
- [122] Reaven G, Segal K, Hauptman J, Boldrin M, Lucas C. Effect of orlistat-assisted weight loss in decreasing coronary heart disease risk in patients with syndrome X. *Am J Cardiol* 2001;87:827–31.
- [123] Heymsfield SB, Segal KR, Hauptman J, Lucas CP, Boldrin MN, Rissanen A, et al. Effects of weight loss with orlistat on glucose tolerance and progression to type 2 diabetes in obese adults. *Arch Intern Med* 2000;160:1321–6.
- [124] Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med* 2018;378:e34.
- [125] Azadbakht L, Mirmiran P, Esmailzadeh A, Azizi T, Azizi F. Beneficial effects of a Dietary Approaches to Stop Hypertension eating plan on features of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2005;28:2823–31.
- [126] Brand-Miller J, Hayne S, Petocz P, Colagiuri S. Low-glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care* 2003;26:2261–7.
- [127] Ma Y, Olendzki BC, Wang J, Pursuitte GM, Li W, Fang H, et al. Single-component versus multicomponent dietary goals for the metabolic syndrome: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2015;162:248–57.

Bibliografia

- [128] Després JP, Pouliot MC, Moorjani S, Nadeau A, Tremblay A, Lupien PJ, et al. Loss of abdominal fat and metabolic response to exercise training in obese women. *Am J Physiol* 1991;261:E159-67.
- [129] Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 2003;107:3109–16.
- [130] Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:2549–57.
- [131] Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* (London, England) 1998;352:854–65.
- [132] Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, et al. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation* 2002;106:388–91.
- [133] DREAM Trial Investigators, Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, et al. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med* 2006;355:1551–62.
- [134] NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, Haffner SM, Bethel MA, Holzhauser B, et al. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2010;362:1477–90.
- [135] Kim NH, Kim JH, Kim YJ, Yoo HJ, Kim HY, Seo JA, et al. Clinical and metabolic factors associated with development and regression of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese subjects. *Liver Int* 2014;34:604–11.
- [136] Reeder SB. Quantitative Assessment of Liver Fat with Magnetic Resonance. *J Magn Reson Imaging* 2012;34:1–38.
- [137] Nouredin M, Lam J, Peterson MR, Middleton M, Hamilton G, Le T-A, et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology*

- 2013;58:1930–40.
- [138] Martín-Rodríguez JL, Arrebola JP, Jiménez-Moleón JJ, Olea N, González-Calvin JL. Sonographic quantification of a Hepato-Renal Index for the assessment of hepatic steatosis in comparison with 3T proton magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014;26:88–94.
- [139] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387–95.
- [140] Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero J, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL. Diagnostic accuracy of serum alanine aminotransferase as biomarker for nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in healthy subjects, using 3T MR spectroscopy. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e6770.
- [141] Onat A, Avcı GŞ, Barlan MM, Uyarel H, Uzunlar B, Sansoy V. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes* 2004;28:1018–25.
- [142] Kullberg J, von Below C, Lönn L, Lind L, Ahlström H, Johansson L. Practical approach for estimation of subcutaneous and visceral adipose tissue. *Clin Physiol Funct Imaging* 2007;27:148–53.
- [143] Kvist H, Chowdhury B, Grangård U, Tylén U, Sjöström L. Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1351–61.
- [144] Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, Yeh MM, Kleiner DE, Unalp-Arida A, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011;53:448–57.
- [145] Manco M, Alisi A, Real J-MF, Equitani F, DeVito R, Valenti L, et al. Early interplay of intra-hepatic iron and insulin resistance in children with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011;55:647–53.
- [146] Bao W, Rong Y, Rong S, Liu L. Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2012;10:119.
- [147] Choi JS, Koh I-U, Lee HJ, Kim WH, Song J. Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2013;24:1634–44.
- [148] Dongiovanni P, Ruscica M, Rametta R, Recalcati S, Steffani L, Gatti S, et al. Dietary Iron Overload Induces Visceral Adipose Tissue Insulin

- Resistance. *Am J Pathol* 2013;182:2254–63.
- [149] Green A, Basile R, Rumberger JM. Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes. *Metabolism* 2006;55:1042–5.
- [150] Haap M, Machann J, von Friedeburg C, Schick F, Stefan N, Schwenzer NF, et al. Insulin Sensitivity and Liver Fat: Role of Iron Load. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E958–61.
- [151] Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Rovida S, Rametta R, Fatta E, et al. A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol* 2014;20:3002.
- [152] Valenti L, Moscatiello S, Vanni E, Fracanzani AL, Bugianesi E, Fargion S, et al. Venesection for non-alcoholic fatty liver disease unresponsive to lifestyle counselling--a propensity score-adjusted observational study. *QJM* 2011;104:141–9.
- [153] Adams LA, Crawford DH, Stuart K, House MJ, St. Pierre TG, Webb M, et al. The impact of phlebotomy in nonalcoholic fatty liver disease: A prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2015;61:1555–64.
- [154] Lainé F, Ruivard M, Loustaud-Ratti V, Bonnet F, Calès P, Bardou-Jacquet E, et al. Metabolic and hepatic effects of bloodletting in dysmetabolic iron overload syndrome: A randomized controlled study in 274 patients. *Hepatology* 2017;65:465–74.
- [155] Dinneen SF, Silverberg JD, Batts KP, O'Brien PC, Ballard DJ, Rizza RA. Liver iron stores in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1994;69:13–5.
- [156] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98:960–7.
- [157] Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44–52.
- [158] Goland S, Shimoni S, Zornitzki T, Knobler H, Azoulai O, Lutaty G, et al. Cardiac Abnormalities as a New Manifestation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Echocardiographic and Tissue Doppler Imaging Assessment. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:949–55.
- [159] Liu J, Fox CS, Hickson D, Bidulescu A, Carr JJ, Taylor HA. Fatty liver, abdominal visceral fat, and cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2715–22.

- [160] Goessling W, Massaro J. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology* 2008;135:1935–44.
- [161] Portillo Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2014.
- [162] Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1889–95.
- [163] Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CDA, Heine RJ, et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2007;191:391–6.
- [164] Ioannou GN. Implications of Elevated Serum Alanine Aminotransferase Levels: Think Outside the Liver. *Gastroenterology* 2008;135:1851–4.
- [165] Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002;137:1–10.
- [166] Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology* 2005;42:650–6.
- [167] Kang HS, Um SH, Seo YS, An H, Lee KG, Hyun JJ, et al. Healthy range for serum ALT and the clinical significance of “unhealthy” normal ALT levels in the Korean population. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:292–9.
- [168] Wu W-C, Wu C-Y, Wang Y-J, Hung H-H, Yang H-I, Kao W-Y, et al. Updated thresholds for serum alanine aminotransferase level in a large-scale population study composed of 34 346 subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:560–8.
- [169] Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Koizumi M, Furukawa S, Ueda T, et al. Metabolic markers and ALT cutoff level for diagnosing nonalcoholic fatty liver disease: a community-based cross-sectional study. *J Gastroenterol* 2012;47:696–703.
- [170] Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg a, Burns DK, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999;276:E977–89.

Bibliografía

- [171] Martí-Bonmatí L, Alberich-Bayarri A, Sánchez-González J. Overload hepatitides: quanti-qualitative analysis. *Abdom Imaging* 2012;37:180–7.
- [172] França M, Alberich-Bayarri Á, Martí-Bonmatí L, Oliveira P, Costa FE, Porto G, et al. Accurate simultaneous quantification of liver steatosis and iron overload in diffuse liver diseases with MRI. *Abdom Radiol* 2017;42:1434–43.
- [173] França M, Martí-Bonmatí L, Porto G, Silva S, Guimarães S, Alberich-Bayarri Á, et al. Tissue iron quantification in chronic liver diseases using MRI shows a relationship between iron accumulation in liver, spleen, and bone marrow. *Clin Radiol* 2018;73:215.e1-215.e9.
- [174] Oka R, Yagi K, Sakurai M, Nakamura K, Nagasawa S, Miyamoto S, et al. Impact of visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue on insulin resistance in middle-aged Japanese. *J Atheroscler Thromb* 2012;19:814–22.
- [175] Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab* 2004;30:569–72.
- [176] Omelchenko E, Gavish D, Shargorodsky M. Adiponectin is better predictor of subclinical atherosclerosis than liver function tests in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Am Soc Hypertens* 2014;8:376–80.
- [177] FARGION S, DONGIOVANNI P, GUZZO A, COLOMBO S, VALENTI L, FRACANZANI AL. Iron and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:61–3.
- [178] Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, et al. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2012;122:3529–40.
- [179] Gonzalez-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fernandez-Perez R, Casado-Caballero F, Ruiz-Escolano E, Olivares EG. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4325–30.
- [180] González-Calvin JL, Mundi JL, Casado-Caballero FJ, Abadia AC, Martín-Ibañez JJ. Bone Mineral Density and Serum Levels of Soluble Tumor Necrosis Factors, Estradiol, and Osteoprotegerin in Postmenopausal Women with Cirrhosis after Viral Hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4844–50.
- [181] Messner DJ, Rhieu BH, Kowdley K V. Iron Overload Causes Oxidative Stress and Impaired Insulin Signaling in AML-12 Hepatocytes. *Dig Dis Sci* 2013;58:1899–908.

- [182] Fernández-Real JM, Manco M. Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:513–26.
- [183] Ryan JD, Armitage AE, Cobbold JF, Banerjee R, Borsani O, Dongiovanni P, et al. Hepatic iron is the major determinant of serum ferritin in NAFLD patients. *Liver Int* 2018;38:164–73.
- [184] Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1978–83.
- [185] Montonen J, Boeing H, Steffen A, Lehmann R, Fritsche A, Joost H-G, et al. Body iron stores and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Diabetologia* 2012;55:2613–21.
- [186] Klein M, Iazzettii L, Speiser P, Carey D, Shelov S, Accacha S, et al. Alanine transferase: An independent indicator of adiposity related comorbidity risk in youth. *J Diabetes* 2015;7:649–56.
- [187] Arulanandan A, Ang B, Bettencourt R, Hooker J, Behling C, Lin GY, et al. Association Between Quantity of Liver Fat and Cardiovascular Risk in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Independent of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:1513–1520.e1.
- [188] Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2005;28:2913–8.
- [189] Ozcelik F, Yuksel C, Arslan E, Genc S, Omer B, Serdar MA. Relationship between visceral adipose tissue and adiponectin, inflammatory markers and thyroid hormones in obese males with hepatosteatosi and insulin resistance. *Arch Med Res* 2013;44:273–80.
- [190] Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology* 2004;40:46–54.
- [191] Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology* 2001;121:91–100.
- [192] Nomura K, Yano E, Shinozaki T, Tagawa K. Efficacy and effectiveness of liver screening program to detect fatty liver in the periodic health check-ups. *J Occup Health* 2004;46:423–8.
- [193] Ruhl CE, Everhart JE. Fatty liver indices in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol*

Bibliografía

- Ther 2015;41:65–76.
- [194] Kim NH, Kim JH, Kim YJ, Yoo HJ, Kim HY, Seo JA, et al. Clinical and metabolic factors associated with development and regression of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese subjects. *Liver Int* 2014;34:604–11.
- [195] Kim HJ, Kim HJ, Lee KE, Kim DJ, Kim SK, Ahn CW, et al. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. *Arch Intern Med* 2004;164:2169–75.
- [196] Liu C-J. Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in Asian people who are not obese. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1555–60.
- [197] Wei JL, Leung JC-F, Loong TC-W, Wong GL-H, Yeung DK-W, Chan RS-M, et al. Prevalence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Patients: A Population Study Using Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy. *Am J Gastroenterol* 2015;110:1306–14; quiz 1315.
- [198] Takeno K, Tamura Y, Kawaguchi M, Kakehi S, Watanabe T, Funayama T, et al. Relation Between Insulin Sensitivity and Metabolic Abnormalities in Japanese Men With BMI of 23–25 kg/m². *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3676–84.
- [199] Lee JY, Kim KM, Lee SG, Yu E, Lim Y-S, Lee HC, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007;47:239–44.
- [200] Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Ríos C, Méndez-Sánchez N. In vivo 3T spectroscopic quantification of liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease: Correlation with biochemical method and morphometry. *J Hepatol* 2010;53:732–7.
- [201] Van Werven JR, Marsman H a., Nederveen AJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, Stoker J. Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model. *Magn Reson Imaging* 2012;30:112–21.
- [202] Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol* 2011;21:87–97.
- [203] Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998;47:1757–62.

8. ANEXO

A continuación, se adjuntan los artículos publicados derivados de esta Tesis Doctoral, de acuerdo con la “Información sobre Depósito y Autorización de la Tesis Doctoral” de la Escuela Internacional de Posgrado:

“(...) es obligatorio indicar los indicios de calidad de cada una de las publicaciones en la tesis. Por otro lado, para su inclusión en la tesis, NO DEBE UTILIZAR EL PDF GENERADO POR LA REVISTA dado que podría resultar en violación de derechos de copyright. En su lugar debe utilizar el manuscrito enviado a la revista (...).”

8.1. ARTÍCULO PRIMERO

Insulin resistance in lean and overweight non-diabetic Caucasian adults: Study of its relationship with liver triglyceride content, waist circumference and BMI

Gonzalez-Cantero J, Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL.

PLoS One. 2018 Feb 9;13(2):e0192663

DOI: 10.1371/journal.pone.0192663

INDICADORES DE CALIDAD

Impact Factor: 2.766 (2017); 3.394 (5 años)

<i>Categoría de JCR®</i>	<i>Clasificación en la categoría</i>	<i>Cuartil en la categoría</i>
MULTIDISCIPLINARY SCIENCES	15 de 64	Q1

Insulin resistance in lean and overweight non-diabetic Caucasian adults: study of its relationship with liver triglyceride content, waist circumference and BMI.

Gonzalez-Cantero Jorge^{1*}, Martin-Rodriguez Jose Luis², Gonzalez-Cantero Alvaro³,

Arrebola Juan Pedro⁴, Gonzalez-Calvin Jorge Luis⁵.

¹Department of Radiology, HGU Gregorio Marañón Madrid Spain; and University of Granada; Spain

²Department of Radiology, University Hospital San Cecilio, Granada; Spain

³Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, Castilla-La Mancha; Spain

⁴Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Instituto de Investigación Biosanitaria ibs CIBERESP, Granada, Spain;

⁵Department of Gastroenterology, University Hospital San Cecilio. University of Granada. Spain.

*: jorgegonzalezcantero@gmail.com

ABSTRACT

Aims: Insulin resistance is the pathophysiological precursor of type 2 diabetes mellitus (DM-2), and its relationship with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been widely studied in patients with obesity or metabolic syndrome using not only ultrasound but also liver biopsies or proton magnetic resonance spectroscopy (H¹-MRS) to assess liver fat content. In contrast, there are no studies on insulin resistance and NAFLD in lean or overweight Caucasian individuals using H¹-MRS or liver biopsies for the quantification of hepatic triglyceride content. Our objectives were to study the presence of insulin resistance in lean and overweight Caucasian adults and investigate its possible relationship with liver triglyceride content, waist circumference (as proxy of visceral adiposity), BMI, and cardiometabolic risk factors.

Methods: A cross-sectional study was conducted in 113 non-obese, non-diabetic individuals classified as overweight (BMI 25-29.9 kg/m²) or lean (BMI 19.5-24.9 kg/m²). Hepatic triglyceride content was quantified by 3T H¹-MRS. NAFLD was defined as hepatic triglyceride content >5.56%. Insulin resistance (HOMA-IR), serum adiponectin, and tumor necrosis factor (TNF) were determined.

Results: HOMA-IR was significantly correlated with hepatic triglyceride content ($r:0.76$; $p<0.0001$). The lean-with-NAFLD group had significantly higher HOMA-IR ($p<0.001$) and lower serum adiponectin ($p<0.05$) than the overweight-without-NAFLD group. Insulin resistance was independently associated with NAFLD but not with waist circumference or BMI. Regression analysis showed hepatic triglyceride content to be the most important determinant of insulin resistance ($p<0.01$).

