



## **VISFATINA: UN POTENCIAL BIOMARCADOR DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA EN MUJERES CON OBESIDAD MÓRBIDA NO DIABÉTICAS**

**José Antonio Porras Ledantes**

**Dipòsit Legal: T. 188-2013**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

2012

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA  
SALUT  
Departament de Medicina i Cirurgia

Visfatina: un potencial biomarcador  
de esteatohepatitis no alcohólica en  
mujeres con obesidad mórbida no  
diabéticas



TESIS DOCTORAL

José Antonio Porras Ledantes  
Diciembre 2012





**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT**  
**Departament de Medicina i Cirurgia**



**Visfatina: un potencial biomarcador de esteatohepatitis no alcohólica en mujeres con obesidad mórbida no diabéticas.**

Dirigida por el Profesor Dr. Cristóbal Richart Jurado y la Dra. Teresa Auguet Quintillà.

Tesis doctoral presentada por José Antonio Porras Ledantes, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII  
Tarragona, octubre del 2012



Cristóbal Richart Jurado, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona y Catedrático de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, y Teresa Auguet i Quintillà, Jefa Clínica del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona y Profesora Asociada Médica de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona,

CERTIFICAN QUE:

La tesis doctoral titulada “**Visfatina: un potencial biomarcador de esteatohepatitis no alcohólica en mujeres con obesidad mórbida no diabéticas**” presentada por José Antonio Porras Ledantes, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente documento.

Tarragona, 10 de octubre de 2012

Dr. Cristóbal Richart Jurado

Dra. Teresa Auguet i Quintillà



## DEDICADO

A María,  
a Alejandro, a Diego  
y a mis padres

Para la mente, las apariencias son de cuatro tipos. Las cosas son lo que aparentan ser; o no son ni aparentan ser; o son y no lo aparentan; o no son aunque aparentan serlo.

El cometido del hombre sabio es distinguir entre todos estos casos.

(Epícteto, siglo II d.C.)



## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. Cristóbal Richart Jurado por haber aceptado la dirección de esta Tesis así como sus acertados consejos a la hora de su realización.

A la Dra. Teresa Auguet i Quintillà por su soporte, continuo estímulo positivo y amistad.

A la Dra. Ximena Terra Barbadora de la Unitat de Recerca del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII por su inestimable colaboración, paciencia y comprensión durante la realización del análisis de los resultados de los datos que constituyen esta Tesis.

A la Dra. Carmen Aguilar Crespillo de la Unitat de Recerca del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII por su inestimable colaboración en el trabajo de laboratorio y por su simpatía.

A la Dra. Salomé Martínez González del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Joan XXIII por su colaboración en la valoración de los resultados histológicos.

Al Servicio de Cirugía General del Hospital Universitari Sant Joan de Reus por su crucial colaboración en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Servicio de Medicina Interna por su tolerancia y buenos consejos.

A todo el personal sanitario del Servicio de Medicina Interna del Hospital Joan XXIII, en especial al personal de Enfermería por su colaboración en este estudio.

A todos los pacientes que participaron en el estudio, verdaderos protagonistas de estos trabajos, mi más sincero agradecimiento.



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>1. La obesidad. Un importante problema de salud pública</b>	<b>17</b>
1.1 ¿Por qué somos obesos?	18
1.2 Causas de la obesidad	19
1.3 Parámetros de medida de la obesidad	20
<b>2. El tejido adiposo</b>	<b>23</b>
2.1 Morfología y función del tejido adiposo	23
2.2 Tejido adiposo visceral vs subcutáneo	25
2.3 Metabolismo y disfunción del tejido adiposo	26
2.4 La respuesta inflamatoria	28
2.4.1 Obesidad e inflamación	29
2.5 Mediadores inflamatorios	33
2.5.1 Las adipocitoquinas	33
2.5.1.1 Adiponectina	36
2.5.1.2 Interleuquina-6	36
2.5.1.3 Leptina	37
2.5.1.4 Lipocalina 2	38
2.5.1.5 Resistina	39
2.5.1.6 Factor de necrosis tumoral alfa y sus receptores R1/R2	39
2.5.1.7 Proteína transportadora de retinol tipo 4	40
2.5.2 Proteínas de fase aguda	41
2.5.2.1 La proteína C reactiva	41
<b>3. Consecuencias de la obesidad</b>	<b>43</b>
3.1 Obesidad y aterosclerosis	43
3.2 Obesidad y síndrome metabólico	44
<b>4. Hepatopatía grasa no alcohólica (HGNA)</b>	<b>49</b>
4.1 Concepto, epidemiología y factores de riesgo	49
4.2 Historia natural de la HGNA	51
4.2.1 Progresividad lesional	52
4.2.2 Diagnóstico de HGNA. ¿Esteatosis, esteatohepatitis, cirrosis?	53

4.3 Relaciones patogénicas de la HGNA _____	55
4.3.1 El hígado un órgano clave en la homeostasis metabólica _____	55
4.3.2. HGNA y resistencia hepática a la insulina _____	57
4.3.3. Transición de esteatosis a esteatohepatitis _____	59
4.4 Adipocitoquinas y la HGNA _____	62
<b>5. Visfatina, una nueva adipocitoquina _____</b>	<b>67</b>
5.1 Visfatina: Aspectos moleculares _____	69
5.2 Visfatina: Aspectos funcionales _____	70
5.2.1 Efectos extracelulares. Una citoquina proinflamatoria _____	70
5.2.2 Efectos intracelulares. La función enzimática _____	71
5.3 Visfatina, obesidad y resistencia a la insulina _____	73
5.4 Visfatina y enfermedades hepáticas _____	75
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____</b>	<b>79</b>
<b>III. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS _____</b>	<b>85</b>
<b>1. Pacientes y procedimientos _____</b>	<b>87</b>
<b>2. Metodología de laboratorio _____</b>	<b>89</b>
2.1 Medida de los parámetros antropométricos _____	89
2.2 Determinaciones bioquímicas _____	89
2.3 Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real _____	90
<b>3. Estudio estadístico _____</b>	<b>90</b>
<b>IV. RESULTADOS _____</b>	<b>93</b>
1. Niveles séricos de Visfatina en el normopeso y en la obesidad mórbida _____	95

2. Niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida en normoglucémicos y en diabéticos tipo 2 _____	97
3. Relación de los niveles séricos de Visfatina con las variables bioquímicas y los niveles circulantes de adipocitoquinas en la obesidad mórbida _____	99
4. Niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA _____	100
5. Niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2 _____	103
6. Influencia de la HGNA y la presencia de diabetes mellitus tipo 2 sobre los niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida _____	105
7. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en normopeso y en la obesidad mórbida _____	106
8. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en la obesidad mórbida en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2 _____	106
9. Relación de la expresión génica en tejido hepático de Visfatina con variables bioquímicas y metabólicas en la obesidad mórbida _____	107
10. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA _____	108
11. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en la obesidad mórbida en relación con el tipo histológico de HGNA en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2 _____	109
12. Expresión génica de Visfatina en el tejido adiposo subcutáneo y visceral en la obesidad mórbida en relación con el tipo histológico de HGNA _____	110
13. Influencia de la HGNA y de la presencia de diabetes mellitus tipo 2 sobre la expresión génica hepática de Visfatina en la obesidad mórbida _____	111

14. Relación de los niveles circulantes y la expresión génica en tejido hepático de Visfatina con el grado de esteatosis y esteatohepatitis en la obesidad mórbida _____	112
15. Valoración del efecto de Visfatina sobre la presencia de esteatohepatitis no alcohólica _____	112
16. Evaluación de los niveles circulantes de Visfatina como biomarcador de HGNA y esteatohepatitis no alcohólica _____	115
<b>V. DISCUSIÓN _____</b>	<b>113</b>
<b>VI. CONCLUSIONES _____</b>	<b>131</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>137</b>
<b>A1. ANEXO 1. ABREVIATURAS _____</b>	<b>155</b>

# I. INTRODUCCIÓN



# I. INTRODUCCIÓN

## *1. La obesidad. Un importante problema de salud pública*

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial asociada a un ambiente de inflamación sistémica. Factores genéticos y moleculares, junto a circunstancias desencadenantes ambientales y conductuales, intervienen en su patogenia y condicionan de forma decisiva su tratamiento<sup>1</sup>.

La incidencia de la obesidad está en un continuo y alarmante aumento en las últimas décadas, erigiéndose como uno de los problemas de salud pública más serio en los inicios de este siglo XXI. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia de la obesidad a nivel mundial supera los 500 millones de personas habiendo llegado a ser definida por esta organización como una verdadera pandemia no infecciosa. Estudios epidemiológicos realizados en EEUU en la última década del siglo XX mostraban que aproximadamente el 63% de los hombres y el 55% de las mujeres mayores de 25 años tenían sobrepeso, siendo obesos hasta el 21% de los hombres y el 27% de las mujeres<sup>2</sup>. En España, datos más recientes, muestran que la prevalencia de la obesidad es de un 15% en adultos<sup>3</sup>, mientras que supera el 35% en las personas de más de 65 años<sup>4</sup>. A esta creciente incidencia se han de añadir las consecuencias clínicas y económicas. Hoy sabemos que la obesidad está asociada a una reducción de la esperanza de vida y es un factor de riesgo de hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipercolesterolemia, riesgo cardiovascular general, litiasis biliar, síndrome de apnea sueño, osteoartritis y de diferentes neoplasias<sup>2</sup>. Respecto a la mortalidad, varios son los trabajos que demuestran su aumento en las personas obesas y relacionan la obesidad y su grado con una mayor mortalidad<sup>5,6</sup>. En un reciente estudio se calculó un aumento de hasta 1,31 veces en la mortalidad global de la población por cada incremento de 5 Kg/m<sup>2</sup> del índice de masa corporal (IMC), cuando este estaba comprendido entre 25 y 49,9 Kg/m<sup>2</sup>, considerándose al IMC comprendido entre 20 y 24,9 Kg/m<sup>2</sup> como el IMC ideal<sup>6</sup>. Así, en la actualidad, la obesidad se ha convertido en la segunda causa de mortalidad prematura y evitable, después del tabaco<sup>7</sup>. En lo económico, estimaciones recientes indican que, en algunos países europeos, la obesidad y el sobrepeso podrían ser responsables de un 6% de los gastos sanitarios directos y de

más del 12% de los costes indirectos, resultantes del acortamiento de la esperanza de vida y la disminución de la productividad laboral<sup>8</sup>.

## 1.1 ¿Por qué somos obesos?

La fuerza que mueve la evolución de los seres vivos es **la selección natural**. Se acepta que el diseño del organismo humano codificado en sus genes es el resultado de millones de años de evolución biológica. La casi totalidad del genoma humano se formó durante la evolución preagrícola y se considera que es el óptimo, ya que nos permitió adaptarnos a las modificaciones del medio en cada etapa de nuestra evolución. Así, la selección natural, apoyada en una serie de mutaciones genéticas ventajosas, desarrolló una peculiaridad metabólica que se ha denominado “**el genotipo ahorrador**” formulada por Neel en 1962. El genotipo ahorrador permitía acumular rápidamente grasa durante las épocas de abundancia de alimento, y así proporcionar ventajas de supervivencia y reproducción en épocas de escasez como fueron las glaciaciones. Esta condición genotípica permitió la supervivencia de nuestros antecesores en condiciones de penuria nutricional, y sobre todo adaptarse a una dieta pobre en azúcares y rica en proteínas<sup>9</sup>.

La presión de la selección natural sobre el genotipo ahorrador se relajó tras la última glaciación, cuando hace unos 15.000 años nuestros antecesores comenzaron a desarrollar la agricultura y la ganadería. Entre los europeos, se calcula que la implantación del genotipo ahorrador se acerca al 40 % de la población. Así, desde el punto de vista de la evolución biológica, los genes que favorecen la obesidad están en nuestro genoma porque en algún momento de nuestra evolución nos beneficiamos de poseer tales características<sup>9</sup>.

Hace escasamente 100 años, con la revolución industrial, nuestras condiciones de vida cambiaron drásticamente y nos alejamos definitivamente de nuestro diseño evolutivo; comenzamos a ingerir una alimentación muy rica en calorías, hiperproteica, abundante en grasas saturadas y en hidratos de carbono de absorción rápida y de elevado índice glucémico. Además, el desarrollo de máquinas que facilitaban todas nuestras labores y de vehículos que nos transportaban diariamente sin esfuerzo, redujo nuestro nivel de actividad física. En este nuevo y reciente **ambiente obesogénico**, muy alejado del diseño evolutivo que determinó la aparición del genotipo ahorrador, la consecuencia inevitable ha sido la progresiva e imparable aparición de la obesidad y sus consecuencias negativas para la salud humana<sup>10</sup>.

## 1.2 Causas de la obesidad

La causa más frecuente y directa de la aparición de la obesidad es la relacionada con el desequilibrio de los hábitos nutricionales. El aumento de la prevalencia de la obesidad a nivel mundial es consecuencia de un gran número de factores, aunque dos son los factores que debemos considerar como los principales. En primer lugar, la ingesta de una dieta hipercalórica, rica en grasas saturadas y carbohidratos simples, y en segundo lugar, la reducción de la actividad física del ser humano<sup>11</sup>. Una dieta equilibrada y la práctica regular de ejercicio físico son claves para evitar la obesidad y mantener un buen estado de salud.

Desde el inicio de la vida, ya a nivel intrauterino, el entorno nutricional y bioquímico son claves para prevenir el problema de la obesidad en la edad adulta. La obesidad en la mujer gestante o la realización de una dieta hipercalórica durante el embarazo puede inducir alteraciones en el curso normal del crecimiento fetal, y predisponer al desarrollo en la edad adulta de la obesidad y sus complicaciones. La obesidad materna durante el embarazo está asociada a alteraciones en los niveles sanguíneos maternos de glucosa, lípidos, citoquinas y ciertas hormonas, pudiendo esta circunstancia determinar el desarrollo de la obesidad en la descendencia. Así, se sabe que los hijos de mujeres obesas son hasta un 36% más propensos a desarrollar una DM2 que los hijos de mujeres con normopeso<sup>11</sup>.