Conclusions: Our findings suggest that NAFLD, once established, seems to be involved in insulin resistance and cardio-metabolic risk factors above and beyond waist circumference and BMI in non-obese, non-diabetic Caucasian individuals

Introduction

Insulin resistance is the pathophysiological precursor of type 2 diabetes mellitus (DM-2). Its relationship with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been widely studied in patients with obesity, metabolic syndrome (MS) [7], and DM-2 [3], reaching a prevalence of 60-90% in these populations [1], suggesting that increased fat accumulation in the liver may be an independent risk factor for the development of insulin resistance, DM-2 [3] and cardiovascular disease (CVD) [2,4]. It is well documented that patients with NAFLD more frequently die from CVD than from chronic liver disease [5,6]. NAFLD has been extensively studied using not only ultrasound but also liver biopsies or proton magnetic resonance spectroscopy (H¹-MRS) in obesity and diabetes [7]. H¹-MRS is the noninvasive gold standard for the quantification of liver triglyceride content [19,136] and has been widely validated in population-based studies [19] and clinical trials [137]. In contrast, ultrasound imaging is an operator-dependent method with high intra-observer and inter-observer variability [69] that offers inadequate sensitivity and specificity in cases of mild or moderate steatosis [25,138]. However, insulin resistance and NAFLD are also found in non-obese individuals [26,194], and most research in non-obese subjects has been carried out in Asia in lean individuals using ultrasound [194–196] and few studies have employed H¹-MRS [197,198]. In addition, we have found no publications on insulin resistance and NAFLD in overweight Western individuals, (body mass index [BMI] of 25-30 kg/m²) as a single group, and there are no studies in lean Caucasian individuals using H¹-MRS or liver biopsies for the quantification of hepatic triglyceride content. In fact, there have only been two studies in lean Western subjects (BMI 18.5 – 24.9 kg/m²), and these used only serum aminotransferase levels and/or ultrasound to assess liver fat content [26,27]. An appreciable number of false-negative results are expected with these methods, given the large proportion of individuals with NAFLD who have “normal” serum aminotransferase levels, alanine aminotransferase (ALT) <40 IU [7,139,140] and the poor sensitivity of abdominal ultrasound to detect mild steatosis (liver fat content <30%) [25,138]. This is of special importance in studies of non-obese populations, which are likely to contain a larger proportion of individuals with mild steatosis in comparison to obese subjects. Waist circumference is a simple, indirect method for measuring visceral adiposity. Although it may represent visceral and subcutaneous fat, it has been described as the most reliable surrogate marker of visceral adiposity (24), and a strong

correlation has been reported between waist circumference and visceral adiposity assessed with Magnetic Resonance Imaging (25). It has long been debated whether insulin resistance precedes or is a consequence of NAFLD. It is now generally accepted that excess energy intake initially induces the accumulation of fat (mainly subcutaneous) and insulin resistance, with a subsequent increase in intrahepatic triglyceride content [14]. We also included BMI in this study because it has been related by observational and epidemiological studies to morbidity and mortality risk, highlighting the finding of an increased risk of cardiovascular disease with higher BMI in all population groups. In addition, BMI has been shown to be the best single predictor of total adipose tissue volume assessed with computed tomography in male and female adults (26).

In short, inadequate data are available on insulin resistance in lean and overweight Caucasian individuals and its possible relationship with liver fat content, waist circumference (as proxy of visceral adiposity), BMI, and cardiometabolic risk factors.

With this background, our aim was to study insulin resistance in non-obese, non-diabetic Caucasian individuals and investigate its relationship with liver triglyceride content, waist circumference (proxy of visceral adiposity), and BMI, avoiding the potential confounding factors of diabetes and obesity and using 3T H¹-MRS to accurately quantify liver triglyceride content.

Materials and Methods

Study population

A total of 113 healthy, non-obese, non-diabetic, Caucasian adults, aged between 25 and 70 years, participated in this study. Participants were consecutively recruited among individuals undergoing examination at the Occupational Risk Prevention Unit in Granada (Southern Spain) for routine annual general checkup.

Study exclusion criteria were: history of daily alcohol intake > 20 g (men) or > 10 g (women), based on responses to a validated questionnaire on alcohol consumption and confirmation of results by a family member; the presence of HBV/HCV serologic markers, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, hemochromatosis, Wilson's disease, cancer, diabetes

Anexo

mellitus, or endocrinal, cardiac, renal, or pulmonary disease; consumption of drugs that might cause steatosis (e.g. corticosteroids, amiodarone, methotrexate, tamoxifen); BMI <18.5 or ≥30 kg/m²; and the wearing of a pacemaker or other device incompatible with ¹H-MRS. The study was approved by the ethics committee of San Cecilio University Hospital.

Study design, anthropometric evaluations and groups

Participants attended two appointments within < 7 days. The first visit involved a full medical history, physical examination, blood analyses and abdominal ultrasound as part of the screening process. Waist circumference was measured with soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest in standing position. The weight and height of participants were recorded, calculating their BMI (kg/m²). Following WHO criteria for Western populations, a lean individual was defined by a BMI of 18.5 – 24.9 kg/m² and an overweight individual by a BMI of 25 - 29.9 kg/m². At the second visit, blood was drawn in the morning after overnight fasting, and their hepatic triglyceride content was quantified by 3 Tesla Magnetic Resonance Spectroscopy (3T H¹-MRS).

Four groups were then established to study the relationship of insulin resistance with hepatic triglyceride content and cardio-metabolic risk factors in overweight and lean individuals, based on their BMI and the presence or absence of NAFLD (defined by hepatic triglyceride content >5.56 % as quantified by 3T H¹-MRS): *Lean-with-NAFLD*, *Lean-without-NAFLD*, *Overweight-with-NAFLD*, and *Overweight-without-NAFLD*. Based on a previous study with similar methodology and non-obese participants (19), and on a pilot sample of 20 cases, a total sample size of 96 cases was estimated, assuming an α -error of 0.05 and power (1- β) of 0.8. The sample size for each group was therefore set at 25-30 individuals. Once the 3T H¹-MRS result was obtained, participants were consecutively allocated to the corresponding group until the sample size was reached for each group. All participants received complete information and gave written informed consent to participate in the study.

Laboratory analysis

Serum ALT and aspartate aminotransferase (AST) levels were determined by a kinetic method (Cobas c 311, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), with coefficients of variation of 3.3 and 3.1, respectively, serum glucose by the glucose oxidase (enzymatic) method

(Roche/Hitachi Analytics systems, Roche Diagnostics GmbH), adiponectin levels by radioimmunoassay, (Linco Research, St. Charles, MO, USA), serum Insulin by electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys 2010, Roche Diagnostics GmbH), serum TNF- α by human TNF-alpha enzyme-linked immunosorbent assay (Biosource Europe, Nivelles, Belgium), and serum cholesterol by an enzymatic method (Roche Diagnostics GmbH). Insulin resistance was calculated as HOMA-IR = fasting insulin (mU/L) x fasting glucose (mmol/L)/22.5 [102]. Coefficients of variation in the biochemical tests ranged from 3.1 to 9.9%.

3 Tesla H¹-MRS analysis

A magnetic resonance imaging study was conducted before the spectroscopy, acquiring in-vivo spectra at 3T with a Philips Achieva system (Royal Philips, Amsterdam, Netherlands). A 3-plane localizer was employed to plan the 1H-MRS, and the spectra were obtained using the body coil of the scanner. Breath-hold was monitored using a respiratory belt.

A single voxel of 27cm³ (30 x 30 x 30mm) was selected within normal liver tissue in segment VI, avoiding the edge of the liver, the diaphragm, and major blood vessels. All spectra were obtained with a stimulated echo acquisition mode sequence (STEAM), setting the following parameters: repetition time=8000; echo time=20, 40, and 60ms; number of signal averages=4 (without water suppression); and bandwidth=2000. Data were acquired within a breath hold. T2 correction was applied and field homogeneity was adjusted automatically for each voxel.

MRS images were reconstructed with Extended MR WorkSpace software (Royal Philips). Raw data were zero-filled once, with no filter, and were phase-corrected, Fourier-transformed, baseline-corrected, and averaged. A Marquardt curve was fitted, using a combined Lorentzian–Gaussian model to calculate the area under the curve of fat and water peaks. Spectra were referenced to residual water and the dominant methylene lipid (–CH₂) peak at $\delta=4.47$ and $\delta=1.43$ ppm, respectively. Fat fraction percentage (FF) was defined as $FA / (FA+WA) \times 100$, where FA is the area under the fat peak and WA is the area under the water peak. ¹H-MRS data were interpreted by an experienced radiologist blinded to the biochemical results.

NAFLD was defined by an hepatic triglyceride content greater than 5.56%, which corresponds to 5.56 g/100g (g triglyceride per 100 g wet liver tissue), as previously proposed [19].

Anexo

Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard deviation (SD). The Kolmogorov-Smirnoff test was used to check the normality of the data distribution. Mean values were compared among groups with the one-way ANOVA, followed by the Tukey multiple-comparison test, the unpaired Student's two-tailed t test or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate. Correlations were examined by Pearson standard linear regression analysis (normal distribution) or by the Spearman test (non-normal distribution). The chi-square test was used for non-continuous variables.

Regression analyses were conducted on the global population to increase the sample size and therefore statistical power for evaluation of the main predictors of insulin resistance and NAFLD in our population of non-obese, non-diabetic individuals. Backward stepwise multiple regression analysis was performed to establish the most significant determinants of insulin resistance, entering the following variables: age, sex, hepatic triglyceride content, waist circumference, BMI, and serum ALT, AST, GGT, triglyceride, adiponectin, and HDL-cholesterol (HDL-C) values. Backward Wald binary logistic regression analysis was used to study the main predictors of NAFLD, entering the following variables: age, sex, waist circumference, BMI, HOMA-IR, and serum ALT, AST, GGT, fasting insulin, triglyceride, adiponectin, and HDL-cholesterol (HDL-C) values. Only variables with $P < 0.05$ were retained in the final regression model. Data analyses were performed with SPSS software for Windows version 22 (IBM SPSS Inc., Chicago IL).

Results

Anthropometric, biochemical, and metabolic data

The final study sample comprised 113 adults with a mean \pm SD age of 45.1 ± 10.2 years (range, 25-70 yrs). Their anthropometric and biochemical data are exhibited in Table 1.

Table 1. Anthropometrical and biochemical parameters in lean and overweight Caucasian individuals.

	Lean n=55	Overweight n=58	P<
Sex (m/f)	28/27	31/27	NS
Age (years)	41.35±10.29	46.25±11.08	0.05
Body Mass Index (Kg/m ²)	23.52±1.75	27.53±1.44	0.001
Waist Circumference (cm)	85.03±8.12	97.34±10.20	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	13.02±6.65	18.29±8.43	0.01
Cholesterol (mg/dl)	191.42±37.15	194.28±44.16	NS
LDL (mg/dl)	108.85±29.91	115.59±37.98	NS
HDL (mg/dl)	66.59±14.28	53.77±13.78	0.05
Triglycerides (mg/dl)	76.12±39.34	117.35±77.64	0.05
Serum AST (IU/L)	31.21±14.89	23.96±6.31	NS
Serum ALT (IU/L)	30.62±23.22	30.77±10.11	NS
Serum GGT (IU/L)	37.05±58.75	70.22±32.89	0.05
Glucose (mg/dl)	92.05±11.27	102.40±19.05	NS
Fasting serum insulin (µU/ml)	8.16±5.01	9.80±4.37	NS
HOMA-IR	3.51±2.33	4.93±2.96	NS
TNF-α (pg/ml)	148.97±41.27	160.34±40.38	NS
Adiponectin (µg/ml)	13.25±8.16	10.98±5.82	0.05

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NS, non-significant; TNFα, tumor necrosis factor-α. Data are expressed as means ± standard deviation. P value: the chi-square test for non-continuous variables and the unpaired Student's two-tailed t-test or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate, for continuous variables.

According to the Kolmogorov-Smirnoff test, the only variables that significantly deviated from a normal distribution were intrahepatic triglyceride content ($p < 0.001$) and HOMA-IR ($p < 0.001$). Among overweight individuals and lean individuals, considered separately, significant differences were found in BMI, waist circumference, and hepatic triglyceride content (table 1), using the unpaired Student's two-tailed t test or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate.

As observed in Table 2, the mean age, BMI, waist circumference, serum ALT, AST, GGT, triglyceride levels, fasting serum insulin, and HOMA-IR were significantly higher and adiponectin and HDL-C values were significantly lower in subjects with than without NAFLD, considered globally, using the unpaired Student's two-tailed t-test or non-parametric Mann-Whitney U test, as appropriate.

Table 2. Anthropometrical and biochemical parameters of non-obese Caucasian individuals according to the presence of NAFLD.

	No NAFLD n=58	NAFLD n=55	P<
Sex (m/f)	27/31	32/23	0.05
Age (years)	42.05±10.16	47.59±10.24	0.01
Body Mass Index (Kg/m ²)	24.87±2.71	27.28±2.27	0.001
Waist Circumference (cm)	87.65±11.68	98.91±9.88	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	2.37±1.39	28.94±13.82	0.001
Cholesterol (mg/dl)	192.26±43.30	194.54±40.39	NS
LDL-C (mg/dl)	112.86±35.07	114.43±36.03	NS
HDL-C (mg/dl)	61.23±14.91	51.73±15.14	0.01
Triglycerides (mg/dl)	85.81±65.75	130.50±70.09	0.01
Serum AST (IU/L)	21.86±8.02	29.05±11.05	0.01
Serum ALT (IU/L)	20.05±6.97	41.30±18.14	0.001
GGT (IU/L)	27.91±24.23	56.19±53.74	0.01
Glucose (mg/dl)	94.86±15.44	105.89±50.28	NS
Fasting serum insulin (μ U/ml)	5.92±2.20	12.91±6.90	0.001
HOMA-IR	2.47±1.04	6.73±4.10	0.001
TNF- α (pg/ml)	150.62±27.41	163.32±53.04	NS
Adiponectin (μ g/ml)	14.81±8.60	7.57±7.06	0.001

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NS, non-significant; TNF α , tumor necrosis factor- α . Data are expressed as means \pm standard deviation.

P value: the chi-square test for non-continuous variables and the unpaired Student's two-tailed t-test or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate, for continuous variables.

In comparison to the lean-NAFLD group, significantly higher HOMA-IR, hepatic triglyceride content, waist circumference, BMI, and serum triglyceride values and significantly lower serum adiponectin and HDL-C levels were observed in the overweight-with-NAFLD group (Table 3).

Table 3. Anthropometrical and biochemical parameters in lean and overweight Caucasian individuals according to the presence of NAFLD.

	Lean without NAFLD n=30	Lean with NAFLD n= 25	Overweight without NAFLD n=28	Overweight with NAFLD n=30
Age (years)	39.71±7.30	43.00±12.81	44.27±12.04	48.24±9.61 ^a
Sex (m/f)	14/16	14/11 ^a	13/15	18/12 ^{a,c}
Body Mass Index (Kg/m ²)	22.59±1.61	23.46±1.96	27.06±1.41 ^{d,e}	28.00±1.46 ^{c,d,e}
Waist Circumference (cm)	81.19±8.74	88.86±7.95 ^a	93.82±10.9 ^d	100.86±9.07 ^{c,d,e}
Hepatic Triglycerides (%)	2.15±1.34	23.90±11.91 ^{d,f}	2.60±1.43	33.98±15.24 ^{d,e,f}
Cholesterol (mg/dl)	189.24±41.02	193.60±32.22	195.14±46.15	193.43±41.87
LDL-C (mg/dl)	108.71±31.61	109.00±28.22	116.82±38.41	114.36±37.09
HDL-C (mg/dl)	68.80±13.33	64.38±15.59	58.23±13.93	49.31±13.69 ^{c,d,e}
Triglycerides (mg/dl)	72.05±37.86	80.20±41.57	98.95±83.14	135.75±70.70 ^{b,d}
Serum AST (IU/L)	23.10±10.46	39.33±17.60 ^d	20.68±4.62 ^e	27.24±8.71 ^{c,a}
Serum ALT (IU/L)	19.38±7.93	41.86±38.59 ^d	20.68±6.02 ^e	40.87±17.44 ^{f,d}
Serum GGT (IU/L)	26.29±24.02	47.81±40.16 ^d	29.45±24.90 ^e	111.00±89.54 ^{c,a}
Fasting Glucose (mg/dl)	90.71±6.12	93.40±16.23	98.82±18.19	105.99±20.29 ^a
Fasting Insulin (µU/ml)	5.62±2.16	10.70±7.60 ^a	6.20±2.27 ^b	13.41±6.96 ^{d,f}
HOMA-IR	2.26±0.96	4.75±3.46 ^{d,f}	2.68±1.10	7.18±4.22 ^{b,d,f}
TNF-α (pg/ml)	146.54±24.41	151.40±67.27	154.51±30.04	166.17±50.17 ^a
Adiponectin (µg/ml)	14.24±9.05	12.27±8.08 ^{a,c}	15.35±7.15	6.61±4.58 ^{d,e,f}

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNFα, tumor necrosis factor-α. Data are expressed as means with standard deviation (SD).

^a P< 0.05 vs. Lean-without-NAFLD; ^b P< 0.05 vs. Lean-with-NAFLD; ^c P< 0.05 vs. Overweight-without-NAFLD; ^d P< 0.001 vs. Lean- without-NAFLD; ^e P< 0.001 vs. Lean-with-NAFLD; ^f P< 0.001 vs. Overweight-without-NAFLD.

^{a-f} P value: chi-square test for non-continuous variables and one-way ANOVA for continuous variables followed by the Tukey multiple-comparison test

The only significant differences found between the overweight-without-NAFLD group and the lean-without-NAFLD group were the higher waist circumference and BMI in the former. Finally, in comparison to the overweight-without-NAFLD group, the lean with NAFLD group had significantly higher hepatic triglyceride content, HOMA-IR, and serum fasting insulin, AST and ALT values and significantly lower serum adiponectin values (using one-way ANOVA for continuous variables followed by the Tukey multiple-comparison test). As depicted in Figure 1,

changes in HOMA-IR and serum adiponectin levels paralleled changes in hepatic triglyceride content in all groups.

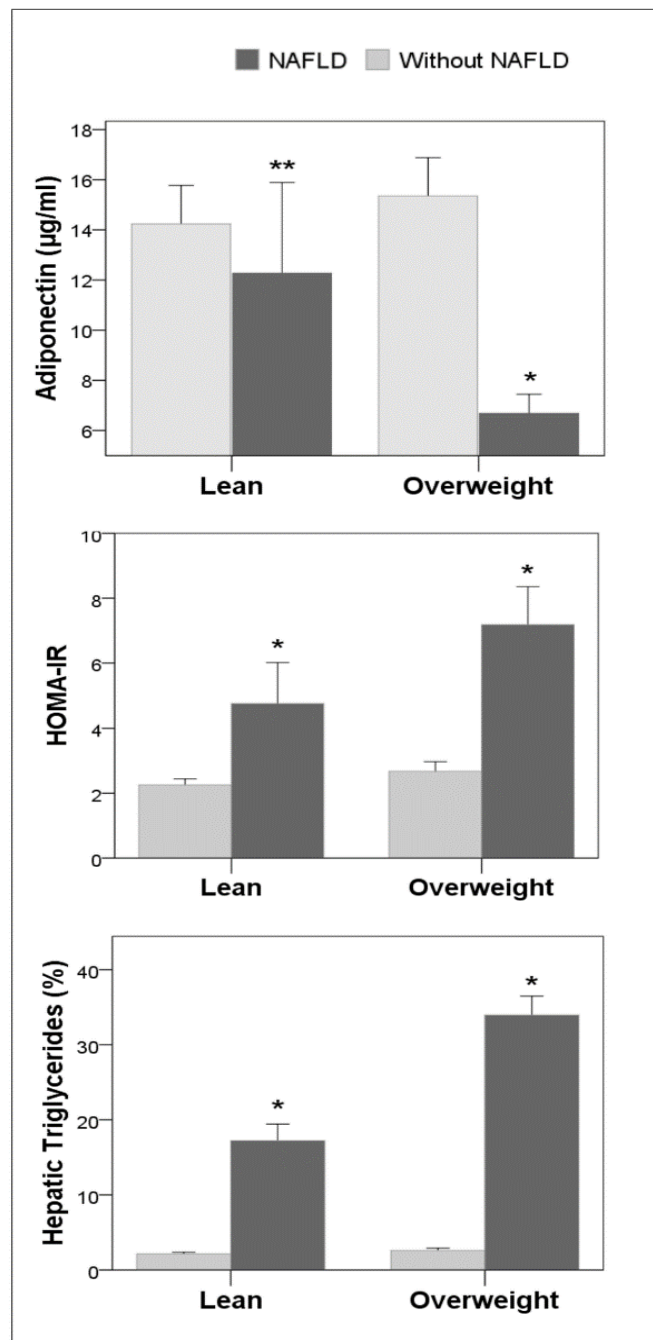


Fig. 1 Comparison of HOMA-IR, serum adiponectin level and hepatic triglyceride content between lean and overweight groups with and without NAFLD. Changes in HOMA-IR and serum adiponectin level paralleled changes in hepatic triglyceride content.

*: $p < 0.001$ versus all other groups.

** : $p < 0.05$ versus lean- and overweight-without NAFLD groups.

Correlations of HOMA-IR

HOMA-IR was highly significantly and positively correlated with hepatic triglyceride content ($r:0.76;p<0.0001$), and other less highly significant positive correlations were found with waist circumference ($r:0.52;p<0.001$), BMI ($r:0.48;p<0.01$), age ($r:0.49;p<0.01$) and serum ALT ($r:0.3;p<0.03$), while inverse correlation with serum adiponectin ($r:0.47;p<0,01$) and HDL-C ($r:0.46;p<0.02$) were observed.

Correlations of hepatic triglyceride content with metabolic risk factors and other variables

Hepatic triglyceride content was highly significantly and positively correlated with HOMA-IR, ($r:0.76;p<0,0001$), fasting serum insulin ($r:0.71, p<0.0001$) and serum ALT ($r:0.63; p< 0.001$). Other less highly significant positive correlations were found with waist circumference ($r:0,48;p<0.01$), BMI ($r:0.39, p<0.01$), and serum triglycerides ($r:0.41, p<0.01$), while inverse correlations with serum adiponectin ($r:0.01, p<0.46$) and HDL-C ($r:0.39; p<0.01$) were observed.

Backward Stepwise Multiple Regression analysis of factors associated with insulin resistance

In the regression analyses on insulin resistance predictors, hepatic triglyceride content was the most influential determinant (B -coefficient=0.16, $SE=0.017$; $p<0.01$), while the effect of age was also significant (B -coefficient=0.06, $SE=0.019$; $p<0.05$). Only significant variables ($p<0.05$) are shown.

Backward Wald Binary Logistic Regression analysis on factors associated with NAFLD

Backward stepwise regression analyses showed that the most influential determinants of NAFLD in our sample of non-obese individuals were HOMA-IR (B -coefficient=2.9, $SE=1.5$; ($p<0.01$) and serum ALT (B -coefficient=0.55, $SE=0.25$; $p<0.032$). Only significant variables ($p<0.05$) are shown.

Discussion

The results of this study indicate that increased hepatic triglyceride content is closely associated with insulin resistance in non-obese, non-diabetic Caucasian individuals above and beyond waist circumference (proxy of visceral adiposity) and BMI. Overfeeding studies have shown that subcutaneous fat accumulation and insulin resistance are early effects of positive energy

balance, and that hepatic triglyceride accumulation occurs later (28, 29). However, the relative importance of the relationships of NAFLD, waist circumference and BMI with insulin resistance and other cardiovascular risk factors remains to be elucidated (1, 30-32).

To our best knowledge, this is the first published report designed to improve understanding of the clinical significance of NAFLD, waist circumference, and BMI in relation to insulin resistance and cardiometabolic risk factors in lean and overweight Caucasian individuals, and using 3T H¹-MRS for liver fat assessment. Higher insulin resistance values were found in the lean-with-NAFLD group than in the overweight-without-NAFLD group despite the significantly higher waist circumference and BMI of the latter. This suggests that the increased hepatic triglyceride accumulation in the lean-with-NAFLD group rather than their waist circumference or BMI contributes to the development of insulin resistance. In addition, no differences in insulin resistance or the other metabolic risk factors were found between the lean and overweight individuals without NAFLD, who only differed in waist circumference and BMI. This supports the proposal that insulin resistance is more closely associated with NAFLD than with waist circumference or BMI. Nevertheless, our correlation analyses indicate that an association of both BMI and waist circumference with insulin resistance and other metabolic risk factors can be expected. Similar results were reported for females but not males in a previous study; this discrepancy with our findings may be explained by their use of computed tomography and their inclusion of obese subjects [174]. In addition, multiple regression analysis showed that hepatic triglyceride content was the most important determinant of insulin resistance, even after adjustment for sex and age, while neither waist circumference nor BMI were significant predictors, which supports the concept of metabolically obese but normal weight individuals, with normal BMI but significant risk factors for diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular disease [175]. Based on these findings, we suggest that NAFLD, once established, appears to be involved in insulin resistance and cardio-metabolic risk factors above and beyond waist circumference or BMI in non-obese non-diabetic individuals.

Insulin resistance, low serum levels of adiponectin and HDL-C and high serum triglyceride levels have been considered to represent a possible link between NAFLD and atherosclerotic vascular disease [176]. This proposal might be applicable to lean individuals, as supported by the present study in non-obese subjects, in which adiponectin, lipid profile abnormalities and

insulin resistance were significantly associated with the increased accumulation of hepatic triglycerides.

Elevated serum TNF levels have been observed in chronic liver disease [179,180] and in some cases of NAFLD [27,190]. In our study, TNF α serum levels were higher in the overweight-with-NAFLD group than in the lean-without-NAFLD group but showed no correlation with hepatic triglyceride content, insulin resistance, or serum aminotransferase levels. The implication of the TNF system in the development of insulin resistance and other metabolic consequences in non-obese, non-diabetic individuals remains to be elucidated.

Study limitations include a potential selection bias, in that individuals undergoing a routine general checkup may be more health conscious than the general population. In addition, it was not possible to investigate the natural progression of insulin resistance due to the cross-section design of the study. The sample size delivered adequate statistical power, but further studies in wider samples are warranted to verify these findings.

Study strengths include the use of 3T H¹-MRS for liver triglyceride quantification, the prospective enrolment of patients, the strict exclusion criteria imposed, and the gathering of all biochemical and 3T H¹-MRS measurements within a 24-h period.

In conclusion, our findings suggest that NAFLD, once established, appears to make a greater contribution to insulin resistance and cardio-metabolic risk factors in comparison to waist circumference and BMI in non-obese, non-diabetic Caucasian individuals.

Acknowledgements:

Dr. Jorge Gonzalez-Cantero is a PhD candidate at the University of Granada. The authors thank those responsible for the PhD Programme in Clinical Medicine and Public Health at the University of Granada.

REFERENCES

1. Maximos M, Brill F, Portillo Sanchez P, Lomonaco R, Orsak B, Biernacki D, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2015; 61: 153-160. <https://doi.org/10.1002/hep.27395> PMID: 25145475
2. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*. 2009; 29: 113-9. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01718.x> PMID: 18384521
3. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34: 274-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x> PMID: 21623852
4. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1341-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912063> PMID: 20879883
5. Adams LA, Anstee QM, Tilg H, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut*. 2017; 66: 1138-1153. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313884> PMID: 28314735
6. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology*. 2005; 129: 113-121. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.04.014> PMID: 16012941
7. Rafiq N, Bai C, Fang YUN, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *YJCGH. AGA Institute*; 2009; 7: 234-238. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.11.005> PMID: 19049831
8. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288: E462-E468. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00064.2004> PMID: 15339742
9. Reeder SB. Quantitative Assessment of Liver Fat with Magnetic Resonance. *J Magn Reson Imaging*. 2012; 34: 1-38.
10. Nouredin M, Lam J, Peterson MR, Middleton M, Hamilton G, Le T-A, et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology*. 2013; 58: 1930-40. <https://doi.org/10.1002/hep.26455> PMID: 23696515
11. Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and Intraobserver Variability in the Sonographic Assessment of Fatty Liver. *Am J Roentgenol*. 2007; 189: W320-W323. <https://doi.org/10.2214/AJR.07.2123> PMID: 18029843
12. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *J Hepatol*. 2009; 51: 1061-7. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.09.001> PMID: 19846234
13. MartõÁn-RodrõÁguez JL, Arrebola JP, JimeÁnez-MoleoÁn JJ, Olea N, GonzaÁlez-Calvin JL. Sonographic quantification of a Hepato-Renal Index for the assessment of hepatic steatosis in comparison with 3T proton magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014; 26: 88-94. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283650650> PMID: 23921844
14. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)*. 2012; 91: 319-27. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182779d49> PMID: 23117851
15. Kim NH, Kim JH, Kim YJ, Yoo HJ, Kim HY, Seo JA, et al. Clinical and metabolic factors associated with development and regression of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese subjects. *Liver Int*. 2014; 34: 604-611. <https://doi.org/10.1111/liv.12454> PMID: 24382309
16. Kim HJ, Kim HJ, Lee KE, Kim DJ, Kim SK, Ahn CW, et al. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. *Arch Intern Med*. 2004; 164: 2169-75. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.19.2169> PMID: 15505132
17. Liu C-J. Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in Asian people who are not obese. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27: 1555-60. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07222.x> PMID: 22741595
18. Wei JL, Leung JC-F, Loong TC-W, Wong GL-H, Yeung DK-W, Chan RS-M, et al. Prevalence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Patients: A Population Study Using Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy. *Am J Gastroenterol*. 2015; 110: 1306-14; quiz 1315. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.235> PMID: 26215532
19. Takeno K, Tamura Y, Kawaguchi M, Kakehi S, Watanabe T, Funayama T, et al. Relation Between Insulin Sensitivity and Metabolic Abnormalities in Japanese Men With BMI of 23-25 kg/m². *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101: 3676-3684. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1650> PMID: 27383116
20. Feldman A, Eder SK, Felder TK, Kedenko L, Paulweber B, Stadlmayr A, et al. Clinical and Metabolic Characterization of Lean Caucasian Subjects With Non-alcoholic Fatty Liver. *Am J Gastroenterol*. 2017; 112: 102-110. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.318> PMID: 27527746
21. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40: 1387-1395. <https://doi.org/10.1002/hep.20466> PMID: 15565570
22. Martin-Rodríguez JL, Gonzalez-Cantero J, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL. Diagnostic accuracy of serum alanine aminotransferase as biomarker for nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in healthy subjects, using 3T MR spectroscopy. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96: e6770. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006770> PMID: 28445310
23. Onat A, Avcõ GŞ, Barlan MM, Uyarel H, Uzunlar B, Sansoy V. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes*. 2004; 28: 1018-1025. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802695> PMID: 15197408
24. Kullberg J, von Below C, LoÈnn L, Lind L, AhlstrõEm H, Johansson L. Practical approach for estimation of subcutaneous and visceral adipose tissue. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2007; 27: 148-153. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2007.00728.x> PMID: 17445065

25. Gastaldelli A. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD? *Clin Sci*. 2017; 131: 2701-2704. <https://doi.org/10.1042/CS20170987> PMID: 29109303
26. Kvist H, Chowdhury B, Grangård U, TyleÅn U, SjöEstroEm L. Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am J Clin Nutr*. 1988; 48: 1351-61. PMID: 3202084
27. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28: 412-9. PMID: 3899825
28. Cuthbertson DJ, Steele T, Wilding JP, Halford JC, Harrold JA, Hamer M, et al. What have human experimental overfeeding studies taught us about adipose tissue expansion and susceptibility to obesity and metabolic complications? *Int J Obes*. 2017; 41: 853-865. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.4> PMID: 28077863
29. Knudsen SH, Hansen LS, Pedersen M, Dejgaard T, Hansen J, Hall G Van, et al. Changes in insulin sensitivity precede changes in body composition during 14 days of step reduction combined with overfeeding in healthy young men. *J Appl Physiol*. 2012; 113: 7-15. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00189.2011> PMID: 22556394
30. McLaughlin T, Lamendola C, Liu A, Abbasi F. Preferential Fat Deposition in Subcutaneous Versus Visceral Depots Is Associated with Insulin Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96: E1756-E1760. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0615> PMID: 21865361
31. Yamada T, Fukatsu M, Suzuki S, Wada T, Yoshida T, Joh T. Fatty liver predicts impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus in Japanese undergoing a health checkup. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25: 352-356. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05998.x> PMID: 19817963
32. Oka R, Yagi K, Sakurai M, Nakamura K, Nagasawa S, Miyamoto S, et al. Impact of visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue on insulin resistance in middle-aged Japanese. *J Atheroscler Thromb*. 2012; 19: 814-22. PMID: 22813532
33. Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab*. 2004; 30: 569-72. PMID: 15671927
34. Omelchenko E, Gavish D, Shargorodsky M. Adiponectin is better predictor of subclinical atherosclerosis than liver function tests in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Am Soc Hypertens*. Elsevier Ltd; 2014; 8: 376-80. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2014.03.002> PMID: 24794207
35. Gonzalez-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fernandez-Perez R, Casado-Caballero F, Ruiz-Escolano E, Olivares EG. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 4325-30. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0077> PMID: 15356028
36. GonzaÁlez-Calvin JL, Mundi JL, Casado-Caballero FJ, Abadia AC, Martin-Ibañez JJ. Bone Mineral Density and Serum Levels of Soluble Tumor Necrosis Factors, Estradiol, and Osteoprotegerin in Postmenopausal Women with Cirrhosis after Viral Hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94: 4844-4850. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0835> PMID: 19897681
37. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-α or adiponectin? *Hepatology*. 2004; 40: 46-54. <https://doi.org/10.1002/hep.20280> PMID: 15239085

8.2.ARTÍCULO SEGUNDO

Insulin resistance and NAFLD: relationship with intrahepatic iron and serum TNF- α using ^1H MR spectroscopy and MRI

Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero J, Gonzalez-Cantero A, Martí-Bonmatí L, Alberich-Bayarri Á, Gonzalez-Cejudo T, Gonzalez-Calvin JL.

Diabetes Metab. 2019 Jan 17. [Epub ahead of print]

DOI: 10.1016/j.diabet.2019.01.005

INDICADORES DE CALIDAD

Impact Factor: 3.744 (2017); 3.463 (5 años)

<i>Categoría de JCR®</i>	<i>Clasificación en la categoría</i>	<i>Cuartil en la categoría</i>
MULTIDISCIPLINARY SCIENCES	45 de 143	Q2

Insulin resistance and NAFLD. Relationship with intrahepatic iron and serum TNF α using ^1H Spectroscopy and MRI

Martin-Rodriguez Jose Luis¹, Gonzalez-Cantero Jorge²,

Gonzalez-Cantero Alvaro³, Martí-Bonmatí Luis⁴, Alberich-Bayarri Ángel⁵,

Gonzalez-Cejudo Trinidad⁶, Gonzalez-Calvin Jorge Luis⁷.