En el desarrollo de la obesidad existe una contribución ambiental evidente, pero también existe una **susceptibilidad genética** que conduce a diferentes grados de obesidad. Genéticamente, la obesidad se clasifica en 3 subtipos. La **obesidad monogénica** que produce una obesidad extrema. Actualmente, existen descritas cerca de 20 de alteraciones en un único gen que producen esta forma autosómica de obesidad. La **obesidad sindrómica**, donde además de la obesidad hay retraso mental, rasgos dismórficos, y anormalidades de desarrollo órgano específicas. Se produce por defectos genéticos discretos o anomalías cromosómicas que afectan a varios genes y puede ser de herencia autosómica o ligada al cromosoma X. Por último, tenemos la **obesidad común o poligénica**, donde los estudios epidemiológicos han demostrado que la tendencia a su padecimiento disminuye en paralelo con el grado de parentesco, apuntando así, a un componente genético en la susceptibilidad a este tipo de obesidad. Estudios realizados en personas que han sido recogidas en adopción han demostrado que su IMC correlaciona en mayor modo con el de sus padres biológicos, resaltando así

el componente genético de la obesidad respecto al ambiental. En el año 2007 se identificó con éxito el primer locus asociado a la susceptibilidad al desarrollo de la obesidad poligénica, el locus FTO (gen asociado con la masa grasa y la obesidad). Actualmente, se han reconocido más de una veintena de locus que contienen genes involucrados en el desarrollo de la obesidad poligénica. Estos genes están implicados en la regulación de la ingesta de alimentos a través de su acción sobre el sistema nervioso central y en la funcionalidad del tejido adiposo<sup>12</sup>.

Otras veces, la aparición de la obesidad se ve favorecida por factores exógenos no alimentarios como son el uso de determinados medicamentos, por ejemplo los corticoesteroides, los antidepresivos y los antipsicóticos.

### 1.3 Parámetros de medida de la obesidad

La obesidad se define como un exceso de adiposidad corporal. Por razones prácticas, el peso corporal se ha utilizado como medida indirecta del grado de adiposidad. En la década de los 80 se introdujo el concepto de **IMC o índice de Quetelet** que es una medida de asociación entre el peso y la talla ( $IMC = \text{peso en Kg/cuadrado de la estatura en m}$ ). El IMC permite una estimación del exceso de peso para una determinada altura. En base a este índice se han delimitado puntos de corte para definir el sobrepeso y la obesidad en mujeres y varones adultos<sup>13</sup>. Posteriormente, se definieron los valores de IMC para niños y adolescentes<sup>14</sup>. Así, hablamos de obesidad cuando el IMC es superior a  $30 \text{ Kg/m}^2$ , de sobrepeso cuando este se halla entre 25 y 29,9 y de normopeso cuando el IMC se encuentra entre 18 y 24,9 (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Definiciones de obesidad según el índice de masa corporal

<i>Categoría</i>	<i>Niños y adolescentes<sup>a</sup> (p)</i>	<i>Adultos<sup>b</sup> (Kg/m<sup>2</sup>)</i>
Peso escaso	<p5	<18,5
Peso normal	p5-85	18,5-24,9
Riesgo de sobrepeso	p85-90	-
Sobrepeso	>p95	25-29,9
Obesidad grado 1	-	30-34,9
Obesidad grado 2	-	35-39,9
Obesidad mórbida	-	40-49,9
Obesidad supermórbida	-	>50

<sup>a</sup> Percentil de IMC para su edad (Centers for Disease Control and Prevention); p = percentil.

<sup>b</sup> Índice de masa corporal (IMC) = peso (en Kg)/cuadrado de la estatura (en m) (NIH y OMS).

Dentro del concepto de obesidad se han descrito algunos subtipos que complementan la relación que existe entre el IMC y sus consecuencias para la salud. Los más clásicos son los que corresponden a la **obesidad androide o abdominal** y a la **obesidad ginecoide**, y fue hace ya más de 50 años que Vague<sup>15</sup> predijo la asociación entre la obesidad androide y el desarrollo de DM2, arterioesclerosis, gota y litiasis renal. Otros subtipos son menos conocidos, pero no por ello menos interesantes, como el fenotipo correspondiente a individuos de peso normal, pero metabólicamente obesos (**metabolically obese normal-weight**); es decir, tienen el IMC normal, pero presentan alteraciones metabólicas típicas de los pacientes obesos: resistencia a la insulina (RI), adiposidad central, cifras bajas de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y elevadas concentraciones de triglicéridos (TG), así como HTA<sup>16</sup>. Al mismo tiempo, existen los denominados “obesos metabólicamente sanos” (**metabolically healthy obese**) que son individuos cuyo IMC es  $> 30 \text{ Kg/m}^2$ , pero que no presentan ninguna de las alteraciones metabólicas típicas de los individuos obesos<sup>17</sup>. La existencia de estos dos últimos subtipos “paradójicos” hace, por una lado, tambalearse el IMC como parámetro ideal para medir la obesidad y sus consecuencias, y también nos ha llevado a que en las últimas dos décadas se hayan realizado estudios de caracterización metabólica y cuantificación del tejido adiposo visceral en contraposición al subcutáneo. En este último sentido, se han desarrollado métodos más precisos de diagnóstico como la **tomografía computarizada (TC)** o la **resonancia magnética (RM)** que permiten delimitar con gran precisión los compartimentos de grasa subcutánea e intraabdominal, pero que por su elevado coste, su tiempo de realización, dificultades de estandarización de la técnica y el riesgo de radiación en el caso del TC, están relegados todavía al terreno de la investigación, donde constituyen buenas herramientas para validar parámetros clínicos y antropométricos. La **impedanciometría bioeléctrica regional** se basa en la baja conductividad del tejido adiposo. Mediante el paso por el organismo de una mínima corriente eléctrica alterna, a una o varias frecuencias, permite determinar la masa grasa de un tejido con mayor precisión que la antropometría y con un menor coste que el TC o la RM. Como inconveniente, esta técnica no permite diferenciar entre los compartimentos grasos visceral y subcutáneo. Así, en la práctica clínica, es el uso de las medidas antropométricas, como el propio IMC, las verdaderas herramientas útiles de medida de la obesidad dada su sencillez, bajo coste y ausencia de riesgos añadidos<sup>18</sup>. A resaltar, que la simple medida del **perímetro de cintura (PC)** ha demostrado ser un excelente marcador de obesidad abdominal, ya que se relaciona estrechamente con la

grasa intraabdominal medida por TC<sup>19</sup>. En adultos el PC es capaz por sí mismo de identificar a personas con riesgo aumentado de morbilidad y mortalidad<sup>20</sup>, complementando así la información proporcionada por el IMC.

## 2. El tejido adiposo

### 2.1 Morfología y función del tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano que poseen todos los mamíferos, cuya importancia real ha sido escasamente reconocida por los científicos hasta hace escasas décadas. El tejido adiposo en el ser humano representa alrededor del 20% del peso corporal, y esto lo convierte en uno de los órganos más grandes del organismo.

Hay dos tipos de tejido adiposo en función de su estructura celular, ubicación, color, vascularización y función: **el tejido adiposo pardo** y **el tejido adiposo blanco**.

El **tejido adiposo pardo** existe en una gran variedad de mamíferos, pero es especialmente importante en aquellos que hibernan. El origen de su nombre se debe a que posee una tonalidad amarronada al poseer una elevada cantidad de mitocondrias y citocromos. En los seres humanos el tejido adiposo pardo está presente sólo en los recién nacidos y su función es la regulación de la termogénesis. La función termogénica del tejido adiposo pardo es debida a su patrón de expresión génica que determina la presencia en sus mitocondrias de una proteína llamada UCP1 (Proteína desacoplante 1) que actúa en la cadena respiratoria desacoplando la síntesis de ATP de la cadena de transporte de electrones para las oxidaciones celulares<sup>21</sup>.

El **tejido adiposo blanco**, al cual haremos siempre referencia a partir de ahora, se distribuye en el organismo en dos principales localizaciones anatómicas: la región hipodérmica o de **tejido adiposo subcutáneo** y el tejido adiposo ubicado alrededor de los órganos o **tejido adiposo visceral**<sup>22</sup>.

La distribución anatómica del tejido adiposo es diferente en ambos sexos. En el hombre, el tejido adiposo se concentra en el cuello, zona lumbosacra y alrededor de los músculos deltoides y tríceps, siendo esta distribución denominada **“androide”**. En la mujer la distribución es llamada **“ginecoide”**, y en este caso la grasa se concentra en las caderas, muslos y mamas<sup>22</sup>.

La adipogénesis varía según la edad y el sexo. La capacidad del tejido adiposo de proliferación y diferenciación es muy elevada durante el primer año de la vida. No obstante, los humanos adultos también pueden formar nuevos adipocitos, ya que el tejido adiposo contiene de por vida, células precursoras de los adipocitos<sup>22</sup>.

Tres son las principales funciones del tejido adiposo. Las dos primeras, más clásicas, son la de actuar como una protección física corporal y, la segunda, la capacidad de

almacenar los lípidos aportados por la dieta y la de liberarlos en la situación de ayuno para garantizar un aporte energético suficiente.

Una tercera función del tejido adiposo, más novedosa para la ciencia, es la **endocrina**, dada su capacidad de secreción de moléculas biológicamente activas. Así, los adipocitos almacenan energía mediante la lipogénesis en los momentos de abundancia nutricional, y la liberan mediante la lipólisis cuando existen necesidades energéticas no cubiertas. Todo este sistema está regulado a través de señales autocrinas, paracrinas y endocrinas<sup>23</sup>. El tejido adiposo secreta factores de crecimiento, adipocitoquinas, quimoquinas y citoquinas formando un “cross-talk” o red de comunicación, tanto a nivel local como sistémico, en respuesta a estímulos o cambios metabólicos<sup>22,24</sup>. La actividad del tejido adiposo se encuentra en un equilibrio dinámico entre la lipogénesis y la lipólisis, estando ambos procesos regulados hormonal y metabólicamente<sup>23</sup>.

A nivel celular, el tejido adiposo está formado por los adipocitos y una fracción estroma vascular en la cual están presentes macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y preadipocitos<sup>25</sup>. Aproximadamente el 90% del volumen de los adipocitos maduros está ocupado por una única gota lipídica. Los adipocitos en formación son multiloculares, con múltiples gotas lipídicas que van uniéndose y aumentando en tamaño hasta convertirse en la gota única del adipocito maduro. La gota lipídica está estabilizada por un entramado proteínico que inhibe su hidrólisis. El núcleo del adipocito queda ubicado en situación periférica y el citoplasma que también se localiza en el exterior celular, contiene algunas mitocondrias, un pequeño aparato de Golgi y un elevado número de ribosomas libres. La membrana celular envuelve el conjunto que presenta un aspecto en anillo de sello<sup>22</sup>.

En la fase postprandrial, los TG llegan a los capilares del músculo y del tejido adiposo transportados en forma de partículas lipídicas como son los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), desde donde sus ácidos grasos (AG) son liberados por la acción enzimática de la **lipoproteinlipasa** (LPL). Los AG no captados por estos tejidos son transportados al hígado unidos a la albúmina. En el citoplasma del adipocito se almacenan los TG a partir de la esterificación de los AG absorbidos con el glicerol fosfato (lipogénesis). La movilización de esta reserva energética o lipólisis se produce por la hidrólisis en los adipocitos de los TG almacenados por la acción de la **lipasa hormono-sensible** (LHS). La actividad de la LPL se regula modificando su cantidad absoluta o regulando su velocidad de acción. La insulina y los glucocorticoides son inductores de la LPL, especialmente en la grasa visceral que posee un mayor

número de receptores al cortisol que la grasa subcutánea. La LHS es llamada así, porque su actividad es regulada por la insulina y las catecolaminas. La LHS es activada por las catecolaminas, la hormona del crecimiento, el glucagón, la ACTH y los corticoides, mientras que la insulina se opone a la acción de las anteriores. Así vemos como la **insulina** es el principal regulador del contenido de grasa de los adipocitos, ya que es un potente inhibidor de la LHS y un importante activador de la LPL, favoreciendo la captación de AG y síntesis de TG por parte de los adipocitos<sup>26</sup>.

## 2.2 Tejido adiposo visceral vs subcutáneo

Las diferencias entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo van más allá de la simple localización anatómica, ya que muestran propiedades metabólicas muy diferenciadas. Así, la denominada **obesidad abdominal**, donde el acumulo de tejido adiposo principal es de **grasa visceral**, está considerada actualmente como un **factor predictivo de riesgo cardiovascular** (RCV) más específico y sensible que el IMC<sup>27</sup>.

Como ya se ha mencionado, algunas de las hormonas que modulan la lipogénesis y la lipólisis son las catecolaminas, la insulina, el glucagón, el cortisol y la ACTH, entre otras. No obstante, su acción presenta diferencias según el tejido adiposo considerado. El tejido graso visceral tiene una mayor velocidad de recambio de los TG que el tejido graso subcutáneo<sup>23</sup>. Así, el tejido adiposo visceral es capaz de una mayor lipólisis que el tejido graso subcutáneo. Además, el tejido graso visceral, expresa más el receptor  $\beta$ -adrenérgico, es más sensible a los esteroides, tiene mayor RI y una mayor expresión de citoquinas inflamatorias<sup>28</sup>. Los adipocitos del tejido graso visceral son más grandes, más resistentes a la acción de la insulina y más activos metabólicamente. Segregan una gran cantidad de adipocitoquinas, adquiriendo de esta manera un papel central en la patogénesis del denominado síndrome metabólico (SM), el cual se caracteriza por ser un estado proinflamatorio, procoagulante y de RI. Así, la adiposidad visceral realiza una mayor aportación a la aparición de las comorbilidades asociadas a la obesidad, y puede ser considerada como un marcador de disfuncionalidad del tejido adiposo<sup>22,24</sup>.