¹Department of Radiology. University Hospital San Cecilio. Granada. Spain

²Department of Radiology. HGU Gregorio Marañón. Madrid, and University of Granada. Spain.

³Complejo Hospitalario de Toledo. Toledo. Castilla-La Mancha. Spain.

⁴Medical Imaging Department and Biomedical Imaging Research Group. Hospital Universitario y Politécnico La Fe and Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Valencia; Spain.

⁵Grupo de Investigación Biomédica en Imagen, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia. Quantitative Imaging Biomarkers in Medicine (QUIBIM), Valencia; Spain.

⁶Servicio Laboratorio Clínico. University Hospital San Cecilio, Granada; Spain.

⁷Department of Gastroenterology. University Hospital San Cecilio. Department of Medicine. University of Granada. Spain.

Short running title: IR and NAFLD: Role of hepatic iron and TNF

Word count: 3271; Tables: 3; Figures: 1.

Corresponding author and person to whom print requests should be addressed:

Gonzalez-Cantero Jorge, MD

Department of Radiology, HGU Gregorio Marañón

C/ Doctor Esquerdo, 46 28007 Madrid, SPAIN,

Phone: +34-91-5868000

e-mail: jorgegonzalezcantero@gmail.com

ABSTRACT

Aim: The association of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) with insulin resistance is well established, but little is known about their possible relationship with intrahepatic iron and serum tumor necrosis factor alpha (TNF α) concentrations in non-diabetic adults. We studied the relationship of intrahepatic iron and serum TNF α with intrahepatic triglycerides and insulin resistance in non-diabetic adults.

Methods: Cross-sectional study of 104 healthy non-diabetic Caucasians. A quantitative magnetic resonance imaging (MRI) T2 gradient echo technique was used to measure hepatic iron, and ¹H-MR spectroscopy to measure hepatic triglycerides. The HOMA-IR was calculated to determine insulin resistance.

Results: The prevalence of hepatic iron overload (HIOL) was 26.6% in individuals with NAFLD *versus* 0% in those without. Insulin resistance was present in 87.5% of individuals with both NAFLD and HIOL, in 45.4% of those with NAFLD without HIOL, and in 4.5% of those without either. HOMA-IR was positively correlated with hepatic triglycerides ($r:0.56$; $p<0.001$) and hepatic iron ($r:0.52$; $p<0.001$). Serum TNF α concentrations were correlated with intrahepatic triglycerides ($r:0.28$; $p<0.04$), but not with intrahepatic iron. Hepatic triglycerides, serum TNF α , and age were the only significant determinants of insulin resistance in the regression analysis.

Conclusions: Insulin resistance is associated closely with intrahepatic triglycerides and to a lesser extent with intrahepatic iron, with an interplay between them. High serum TNF α concentrations may contribute to the association between NAFLD and insulin resistance. Increased hepatic triglycerides appear to be determinant for the development of hepatic iron overload in non-diabetic subjects without hemochromatosis.

Key words: Insulin Resistance, NAFLD, TNF α , Hepatic Iron.

1. Introduction

Over the past two decades, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become a major public health problem in developed countries and has been linked to obesity, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome, although it is also found in non-obese individuals. Patients with NAFLD generally have an increased risk of death from cardiovascular disease rather than from chronic liver disease [2,6]. It is well established that insulin resistance is closely associated to NAFLD, and hepatic iron overload has emerged as a possible new factor involved not only in NAFLD but also in insulin resistance [16,17]. Studies of liver biopsies have observed hepatic stainable iron in around one-third of adults [144] and in one-quarter of children with biopsy-proven NAFLD [145]. Epidemiological studies have reported that excessive dietary iron intake and high body iron stores might increase the risk of DM-2 [146]. Likewise, laboratory and animal studies have found that iron overload induces insulin resistance [147–149], and one human study concluded that insulin sensitivity could be in part related to the accumulation of iron in the liver [150]. It has also been observed that a reduction in total iron body content by phlebotomy improves insulin resistance in patients with NAFLD and hyperferritinemia [17,151] and in those with normal serum ferritin concentrations [17,152]. However, two large prospective controlled trials on the impact of phlebotomy in individuals with NAFLD reported no improvement in insulin resistance or hepatic steatosis [153,154], and an autopsy study found no difference in hepatic iron content between individuals with and without DM-2 [155]. According to the above data, the relationship between iron accumulation in the liver and insulin resistance remains controversial. There has also been no definitive conclusion on the pathogenic relevance of the association of NAFLD and hepatic iron overload with insulin resistance. Our study hypothesis was that subclinical chronic inflammation may be involved in the association of intrahepatic triglycerides and intrahepatic iron with insulin resistance.

With this background, the objective of this study was to study the relationship of insulin resistance with intrahepatic triglycerides, quantified by 3T ¹H-MR spectroscopy, and intrahepatic iron, measured by MRI, analyzing their possible relationship with serum TNF α and adiponectin concentrations and lipid profile. The study was conducted in non-diabetic Caucasians to avoid the presence of DM-2 as confounding factor.

2. Design and Methods

Study population

The study included 104 healthy non-diabetic Caucasian adults aged between 25 and 70 years. Participants were consecutively recruited from among individuals undergoing examination at the Occupational Risk Prevention Unit in Granada (Southern Spain) for routine annual general checkup. Study exclusion criteria were: history of daily alcohol intake > 20 g (men) or > 10 g (women), based on responses to a validated questionnaire on alcohol consumption and confirmation of results by a family member; the presence of HBV/HCV serologic markers, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, Wilson's disease, cancer, diabetes mellitus, or endocrinal, cardiac, renal, or pulmonary disease; consumption of drugs that might cause steatosis (e.g. corticosteroids, amiodarone, methotrexate, or tamoxifen); BMI <18.5 or ≥40 kg/m²; and the wearing of a pacemaker or other device incompatible with ¹H-MRS. Hemochromatosis was excluded as follows: patients with serum ferritin levels >300 ng/mL for men, 150 ng/mL for women, and transferrin saturation >45% underwent screening for HFE mutations. We found no C282Y homozygote. HFE genotypes potentially predisposing to iron overload (C282Y/H63D, H63D/H63D or C282Y/wt) were excluded. This study was approved by the local ethics committee of Hospital San Cecilio of Granada. All participants received complete information and gave written informed consent to participate in the study.

Study design and anthropometric evaluations

All individuals recruited for the study had undergone a full medical history, physical examination, complete blood analysis, and ultrasound examination as part of the screening process. Their weight and height were also recorded, calculating their BMI (kg/m²), and their waist circumference was measured with soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest in standing position.

Laboratory analysis

Blood was drawn in the morning after overnight fasting. Serum ALT and aspartate aminotransferase (AST) concentrations were determined by a kinetic method (Cobas, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), serum glucose by the glucose oxidase (enzymatic)

method (Roche/Hitachi Analytics systems, Roche Diagnostics GmbH), adiponectin concentrations by radioimmunoassay, (Linco Research, St. Charles, MO, USA), serum Insulin by electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys 2010, Roche Diagnostics GmbH), serum TNF- α by human TNF-alpha enzyme-linked immunosorbent assay (Biosource Europe, Nivelles, Belgium), serum cholesterol by an enzymatic method (Roche Diagnostics GmbH) and serum ferritin concentrations by immunochemiluminescence in the Architect I2000 analyzer (Abbott Laboratories SA, Madrid, Spain). Insulin resistance was calculated according to the homeostasis model assessment method (HOMA-IR), as follows: $HOMA-IR = \text{fasting insulin (mU/L)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$ [102]. The presence of insulin resistance was defined as HOMA-IR values above 95th percentile in lean subjects (HOMA-IR value > 2.8). Coefficients of variation in the biochemical tests ranged from 3.1 to 9.9%.

3 Tesla MRI and ¹H-MRS examination

Non-contrast multiparametric 3T MRI was conducted as described elsewhere [171–173], using a Philips Achieva system (Royal Philips, Amsterdam, Netherlands).

Liver MR imaging consisted of a multi-echo chemical shift-based encoded gradient echo MR (MECSE-MR) sequence, using 12 echoes (TE's = 0.99 to 8.69, short echo spacing = 0.7 ms; TR = 10 ms) with a 10 flip angle to minimize T1 bias. The whole liver was covered under end-expiratory phase single breath-hold acquisition (34 slices; voxel dimensions, 3 x 3 mm; slice thickness, 7 mm; 0.3 mm gap; reconstruction voxel size, 2 x 2 mm; field of view, 375 x 302 mm; parallel imaging effective acceleration factor, 1.8; bandwidth, 2433 hertz per pixel) [172].

A three- plane localizer was used to plan the proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS), obtaining spectra with the body coil of the scanner, and monitoring breath-hold using a respiratory belt. A single voxel of 27cm³ (30 x 30 x 30mm) was selected within normal liver tissue in segment VI, avoiding the edge of the liver, the diaphragm, and major blood vessels. All spectra were obtained using the following stimulated echo acquisition mode sequence (STEAM): repetition time=8000 ms; echo time=20, 40, and 60 ms; number of signal averages=4; no water suppression; and bandwidth=2000 Hz. Data were acquired within a breath hold. T2 correction was applied and field homogeneity was adjusted automatically for each voxel.

3 Tesla MRI and ¹H-MRS analysis

Images were exported as raw data to quantify iron-related R2* measurements using QLiver software (QUIBIM, Valencia, Spain), which is based on least squares analysis by Levenberg–Marquardt algorithm. The algorithm performs the fitting of a sinusoid of water and fat signals modulated by exponential decays corresponding to R2* of water and R2* of fat. Only the R2* water component was considered for the R2* iron measurements, given the negligible R2* fat component. The R2* value was used to estimate iron content by averaging the mean value of three regions of interest (ROIs) within the right liver lobe, excluding vessels [173].

MRS images were reconstructed with Extended MR Workspace software (Royal Philips). Raw data were zero-filled once, with no filter, and were phase-corrected, Fourier-transformed, baseline-corrected, and averaged. A Marquardt curve was fitted, using a combined Lorentzian–Gaussian model to calculate the area under the curve of fat and water peaks. Spectra were referenced to residual water and the dominant methylene lipid (–CH₂) peak at δ=4.47 and δ=1.43 ppm, respectively. Fat fraction percentage (FF) was defined as $FA / (FA+WA) \times 100$, where FA is the area under the fat peak and WA is the area under the water peak.

All MRI and ¹H-MRS data were interpreted by an experienced radiologist blinded to the biochemical results.

NAFLD was defined by hepatic triglyceride content greater than 5.56% (5.56 g triglyceride/100 g wet liver tissue) as previously proposed, using the 95th percentile in lean subjects as reference [19]. Iron overload was defined by the 95th percentile of R2* values in lean subjects (R2* value > 75.7 seg⁻¹).

Statistical analysis

Results were expressed as means ± standard deviation (SD). The Kolmogorov-Smirnoff test was used to check the normality of the data distribution. Mean values were compared among groups with the unpaired Student's two-tailed t-test or nonparametric Mann-Whitney U test and one-way ANOVA followed by the Tukey multiple-comparison test, as appropriate. The chi-square test was used for non-continuous variables and to compare percentages. Correlations were examined by Pearson standard linear regression analysis (normal distribution) or by the

Spearman test (non-normal distribution). Backward stepwise regression analyses were conducted for evaluation of the main predictors of insulin resistance (hepatic triglyceride and hepatic iron contents) in our population of non-diabetic individuals, entering the following variables: age, sex, HOMA-IR (except for the HOMA-IR analysis) hepatic triglyceride content (except for hepatic triglycerides analysis) hepatic iron R2* (except for the intrahepatic iron analysis), waist circumference, BMI, and serum ALT, triglyceride, ferritin, adiponectin, and HDL-cholesterol (HDL-C) values. Only variables with $P < 0.05$ were retained in the final regression model. SPSS software for Windows version 22 (IBM SPSS Inc., Chicago IL) was used for data analyses.

3. Results

Table 1 displays the anthropometric and biochemical data of all participants and the characteristics of individuals with and without NAFLD. In comparison to individuals without NAFLD, the age, BMI, waist circumference, HOMA-IR, and serum ALT, glucose, fasting insulin, and TNF α concentrations were significantly higher and serum adiponectin and HDL-cholesterol concentrations significantly lower in the individuals with NAFLD. The same trend can be observed in the comparison between individuals with and without hepatic iron overload in Table 2, except that there was no difference in serum TNF α and HDL-cholesterol concentrations. Hepatic iron overload was recorded in 26.6% (16/ 60) of the individuals with NAFLD and was in 0% (0/44) of those without. Table 3 exhibits the comparisons between individuals with and without insulin resistance, showing that the mean age, BMI, waist circumference, intrahepatic iron, intrahepatic triglycerides and serum ALT, triglycerides, fasting insulin, ferritin, and TNF α concentrations were significantly higher and serum adiponectin and HDL-cholesterol concentrations significantly lower in participants with *versus* without insulin resistance. Figure 1 depicts the proportion of participants with insulin resistance in the different groups, showing the presence of insulin resistance in 4.54% (2/44) of those with neither NAFLD nor hepatic iron overload, 45.45% (20 out of 44) of those with NAFLD without hepatic iron overload, and in 87.5% (14 out of 16) of those with both NAFLD and hepatic iron overload.

CORRELATION STUDIES

Complete results of the correlation studies are exhibited in table 4, and significant correlations alone are reported below.

Correlations of HOMA-IR

HOMA-IR was significantly and positively correlated with hepatic triglyceride content (r: 0.56, $p < 0.001$), hepatic iron content (r: 0.52, $p < 0.001$), age (r: 0.63, $p < 0.001$), waist circumference (r: 0.64, $p < 0.001$), BMI (r: 0.60, $p < 0.001$), serum ferritin (r: 0.28, $p < 0.05$), ALT (r: 0.27, $p < 0.05$), serum TNF α (r: 0.28, $p < 0.04$) and serum triglyceride (r: 0.38, $p < 0.05$), while it was significantly and inversely correlated with serum adiponectin concentrations (r: -0.35, $p < 0.01$).

Correlations of hepatic triglyceride content

Hepatic triglyceride content was significantly and positively correlated with HOMA-IR (r: 0.56, $p < 0.001$), hepatic iron content (r: 0.57, $p < 0.001$), age (r: 0.33, $p < 0.01$), waist circumference (r: 0.59, $p < 0.001$), BMI (r: 0.56, $p < 0.001$), and serum concentrations of ferritin (r: 0.41, $p < 0.01$), ALT (r: 0.78, $p < 0.001$), TNF α (r: 0.28, $p < 0.01$) and triglycerides (r: 0.34, $p < 0.01$) and was inversely correlated with serum adiponectin (r: -0.41, $p < 0.001$) and HDL-cholesterol (r: -0.3, $p < 0.02$) concentrations.

Correlations of hepatic iron content

Hepatic iron content was significantly and positively correlated with HOMA-IR (r: 0.52, $p < 0.001$), hepatic triglyceride content (r: 0.57, $p < 0.001$), age (r: 0.50, $p < 0.001$), waist circumference (r: 0.49, $p < 0.001$), BMI (r: 0.39, $p < 0.01$), and serum ferritin (r: 0.62, $p < 0.001$), ALT (r: 0.47, $p < 0.001$) and triglyceride (r: 0.26, $p < 0.05$) concentrations and were inversely correlated with serum adiponectin (r: -0.45, $p < 0.001$) and HDL-cholesterol (r: -0.22, $p < 0.05$) concentrations.

Correlations of serum TNF α

Serum TNF α concentrations were significantly and positively correlated with HOMA-IR (r: 0.28, $p < 0.04$), hepatic triglyceride content (r: 0.28, $p < 0.01$), waist circumference (r: 0.38, $p < 0.02$), BMI (r: 0.39, $p < 0.02$), and serum ALT (r: 0.2, $p < 0.05$) and triglyceride (r: 0.22, $P < 0.03$) concentrations

and were inversely correlated with serum adiponectin ($r: -0.23, p<0.04$) and HDL-cholesterol ($r: -0.51, p<0.001$) concentrations.

Correlations of serum ferritin

Serum ferritin concentrations were significantly and positively correlated with HOMA-IR ($r: 0.28, p<0.05$), hepatic triglyceride content ($r: 0.41, p<0.01$), hepatic iron content ($r: 0.62, p<0.001$), age ($r: 0.26, p<0.01$), waist circumference ($r: 0.54, p<0.001$), BMI ($r: 0.38, p<0.001$), and ALT ($r: 0.62, p<0.001$) and triglyceride ($r: 0.22, P<0.02$) concentrations and were inversely correlated with serum adiponectin ($r: -0.50, p<0.001$) and HDL-cholesterol ($r: -0.38, p<0.001$) concentrations.

REGRESSION ANALYSIS

In the **backward stepwise multiple regression analysis of the main determinants of insulin resistance (HOMA-IR)**, hepatic triglyceride content was the most important predictor (B-coefficient = 0.144; SE = 0.044; $p<0.003$), age (B-coefficient = 0.095; SE = 0.034; $p<0.009$) and serum TNF α were also significant (B-coefficient = 0.048; SE = 0.026; $p<0.047$). No other variable reached $p<0.05$.