Desde el punto de vista vascular, también existen diferencias entre ambos tejidos grasos. A diferencia del tejido graso subcutáneo, el tejido graso visceral drena directamente en la circulación venosa portal. Sabemos que durante el desarrollo de la obesidad se produce una infiltración por los macrófagos del tejido adiposo y que la tasa de infiltración por los monocitos es mayor en el tejido adiposo visceral que en el

subcutáneo<sup>26,29</sup>. Un estudio realizado en personas con obesidad extrema indicó que la grasa visceral era la principal contribuyente a los niveles de Interleuquina-6 (IL-6) en plasma<sup>30</sup>. Por lo tanto, es muy probable que las adipocitoquinas producidas por el tejido graso visceral influyan directamente sobre el funcionalismo hepático, ya que IL-6 es un inductor de la producción hepática de proteína C reactiva (PCR) y de proteínas implicadas en la hemostasia [inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), fibrinógeno, factor activador del plasminógeno tisular]. IL-6 también interviene en la dislipemia, al desinhibir a nivel de los hepatocitos la proteína microsomal de transferencia de TG, que controla la producción hepática de apolipoproteína B (ApoB) in vitro.

A nivel nervioso, ambos tejidos grasos, el visceral y el subcutáneo, están inervados por el sistema nervioso autónomo y bajo un control neuroendocrino. La estimulación del **sistema nervioso parasimpático** conduce a un **estado anabólico** con disminución de la lipólisis, mientras que la estimulación del **sistema nervioso simpático** produce un **estado catabólico** con reducción de la adipogénesis y estimulación de la lipólisis<sup>22</sup>.

## 2.3 Metabolismo y disfunción del tejido adiposo

En condiciones normales, los adipocitos sintetizan, por un lado, lípidos y los almacenan y por otro, secretan moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias y adipogénicas como: la Adiponectina, el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), la Leptina e IL-6<sup>24</sup>.

Los lípidos almacenados se movilizan y renuevan continuamente. La esterificación de los AG para formar TG y su hidrólisis permiten el recambio diario de aproximadamente el 10% de los depósitos lipídicos del tejido adiposo<sup>22</sup>.

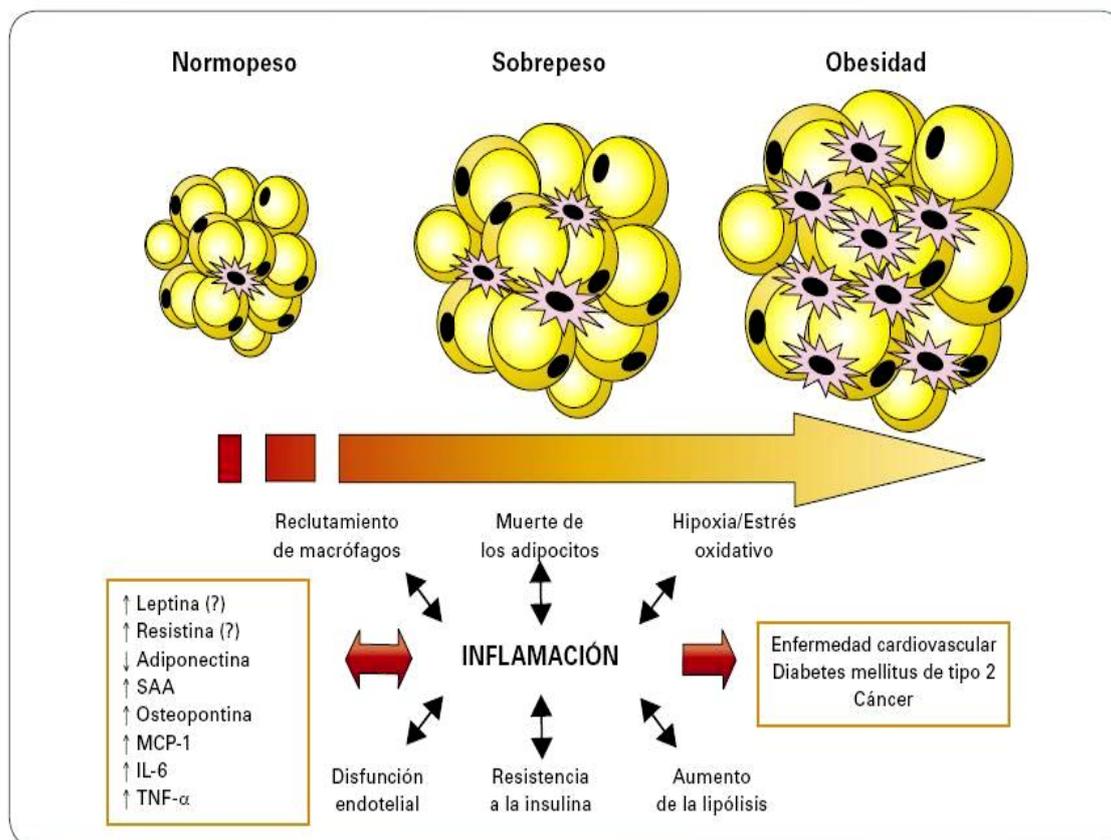
Para la síntesis de TG se requiere de AG y glicerol. Las principales fuentes de AG son el hígado y el intestino delgado. En el hígado, los AG se esterifican con el glicerol, formando TG, que son transportados por moléculas VLDL hasta el tejido adiposo. Para poder entrar en los adipocitos, los TG que son polares, han de ser hidrolizados antes de traspasar la membrana celular. La hidrólisis de los TG transportados por las partículas VLDL y quilomicrones es realizada por la enzima LPL que forma parte de la estructura de estas partículas. Seguidamente, el glicerol vuelve a la circulación y los AG que han entrado en el adipocito se vuelven a esterificar con glicerol, este último sintetizado a partir de glucosa<sup>22</sup>.

La masa grasa depende tanto del número como del tamaño de los adipocitos. En condiciones normales, el número de adipocitos se establece y se mantiene aproximadamente constante al inicio de la vida adulta, y las pequeñas variaciones de peso implicarán únicamente cambios en el tamaño de los adipocitos. No obstante, este aumento del volumen celular queda limitado por la capacidad máxima de almacenaje del adipocito, que oscila entre 0,7-0,8  $\mu\text{g}$ . de lípidos por adipocito. Alcanzado este máximo, situación denominada **hipertrofia**, el paso siguiente supone la formación de nuevos adipocitos obtenidos a partir de la diferenciación de preadipocitos, situación denominada **hiperplasia**<sup>24</sup>.

Los adipocitos hipertróficos muestran RI, y dado que en condiciones normales la insulina favorece la lipogénesis, la RI favorece el proceso contrario en el interior del adipocito, la lipólisis, con la consiguiente descarga de AG al torrente sanguíneo. Este aumento de la lipólisis es del orden de un 50% respecto al de los individuos sanos. Adicionalmente, los adipocitos hipertróficos expresan un perfil de adipocitoquinas alterado: aumentando las citoquinas inflamatorias y disminuyendo la producción de Adiponectina, creándose así, un **microambiente proinflamatorio y procancerígeno**<sup>31</sup>.

En la obesidad existe un exceso de tejido adiposo, y ello produce en consecuencia unos niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, generándose un **estado crónico inflamatorio de bajo grado (Figura 1)**. El tejido adiposo de los individuos obesos presenta una elevada infiltración por macrófagos, en un porcentaje que correlaciona con el grado de obesidad. Los adipocitos y los macrófagos inducen entre sí un cambio en el perfil de secreción de adipocitoquinas provocando la perpetuación del estado de inflamación. La alteración en el perfil de adipocitoquinas tiene consecuencias a nivel metabólico, ya que aumenta la lipólisis, se modifica el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, y todo ello propicia la aparición de **dislipemia, hipertensión arterial, aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico**.

Es este ambiente de hipersecreción de adipocitoquinas proinflamatorias, proaterogénicas y prodiabetogénicas, acompañado de la disminución de la producción de Adiponectina, el que se denomina **estado de disfunción del tejido adiposo**<sup>31</sup>.



**Figura 1. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado proinflamatorio.** A medida que aumenta el tejido adiposo, se modifica la producción de adipocitoquinas y se desencadenan una serie de procesos fisiopatológicos relacionados con la inflamación que van a conducir a un incremento del riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus de tipo 2 y cáncer, entre otras comorbilidades. IL-6: interleuquina-6; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; SAA: amiloide sérico A; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . De Gómez-Ambrosi et al. (2008).

## 2.4 La respuesta inflamatoria

La inflamación es la respuesta a la lesión celular provocada por un traumatismo o infección. Esta respuesta inflamatoria está constituida por una compleja red de interacciones moleculares y celulares dirigidas a facilitar la reparación del tejido y el retorno a la situación de homeostasis fisiológica. Si el tejido inflamado no recupera la normalidad, o si la inflamación persiste en un grado leve, la situación inflamatoria se cronifica siendo capaz de dañar de forma continuada a los tejidos circundantes. Los daños colaterales causados por este tipo de inflamación son, por lo general, lentamente acumulativos, a veces son asintomáticos durante años, pero pueden conducir con el tiempo a un deterioro grave de los tejidos<sup>32</sup>.

La respuesta inflamatoria está compuesta por el componente local y un componente sistémico ambos mediados por citoquinas. Aunque la respuesta inflamatoria es diferente

según la etiología causal, esta se caracteriza, en su conjunto, por involucrar a un espectro común de genes y mediadores endógenos, que incluye a factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias tales como la Interleuquina 1 (IL-1), TNF- $\alpha$ , IL-6, quimioquinas [proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), Interleuquina-8 (IL-8)], metaloproteinasas, y las moléculas tóxicas como el óxido nítrico y los radicales libres<sup>33</sup>.

Las citoquinas son moléculas que en gran medida se secretan a un microambiente tisular inmediato, proporcionando señales entre las células, formando parte de una gran y compleja red de señalización molecular. Los efectos de las citoquinas en las células diana pueden ser inhibidos o aumentados por otras citoquinas, hormonas, receptores de citoquinas circulantes y sus antagonistas. TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 son clásicas citoquinas proinflamatorias<sup>34</sup> y su capacidad para producir acciones tanto a nivel local como sistémico están bien establecidas. A nivel local, contribuyen a la activación de las células inflamatorias, y junto con las quimioquinas, las cuales inducen la expresión de moléculas de adhesión, producen su agrupamiento local. Cuando la respuesta inflamatoria es de intensidad elevada se incrementa la producción de citoquinas y estas son liberadas al torrente circulatorio provocando **“la respuesta de fase aguda”**. Por otro lado, existen citoquinas que antagonizan la inflamación, como Interleuquina 10 (IL-10), que actúan inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, intentando disminuir el proceso inflamatorio con el objetivo de intentar recuperar la homeostasis<sup>35</sup>. La respuesta inflamatoria de fase aguda incluye la leucocitosis, la fiebre, la somnolencia, la anorexia y el incremento en la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, como la PCR. Esta es una respuesta inflamatoria que se activa rápidamente ante infecciones o traumatismos a través de reconocimiento de patrones moleculares. Así, después de producirse una infección, rápidamente aumentan estas proteínas de la fase aguda y su producción está principalmente controlada por citoquinas del tipo IL-6 e IL-1. Estas proteínas de fase aguda influyen en el tráfico celular y la liberación de mediadores proporcionando una mayor protección contra los microorganismos al modificar la respuesta inflamatoria. Algunas de ellas tienen efectos antiinflamatorios, mientras que otras tienen importantes efectos sobre la activación leucocitaria<sup>36</sup>.