In the **backward stepwise multiple regression analysis of the main determinants of hepatic triglyceride content**, hepatic iron content was the most important determinant (B-coefficient = 0.293; SE = 0.076; $p<0.0001$). Serum TNF α was also significant (B-coefficient = 0.047; SE = 0.021; $p<0.032$). Only significant variables ($p<0.05$) are shown.

In the **backward stepwise multiple regression analysis of the main determinants of hepatic iron content**, hepatic triglyceride content was the most important predictor (B-coefficient = 0.985; SE = 0.251; $p<0.0001$), and serum ferritin (B-coefficient = 0.029; SE = 0.013; $p<0.030$) was also significant. No other variable reached $p<0.05$.

4. Discussion

In this study of individuals without DM-2, insulin resistance was associated closely with hepatic triglyceride content and to a lesser extent with hepatic iron content, which showed an interplay between them. High serum TNF α concentrations may contribute to the association between

Anexo

NAFLD and insulin resistance. In the present investigation, hepatic iron overload was found in only one-third of individuals with NAFLD and in none of those without NAFLD, suggesting that increased intrahepatic triglycerides may be important for the development of hepatic iron overload in patients with neither DM-2 nor hemochromatosis.

It has been widely debated whether insulin resistance is a cause or consequence of NAFLD, and it is now generally accepted that insulin resistance both causes and appears to be a consequence of NAFLD [12,14,15]. The association of liver fat accumulation with insulin resistance is well established but there is substantial between-patient variation, mainly attributed to genetic and environmental factors [14]. These include iron overload, which has been implicated in the pathogenesis of insulin resistance [148,177,178], consistent with our findings of greater hepatic iron content in subjects with than without insulin resistance and of a significant positive correlation between hepatic iron and HOMA-IR values. However, the amount of iron in the liver was not a significant determinant of insulin resistance in the present study, while insulin resistance was observed in 45.45% of individuals with NAFLD and without hepatic iron overload and in 87.5% of those with both NAFLD and liver iron overload. These data suggest that insulin resistance is more strongly associated with NAFLD than with hepatic iron overload and that there is an interplay between them, as previously suggested in regard to insulin sensitivity [150]. In addition, unlike intrahepatic iron, intrahepatic triglyceride content was a significant determinant of insulin resistance in the regression analysis, supporting the greater impact of NAFLD. The pathogenic link among NAFLD, intrahepatic iron, and insulin resistance remains unclear. Our study hypothesis was that increased intrahepatic triglycerides and/or iron might contribute to insulin resistance through changes in the secretion of cytokines commonly found in different chronic liver diseases [179,180] and NAFLD [15,140] as an expression of subclinical inflammation. Interestingly, serum TNF α concentrations were higher in individuals with *versus* without NAFLD and in those with *versus* without insulin resistance in the present study, but there was no significant difference between those with *versus* without hepatic iron overload. Furthermore, serum TNF α values were positively correlated with intrahepatic triglyceride content but not with intrahepatic iron content, and the regression analysis showed that serum TNF α concentrations were a significant determinant of both intrahepatic triglyceride content and insulin resistance. Taken together, these findings suggest that serum TNF α may

play a role in the association of insulin resistance with NAFLD rather than with intrahepatic iron. Likewise, serum TNF α concentrations exerted a negative influence on serum adiponectin and lipid profile.

To our best knowledge, this is the first published study on the relationship of intrahepatic triglycerides and intrahepatic iron content with insulin resistance and serum TNF α concentrations in Caucasian adults without DM-2. We have no ready explanation for the potential negative effect of hepatic iron accumulation on insulin resistance; however, our finding of no association between hepatic iron and serum TNF concentrations suggest that intrahepatic iron-associated subclinical inflammation may not play a role in the development of insulin resistance, although a possible role of oxidative stress cannot be ruled out [181].

Serum ferritin is not only an established marker of body iron stores but also a biomarker of inflammation, and elevated concentrations have been associated with insulin resistance [182]. Serum ferritin concentrations were positively correlated with insulin resistance, intrahepatic triglycerides, and intrahepatic iron in the present study but not with serum TNF concentrations and, more importantly, they proved to be a significant determinant of intrahepatic iron content in the regression analysis. Together with the positive relationship of serum ferritin concentrations with serum triglyceride and ALT concentrations and their negative relationship with serum adiponectin and HDL-cholesterol concentrations, these findings support the idea that serum ferritin concentrations in NAFLD patients reflect an increase in intrahepatic iron and possibly in insulin resistance and in the metabolic consequences of NAFLD rather than subclinical inflammation [183]. As noted above, clinical studies have reported discordant results on the relationship of increased body iron stores and serum ferritin concentrations with DM-2 [155,184,185] and on the effect of phlebotomy on insulin resistance [17,151,153,154]. These discrepancies may be explained at least in part by our finding that less than one-third of individuals with NAFLD have hepatic iron overload and that increased iron in the liver appears to play a minor role in insulin resistance, although it may influence the association between NAFLD and insulin resistance. We therefore speculate that only a specific subgroup of patients with NAFLD may benefit from phlebotomy.

Anexo

We also studied the association of HOMA-IR with BMI and waist circumference, finding positive univariate correlations of HOMA-IR with hepatic triglyceride content as well as with BMI and waist circumference. Nevertheless, in multivariate regression analysis adjusted for hepatic triglyceride content, neither BMI nor waist circumference was an independent predictor of HOMA-IR, suggesting that the relationship of BMI and waist circumference with HOMA-IR may be largely mediated by an increase in intrahepatic triglycerides. The percentage of participants with NAFLD was higher than previously reported in a general population using MRS for liver triglycerides quantification [21]. This discrepancy may be in part due to ethnic differences, given that our study population was exclusively Caucasian, whereas 48% of participants in the aforementioned study were black individuals, among whom the prevalence of NAFLD has been described as significantly lower [35]. In addition, there was a high proportion of overweight and obese participants in our study (24.27% lean, 51.46% overweight and 24.27% obese), and there is a clear link between BMI and NAFLD. However, we do not consider that this influenced our findings on the association among insulin resistance, iron overload, and liver fat content, because all participants were healthy and non-diabetic.

Besides its cross-sectional design, study limitations include the lack of liver biopsies and histological data, although no participants had overt liver disease by ultrasound examination and hepatic MRI, and the assessment of liver injury was not the main endpoint. In addition, abdominal visceral adipose tissue would have been more accurately measured by MRI. However, although waist circumference may represent visceral and subcutaneous fat, it is easy to measure and has been described as the most reliable surrogate marker of visceral adiposity [36], with reports of a strong correlation between waist circumference and MRI-assessed visceral adiposity [37]. We also used HOMA-IR to measure insulin resistance instead of the more accurate euglycemic clamp method. Nevertheless, in non-diabetic persons, HOMA-IR can serve as a surrogate for insulin resistance and is considered an acceptable alternative to more expensive and time-consuming dynamic testing [18,102]". Although the sample size provided adequate statistical power, further studies in larger samples are warranted.

Study strengths include the utilization of MRI to quantify hepatic iron content and ¹H-MRS to measure triglyceride content, and the adoption of strict exclusion criteria (e.g., presence of DM-

2) to avoid possible confounding factors. Furthermore, all anthropometric, biochemical, MRI, and ¹H-MRS data were gathered within a 48-hour period.

In conclusion, these results indicate that insulin resistance is associated closely with hepatic triglyceride content and to a lesser extent with hepatic iron content. An interplay was observed between NAFLD and hepatic iron overload, with the former showing a greater impact. High serum TNF α concentrations may contribute to the association between NAFLD and insulin resistance. Increased intrahepatic triglyceride accumulation appears determinant for the development of hepatic iron overload in non-diabetic subjects without hemochromatosis.

Conflict of Interest: The authors have nothing to disclose.

Funding: This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

Author Contributions: JLMR researched data. JGC wrote the manuscript and researched data. AGC reviewed/edited the manuscript. LMB and AAG contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. TGC researched data and contributed to discussion. JLGC wrote the manuscript.

Acknowledgments: Dr. Jorge Gonzalez-Cantero is guarantor of the study and a PhD candidate at the University of Granada. The authors thank those responsible for the PhD Program in Clinical Medicine and Public Health at the University of Granada.

REFERENCES

- [1] Adams LA, Anstee QM, Tilg H, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut* 2017;66:1138–53. doi:10.1136/gutjnl-2017-313884.
- [2] Rafiq N, Bai C, Fang YUN, Srishord M, Mccullough A, Gramlich T, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *YJCGH* 2009;7:234–8. doi:10.1016/j.cgh.2008.11.005.
- [3] Huth C, Beuerle S, Zierer A, Heier M, Herder C, Kaiser T, et al. Biomarkers of iron metabolism are independently associated with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the KORA F4 study. *Eur J Endocrinol* 2015;173:643–53. doi:10.1530/EJE-15-0631.
- [4] Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, et al. Iron Depletion by Phlebotomy Improves Insulin Resistance in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hyperferritinemia: Evidence from a Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1251–8. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01192.x.
- [5] Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, Yeh MM, Kleiner DE, Unalp-Arida A, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011;53:448–57. doi:10.1002/hep.24038.
- [6] Manco M, Alisi A, Real J-MF, Equitani F, DeVito R, Valenti L, et al. Early interplay of intra-hepatic iron and insulin resistance in children with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011;55:647–53. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.007.
- [7] Bao W, Rong Y, Rong S, Liu L. Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2012;10:119. doi:10.1186/1741-7015-10-119.
- [8] Choi JS, Koh I-U, Lee HJ, Kim WH, Song J. Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2013;24:1634–44. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.02.004.
- [9] Dongiovanni P, Ruscica M, Rametta R, Recalcati S, Steffani L, Gatti S, et al. Dietary Iron Overload Induces Visceral Adipose Tissue Insulin Resistance. *Am J Pathol* 2013;182:2254–63. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.019.
- [10] Green A, Basile R, Rumberger JM. Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes. *Metabolism* 2006;55:1042–5. doi:10.1016/j.metabol.2006.03.015.
- [11] Haap M, Machann J, von Friedeburg C, Schick F, Stefan N, Schwenzer NF, et al. Insulin Sensitivity and Liver Fat: Role of Iron Load. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E958–61. doi:10.1210/jc.2010-2682.
- [12] Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Rovida S, Rametta R, Fatta E, et al. A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol* 2014;20:3002. doi:10.3748/wjg.v20.i11.3002.
- [13] Valenti L, Moscatiello S, Vanni E, Fracanzani AL, Bugianesi E, Fargion S, et al. Venesection for non-alcoholic fatty liver disease unresponsive to lifestyle counselling--a propensity score-adjusted observational study. *QJM* 2011;104:141–9. doi:10.1093/qjmed/hcq170.
- [14] Adams LA, Crawford DH, Stuart K, House MJ, St. Pierre TG, Webb M, et al. The impact of phlebotomy in nonalcoholic fatty liver disease: A prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2015;61:1555–64. doi:10.1002/hep.27662.
- [15] Lainé F, Ruivard M, Loustaud-Ratti V, Bonnet F, Calès P, Bardou-Jacquet E, et al. Metabolic and hepatic effects of bloodletting in dysmetabolic iron overload syndrome: A randomized controlled study in 274 patients. *Hepatology* 2017;65:465–74. doi:10.1002/hep.28856.
- [16] Dinneen SF, Silverberg JD, Batts KP, O'Brien PC, Ballard DJ, Rizza RA. Liver iron stores in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1994;69:13–5.
- [17] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [18] Martí-Bonmatí L, Alberich-Bayarri A, Sánchez-González J. Overload hepatitides: quantitative analysis. *Abdom Imaging* 2012;37:180–7. doi:10.1007/s00261-011-9762-5.

- [19] França M, Alberich-Bayarri Á, Martí-Bonmatí L, Oliveira P, Costa FE, Porto G, et al. Accurate simultaneous quantification of liver steatosis and iron overload in diffuse liver diseases with MRI. *Abdom Radiol* 2017;42:1434–43. doi:10.1007/s00261-017-1048-0.
- [20] França M, Martí-Bonmatí L, Porto G, Silva S, Guimarães S, Alberich-Bayarri Á, et al. Tissue iron quantification in chronic liver diseases using MRI shows a relationship between iron accumulation in liver, spleen, and bone marrow. *Clin Radiol* 2018;73:215.e1-215.e9. doi:10.1016/j.crad.2017.07.022.
- [21] Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E462–8. doi:10.1152/ajpendo.00064.2004.
- [22] Gastaldelli A. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD? *Clin Sci* 2017;131:2701–4. doi:10.1042/CS20170987.
- [23] Caprio S, Perry R, Kursawe R. Adolescent Obesity and Insulin Resistance: Roles of Ectopic Fat Accumulation and Adipose Inflammation. *Gastroenterology* 2017;152:1638–46. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.051.
- [24] Gonzalez-Cantero J, Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL. Insulin resistance in lean and overweight nondiabetic Caucasian adults: Study of its relationship with liver triglyceride content, waist circumference and BMI. *PLoS One* 2018;13. doi:10.1371/journal.pone.0192663.
- [25] FARGION S, DONGIOVANNI P, GUZZO A, COLOMBO S, VALENTI L, FRACANZANI AL. Iron and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:61–3. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02599.x.
- [26] Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, et al. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2012;122:3529–40. doi:10.1172/JCI44421.
- [27] Gonzalez-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fernandez-Perez R, Casado-Caballero F, Ruiz-Escolano E, Olivares EG. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4325–30. doi:10.1210/jc.2004-0077.
- [28] González-Calvin JL, Mundi JL, Casado-Caballero FJ, Abadia AC, Martín-Ibañez JJ. Bone Mineral Density and Serum Levels of Soluble Tumor Necrosis Factors, Estradiol, and Osteoprotegerin in Postmenopausal Women with Cirrhosis after Viral Hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4844–50. doi:10.1210/jc.2009-0835.
- [29] Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero J, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL. Diagnostic accuracy of serum alanine aminotransferase as biomarker for nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in healthy subjects, using 3T MR spectroscopy. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e6770. doi:10.1097/MD.0000000000006770.
- [30] Messner DJ, Rhieu BH, Kowdley K V. Iron Overload Causes Oxidative Stress and Impaired Insulin Signaling in AML-12 Hepatocytes. *Dig Dis Sci* 2013;58:1899–908. doi:10.1007/s10620-013-2648-3.
- [31] Fernández-Real JM, Manco M. Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:513–26. doi:10.1016/S2213-8587(13)70174-8.
- [32] Ryan JD, Armitage AE, Cobbold JF, Banerjee R, Borsani O, Dongiovanni P, et al. Hepatic iron is the major determinant of serum ferritin in NAFLD patients. *Liver Int* 2018;38:164–73. doi:10.1111/liv.13513.
- [33] Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1978–83.
- [34] Montonen J, Boeing H, Steffen A, Lehmann R, Fritsche A, Joost H-G, et al. Body iron stores and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Diabetologia* 2012;55:2613–21. doi:10.1007/s00125-012-2633-y.
- [35] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nurenberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387–95. doi:10.1002/hep.20466.
- [36] Onat A, Avci GŞ, Barlan MM, Uyarel H, Uzunlar B, Sansoy V. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes* 2004;28:1018–25. doi:10.1038/sj.ijo.0802695.

Anexo

- [37] Kullberg J, von Below C, Lönn L, Lind L, Ahlström H, Johansson L. Practical approach for estimation of subcutaneous and visceral adipose tissue. *Clin Physiol Funct Imaging* 2007;27:148–53. doi:10.1111/j.1475-097X.2007.00728.x.
- [38] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67:328–57. doi:10.1002/hep.29367.

Table 1. Characteristics of participants in total and as classified by hepatic triglyceride content.

	Total participants n=104	NAFLD		p
		Absent (42.31%) n= 44	Present (57.69%) n= 60	
Sex (m/f)	59/45	19/25	40/20	0.017
Age (years)	45.11±10.03	41.64±8.89	47.65±10.11	0.002
Body Mass Index (Kg/m ²)	27.81±4.31	25.26±3.42	29.71±3.92	0.001
Waist Circumference (cm)	97.25±14.38	88.02±12.06	104.26±11.88	0.001
Cholesterol (mg/dl)	195.27±41.69	192.36±42.87	197.40±41.03	0.545
HDL-C (mg/dl)	55.35±15.64	61.45±15.17	50.87±14.53	0.001
LDL-C (mg/dl)	117.59±37.33	112.89±34.91	121.03±38.93	0.274
Triglycerides (mg/dl)	110.86±71.40	85.20±65.12	130.00±70.36	0.001
Serum AST (IU/L)	26.04±9.89	22.00±7.86	29.00±10.23	0.001
Serum GGT (IU/L)	41.50±37.81	28.32±23.94	51.17±43.06	0.001
Serum ALT (IU/L)	34.75±22.64	19.98±6.91	45.58±24.05	0.001
Fasting Glucose (mg/dl)	92.54±9.36	91.66±6.52	93.19±11.00	0.377
Fasting Insulin (µU/ml)	9.37±6.18	6.26±2.55	13.72±7.15	0.001
HOMA-IR	2.17±1.52	1.41±0.61	3.24±1.78	0.001
Serum Fe (µg/dl)	93.67±35.68	86.16±34.65	99.35±35.75	0.090
Ferritin (ng/mL)	142.36±128.84	70.42±68.25	197.09±137.49	0.001
Transferrin saturation (%)	24.86±12.37	18.00±10.64	27.50±12.32	0.150
Hepatic Iron R2* (s ⁻¹)	57.95±18.38	47.68±10.82	66.21±19.11	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	10.87±10.20	2.54±1.45	16.99±9.51	0.001
TNF-α (pg/ml)	164.29±42.98	150.53±31.35	174.39±47.58	0.003
Adiponectin (µg/ml)	11.07±9.09	15.47±9.53	7.84±7.28	0.001

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNFα, tumor necrosis factor-α. p: comparison between absence versus presence of NAFLD.