### **2.4.1 Obesidad e inflamación**

El tejido adiposo está formado por adipocitos y una fracción estroma vascular compuesta por linfocitos, fibroblastos, células endoteliales y estromales, y

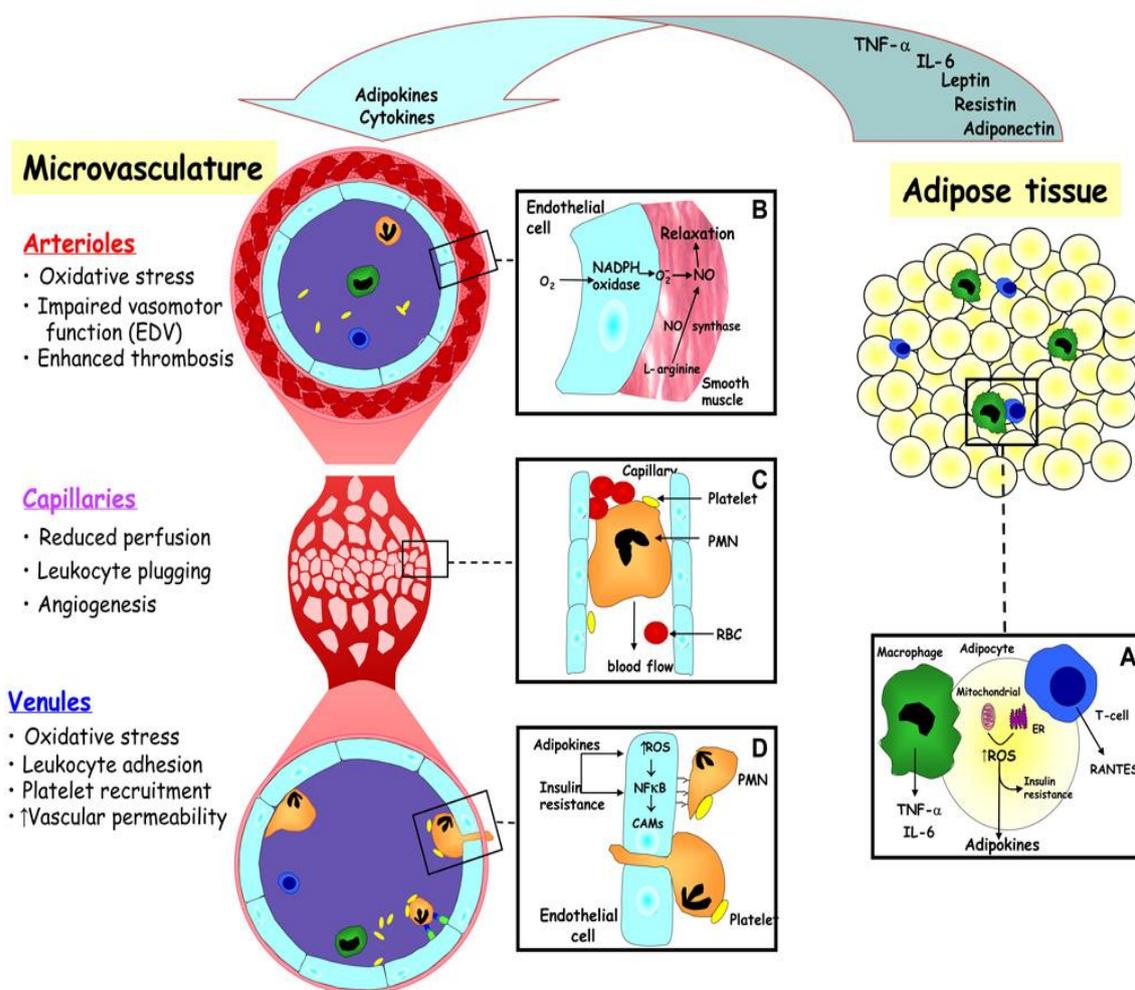
preadipocitos. Hoy sabemos que además de su capacidad para almacenar lípidos, tiene una importante función inmunológica participando de forma activa en el **estado inflamatorio crónico de bajo grado que se asocia a la obesidad**<sup>28</sup>.

El estado inflamatorio crónico de bajo grado que se asocia a la obesidad es el resultado de la aparición de una progresiva y creciente de la RI, y de la secreción de mediadores inflamatorios por parte del tejido adiposo en expansión. Como ocurre con otros factores de riesgo cardiovasculares (FRCV); como la HTA y la dislipemia, la obesidad induce la aparición de un **fenotipo inflamatorio**. La obesidad frecuentemente se encuentra asociada a estos FRCV, siendo el resultado final un aumento del estado de inflamación sistémica y de la severidad evolutiva de las enfermedades cardiovasculares asociadas<sup>31,37</sup>.

La obesidad supone, en sus fases iniciales, el aumento del depósito de lípidos en los adipocitos, la hipertrofia del adipocito, pero llega un momento en su progresión en que se producirá también el aumento en el número de adipocitos o hiperplasia. Existen evidencias de que la hipertrofia de los adipocitos desencadena una situación de importante estrés, provocando la activación celular y la consecuente producción de péptidos que modulan procesos fisiológicos como son: la sensación de hambre, la inmunidad, la homeostasis energética y la inflamación<sup>37</sup>.

Esta situación de estrés adipocitario, a nivel celular se manifiesta principalmente en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias. La disfunción del retículo endoplásmico que acompaña a la hipertrofia de los adipocitos puede producir una modificación postraduccional incorrecta de las proteínas, que se manifiesta como una alteración de la estructura proteica terciaria; su incorrecto plegamiento espacial, y una alteración de su actividad. La disfunción mitocondrial puede ser consecuencia del procesamiento del exceso de AG, acumulándose un exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO), que provocan paralelamente un estrés oxidativo en el entorno celular de los adipocitos. En respuesta a esta situación de estrés, los adipocitos se activan y asumen un fenotipo proinflamatorio y de RI<sup>37</sup>.

Los adipocitos activados secretan citoquinas llamadas **adipoquinas o adipocitoquinas**. Estos péptidos poseen efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos, cuya acción puede ser tanto local como sistémica (**Figura 2**).

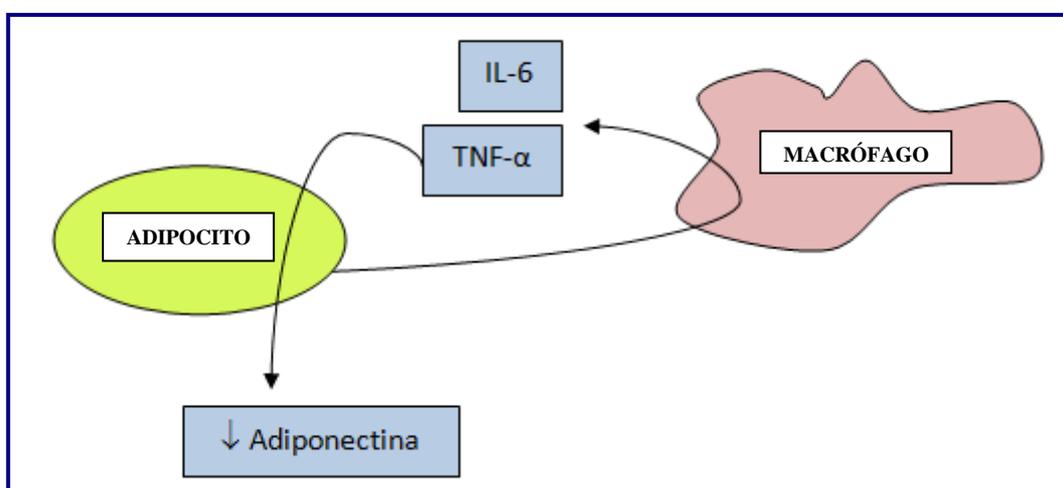


**Figura 2. Relación del tejido adiposo con la inflamación en la obesidad.** Adipocitos, macrófagos y linfocitos T residentes en el tejido adiposo hipertrofico son activados por mecanismos dependientes de la actividad mitocondrial y del retículo endoplásmico (**Recuadro A**) para producir y secretar una variedad de mediadores (citoquinas, quimioquinas y adipocitoquinas). Estas sustancias ejercen una acción paracrina sobre la microcirculación local y una acción endocrina a distancia sobre los vasos de los diferentes tejidos, induciendo los cambios fenotípicos que son característicos de una respuesta inflamatoria. En las arteriolas (**Recuadro B**), estos mediadores que han sido producidos por el tejido adiposo inducen la producción de radicales superóxido, los cuales inactivan la acción de relajación que sobre la musculatura lisa vascular produce el óxido nítrico, produciéndose una vasoconstricción y disminución de la perfusión tisular. Además, estos mediadores, empeoran aún más la perfusión tisular al activar a los leucocitos, los cuales se convierten en menos deformables, aumentando la resistencia a su paso por los capilares (**Recuadro C**). El estado resultante de hipoxia promueve la angiogénesis. La respuesta de las vénulas a los mediadores es la de aumentar la expresión de moléculas de adhesión celular endotelial (CAMs) que promueven el reclutamiento de leucocitos y plaquetas (**Recuadro D**), lo cual posteriormente produce una alteración de la barrera endotelial, aumentando la permeabilidad vascular y el edema intersticial. Vachharajani et al. (2009).

Uno de los procesos que tienen lugar en los estados inflamatorios es la infiltración de los tejidos afectados por células del sistema inmune, como son los macrófagos. La hipertrofia de los adipocitos implica un aumento en la producción de adipocitoquinas, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, entre otras. El aumento de estas moléculas desencadena efectos locales, tales como el aumento de moléculas de adhesión endoteliales (VCAM-1, ICAM-1) y de permeabilidad vascular, aumentando

así la infiltración por las células del sistema inmunitario, como los macrófagos, los cuales sintetizan más factores quimiotácticos que atraen más células, perpetuando en el tiempo el estado proinflamatorio<sup>31</sup>.

Otra función de los macrófagos residentes en el tejido adiposo es la de modulación de la función de los adipocitos. La influencia de adipocitos y macrófagos entre sí, se constata en la inducción sobre los macrófagos por el TNF- $\alpha$  e IL-6 segregado por los adipocitos; y en la inducción sobre los adipocitos por los macrófagos a través de la acción del TNF- $\alpha$ , reduciendo la expresión de Adiponectina. Esta intermodulación conlleva a la perpetuación del estado inflamatorio leve<sup>37</sup>.



**Figura 3. Representación de la espiral que favorece la situación de inflamación crónica.** El adipocito hipertrófico se activa e induce en los macrófagos la síntesis de citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6. TNF- $\alpha$  disminuye la expresión de la citoquina antiinflamatoria Adiponectina.

Es importante que, aunque otros tejidos alejados del tejido adiposo no muestren una respuesta inflamatoria, sí se encuentran expuestos a la modulación de las adipocitoquinas segregadas por los adipocitos activados por su hipertrofia<sup>37</sup>

El aumento de las citoquinas inflamatorias durante la obesidad produce un aumento de la lipólisis y una disminución en la capacidad de almacenaje de los TG por parte de los adipocitos. Esto se traduce en un aumento de los AG circulantes y su depósito en forma de TG en el músculo, hecho que contribuye a la RI<sup>31</sup>.

En los pacientes obesos, los reguladores positivos de la inflamación presentan un aumento de su expresión en el tejido adiposo. No obstante, en situaciones de restricción calórica, el transcriptograma de tejido adiposo revierte hacia una situación similar a la

de los pacientes con normopeso, volviendo a exhibir niveles bajos de adipocitoquinas proinflamatorias y altos de las antiinflamatorias<sup>28</sup>.

Además del estado inflamatorio de bajo grado, la obesidad tiene otras consecuencias. Las dietas hipercalóricas mantenidas a lo largo del tiempo pueden sobrepasar la capacidad de almacenaje de los adipocitos, llevando a un aumento de los AG circulantes, con consecuencias sistémicas. Estos lípidos depositados son citotóxicos para algunas células sensibles, lo que provoca situaciones patológicas como las descritas en la **tabla 2**. Los mecanismos mediante los cuales se produce el efecto citotóxico por el depósito de los lípidos no son completamente conocidos, si bien diferentes estudios han mostrado que los AG desacoplan la fosforilación oxidativa y aumentan la producción mitocondrial de ERO, induciendo también estrés en el retículo endoplásmico. Este estrés mitocondrial y del retículo endoplásmico es similar al que se produce en los adipocitos activados<sup>28</sup>.

**Tabla 2.** Situaciones patológicas consecuencia del acúmulo citotóxico de lípidos, según el tejido afectado<sup>28</sup>.

Tejido afectado	Consecuencia citotóxica
Células $\beta$ -Pancreáticas	Desarrollo de DM2
Células Endoteliales	Hipertensión arterial
Células Hepáticas	Esteatosis, que puede progresar a esteatohepatitis
Músculo Esquelético	Resistencia periférica a la insulina

## 2.5 Mediadores inflamatorios

### 2.5.1 Las adipocitoquinas

El tejido adiposo blanco sintetiza una elevada cantidad de moléculas biológicamente activas; alguna de ellas son citoquinas, también llamadas **adipoquinas** o **adipocitoquinas** por ser segregadas por el tejido adiposo, las cuales participan en la modulación de la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad. Cuando en el ser humano se mantiene la situación de obesidad a lo largo del tiempo, el organismo realiza una serie de cambios en relación con este estado inflamatorio crónico de bajo grado que se manifiestan en el aumento a nivel circulatorio de marcadores inflamatorios como la PCR, el TNF- $\alpha$  y el fibrinógeno<sup>31</sup>. Este cambio en el perfil de citoquinas y adipocitoquinas es la piedra angular del proceso inflamatorio crónico presente en la

obesidad. Las adipocitoquinas reflejan únicamente las citoquinas segregadas por el tejido adiposo, donde también existe una fracción celular no adipocitaria que es también fuente importante de proteínas moduladoras, reflejando esta situación la estrecha relación entre los adipocitos y las células hematopoyéticas infiltradas en el tejido adiposo<sup>28</sup>.