Table 2. Characteristics of participants classified by hepatic iron content (n=104).

	Hepatic Iron Overload		<i>p</i>
	Absent (84.79%) N= 88	Present (15.21%) n= 16	
Sex (m/f)	52/36	9/7	0.899
Age (years)	43.81±10.14	54.00±7.05	0.001
Body Mass Index (Kg/m ²)	27.22±4.47	29.06±2.10	0.038
Waist Circumference (cm)	95.27±15.06	103.14±4.26	0.050
Cholesterol (mg/dl)	194.51±44.24	198.64±32.30	0.431
HDL-C (mg/dl)	54.92±15.57	51.50±15.49	0.453
LDL-C (mg/dl)	117.45±39.23	118.86±29.74	0.625
Triglycerides (mg/dl)	106.85±70.18	145.43±80.82	0.040
Serum AST (IU/L)	25.88±10.51	28.79±8.93	0.101
Serum GGT (IU/L)	40.08±39.92	45.00±30.12	0.150
Serum ALT (IU/L)	32.09±20.22	49.43±33.35	0.007
Fasting Glucose (mg/dl)	92.31±8.66	94.57±11.63	0.493
Fasting Insulin (μU/ml)	7.84±4.83	21.45±4.54	0.002
HOMA-IR	1.81±1.23	5.06±1.20	0.003
Serum Fe (μg/dl)	92.73±35.01	115.22±40.32	0.101
Ferritin (ng/mL)	133.18±115.34	285.52±178.05	0.011
Transferrin saturation (%)	23.75±11.32	37.90±5.23	0.104
Hepatic Iron R2* (s ⁻¹)	52.01±11.65	91.05±13.07	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	7.63±6.70	19.97±10.84	0.001
TNF-α (pg/ml)	162.98±37.26	159.98±36.05	0.728
Adiponectin (μg/ml)	11.87±9.56	5.96±4.08	0.023

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNFα, tumor necrosis factor-α.

Table 3. Characteristics of participants classified by insulin resistance (n=104).

	Insulin Resistance		<i>p</i>
	Absent (75%) n= 78	Present (25%) n= 26	
Sex (m/f)	39/39	15/11	0.620
Age (years)	38.50±7.52	51.75±9.46	0.001
Body Mass Index (Kg/m ²)	25.59±3.64	31.45±4.51	0.001
Waist Circumference (cm)	87.49±11.98	107.50±10.65	0.000
Cholesterol (mg/dl)	183.33±39.46	197.50±35.61	0.284
HDL-C (mg/dl)	58.19±14.17	48.17±13.86	0.035
LDL-C (mg/dl)	109.53±39.12	122.75±32.46	0.194
Triglycerides (mg/dl)	76.77±35.07	129.67±57.36	0.003
Serum AST (IU/L)	26.86±12.65	25.42±3.92	0.431
Serum GGT (IU/L)	27.83±22.94	52.08±44.59	0.008
Serum ALT (IU/L)	28.03±16.99	38.17±11.07	0.008
Fasting Glucose (mg/dl)	89.43±8.26	96.42±7.05	0.018
Fasting Insulin (μU/ml)	6.30±2.62	18.58±4.23	0.001
HOMA-IR	1.42±.65	4.42±1.07	0.001
Serum Fe (μg/dl)	88.18±32.62	106.67±41.21	0.204
Ferritin (ng/mL)	95.17±88.33	215.06±148.84	0.009
Transferrin saturation (%)	16.97±4.64	40.20±13.72	0.083
Hepatic Iron R2* (s ⁻¹)	47.53±9.44	67.20±17.49	0.001
Hepatic Triglycerides (%)	5.71±6.87	16.85±10.91	0.001
TNF-α (pg/ml)	162.24±49.37	191.32±52.39	0.051
Adiponectin (μg/ml)	17.21±10.03	11.40±10.75	0.043

ALT, alanine aminotransferase, AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNFα, tumor necrosis factor-α.

Table 4. Correlation studies.

	HOMA-IR	Hepatic triglyceride content	Hepatic iron content	Serum TNF α	Serum ferritin
HOMA-IR	-	r: 0.56 p<0.001	r: 0.52 p<0.001	r: 0.28 p<0.04	r: 0.28 p<0.05
Hepatic triglyceride content (%)	r: 0.56 p<0.001	-	r: 0.57 p<0.001	r: 0.28 p<0.01	r: 0.41 p<0.01
Hepatic iron content (s ⁻¹)	r: 0.52 p<0.001	r: 0.57 p<0.001	-	r: 0.026 p<0.793	r: 0.62 p<0.001
Age (years)	r: 0.63 p<0.001	r: 0.33 p<0.01	r: 0.50 p<0.001	r: -0.140 p<0.126	r: 0.26 p<0.01
Waist circumference (cm)	r: 0.64 p<0.001	r: 0.59 p<0.001	r: 0.49 p<0.001	r: 0.38 p<0.02	r: 0.54 p<0.001
BMI (Kg/m ²)	r: 0.60 p<0.001	r: 0.56 p<0.001	r: 0.39 p<0.01	r: 0.39 p<0.02	r: 0.38 p<0.001
Serum ferritin (ng/mL)	r: 0.28 p<0.05	r: 0.41 p<0.01	r: 0.62 p<0.001	r: 0.005 p<0.966	-
ALT (IU/L)	r: 0.27 p<0.05	r: 0.78 p<0.001	r: 0.47 p<0.001	r: 0.2 p<0.05	r: 0.62 p<0.001
Serum TNF α (pg/ml)	r: 0.28 p<0.04	r: 0.28 p<0.01	r: 0.026 p<0.793	-	r: 0.005 p<0.966
Serum triglyceride (mg/dl)	r: 0.38 p<0.05	r: 0.34 p<0.01	r: 0.26 p<0.05	r: 0.22 p<0.03	r: 0.22 p<0.02
Serum adiponectin (μ g/ml)	r: -0.35 p<0.01	r: -0.41 p<0.001	r: -0.45 p<0.001	r: -0.23 p<0.04	r: -0.50 p<0.001
HDL-cholesterol (mg/dl)	r: -0.204 p<0.139	r: -0.3 p<0.02	r: -0.22 p<0.05	r: -0.51 p<0.001	r: -0.38 p<0.001

HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF α , tumor necrosis factor- α ; BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferase; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol.

Table 5. Backward stepwise multiple regression analysis of the main determinants of insulin resistance (HOMA-IR).

	B-coefficient	S.E.	Sig.	95%CI
Hepatic triglyceride content (%)	0.144	0.044	0.003	(0.054-0.234)
Age (years)	0.095	0.034	0.009	(0.025-0.165)
Serum TNF α (pg/ml)	0.048	0.026	0.047	(0.997-1.103)

HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; S.E., standard error; Sig. significance; 95%CI, 95% confidence interval; TNF α , tumor necrosis factor- α .

Table 6. Backward stepwise multiple regression analysis of the main determinants of hepatic triglyceride content.

	B-coefficient	S.E.	Sig.	95%CI
Hepatic iron content (pg/ml)	0.293	0.076	0.0001	(0.139-0.446)
Serum TNF α (pg/ml)	0.047	0.021	0.032	(0.004-0.090)

HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; S.E., standard error; Sig. significance; 95%CI, 95% confidence interval; TNF α , tumor necrosis factor- α .

Table 7. Backward stepwise multiple regression analysis of the main determinants of hepatic iron content.

	B-coefficient	S.E.	Sig.	95%CI
Hepatic triglyceride content (%)	0.985	0.251	0.0001	(0.475-1.494)
Serum ferritin (ng/mL)	0.029	0.013	0.030	(0.003-0.055)

S.E., standard error; Sig. significance; 95%CI, 95% confidence interval.

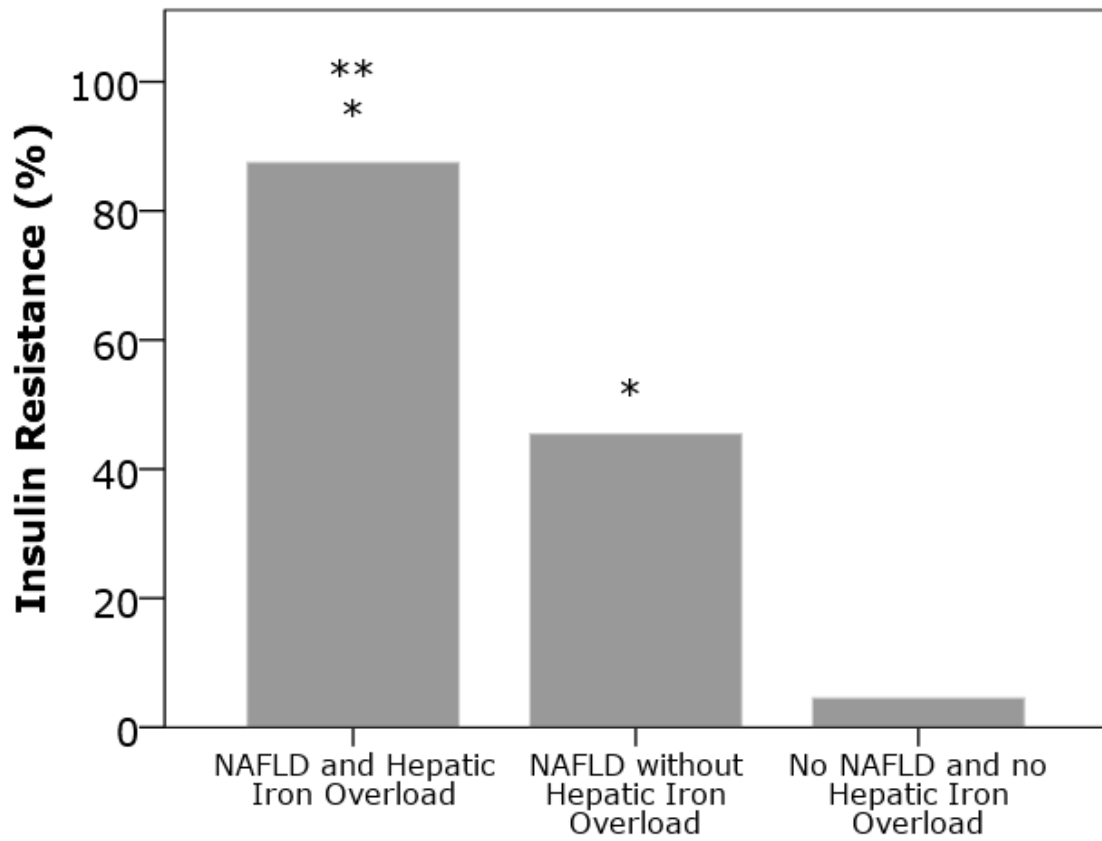


Figure Legend:

Figure: Percentage of participants with insulin resistance in the different groups. No participant had Hepatic Iron Overload without NAFLD (0/44).

** $p < 0.001$ versus "No NAFLD and no Hepatic Iron Overload"

* $p < 0.01$ versus "NAFLD without Hepatic Iron Overload" or versus "No NAFLD and no Hepatic Iron Overload".

8.3.ARTÍCULO TERCERO

Diagnostic accuracy of serum alanine aminotransferase as biomarker for nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in healthy subjects, using 3T MR spectroscopy

Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero J, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL.

Medicine (Baltimore). 2017 Apr;96(17):e6770.

DOI: 10.1097/MD.0000000000006770

INDICADORES DE CALIDAD

Impact Factor: 2.028 (2017); 2.07 (5 años)

<i>Categoría de JCR®</i>	<i>Clasificación en la categoría</i>	<i>Cuartil en la categoría</i>
MEDICINE, GENERAL & INTERNAL	56 de 154	Q2

Diagnostic accuracy of serum alanine aminotransferase as biomarker for nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in healthy subjects, using 3T MR Spectroscopy

Jose Luis Martin-Rodriguez ¹, Jorge Gonzalez-Cantero ², Alvaro Gonzalez-Cantero ³,

Juan Pedro Arrebola ⁴, Jorge Luis Gonzalez-Calvin ⁵.

¹Department of Radiology University Hospital San Cecilio Granada Spain;

²Department of Radiology HGU Gregorio Marañón Madrid Spain; and University of Granada Spain

³Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, Castilla-La Mancha;

⁴Complejo Hospitalario Universitario de Granada Instituto de Investigación Biosanitaria ibs CIBERESP Granada Spain;

⁵Department of Gastroenterology University Hospital San Cecilio. University of Granada. Spain.

Corresponding author and person to whom print requests should be addressed:

Gonzalez-Cantero Jorge, MD

Department of Radiology, HGU Gregorio Marañón

C/ Doctor Esquerdo, 46 28007 Madrid, SPAIN,

Phone: +34-91-5868000

e-mail: jorgegonzalezcantero@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Recognition of the close relationship of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with diabetes mellitus 2, obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease has stimulated growing interest in NAFLD as a public health problem. Serum ALT has been proposed as a marker of NAFLD, but levels in a large proportion of NAFLD cases are within the range currently considered “normal”.

Objective: To determine the diagnostic accuracy of serum ALT for identifying individuals with NAFLD using 3 Tesla magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS).

Methods: A cross-sectional study was conducted in 129 healthy subjects. Liver triglyceride content was quantified by ¹H-MRS. NAFLD was defined as liver triglyceride content > 5.56%.

Results: Liver triglyceride content was >5.56% in 79 participants (NAFLD) and lower in the remaining 50 (normal). Serum ALT levels were positively correlated with liver triglyceride content (r: 0.58; p<0.001), HOMA-IR (r: 0.32; p<0.01), and fasting insulin (r: 0.31; p<0.01) and were inversely correlated with adiponectin (r: 0.35; p<0.01) and HDL-cholesterol (r: 0.32; p<0.01). Regression analysis showed that serum ALT was the best predictor of NAFLD (p<0.01). Optimal serum ALT cutoff to predict NAFLD was 23 IU/L (area under ROC curve: 0.93; sensitivity: 0.94; specificity: 0.72).

Conclusions: This study shows that serum ALT is a sensitive and accurate biomarker of NAFLD if a lower “normal” ALT value is considered. An ALT threshold of 23 IU/L identified 94% of individuals with NAFLD in the present series, using 3 T ¹H-MRS for liver triglyceride quantification.

Key words: NAFLD; Insulin Resistance; Magnetic Resonance Spectroscopy; Sensitivity and Specificity.

INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as fat accumulation in the liver in the absence of significant alcohol consumption or any other etiology for secondary hepatic steatosis. It is considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome (MetS), and is the most frequent cause of aminotransferase elevation [20]. NAFLD encompasses simple hepatic steatosis, i.e., the accumulation of triglycerides in the liver with no evidence of hepatocyte injury or inflammation, and nonalcoholic steatohepatitis, i.e., the presence of hepatic steatosis with hepatocellular injury and inflammation that may eventually progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [20,21].

The prevalence of NAFLD varies widely from 10-52% in the general population and up to 60-90% in high-risk individuals with obesity, type 2 Diabetes (T2DM), and/or MetS [1,5,20,23,139,199]. Estimates from liver biopsy series indicate that the prevalence of nonalcoholic steatohepatitis is much lower, ranging from 2% to 5% [1]. Studies on the long-term outcome of patients with NAFLD reported their more frequent death from cardiovascular disease (CVD) than from liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma [5,6].