A continuación se describen los conocimientos sobre las adipocitoquinas más estudiadas hasta la actualidad (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Principales adipocitoquinas implicadas en la inflamación**

<b>Adipocitoquina</b>	<b>Función y participación específica en la inflamación</b>
<b>Adiponectina</b>	Función protectora en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus de tipo 2. Efecto antiinflamatorio
<b>Apelina</b>	Ligando del receptor APJ. Participa en la regulación de la presión arterial y la contractilidad cardíaca. Aumenta en la obesidad y la inflamación, pero podría tener un efecto compensatorio antiinflamatorio
<b>Chemerina</b>	Proteína quimiotáctica implicada en la inmunidad innata y adquirida. Aumentada en la obesidad. Aunque se le ha atribuido un papel proinflamatorio al participar en el reclutamiento y la activación de células del sistema inmune, podría tener un efecto antiinflamatorio
<b>Factor tisular</b>	Principal iniciador de la cascada de la coagulación
<b>Hepcidina</b>	Podría estar implicada en la hipoferremia que acompaña la inflamación en los pacientes obesos
<b>HGF</b>	Factor angiogénico con efecto antiinflamatorio
<b>IL-6</b>	Mediador de inflamación con efectos en el metabolismo glucídico y lipídico
<b>Leptina</b>	Gran pleiotropismo. Homeostasis energética. Factor permisivo/estimulador del sistema inmune. Supuesto efecto proinflamatorio
<b>Lipocalina-2</b>	Marcador de inflamación relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina. También se ha descrito un efecto autocrino/paracrino sobre los adipocitos al antagonizar el efecto de moléculas proinflamatorias y un efecto supresor sobre la liberación de citocinas por los macrófagos

<b>Adipocitoquina</b>	<i>Función y participación específica en la inflamación</i>
<b>MCP-1</b>	Molécula quimioatrayente. Resulta clave para la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo que tiene lugar en la obesidad
<b>Omentina</b>	Efectos insulino-sensibilizantes en humanos. Podría participar en la inflamación y la respuesta a las infecciones
<b>Osteopontina</b>	Proteína multifuncional implicada en el metabolismo óseo, metástasis e inflamación. Implicada en el estado proinflamatorio asociado con la obesidad y con el desarrollo de resistencia a la insulina
<b>PAI-1</b>	Potente inhibidor del sistema fibrinolítico
<b>RBP4</b>	Posible regulador de la sensibilidad a la insulina. Correlación positiva con marcadores de inflamación
<b>Resistina</b>	Efecto proinflamatorio. Regulador del metabolismo lipídico. Implicación en la resistencia a la insulina en humanos dudosa
<b>SAA</b>	Reactante de fase aguda muy expresado en tejido adiposo. Podría participar en el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo. Promueve la expresión de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ por parte del endotelio. Inductor de la lipólisis en relación con un aumento de la resistencia a la insulina mediada por ácidos grasos libres
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Regulador de la proliferación y diferenciación celular. Regulador de la apoptosis y de la liberación de factores proinflamatorios
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Importante mediador de inflamación. Implicado también en el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad
<b>Trombospondina-1</b>	Factor angiogénico y regulador de TGF- $\beta$ . Implicada en la respuesta inflamatoria del tejido adiposo mediada por los macrófagos. Podría estar implicada en la elevación del PAI-1
<b>Vaspina</b>	Efecto insulino-sensibilizante. Relacionada negativamente con los niveles de proteína C-reactiva, lo que podría indicar un efecto protector frente a la inflamación
<b>Visfatina</b>	Aparente efecto insulino-mimético. Inhibe la apoptosis de neutrófilos. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión de manera dependiente del estrés oxidativo y de NF- $\kappa$ B

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IL-6: interleuquina 6; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; RBP4: proteína transportadora de retinol tipo 4; SAA: amiloide sérico A; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

### 2.5.1.1 Adiponectina

La Adiponectina es una proteína de 224 aminoácidos codificada por el gen APM1, que se expresa casi exclusivamente en el tejido adiposo. Su estructura es similar al factor C1q del complemento y a la de los colágenos VIII y X<sup>38</sup>. Las concentraciones plasmáticas de Adiponectina están disminuidas en pacientes obesos y aumentan con la pérdida ponderal. De modo similar, se encuentran bajas concentraciones de esta hormona en personas con enfermedad cardiovascular<sup>39</sup>.

La Adiponectina se ha relacionado con un **efecto antiinflamatorio**. Se ha demostrado que la Adiponectina incrementa la sensibilidad a la insulina y previene la acumulación de lípidos en el músculo esquelético e hígado, y aumenta su oxidación, a través de la activación de la quinasa dependiente del AMP<sup>37,38</sup>.

Las concentraciones séricas de Adiponectina en individuos no obesos son del orden de 5 a 30 mg/L, pero disminuyen a medida que aumenta la adiposidad. Además, se correlacionan de forma inversa con la PCR y de forma directa con la sensibilidad a la insulina<sup>38</sup>. Algunos estudios indican que la deficiencia de Adiponectina aumenta el riesgo de desarrollo de RI, inflamación y aterosclerosis<sup>37,38</sup>.

El papel protector de Adiponectina frente a la inflamación parece deberse a que inhibe la expresión de moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1 y VCAM-1) inducida por TNF- $\alpha$ , disminuye la respuesta inflamatoria regulando la maduración de los macrófagos y la señalización a través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), y suprime la formación de células espumosas, así como la proliferación y migración de células de músculo liso vascular<sup>40</sup>.

### 2.5.1.2 Interleuquina-6

La IL-6 es un mediador de inflamación con efectos pleiotrópicos en una gran variedad de tejidos, incluyendo la estimulación de la síntesis de proteínas de fase aguda y la regulación del metabolismo glucídico y lipídico<sup>41</sup>. El tejido adiposo es una fuente importante de IL-6. Alrededor del 30% de la IL-6 circulante proviene del tejido adiposo visceral, cuya producción es mayor que la del tejido adiposo subcutáneo. Existe una intensa asociación entre el grado de expresión de IL-6 en el tejido adiposo y los niveles circulantes de IL-6 y de PCR<sup>42</sup>. Por otra parte, la IL-6 reduce la capacidad de la

insulina para suprimir la producción hepática de glucosa y reduce la captación de glucosa inducida por la insulina en el músculo esquelético<sup>43</sup>. Los pacientes obesos presentan concentraciones elevadas de IL-6 y su papel en la relación entre obesidad e inflamación parece evidente. En las personas obesas se ha asociado de manera significativa a IL-6 con el IMC, PC y la obesidad visceral. Se ha propuesto a la IL-6 como el nexo de unión entre la obesidad, la inflamación y la enfermedad coronaria<sup>44</sup>.

### 2.5.1.3 Leptina

La Leptina es una proteína de 16 kDa (167 aminoácidos), codificada por gen *ob* localizado en el cromosoma 7 de los seres humanos. Su acción se realiza a través del receptor OB-R<sup>40</sup>.

La Leptina está producida principalmente por el tejido adiposo, sobre todo por el tejido graso subcutáneo, pero también se expresa en otros tejidos. La Leptina se produce de manera proporcional a la cantidad de grasa corporal y funciona como un **factor de saciedad o lipostato**, es decir, como una señal que informa al hipotálamo sobre el tamaño de los depósitos de grasa del organismo<sup>45</sup>. En los períodos de ayuno, la masa adiposa y los niveles plasmáticos de Leptina disminuyen, iniciándose la respuesta orexígena e inhibiéndose la respuesta anorexígena; de esta manera, se estimula la sensación de hambre y se favorece la ingesta de alimentos. En los períodos postingesta, aumenta la concentración sérica de glucosa e insulina, aumentando los niveles circulantes de Leptina, lo que induce sensación de saciedad<sup>46</sup>.

Aparte de su bien conocida función reguladora de la homeostasis energética, la Leptina participa en otros muchos procesos como la regulación de la función neuroendocrina, la hematopoyesis, la angiogénesis, y la reproducción<sup>40</sup>.

Las concentraciones circulantes de Leptina son mayores en mujeres que en hombres, y mayores en los individuos obesos que en los normopeso. Así, en la obesidad se produce una situación de **resistencia a la Leptina**, perdiéndose la actividad anorexígena de la Leptina<sup>40</sup>.

Leptina tiene importantes efectos sobre la homeostasis de la glucosa mejorando la misma en ratones y humanos con lipodistrofia. Sin embargo, es importante destacar que Leptina, no corrige la hiperglucemia en pacientes obesos, lo cual apoya el concepto de resistencia a la Leptina en estos pacientes. Además, Leptina mejora la sensibilidad hepática a la insulina. Como en el músculo, Leptina disminuye los niveles intracelulares

de TG hepáticos. Leptina podría tener una interacción directa en el metabolismo de la insulina inhibiendo su liberación. En conjunto todos estos datos apoyarían el papel de la Leptina en la regulación de la homeostasis de la glucosa<sup>47</sup>.

Las evidencias que apuntan a una posible participación de la Leptina como adipocitoquina **proinflamatoria** cada vez son mayores. Si bien es cierto que las concentraciones circulantes de Leptina aumentan ante estímulos proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 o lipopolisacárido, también se ha sugerido que esta elevación podría tener una función protectora en algunos procesos como la artritis reumatoide. Los ratones carentes de Leptina o de su receptor son menos propensos al desarrollo de enfermedades con componente inflamatorio<sup>48</sup>.

Se ha sugerido una estrecha relación entre la Leptina y la PCR. En experimentos *in vitro*, la PCR humana inhibe la unión de la Leptina con sus receptores. *In vivo*, la infusión de PCR humana en ratones ob/ob bloquea los efectos de Leptina sobre la saciedad y la reducción del peso corporal. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la PCR contribuye en la resistencia a la Leptina al ser capaz de atenuar sus funciones fisiológicas<sup>49</sup>. No obstante, otros autores no han podido replicar estos hallazgos<sup>50</sup>. Asimismo, se ha sugerido que la Leptina podría ser un determinante de los niveles circulantes de la PCR en humanos<sup>51</sup>. Sin embargo, otros investigadores no encuentran tal asociación después de ajustar en función del porcentaje de la grasa corporal sus resultados<sup>52</sup>. Como puede apreciarse, el papel proinflamatorio de la Leptina no está todavía del todo esclarecido.

#### 2.5.1.4 Lipocalina 2

Recientemente, se ha descrito a Lipocalina 2 como un marcador de inflamación relacionado con la obesidad y la RI<sup>53</sup> que se encuentra elevado en pacientes con enfermedad coronaria<sup>54</sup>. Lipocalina 2 presenta un alto nivel de expresión en tejido adiposo y se encuentra sobreexpresada tanto en este tejido como en el hígado de ratones obesos diabéticos. La expresión de Lipocalina 2 se ve estimulada por factores que promueven la RI, como corticoides o TNF- $\alpha$ . Además, se ha observado que la administración de rosiglitazona a ratones obesos diabéticos reduce las concentraciones séricas de Lipocalina 2, lo que a su vez se correlaciona con una disminución en la inflamación<sup>51</sup>. En humanos, estos mismos autores, demostraron que los niveles

circulantes de Lipocalina 2 correlacionaban positivamente con la obesidad, los niveles circulantes de TG, glucosa, PCR ultrasensible y el grado de insulín resistencia<sup>55</sup>.

### 2.5.1.5 Resistina

Resistina es una hormona de 108 aminoácidos que ha sido implicada en la patogénesis de la obesidad asociada a RI y DM2 en modelos de ratón, mientras que su papel en los humanos es objeto de debate.

La Resistina inhibe la adipogénesis, pero, al mismo tiempo, su expresión aumenta durante la diferenciación de adipocitos, lo cual parece indicar que Resistina podría actuar como una señal negativa de retroalimentación para reducir la formación de tejido adiposo. Se ha descrito, en diferentes modelos genéticos o dietéticos de obesidad en roedores, un aumento en las concentraciones plasmáticas de Resistina<sup>56</sup>. Paradójicamente, la expresión de Resistina en el tejido adiposo blanco de estos animales se encuentra muy reprimida<sup>57</sup>.

Las evidencias científicas disponibles hasta la fecha sugieren que la Resistina no desempeña un papel importante en el desarrollo de la RI en humanos<sup>58</sup>. En cambio, parece que sí podría tener implicación en la inflamación. En este sentido, se ha observado que Resistina se correlaciona con marcadores de inflamación y es un predictor de enfermedad coronaria en humanos independientemente de la PCR<sup>59</sup>.

Aunque la función fisiológica exacta de la Resistina en humanos todavía no ha sido esclarecida, se han descrito algunos mecanismos que podrían ayudar a entender su efecto **proinflamatorio**<sup>41</sup>. Resistina y Adiponectina tienen efectos antagónicos sobre las células endoteliales vasculares. Resistina tiene un efecto activador directo de las células endoteliales vasculares a través de la producción de endotelina-1, induce la expresión de las moléculas de adhesión endotelial (VCAM1 e ICAM1) y de quimiocinas, además de potenciar los efectos del ligando de CD40<sup>60</sup>, mientras que Adiponectina regula a la baja la expresión de estas moléculas.

### 2.5.1.6 Factor de necrosis tumoral alfa y sus receptores R1/R2

El TNF- $\alpha$  es una **citoquina proinflamatoria** codificada en el cromosoma 6. La proteína expresada tiene un peso molecular de 27 kDa (233 aminoácidos) y es escindida proteolíticamente para obtener un protómero de 17 KDa (157 aminoácidos)<sup>61</sup>.

En el tejido adiposo los principales productores de TNF- $\alpha$  son los macrófagos y los linfocitos<sup>61</sup>. TNF- $\alpha$  tiene múltiples acciones en el tejido adiposo: aumenta la RI, disminuye la actividad de la LPL y aumenta la sensibilidad a la lipasa para evitar la acumulación de lípidos<sup>62</sup>.

El TNF- $\alpha$  se encuentra muy implicado en la inflamación secundaria a la obesidad, induciendo un aumento en la expresión de la PCR hepática y una disminución en la expresión de Adiponectina en los adipocitos.

El TNF- $\alpha$  **acelera el desarrollo de la aterosclerosis** al inducir en las células endoteliales vasculares la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y selectina-E, y favoreciendo la formación de células espumosas por los macrófagos.

Esta citoquina actúa a través de dos receptores de membrana: TNFR1 y TNFR2. La porción extracelular del receptor puede escindirse y existir de forma independiente como un receptor soluble, pero manteniendo su capacidad de unión a la citoquina. El receptor soluble competiría con el receptor de transmembrana por la unión al TNF- $\alpha$  disminuyendo así su acción celular<sup>62</sup>. TNF- $\alpha$  presenta la misma afinidad por ambos receptores. La unión de TNF- $\alpha$  al receptor TNFR1 se considera un mecanismo irreversible; en cambio su unión al receptor TNFR2 es reversible y parece concentrar a esta citoquina en la superficie celular para después transferirla al receptor TNFR1<sup>61</sup>.

Diferentes estudios muestran concentraciones de TNF- $\alpha$  similares o escasamente diferenciadas entre personas con obesidad mórbida y personas con normopeso, pero en cambio, sí se detectan concentraciones aumentadas de los receptores en los estados de obesidad. En cuanto a su determinación sérica, es mejor la determinación de los receptores que la de la propia citoquina, dada la corta vida del TNF- $\alpha$  en la circulación y la mayor estabilidad de la molécula del receptor<sup>62</sup>.

#### 2.5.1.7 Proteína transportadora de retinol tipo 4

La proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) es una proteína de 22-25 kDa, que sirve de proteína transportadora de la vitamina A. Se expresa principalmente en el hígado, pero también se expresa en otros tejidos, como el adiposo. Se ha demostrado que tanto la expresión de RBP4 en tejido adiposo como los niveles séricos están aumentados en modelos murinos de obesidad y de RI. Además, la reducción farmacológica de RBP4 mejora la sensibilidad a la insulina en la obesidad inducida por la dieta. Parece que el RBP4 estimula la gluconeogénesis hepática y altera la señalización de la insulina en el músculo<sup>63</sup>. Se ha sugerido que las concentraciones circulantes de RBP4 se

encuentran elevadas en pacientes con obesidad y DM2<sup>64</sup>. Sin embargo, otros autores han obtenido resultados contrarios<sup>65,66</sup>.

Recientemente, se ha descrito que el RBP4 presenta una correlación positiva con marcadores de inflamación como MCP-1 y CD68 (un marcador específico de macrófagos) en adultos<sup>67</sup>, así como una correlación positiva con la PCR, y negativa con la Adiponectina en niños<sup>68</sup>. Estos hechos plantean la posibilidad de la existencia de una conexión fisiopatológica entre RBP4 e inflamación.

## 2.5.2 Proteínas de fase aguda

### 2.5.2.1 La proteína C reactiva

La PCR es un marcador muy sensible sistémico de inflamación y daño tisular<sup>34</sup>. El gen que codifica esta proteína se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1; contiene un único intrón, que separa el péptido señal de la región que codifica la proteína madura. Su vida media en la circulación es de 19 horas y no presenta variaciones circadianas. En donantes de sangre sanos, la concentración media de PCR es 0,8 mg/dl, pero tras su estimulación aguda sus valores pueden aumentar hasta 10.000 veces. En la mayoría, pero no en todas las enfermedades, los niveles circulantes de PCR reflejan la presencia de una inflamación en curso con una precisión mucho mayor que otros parámetros bioquímicos de inflamación, como es la velocidad de sedimentación globular<sup>69</sup>.

En condiciones normales la PCR es sintetizada principalmente por el hígado, incrementándose su expresión en respuesta a citoquinas como TNF-  $\alpha$ , IL-1 y IL6, y parece incrementar el efecto proinflamatorio de estas citoquinas, induciendo el fenotipo inflamatorio en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, las cuales incrementan la expresión de moléculas de adhesión y la producción de ERO<sup>70</sup>. La inducción de la PCR en los hepatocitos se encuentra regulada a nivel transcripcional por la IL-6, proceso que puede ser incrementado por IL-1.

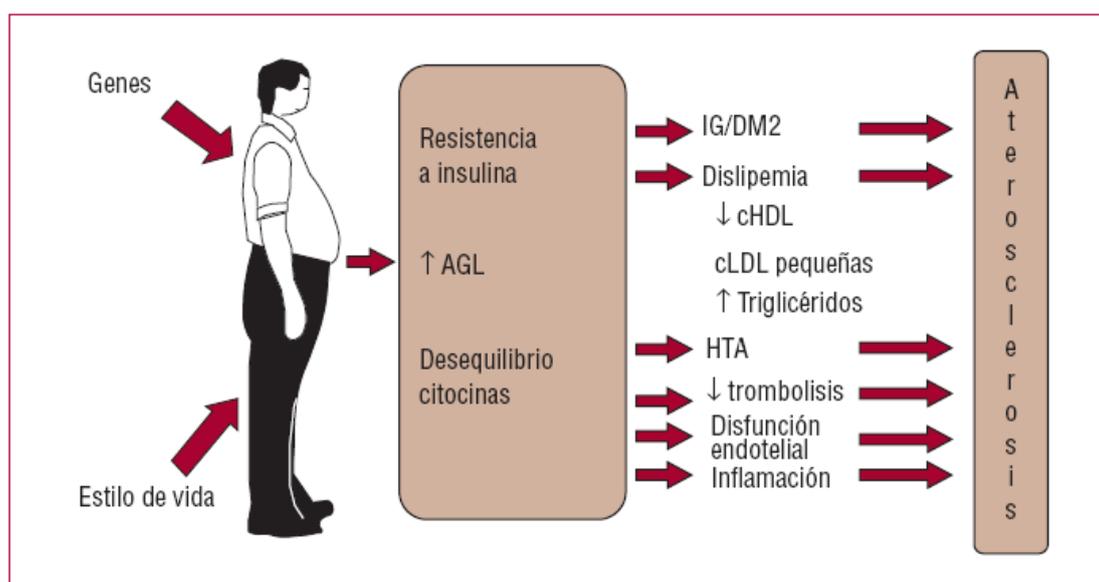
El exceso de tejido adiposo se asocia al aumento de las concentraciones séricas de IL-6 y PCR, y estas mayores concentraciones se correlacionan con la hipertrofia de los adipocitos. La secreción de la PCR hepática se encuentra incrementada por la estimulación de las adipocitoquinas TNF-  $\alpha$ , IL-1 e IL-6 secretadas por los adipocitos y macrófagos activados del tejido adiposo<sup>70</sup>.

Las concentraciones circulantes de PCR son más altas en adultos con SM, y el incremento de PCR es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de DM2 y enfermedades cardiovasculares<sup>71</sup>.

## 3. Consecuencias de la obesidad

### 3.1 Obesidad y aterosclerosis

Hipócrates escribió “La corpulencia no es sólo una enfermedad en sí misma, sino la puerta de entrada de otras”, reconociendo a la obesidad como una enfermedad a la cual se asocian otras comorbilidades. La obesidad es un factor de riesgo de aterosclerosis, merced a múltiples mecanismos (**Figura 4**), siendo los tres principales: la RI, el aumento de los AG libres, y el desequilibrio en el patrón de producción de adipocitoquinas: aumentando las de perfil proinflamatorio (IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  y Leptina entre las más importantes) y disminuyendo las de perfil antiinflamatorio como la Adiponectina<sup>72,73</sup>.



**Figura 4. Patogénesis de la aterosclerosis en la obesidad.** AGL: ácidos grasos libres; cHDL: colesterol de las lipoproteínas de densidad alta; cLDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; DM2: diabetes mellitus tipo 2; HTA: hipertensión arterial; IG: intolerancia a la glucosa. De Alegría et al. (2008).

La RI se produce a partir del acumulo del exceso de grasa en el interior de los adipocitos y la secreción por parte de estos adipocitos hipertróficos de adipocitoquinas proinflamatorias. La infiltración de grasa de las células pancreáticas acelera la disminución de la capacidad de los islotes pancreáticos de mantener el incremento de la producción de insulina que exige la RI y, como consecuencia, se desarrolla de forma prematura en el tiempo: la intolerancia a la glucosa y la DM2<sup>72</sup>.

La obesidad abdominal acentúa el problema, probablemente debido a que se produce un alto flujo por la vía portal de AG, citoquinas y hormonas hacia el hígado, procedentes de los adipocitos del tejido adiposo omental. El resultado es una alteración del metabolismo hepático, aumentándose la síntesis de apoB y VLDL, y un importante aumento en la liberación de insulina (hiperinsulinismo) a la circulación general. En los tejidos periféricos, que también presentan un aumento en el depósito de lípidos, como efecto de las citoquinas se produce una disminución en la sensibilidad a la insulina. A nivel vascular, el acúmulo de lípidos promueve la proliferación de los *vasa vasorum* de la capa media arterial y la apoptosis por los macrófagos que a su vez liberan más citoquinas. Estos cambios, ayudan a explicar el papel de la obesidad como promotor del proceso fisiopatológico de inflamación intracelular y cuyo resultado es el daño arterial<sup>74</sup>.

## 3.2 Obesidad y síndrome metabólico

Muchas de las comorbilidades asociadas a la obesidad están reflejadas en el llamado **síndrome metabólico (SM)**, también conocido como síndrome X, síndrome de Reaven o síndrome de resistencia a la insulina. Este síndrome describe la agrupación en un individuo de varios trastornos metabólicos, incluida la obesidad abdominal, que confieren al que los presenta un elevado riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y DM2. Los factores de riesgo que componen el SM son la dislipemia aterogénica, la HTA, la disglucosis y la exacerbación de la inflamación y la trombosis<sup>73</sup>. La concomitancia de estas alteraciones metabólicas es más frecuente de los que se esperaría por la mera casualidad, y su agrupación añade un riesgo cardiovascular (RCV) más allá del que aporta cada uno de los factores por separado<sup>75</sup>.

Previamente, a mediados del siglo XX, el médico francés Jean Vague<sup>15</sup> observó que la obesidad abdominal (obesidad androide) parecía predisponer a la DM2 y la cardiopatía, mientras que la obesidad del tren inferior del cuerpo no tenía estas asociaciones. Con más detalle, el trabajo de Gerald Reaven<sup>76</sup>, profundizó en la clasificación e importancia clínica de un grupo de alteraciones metabólicas que denominó Síndrome X. En su definición se incluía la resistencia a la captación de la glucosa estimulada por la insulina, la intolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia, el aumento de la concentración plasmática de VLDL y de TG, la disminución de la concentración plasmática de HDL-C y la HTA. Reaven planteó la hipótesis de que estos factores de

riesgo, cuando coexisten en una misma persona, pueden tener mucha importancia en la génesis de la arteriopatía coronaria. Además, atribuyó a la RI subyacente como la causa de la asociación de este grupo de factores de riesgo.

A lo largo del tiempo, la definición de este síndrome ha ido oscilando entre una **concepción etiopatogénica**, que contempla a la RI como el núcleo fundamental y criterio necesario de definición<sup>76</sup>, y una **concepción clínica** que considera a la obesidad abdominal como un criterio importante, incluso imprescindible<sup>77</sup>.

Existen en la actualidad varias definiciones para el SM<sup>77-80</sup> (**Tabla 4**). Las dos más ampliamente aceptadas son la de National Cholesterol Education Program (NCEP/ATP III) y la de la International Diabetes Federation (IDF).

La prevalencia en nuestra sociedad de este síndrome aumenta día a día y la razón de ello debemos buscarla en los cambios en los patrones alimentarios, el sedentarismo y en la obesidad. La prevalencia varía ampliamente en función de los criterios utilizados y de la población estudiada, siendo más frecuente en el varón y aumentando con la edad. En Estados Unidos, utilizando los criterios de la ATP III del 2001, y los datos del Third National Health and Nutritional Examination Survey (NHANES III) entre 1988-1994, se calculó una prevalencia de SM en la población adulta examinada de un 22%<sup>81</sup>. Esta prevalencia no ha hecho más que aumentar en las últimas décadas, y con los datos NHANES entre 1999-2002 ya había alcanzado el 34,5%<sup>82</sup>. En Europa, la prevalencia global mediante los criterios de la OMS (excluyendo los diabéticos) es del 23% en varones y del 12% en mujeres<sup>83</sup>. En España, el estudio VIVA (Variability of Insulin with Visceral Adiposity) confirma los datos europeos, detectando una prevalencia del 19,3%<sup>84</sup>.

Dentro de los factores de riesgo que determinan la aparición del SM, el aumento del peso corporal es un factor de riesgo mayor. En el NHANES III, el SM estaba presente en un 5% de los individuos con peso corporal normal, en un 22% de los individuos con sobrepeso, y en el 60% de los individuos que eran obesos<sup>85</sup>.

Se ha demostrado también que la prevalencia del SM es mucho mayor en pacientes con enfermedad cardiovascular y alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. Los pacientes con cardiopatía isquémica muestran una prevalencia dos veces mayor de SM<sup>86</sup>. El estudio BOTNIA<sup>87</sup>, llevado a cabo en los países nórdicos, descubrió SM en el 10% de las mujeres y el 15% de los varones con tolerancia normal a la glucosa; en el 42 y el 64% de individuos con intolerancia a la glucosa, y en el 78 y el 84% de los pacientes con DM2.