Recognition of the close relationship of NAFLD with obesity [156], T2DM [3], MetS [22,157], insulin resistance [7], and CVD [4,158,159] has stimulated growing interest in NAFLD as a public health problem and in the search for a marker to identify individuals with NAFLD in the general population. After the demonstration by epidemiological and clinical studies of a frequent association between increased liver fat content and serum alanine aminotransferase (ALT) elevation, serum ALT has been proposed as a surrogate marker for NAFLD [160]. Nevertheless, only a proportion of patients with NAFLD have elevated serum ALT levels [7,139,160–163]

Given that serum ALT values within the current “normal” range have been associated with NAFLD and a higher risk of cardiometabolic disorders, individuals with these conditions are included in the apparently healthy population considered “normal”. Therefore, it has been suggested that the upper “normal” limit for serum ALT should be re-evaluated in order to facilitate the identification of individuals with NAFLD [160,164]. After a retrospective study of liver biopsies in 133 HCV antibody-positive persons and ultrasound findings in 59 HCV

antibody-negative blood donors, Prati et al. proposed a decrease in the upper limit of “normal” serum ALT levels to ≤ 30 IU/L in men and ≤ 19 IU/L in women to detect more cases of hepatitis C viremia [165], but no consensus has been reached on these proposals [166]. Recent cross-sectional studies are available on the sensitivity and specificity of serum ALT as a biomarker of NAFLD [159,167–169]. However, the NAFLD diagnosis in these studies was exclusively based on ultrasound imaging and was not confirmed by liver biopsy or Proton Magnetic Resonance Spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$), which is the noninvasive gold standard for liver triglyceride quantification [19,136] and widely validated in clinical and epidemiological studies [7,24,170]. Liver ultrasound examination is not sufficiently sensitive in cases of mild and moderate steatosis and is likely to underestimate the prevalence of NAFLD [24,25,138].

Hence, no published evidence is available on the true diagnostic accuracy of serum ALT as NAFLD biomarker in healthy individuals or on its relationship with insulin resistance or other metabolic risk factors. Elucidation of this issue may help to identify individuals with hepatic steatosis who are at greater risk of cardiometabolic disease.

We have found no published study on the diagnostic accuracy, sensitivity, and specificity of serum ALT to identify individuals with NAFLD using 3 Tesla ($^1\text{H-MRS}$). We therefore utilized this technique to quantify liver triglyceride content in a sample of healthy adults to assess the accuracy, sensitivity and specificity of serum ALT as a biomarker of NAFLD. We also investigated the relationship of liver triglyceride content and serum ALT with metabolic risk factors, including insulin resistance (homeostatic model assessment of insulin resistance [HOMA-IR]), fasting insulin, adiponectin and tumor necrosis factor ($\text{TNF}\alpha$), among others.

Material and Methods

Study population

The study population was consecutively recruited between February 2011 and October 2013 from among individuals undergoing examination at the Occupational Risk Prevention Unit in Granada (Southern Spain) for a routine annual general checkup. Participants were all healthy male or female Caucasians aged between 19 and 76 years.

Anexo

Study exclusion criteria were: history of daily alcohol intake > 20g (men) or > 10g (women), based on responses to a validated questionnaire on alcohol consumption and confirmation of results by a family member; the presence of HBV/HCV serologic markers, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, hemochromatosis, Wilson's disease, cancer, diabetes mellitus, endocrine, cardiac, renal or lung disease; the consumption of drugs that may cause steatosis (e.g. corticosteroids, amiodarone, methotrexate, tamoxifen); body mass index (BMI) <17 or >40kg/m²; and the wearing of a pacemaker or other device and/or self-reported claustrophobia incompatible with ¹H-MRS. Out of the total 911 adults who came for the routine annual checkup, 263 individuals met the eligibility criteria, and 140 (53%) signed informed consent to participate in the study. After the exclusion of 11 of these individuals for missing test appointments, the final sample comprised 129 subjects with a mean age 45.7 years, range 20-76 years (Figure 1). The study was approved by the ethical committee of the University Hospital San Cecilio.

Study Design and anthropometric evaluations

All individuals recruited for the study had undergone a full medical history, physical examination, complete blood analysis, and ultrasound examination as part of the screening process. The weight and height of the study participants were also recorded, calculating their BMI (kg/m²), and their waist circumference was measured with soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest in standing position.

Laboratory analysis

Blood was drawn in the morning after overnight fasting. Serum ALT and aspartate aminotransferase (AST) levels were determined using a kinetic method (Cobas c 311, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), with coefficients of variation of 3.3 and 3.1, respectively, serum glucose by the glucose oxidase (enzymatic) method (Roche/Hitachi Analytix systems, Roche Diagnostics GmbH), adiponectin by radioimmunoassay, (Linco Research, St. Charles, MO, USA), serum Insulin by electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys 2010, Roche Diagnostics GmbH), serum TNF α by enzyme-linked immunosorbent assay, using a TNF α (human) ELISA kit (Biosource Europe, Nivelles, Belgium) and serum cholesterol with an enzymatic method (Roche Diagnostics GmbH). Insulin resistance was

calculated as $\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin (mU/L)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$ [102]. Coefficients of variation of the biochemical tests ranged from 3.1 to 9.9%.

¹H-MRS 3T analysis

A magnetic resonance imaging study was conducted before the spectroscopy, acquiring in-vivo spectra at 3T with a Philips Achieva system (Royal Philips, Amsterdam, Netherlands). A 3-plane localizer was employed to plan the ¹H-MRS, and the spectra were obtained using the body coil of the scanner. Breath-hold was monitored using a respiratory belt.

A single voxel of 27cm³ (30 x 30 x 30mm) was selected within normal liver tissue in segment VI, avoiding the edge of the liver, the diaphragm, and major blood vessels. All spectra were obtained with a stimulated echo acquisition mode sequence (STEAM), setting the following parameters: repetition time=8000; echo time=20, 40, and 60ms; number of signal averages=4 (without water suppression); and bandwidth=2000. Data were acquired within a breath hold. T2 correction was applied and field homogeneity was adjusted automatically for each voxel.

MRS was reconstructed using Extended MR WorkSpace software (Philips). Raw data were zero-filled once, with no filter, and were phase-corrected, Fourier-transformed, baseline-corrected, and averaged. A Marquardt curve was fitted, using a combined Lorentzian–Gaussian model to calculate the area under the curve of fat and water peaks. Spectra were referenced to residual water and the dominant methylene lipid (–CH₂) peak at $\delta=4.47$ and $\delta=1.43$ ppm, respectively. Fat fraction percentage (FF) was defined as $\text{FA} / (\text{FA} + \text{WA}) \times 100$, where FA is the area under the fat peak and WA is the area under the water peak. ¹H-MRS data were interpreted by an experienced radiologist blinded to the biochemical results.

NAFLD was defined by a liver fat content greater than 5.56%, as proposed in previous studies, and was classified as mild (>5.56 to 25% liver fat content), moderate (>25 to 50%), or severe (>50%) [19,200].

The anthropometric, biochemical, and ¹H-MRS measurements of each individual were performed within a 24-h period.

Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard deviation (SD). The Kolmogorov-Smirnoff test was used to check the normality of the data distribution. Mean values were compared among groups with the one-way ANOVA, followed by the Tukey multiple-comparison test, the unpaired Student's two-tailed *t*-test, or nonparametric Mann-Whitney U test, as appropriate. Correlations were examined by Pearson standard linear regression analysis (normal distribution) or by the Spearman test (non-normal distribution).

Backward step-wise multiple regression analysis was used to establish the most significant determinants of NAFLD. Variables entered into the equation were waist circumference, BMI, HOMA-IR and serum values of ALT, AST, GGT, fasting insulin, triglycerides, adiponectin and HDL-cholesterol. Only variables showing a $P < 0.5$ were retained in the final regression model.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were created, estimating optimal cutoff points for the diagnosis of NAFLD and calculating their sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV).

SPSS version 22 for Windows (SPSS Inc., Chicago IL) was used for all data analyses.

RESULTS

The final study comprised 129 participants with a mean \pm SD age of 45.7 ± 10.2 (range 20-76 years). Their anthropometric data are exhibited in Table 1 and their biochemical results in Table 2. Seventy-five (58.13%) of the participants were diagnosed with NAFLD, classified as mild (29 cases), moderate (34 cases), or severe (12 cases); the remaining 54 individuals had liver fat content below 5.56%.

Anthropometric and biochemical parameters according to liver fat content

As shown in tables 1 and 2, mean BMI, waist circumference, HOMA-IR, serum ALT, AST, gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), triglycerides, TNF α , and fasting insulin levels were higher in individuals with NAFLD than in those without ($p < 0.001$, except for ALP and TNF α $p < 0.05$); only HDL-cholesterol and adiponectin were lower in

individuals with NAFLD than in those without ($p < 0.001$ for both). Multiple comparison tests among NAFLD categories solely revealed significant differences in ALT ($p < 0.05$), HOMA-IR ($p < 0.05$) and adiponectin ($p < 0.05$) between individuals with severe *versus* mild steatosis.

Correlations of liver fat content with different parameters

Liver fat content was highly significantly and positively correlated with serum ALT ($r: 0.58$; $p < 0.001$) (Fig. 1), serum AST ($r: 0.32$; $p < 0.01$), serum GGT ($r: 0.31$; $p < 0.01$), waist circumference ($r: 0.54$; $p < 0.001$), BMI ($r: 0.48$; $p < 0.001$), fasting insulin ($r: 0.57$; $p < 0.001$), HOMA-IR ($r: 0.57$; $p < 0.001$), and serum triglyceride ($r: 0.35$; $p < 0.01$), and was inversely correlated with serum adiponectin ($r: -0.43$; $p < 0.001$) and HDL-cholesterol ($r: -0.32$; $p < 0.01$).

Correlations of serum ALT values with different parameters

The results depicted in Figure 2 confirm that serum ALT values were positively correlated with liver fat content. Serum ALT was also correlated with HOMA-IR ($r: 0.32$; $p < 0.01$), serum fasting insulin ($r: 0.31$; $p < 0.01$), triglycerides ($r: 0.18$; $p < 0.05$), waist circumference ($r: 0.25$; $p < 0.01$), and BMI ($r: 0.25$; $p < 0.01$) and inversely correlated with adiponectin ($r: -0.35$; $p < 0.01$) and HDL-cholesterol ($r: -0.32$; $p < 0.01$).

Regression analyses

Backward stepwise regression analyses of the predictors of liver fat content showed that serum ALT was the most significant independent variable (β Coefficient = 1.367; SE = 0.121; $p < 0.01$) and that HOMA-IR was also significant (β Coefficient = 1.160; SE = 0.075; $p < 0.04$).

ROC curves and validity of serum ALT for the diagnosis of NAFLD

ROC curves were created to assess the accuracy of serum ALT to predict liver fat content greater than 5.56% (upper limit of normal range) (Fig.3). The area under the curve (AUC) was 0.93 (95% confidence interval [CI]: 0.89, 0.97), and the optimal ALT cutoff point was 23 IU/L, with a sensitivity of 0.94, specificity of 0.72, PPV of 0.82, and NPV of 0.90. Analysis by sex showed an optimal ALT cutoff value to identify individuals with NAFLD of 24 IU/L for the males (AUC: 0.92; sensitivity: 0.95; specificity: 0.67) and 21 IU/L for the females (AUC: 0.94; sensitivity: 0.96; specificity: 0.76). Figure 4 shows that 48% of the individuals with ALT below 40 IU/L had NAFLD and that these had significantly higher HOMA-IR and serum fasting insulin

values and significantly lower adiponectin and HDL-cholesterol values in comparison to the individuals without NAFLD. Only four individuals with ALT levels below 23 IU/L had NAFLD. A lower AUC was observed for the other parameters studied: BMI, 0.82; waist circumference, 0.84; GGT, 0.74; and AST, 0.76.

Metabolic variables by liver fat content and ALT category

As depicted in Figure 5, the differences in waist circumference, HOMA-IR, and serum fasting insulin, adiponectin, triglycerides, and HDL-cholesterol values among NAFLD categories paralleled the differences observed among ALT categories.

DISCUSSION

In this sample of healthy individuals from the general population, serum ALT levels were strongly correlated with liver fat content and enabled the detection of most of the participants with NAFLD. Liver triglyceride content was determined by ¹H-MRS, the only noninvasive reference method for its quantification [200–202], widely validated in population-based studies [19] and clinical trials [137].

The participants with NAFLD had higher serum levels of ALT, HOMA-IR, fasting insulin, and triglycerides and lower levels of adiponectin and HDL-cholesterol in comparison to those without NAFLD, as previously reported in selected populations of obese or diabetic patients [7,176,186,187]. Significant differences in ALT levels were found between the individuals with mild NAFLD and those without NAFLD and between those with severe and mild NAFLD, suggesting that serum ALT levels might offer the capacity to discriminate among different degrees of liver fat content.

Both serum ALT and liver fat content were significantly correlated with HOMA-IR, serum fasting insulin, and triglycerides and were significantly inversely correlated with serum adiponectin and HDL cholesterol. Parallelism observed between differences in these metabolic parameters among NAFLD categories and the differences among ALT categories support the possible relationship of both NAFLD and serum ALT with insulin resistance and other metabolic risk

factors. The present findings in healthy individuals are in agreement with results obtained in selected populations of obese individuals or patients with diabetes or MetS [160–163,188].

Serum adiponectin levels were inversely correlated with liver fat content, serum ALT, HOMA-IR, and fasting insulin and were positively correlated with HDL-cholesterol, consistent with previous reports on the association of NAFLD and serum ALT with low adiponectin levels in obese patients (42).

Taken together, our findings in healthy individuals endorse epidemiological findings that elevated ALT values (including those within normal range) are strongly associated with NAFLD and insulin resistance and likely with an increased risk of T2DM (16).

Elevated serum TNF α levels have been described in patients with chronic liver disease of different etiologies [179,180], including NAFLD [190], and activation of the TNF α system has been associated with insulin resistance [203] and low adiponectin levels [190]. In our study, serum TNF α levels were higher in the individuals with NAFLD than in those without NAFLD, but TNF α was not correlated with ALT, HOMA-IR, adiponectin, or any other parameter, in agreement with previous reports in obese patients [186]. These findings might indicate that the TNF α system is activated in NAFLD, but its relationship with insulin resistance and other metabolic risk factors remains to be elucidated.

It is well documented that serum ALT levels cannot be used to predict nonalcoholic steatohepatitis or to differentiate between simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis [7,166]. A recent study of the severity of liver disease in NAFLD patients using ¹H-MRS and liver biopsies found that elevated serum ALT was strongly associated with liver fat content but not with inflammation, hepatocyte ballooning, or liver fibrosis [7]. It has therefore been proposed that serum ALT might be a good indicator of NAFLD [7] and a predictor of cardio-metabolic disorders, regardless of possible progression to steatohepatitis or liver cirrhosis [160,163]. Unfortunately, most studies on the sensitivity and specificity of serum ALT as a biomarker of NAFLD were designed to identify nonalcoholic steatohepatitis [166,191]. Moreover, other researchers assessed liver fat content using only abdominal ultrasound [168,169,192], an operator-dependent method that offers inadequate sensitivity and specificity in cases of mild and moderate NAFLD and, importantly, does not quantify liver triglyceride content [24,25].

Anexo

Likewise, indexes developed to detect NAFLD have not proven useful for routine clinical practice in the general population due to their high complexity [193]. Our study provides the first report on the diagnostic accuracy, sensitivity, and specificity of serum ALT as a biomarker of NAFLD in healthy individuals from the general population using ¹H-MRS for liver triglyceride quantification, avoiding confounding factors such as diabetes mellitus and the metabolic syndrome. In our study, in addition to the strong correlation between serum ALT and liver triglyceride content, regression analysis showed that serum ALT was the main predictor of NAFLD even after adjustment for sex, age, BMI, and waist circumference. Furthermore, the ROC curve yielded an AUC of 0.93 and showed that a serum ALT value ≥ 23 IU/L predicted the presence of NAFLD with a sensitivity of 0.94 and specificity of 0.72. We found that 48% of individuals with serum ALT below 40 IU/L had NAFLD, and these individuals had significantly elevated HOMA-IR and lower serum levels of adiponectin and HDL-cholesterol in comparison to those with serum ALT below 23 IU/L. These findings support proposals to reduce the threshold for “normal” serum ALT [160,164]. Only 10% of participants with ALT below 23 IU/L had NAFLD, suggesting that this cutoff value would identify a large majority of individuals with hepatic steatosis. The detection of NAFLD is important to allow clinical counseling on the risk of insulin resistance, T2DM, and coronary heart disease.

The major strengths of this study are that ¹H-MRS was used to quantify liver triglyceride content and the participants met strict exclusion criteria. In addition, the anthropometric, biochemical, and ¹H-MRS measurements were performed within a 24- hour period.

Limitations of this study include the relatively high proportion of participants with NAFLD, possibly because most individuals in the eligible population had normal blood analyses and may therefore have been less willing to participate in comparison to those with elevated ALT values. We also acknowledge that this was a cross-sectional study based on biochemical determinations at a single time point in each participant. It proved possible to classify participants into different groups with adequate statistical power, but the sample size was relatively small, and further studies in wider samples and with an independent validation cohort are required to verify our findings in a different subset of patients.

In conclusion, this study shows that serum ALT is a sensitive, simple, and reliable biomarker of NAFLD when the upper threshold of “normal” ALT values is lowered. Thus, in the present series of healthy individuals, an ALT threshold of 23 IU/L identified 94% of the participants with NAFLD, who might be more at risk of cardiometabolic events, allowing appropriate clinical counseling to be offered to these individuals. The low cost and wide availability of this screening test facilitate its routine application in primary care.

Acknowledgements: Dr. Jorge Gonzalez-Cantero is a PhD candidate at University of Granada.