**Tabla 4. Criterios de definición del Síndrome metabólico**

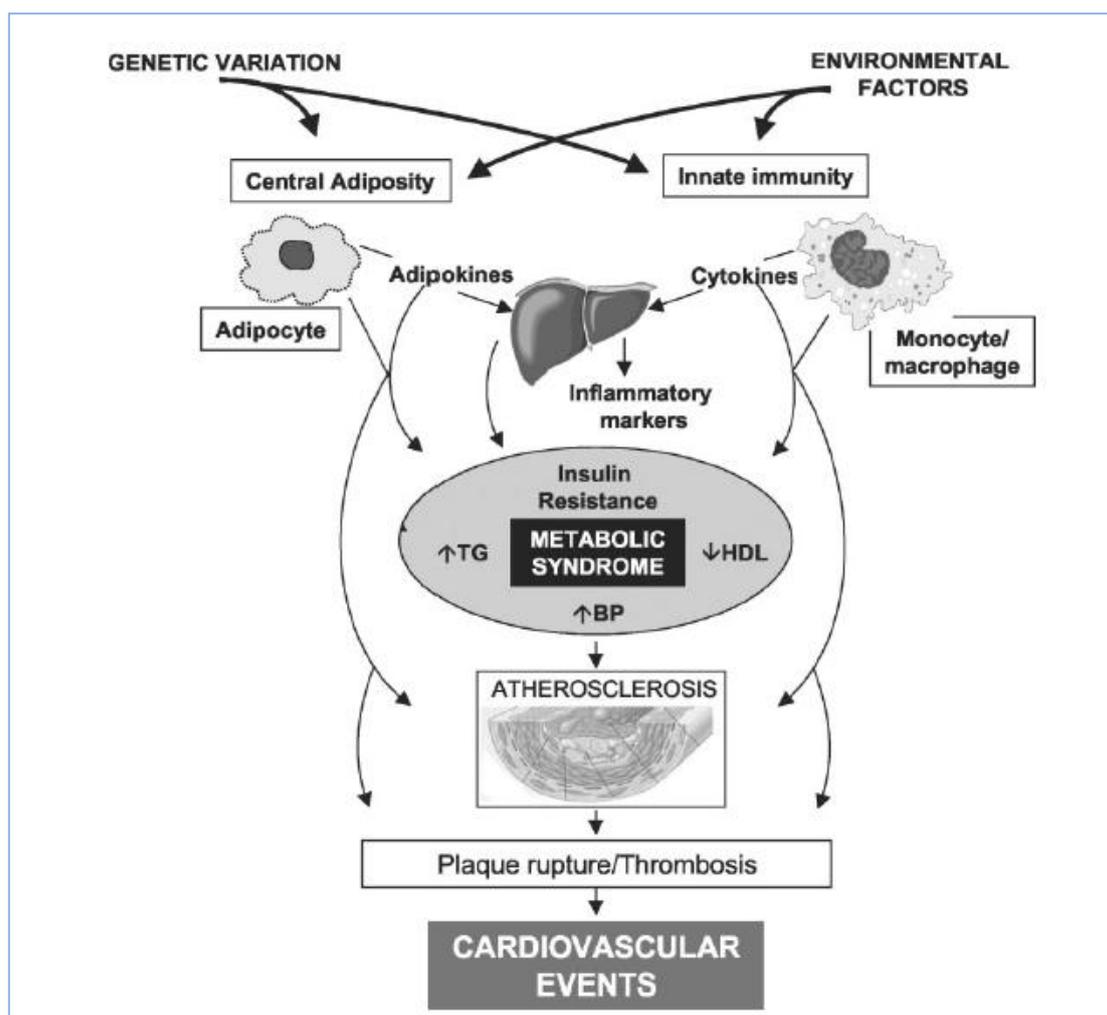
Parámetros	NCEP/ATP III 2005	IDF 2006	AACE 2003	WHO 1999	EGIR 1999
<b>Presencia de</b>		PC $\geq$ 94 cm varón o $\geq$ 80 cm mujer*	Alto riesgo de IR o IMC $\geq$ 25 Kg/m <sup>2</sup> o PC $\geq$ 102 cm varón o $\geq$ 88 cm mujer	ITG o glucemia en ayunas $\geq$ 110 mg/dl	Insulinemia en ayunas > 75 percentil
<b>Nº alteraciones</b>	$\geq$ 3 de:	y $\geq$ 2 de:	y $\geq$ 2 de:	y $\geq$ 2 de:	y $\geq$ 2 de:
<b>Glucosa</b>	$\geq$ 100 mg/dl o en tratamiento con fármacos por DM	$\geq$ 100 mg/dl o diagnóstico de DM	ITG o glucemia en ayunas $\geq$ 110 mg/dl		Glucemia basal 110-125 mg/dl
<b>HDL-C</b>	< 40 mg/dl varón < 50 mg/dl mujer O en tratamiento por HLD-C baja	< 40 mg/dl varón < 50 mg/dl mujer O en tratamiento por HLD-C baja	< 40 mg/dl varón < 50 mg/dl mujer	< 45 mg/dl varón < 40 mg/dl mujer	< 40 mg/dl
<b>Triglicéridos</b>	$\geq$ 150 mg/dl o en tratamiento con fármacos por TG elevados	$\geq$ 150 mg/dl o en tratamiento con fármacos por TG elevados	$\geq$ 150 mg/dl	$\geq$ 150 mg/dl	$\geq$ 150mg/dl o tratamiento con fármacos por DLP
<b>Obesidad</b>	PC $\geq$ 102 cm varón o $\geq$ 88 cm mujer			Índice cintura cadera: >0,9 varón >0,8 mujer o IMC $\geq$ 30 Kg/m <sup>2</sup>	PC $\geq$ 94 cm varón o $\geq$ 80 cm mujer
<b>Hipertensión</b>	$\geq$ 130/85 mmHg o en tratamiento por hipertensión	$\geq$ 130/85 mmHg o en tratamiento por hipertensión	$\geq$ 130/85 mmHg	$\geq$ 140/90 mmHg	$\geq$ 140/90 mmHg o en tratamiento por hipertensión

NCEP: National Cholesterol Education Program; IDF: International Diabetes Federation; AACE: American Association of Clinical Endocrinologists; WHO: World Health Organization; EGIR: Group for the Study of Insulin Resistance; PC: perímetro de cintura; IR: insulín resistencia; IMC: índice de masa corporal; ITG: intolerancia a la glucosa; DM: diabetes mellitus; HDL-C: colesterol HDL.

\*Para pacientes Asiáticos, japoneses y Chinos: PC  $\geq$  90 cm en hombres y  $\geq$  80 cm para mujeres

En la patogénesis del SM, también encontramos a la obesidad y la alteración en la producción y liberación de moléculas biológicamente activas por parte de los adipocitos y de otras células como los macrófagos, que infiltran el tejido adiposo<sup>88</sup>. Estas adipocitoquinas son moléculas que participan en la regulación del apetito y la

homeostasis energética, el metabolismo lipídico (TNF- $\alpha$ ), la sensibilidad a la insulina (TNF- $\alpha$ , Adiponectina, Resistina, Visfatina), la inmunidad (MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6), la angiogénesis, la presión arterial y la hemostasia (PAI-1). En la obesidad, la expresión, síntesis y liberación de adipocitoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, Leptina, Resistina, haptoglobina) está aumentada, y disminuye la síntesis y liberación de adipocitoquinas antiinflamatorias como Adiponectina<sup>89</sup>. Así, se ha postulado la participación de la inflamación de bajo grado que se asocia a la obesidad en el mecanismo etiopatogénico del SM. Por otro lado, los niveles elevados de PCR, IL-6 y TNF- $\alpha$ , que encontramos asociados con la obesidad visceral, también han sido objetivados en los individuos que padecen este síndrome. Actualmente, los conocimientos sobre la compleja interrelación entre la respuesta inflamatoria de la obesidad, la aterosclerosis y el RCV con el SM son todavía limitados y motivo de una intensa investigación y debate científico (**Figura5**).



**Figura 5.** Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular. Reilly et al. (2003).



## 4. Hepatopatía grasa no alcohólica (HGNA)

### 4.1 Concepto, epidemiología y factores de riesgo

La HGNA se define como el depósito excesivo de TG en el interior de los hepatocitos de causa no alcohólica. El hígado sano contiene entre un 5-10% de su peso en grasa. Una gran variedad de términos han sido utilizados para describir esta entidad como son el de hepatitis grasa, enfermedad de Laënnec no alcohólica, hepatitis diabética, enfermedad hepática alcohol-like, esteatohepatitis no alcohólica<sup>90</sup>. Los primeros casos de HGNA fueron descritos hace más de 30 años en la literatura médica<sup>91</sup>. En 1980, Ludwig acuñó el término de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), comentando en su descripción la posibilidad de una evolución a cirrosis y su asociación con la obesidad moderada y con otras enfermedades relacionadas con la obesidad, como la DM2 y la colelitiasis<sup>92</sup>. La HGNA engloba un amplio espectro de lesiones hepáticas que van desde la esteatosis simple (ES), pasando por la EHNA, hasta la fibrosis avanzada y la cirrosis<sup>90</sup>. Hasta hace diez años, escasos eran los conocimientos sobre la historia natural o la etiopatogenia de la HGNA, pero en los últimos años se están produciendo importantes avances en los conocimientos de esta entidad clínico-patológica.

La prevalencia de la HGNA en la población general es mal conocida debido a su carácter silente, a la ausencia de un método de cribado aceptado, a que su diagnóstico preciso requiere de un procedimiento invasivo como es la biopsia hepática y a que no existe un consenso sobre su caracterización y gradación histológica<sup>93</sup>. La prevalencia de la HGNA es muy alta en algunas zonas del mundo como América del Norte y del Sur, gran parte de Asia, el Pacífico (incluyendo Australia y Nueva Zelanda), Oriente Medio y Europa<sup>94</sup>, y aunque no existen estimaciones precisas sobre su incidencia, la HGNA es actualmente la causa más frecuente de alteración de las pruebas hepáticas y de consulta al especialista en hepatología en el mundo occidental<sup>90</sup>. Un método de aproximación para calcular la prevalencia de esta entidad en la población general es la utilización de datos de encuestas epidemiológicas de salud, y así es como Clark et al.<sup>95</sup> usando los datos del NHANES III entre 1988-1994, observaron que un 7,9% de la población tenía una elevación asintomática de las transaminasas [Aspartato aminotransferasa (ASAT) >37 U/l y/o Alanina aminotransferasa (ALAT) >40 U/l en varones y ASAT y/o ALAT U/l > 31 U/l en mujeres], y que sólo en un 31% de ellos existía una causa identificable (alcohol, hepatitis vírica, hemocromatosis). En el 69%

restante, donde la elevación de transaminasas no tenía una causa conocida, esta se asoció de forma significativa en ambos sexos a un mayor IMC y PC, al aumento de los niveles en sangre de TG e insulina en ayunas y la disminución de los de HDL-C, y además a una mayor prevalencia en mujeres de DM2 y HTA. Estos autores concluyen que la mayoría de estas elevaciones en la cifra de transaminasas sin causa conocida y significativamente asociadas a la obesidad y a otros parámetros del SM están causadas por una HGNA.

En Estados Unidos, la prevalencia de la obesidad de la población adulta mayor de 20 años a finales del pasado siglo (1988-1994) era del 22,5%<sup>96</sup>. La esteatosis afecta a más de dos tercios de la población obesa con independencia del estado glucémico, y a más del 90% de las personas con obesidad mórbida<sup>97</sup>. En estudios necrópsicos de individuos no alcohólicos fallecidos en un hospital se observó la presencia de ES en el 70% de los obesos y en un 35% de los individuos que tenían un peso normal. Al valorar la presencia de EHNA, ésta estuvo presente en el 18,5% de las personas obesas y en el 2,7% de las personas sin sobrepeso<sup>98</sup>. En base a todo ello, y calculado sobre la población norteamericana en el año 2000, Angulo<sup>90</sup> estimó que alrededor de 30,1 millones de obesos adultos tendrían ES y 8,6 millones EHNA, con independencia de su estado glucémico. En un estudio más reciente realizado en adultos sanos japoneses<sup>99</sup>, utilizando la ecografía hepática como método diagnóstico de HGNA, se encontró una prevalencia del 29%. En virtud de todos estos datos y aproximaciones y ajustándolos al siglo XXI, la prevalencia en la población general adulta en los países occidentales de la HGNA sería de un 20-30% y de un 2-3% para la EHNA<sup>100</sup>.

La prevalencia y la severidad de la HGNA aumenta con la edad y los casos que en su evolución se complican se diagnostican mayoritariamente entre la sexta y octava décadas de la vida<sup>94</sup>.

En los estudios publicados hasta 1990 parecía que la HGNA y la EHNA eran más frecuentes en mujeres que en hombres, pero en los estudios más recientes la tendencia es a la igualdad o a un ligero predominio en los varones. La hipótesis de que las hormonas femeninas podrían resultar protectoras frente al hígado graso se fundamenta en que la HGNA es dos veces más frecuente en mujeres posmenopáusicas que en premenopáusicas<sup>93</sup>.

Los factores de riesgo más claramente asociados a la HGNA son la obesidad, la hiperglicemia, la DM2 y la hipertriglicerinemias<sup>90,94</sup>. La asociación causal más fuerte conocida es con la obesidad, en concreto con la obesidad central o visceral. La obesidad

central tiene una fuerte correlación con la RI y ésta es el elemento clave en la patogénesis del SM. Así, actualmente se considera que **la HGNA es la manifestación hepática del SM**, lo que permite establecer un vínculo de unión entre la obesidad, la DM2, las enfermedades cardiovasculares y la HGNA, ya que comparten entre sí factores fisiopatogénicos<sup>94</sup>. La DM2 es un factor de riesgo de EHNA independiente de la obesidad y, de hecho, las personas diabéticas presentan, respecto a las que no lo son, un mayor acúmulo de grasa visceral y de TG hepáticos para un mismo IMC<sup>101</sup>. La prevalencia de HGNA en los individuos diabéticos se eleva hasta un 75% y, en estos pacientes, la enfermedad hepática sigue un curso más agresivo con una mayor necroinflamación y fibrosis.

Los factores de tipo genético también predisponen a que se produzca la HGNA, de hecho, 2/3 partes de los casos presentan una historia familiar de DM2<sup>102</sup>.

## 4.2 Historia natural de la HGNA

No existen investigaciones prospectivas y longitudinales que aborden con rigor esta cuestión, entre otras razones porque no es habitual realizar biopsias a pacientes con sospecha clínica de HGNA y mucho menos biopsias seriadas.

Aunque la evolución y el pronóstico de esta entidad no están claramente definidos, éstos parecen relacionarse con la intensidad de la lesión histológica en el momento del diagnóstico<sup>90</sup>. Matteoni et al.<sup>103</sup> publicaron un estudio retrospectivo sobre 132 casos seguidos hasta 18 años, clasificando a los pacientes en 4 tipos histológicos: tipo 1, ES; tipo 2, esteatosis con inflamación lobulillar; tipo 3, esteatosis con degeneración balonzante, y el tipo 4, esteatosis con fibrosis con/sin hialina de Mallory. La evolución a cirrosis a los 10 años fue del 24,7% en los tipos 3 y 4, mientras que en los tipos 1 y 2 fue sólo del 3,4%. Aunque no se observaron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad global, sí las hubo en cuanto a la mortalidad relacionada con la enfermedad hepática, que fue del 11% en los tipos 3 y 4 por tan sólo del 1,7% en los tipos 1 y 2. Estos resultados apuntan a que el pronóstico de la HGNA diagnosticado en fases tempranas es más benigno, mientras que en los casos en que la lesión hepatocelular y/o fibrosis están avanzadas, la evolución a cirrosis en un plazo de 10 años es más frecuente y con repercusión en las tasas de supervivencia.