Funding: This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

Authorship: All authors participated in the data collection, analysis, and manuscript preparation. All authors approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1592-1609. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.001.
2. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison S a. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820-1832. doi:10.1002/hep.23594.
3. Lee JY, Kim KM, Lee SG, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol*. 2007;47(2):239-244. doi:10.1016/j.jhep.2007.02.007.
4. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-1395. doi:10.1002/hep.20466.
5. Vernon G, Baranova a., Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-285. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x.
6. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology*. 2005;129(1):113-121. doi:10.1053/j.gastro.2005.04.014.
7. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-131. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.038.
8. Rafiq N, Bai C, Fang YUN, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *YJCGH*. 2009;7(2):234-238. doi:10.1016/j.cgh.2008.11.005.
9. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(5):960-967. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07486.x.
10. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*. 2009;29(1):113-119. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01718.x.
11. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001;50(8):1844-1850.
12. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005;42(1):44-52. doi:10.1002/hep.20734.
13. Maximos M, Bril F, Portillo Sanchez P, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2015;61(1):153-160. doi:10.1002/hep.27395.
14. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1341-1350. doi:10.1056/NEJMra0912063.
15. Goland S, Shimoni S, Zornitzki T, et al. Cardiac Abnormalities as a New Manifestation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Echocardiographic and Tissue Doppler Imaging Assessment. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(10):949-955. doi:10.1097/01.mcg.0000225668.53673.e6.

16. Liu J, Fox CS, Hickson D, Bidulescu A, Carr JJ, Taylor HA. Fatty liver, abdominal visceral fat, and cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(11):2715-2722. doi:10.1161/ATVBAHA.111.234062.
17. Goessling W, Massaro J. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology.* 2008;135(6):1935-1944. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.018.Aminotransferase.
18. Portillo Sanchez P, Bril F, Maximos M, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab.* October 2014. doi:10.1210/jc.2014-2739.
19. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(6):1889-1895.
20. Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis.* 2007;191(2):391-396. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.006.
21. Ioannou GN. Implications of Elevated Serum Alanine Aminotransferase Levels: Think Outside the Liver. *Gastroenterology.* 2008;135(6):1851-1854. doi:10.1053/j.gastro.2008.11.005.
22. Prati D, Taioli E, Zanella A, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med.* 2002;137(1):1-10.
23. Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology.* 2005;42(3):650-656. doi:10.1002/hep.20818.
24. Kang HS, Um SH, Seo YS, et al. Healthy range for serum ALT and the clinical significance of "unhealthy" normal ALT levels in the Korean population. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(2):292-299. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06481.x.
25. Wu W-C, Wu C-Y, Wang Y-J, et al. Updated thresholds for serum alanine aminotransferase level in a large-scale population study composed of 34 346 subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36(6):560-568. doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05224.x.
26. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, et al. Metabolic markers and ALT cutoff level for diagnosing nonalcoholic fatty liver disease: a community-based cross-sectional study. *J Gastroenterol.* 2012;47(6):696-703. doi:10.1007/s00535-012-0534-y.
27. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(2):E462-E468. doi:10.1152/ajpendo.00064.2004.
28. Reeder SB. Quantitative Assessment of Liver Fat with Magnetic Resonance. *J Magn Reson Imaging.* 2012;34(4):1-38. doi:10.1002/jmri.22775.Quantitative.
29. Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol.* 2009;51(3):433-445. doi:10.1016/j.jhep.2009.05.023.
30. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 1):E977-E989.
31. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *J Hepatol.* 2009;51(6):1061-1067. doi:10.1016/j.jhep.2009.09.001.
32. Martín-Rodríguez JL, Arrebola JP, Jiménez-Moleón JJ, Olea N, González-Calvin JL. Sonographic quantification of a Hepato-Renal Index for the assessment of hepatic

- steatosis in comparison with 3T proton magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(1):88-94. doi:10.1097/MEG.0b013e3283650650.
33. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419.
 34. Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Ríos C, Méndez-Sánchez N. In vivo 3T spectroscopic quantification of liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease: Correlation with biochemical method and morphometry. *J Hepatol*. 2010;53(4):732-737. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.018.
 35. Van Werven JR, Marsman H a., Nederveen AJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, Stoker J. Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model. *Magn Reson Imaging*. 2012;30(1):112-121. doi:10.1016/j.mri.2011.07.028.
 36. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol*. 2011;21(1):87-97. doi:10.1007/s00330-010-1905-5.
 37. Nouredin M, Lam J, Peterson MR, et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology*. 2013;58(6):1930-1940. doi:10.1002/hep.26455.
 38. Omelchenko E, Gavish D, Shargorodsky M. Adiponectin is better predictor of subclinical atherosclerosis than liver function tests in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Am Soc Hypertens*. 2014;8(6):376-380. doi:10.1016/j.jash.2014.03.002.
 39. Klein M, Izzetti L, Speiser P, et al. Alanine transferase: An independent indicator of adiposity related comorbidity risk in youth. *J Diabetes*. 2015;7(5):649-656. doi:10.1111/1753-0407.12221.
 40. Arulanandan A, Ang B, Bettencourt R, et al. Association Between Quantity of Liver Fat and Cardiovascular Risk in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Independent of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(8):1513-1520.e1. doi:10.1016/j.cgh.2015.01.027.
 41. Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care*. 2005;28(12):2913-2918.
 42. Ozcelik F, Yuksel C, Arslan E, Genc S, Omer B, Serdar MA. Relationship between visceral adipose tissue and adiponectin, inflammatory markers and thyroid hormones in obese males with hepatosteatosis and insulin resistance. *Arch Med Res*. 2013;44(4):273-280. doi:10.1016/j.arcmed.2013.04.001.
 43. Gonzalez-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fernandez-Perez R, Casado-Caballero F, Ruiz-Escolano E, Olivares EG. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4325-4330. doi:10.1210/jc.2004-0077.
 44. González-Calvin JL, Mundi JL, Casado-Caballero FJ, Abadía AC, Martín-Ibañez JJ. Bone Mineral Density and Serum Levels of Soluble Tumor Necrosis Factors, Estradiol, and Osteoprotegerin in Postmenopausal Women with Cirrhosis after Viral Hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4844-4850. doi:10.1210/jc.2009-0835.
 45. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40(1):46-54. doi:10.1002/hep.20280.
 46. Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes*. 1998;47(11):1757-1762.
 47. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of

- Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology*. 2001;121(1):91-100. doi:10.1053/gast.2001.25540.
48. Nomura K, Yano E, Shinozaki T, Tagawa K. Efficacy and effectiveness of liver screening program to detect fatty liver in the periodic health check-ups. *J Occup Health*. 2004;46(6):423-428.
 49. Ruhl CE, Everhart JE. Fatty liver indices in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(1):65-76. doi:10.1111/apt.13012.

FIGURES

Fig. 1

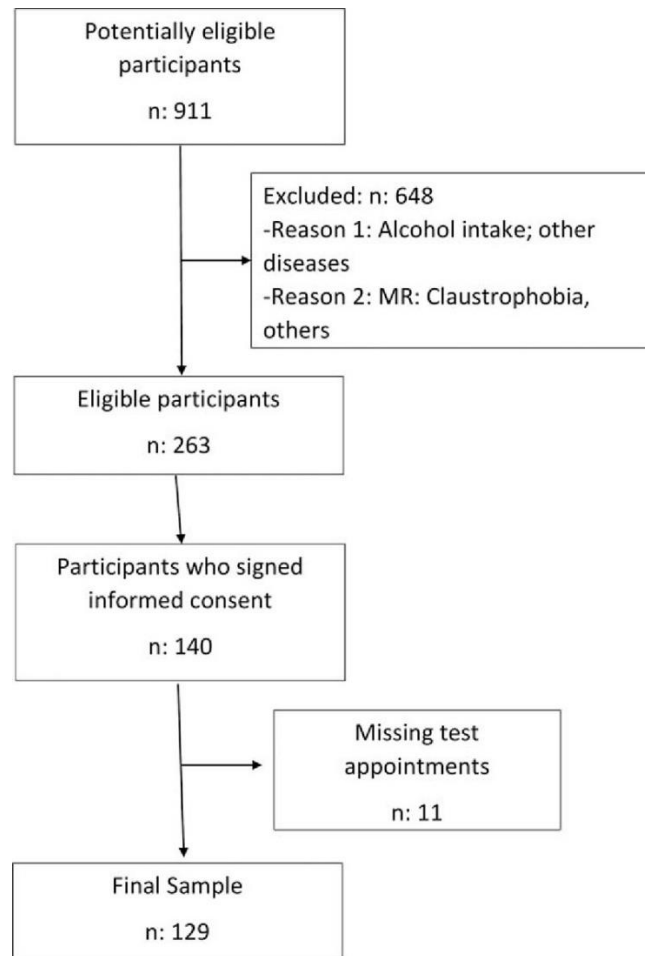


Fig. 2

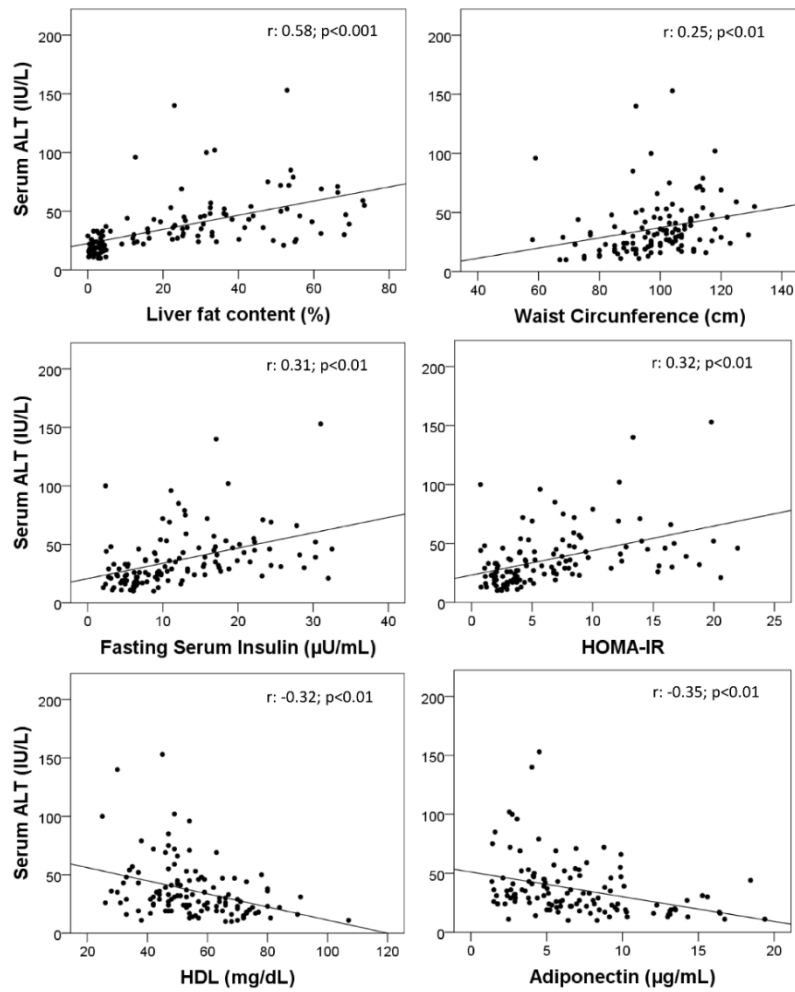


Fig. 3

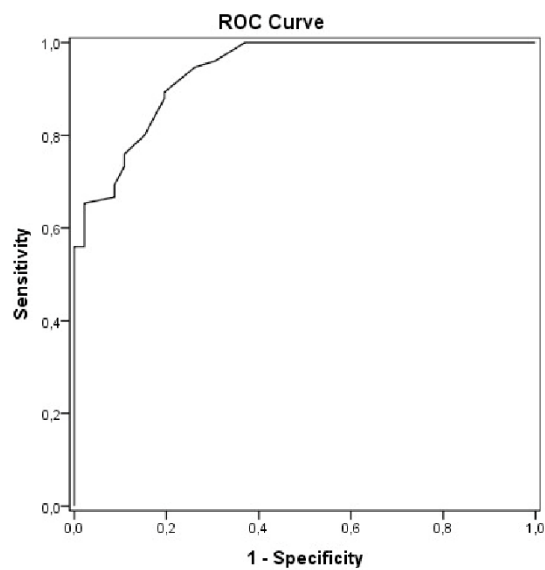


Fig. 4

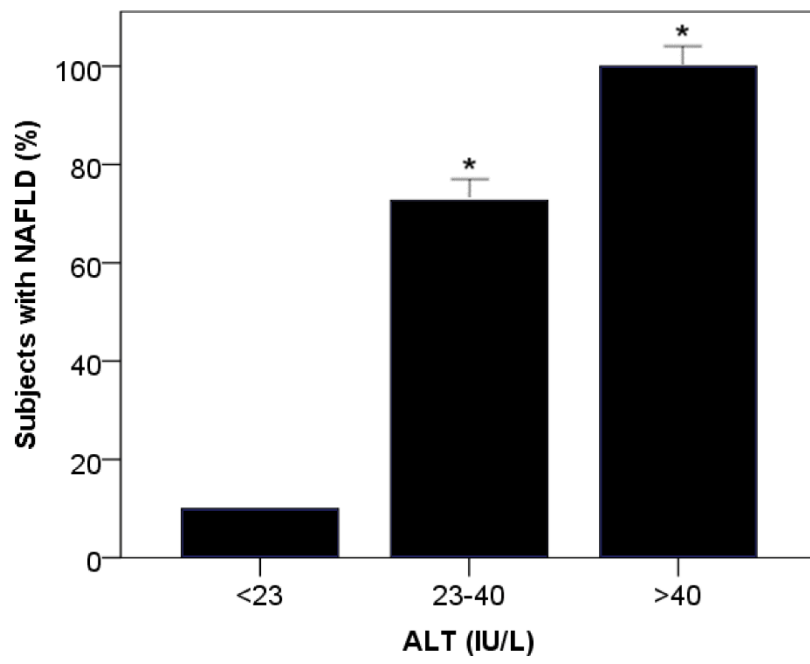


Fig. 5

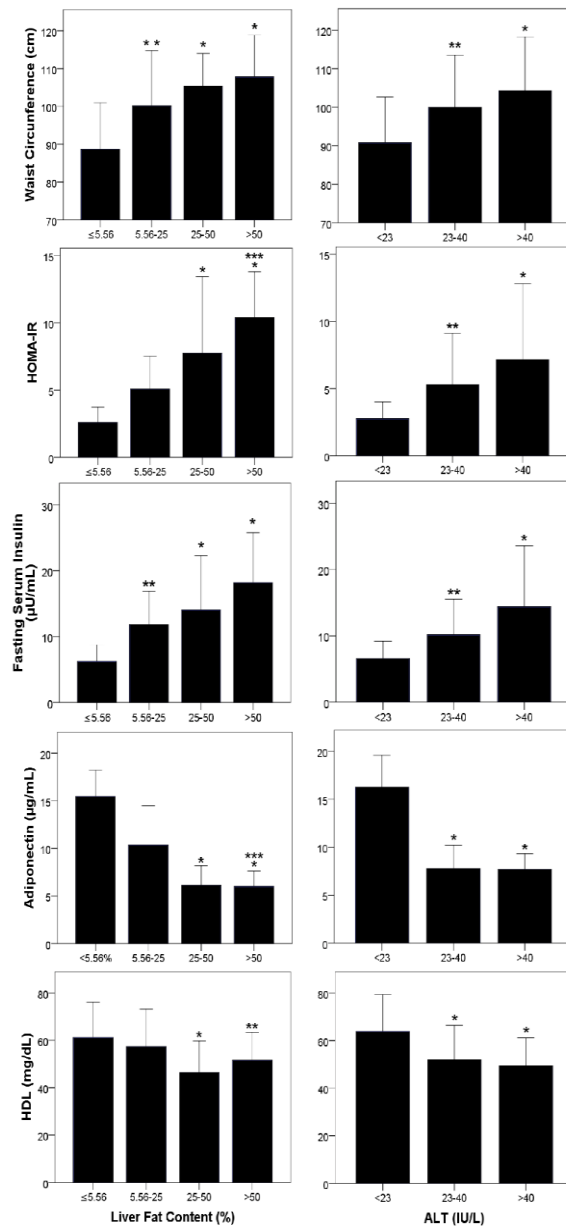


FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow of participants through the study.

Figure 2. Correlation of serum ALT with: liver fat content, waist circumference, HOMA-IR, and serum fasting insulin, adiponectin, and HDL-cholesterol levels.

Figure 3. Receiver-operating characteristic curve of sensitivity plotted against 1-specificity of serum ALT to identify subjects with liver fat content greater than 5.56% quantified by proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) 3T.

Figure 4. Percentage of subjects with NAFLD in the different ALT categories.

* $p < 0.001$ vs. No NAFLD.

Figure 5. Differences in mean \pm SD values of metabolic variables among liver fat content categories and among ALT categories.

* $p < 0.001$ vs. No NAFLD; ** $p < 0.01$ vs. No NAFLD; *** $p < 0.05$ vs. Mild NAFLD.