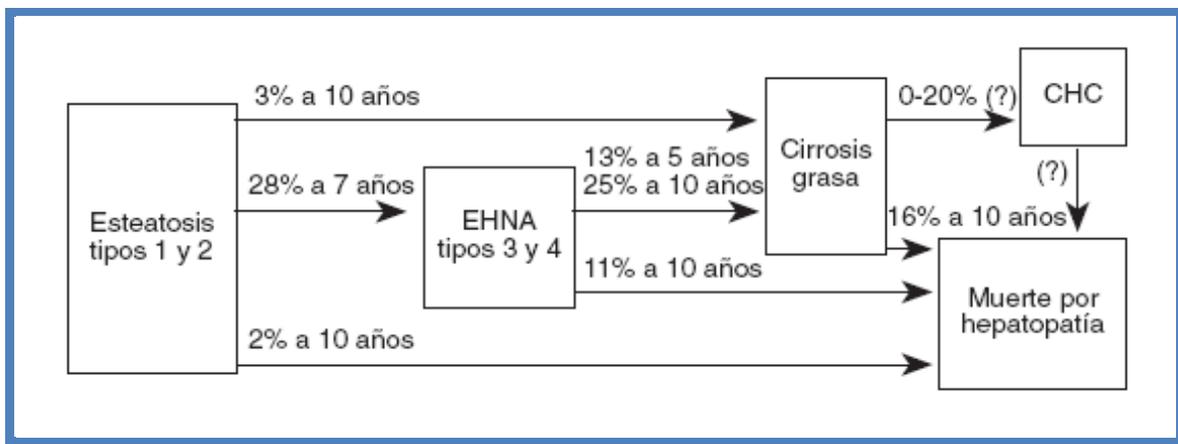
En otro estudio realizado en la cohorte del condado de Olmsted en Minnesota, 420 pacientes diagnosticados de HGNA fueron controlados durante un promedio de 7,6 años. Durante el período de seguimiento, 53 pacientes (12,6%) fallecieron. La supervivencia de los pacientes con HGNA fue menor que la de la población general ajustada por edad y sexo. Las enfermedades hepáticas fueron la tercera causa de muerte en los pacientes con HGNA, en comparación con la treceava en la población general. La edad avanzada, la intolerancia a la glucosa y la cirrosis fueron los factores de riesgo asociados a un mayor mortalidad<sup>104</sup>.

### **4.2.1 Progresividad lesional**

Los estudios transversales indican que la mayoría de individuos con HGNA tienen una ES en el momento de su diagnóstico<sup>92</sup> y existe una cierta convicción entre los clínicos de que la progresión de este estadio al de EHNA es algo inhabitual. Teli et al.<sup>105</sup>, estudiando a 12 pacientes con ES a quienes realizaron una nueva biopsia por persistencia de la hipertransaminasemia, informan de la inexistencia de cambios histológicos en un seguimiento de hasta 19 años. En el estudio de referencia de Matteoni et al.<sup>103</sup> se observó progresión a cirrosis clínica en el 3% de 59 pacientes con ES en un seguimiento medio de 10 años. En cambio, en los individuos con EHNA los estudios demuestran un mayor potencial de progresión lesional y con ello un peor pronóstico evolutivo, y en ese mismo estudio de Matteoni et al.<sup>103</sup>, el 25% de los pacientes con EHNA inicial seguidos de forma retrospectiva cumplían criterios clínicos de cirrosis hepática tras un seguimiento medio de 10 años. Una prueba adicional de la naturaleza evolutiva de la HGNA son estudios que demuestran, con evidencias epidemiológicas, que hasta el 80% de las cirrosis criptogénicas son fases terminales de un hígado graso<sup>106,107</sup>.

Más controvertida es la relación de HGNA con la posibilidad de desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC). Varios son los casos de pacientes que han sido diagnosticados de un CHC sobre la base de la existencia de una EHNA, pero es raro hacer este diagnóstico durante el seguimiento de estos pacientes. En un estudio prospectivo de 23 pacientes con EHNA asociada a cirrosis, ningún caso de CHC fue diagnosticado durante los 5 años de seguimiento promedio<sup>108</sup>, lo que contrasta con el 1-3% anual esperado en los pacientes con hepatitis crónica C. En otro estudio de 42

pacientes con un diagnóstico histológico de EHNA y un seguimiento de hasta más de 20 años, sólo se produjo un caso de CHC<sup>109</sup>.



**Figura 7. Esquema de la posible historia natural de la HGNA.** EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; CHC: carcinoma hepatocelular. Moreno-Sánchez et al. (2006).

#### 4.2.2 Diagnóstico de HGNA. ¿Esteatosis, esteatohepatitis, cirrosis?

El diagnóstico de HGNA se realiza frecuentemente en individuos asintomáticos a los que se les detecta una elevación de las transaminasas en un análisis rutinario, o se les practica una ecografía hepática en un estudio realizado por cualquier motivo<sup>94</sup>. Las pruebas hepáticas (AST, ALT) y/o las técnicas de imagen (ecografía, TC, RM) no permiten distinguir entre esteatosis, esteatohepatitis y cirrosis. Todo ello hace que la biopsia hepática sea la única prueba capaz de confirmar la presencia o ausencia de esteatohepatitis y/o fibrosis en un paciente que está siendo estudiado por una HGNA<sup>103</sup>. Existe claramente la necesidad de encontrar marcadores clínicos y/o biológicos no invasivos que realmente sean capaces de discriminar entre EHNA y ES o la evolución de una fase histológica a otra. Existe un consenso que establece que la edad, la obesidad y la DM2 son los predictores más importantes de fibrosis hepática<sup>110,111</sup>. El hecho de que una edad superior a 40-50 años, sea un factor relacionado con la posibilidad de fibrosis avanzada y/o cirrosis, parece reflejar que cuanto más dure la infiltración grasa más tiempo está sometido el hepatocito al riesgo lesional<sup>93</sup>.

Se sabe que un 20-60% de los pacientes con EHNA tienen elevado el valor de ferritina sérica, probablemente reflejando la existencia de inflamación y lesión a nivel del hepatocito, más que un aumento de los depósitos hepáticos de hierro<sup>110,112</sup>.

Más recientemente se han estudiado otros posibles marcadores hepáticos de fibrosis no invasivos como los relacionados con el metabolismo del colágeno y la matriz extracelular. Laine et al.<sup>113</sup> estudiaron el ácido hialurónico en un estudio sobre 173 pacientes demostrando que ninguno de ellos con un nivel sérico de ácido hialurónico inferior a 35 µg/L padecía una fibrosis hepática significativa. Otros autores, demostraron que los niveles circulantes de ácido hialurónico eran poco capaces de discriminar entre los pacientes con ES no complicada y la EHNA con grado leve de fibrosis. En el estudio de Suzuki et al., valores en suero de ácido hialurónico superiores a 46,1 µg/L se asociaron con severa fibrosis hepática, con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 80%. El valor predictivo negativo de la prueba era del 96% , pero el valor predictivo positivo era sólo del 51%, al asumir una prevalencia de fibrosis severa en los pacientes con HGNA del 20 %<sup>114</sup>. En otras ocasiones, se han diseñado algoritmos para predecir la presencia de fibrosis hepática basados en la combinación de diferentes marcadores séricos hepáticos. Este es el caso del estudio de Internacional Multicéntrico de Rosenberg et al. sobre una cohorte de 1021 pacientes con diferentes enfermedades crónicas hepáticas a los que se realizó una biopsia hepática y la determinación de los niveles séricos de 9 marcadores hepáticos de fibrosis. El algoritmo incluía la edad, los niveles de ácido hialurónico, del propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III y del inhibidor de las metaloproteinasas A de la matriz extracelular. Se obtuvo un algoritmo de predicción cuya sensibilidad era de un 90% para la detección de fibrosis y cuyo valor predictivo negativo era del 92% (ausencia de fibrosis significativa). Este algoritmo funcionó de forma muy notable en el caso de la HGNA<sup>115</sup>. Recientemente, se ha desarrollado la elastografía hepática, también llamada FibroScan. Esta técnica evalúa el grado de fibrosis hepática mediante la determinación de la elasticidad hepática. La elastografía hepática que es una técnica no invasiva y de fácil realización que tiene su handicap en la valoración de la personas con una gran obesidad en las cuales la medición de la elasticidad hepática frecuentemente no es técnicamente realizable<sup>116</sup>.

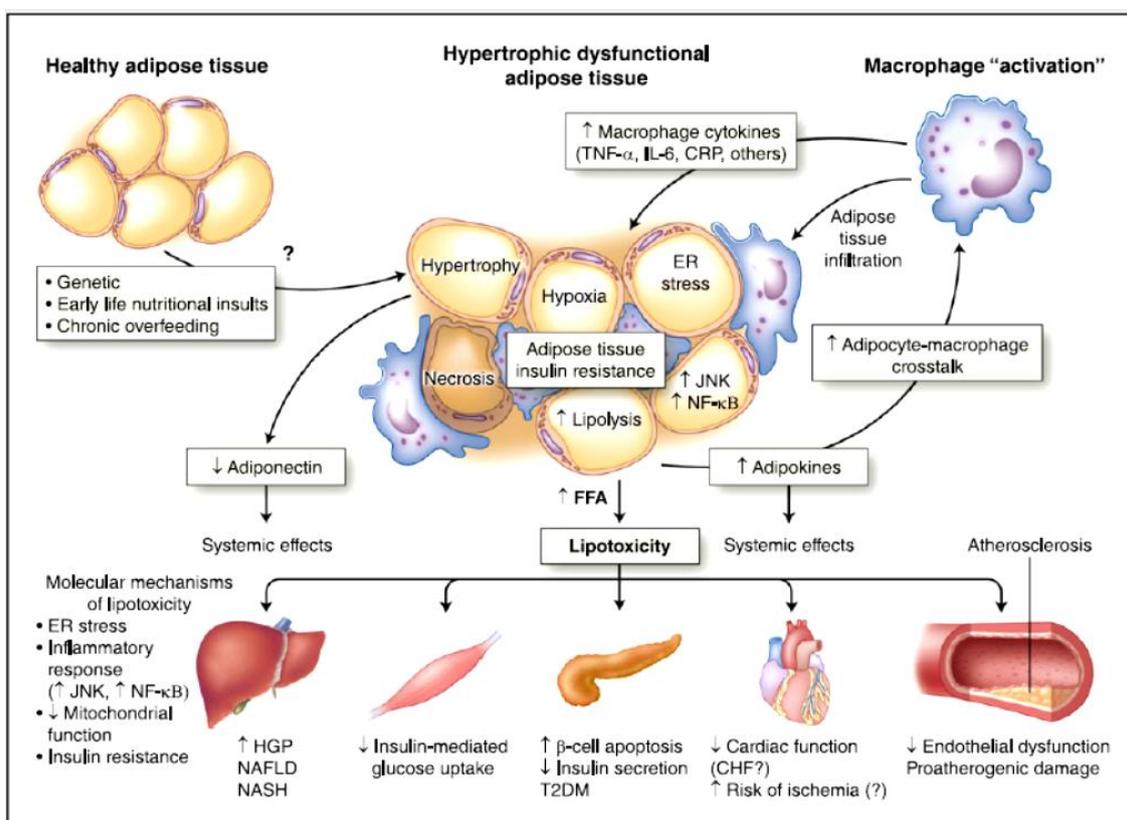
## 4.3 Relaciones patogénicas de la HGNA

### 4.3.1 *El hígado un órgano clave en la homeostasis metabólica*

El hígado es un órgano que ocupa un lugar central en el metabolismo intermediario y es clave en el mantenimiento del balance energético global. Entre sus múltiples funciones encontramos la de sintetizar las proteínas séricas más importantes como es la albúmina, la producción de la bilis y sus transportadores (ácidos biliares, colesterol, lecitina, fosfolípidos), la regulación de nutrientes (glucosa, glucógeno, colesterol, aminoácidos), y el metabolismo y la conjugación de compuestos lipofílicos (bilirrubina, aniones, cationes, fármacos) para su excreción en la bilis o la orina.

En este apartado analizaremos los conocimientos actuales en relación con la capacidad del hígado para captar, metabolizar, almacenar y liberar lípidos, y cómo la alteración de estos procesos conduce al acúmulo excesivo de TG en los hepatocitos con la consiguiente inflamación y el daño del tejido hepático, características ambas que definen la HGNA.

La razón última del depósito de TG intrahepáticos todavía no está del todo establecida, aunque todo parece indicar que el inicio se localiza en la disfunción del tejido adiposo, como la que se observa en la obesidad, caracterizada por una hipertrofia de los adipocitos, infiltración por macrófagos, deterioro de la señalización de la insulina y resistencia a la misma. El resultado es la liberación de gran cantidad de adipocitoquinas inflamatorias y cantidades excesivas de AG libres que promueven el depósito de grasa ectópica y una situación de lipotoxicidad a nivel de la célula  $\beta$ -pancreática, la célula muscular esquelética y el hepatocito. El depósito de estos lípidos y su toxicidad conduce a un daño metabólico significativo con disminución de la secreción pancreática de insulina y la tendencia a desarrollar DM2; disminución de la captación muscular de la glucosa mediada por la insulina; aumento de la producción hepática de glucosa y acumulación hepática patológica de lípidos que conducen a la HGNA y la EHNA. Finalmente, este conjunto de cambios conlleva un aumento en el riesgo a sufrir una enfermedad cardiovascular<sup>117</sup> (**Figura 8**).



**Figura 8.** Factores genéticos y ambientales mal conocidos modifican la biología normal del adipocito conduciéndolo a la hipertrofia y a una situación de hipoxia, alterándose el plegado de sus proteínas y produciendo estrés del retículo endoplásmico. Esto produce una activación de las vías inflamatorias, y finalmente la necrosis de los adipocitos. Estos acontecimientos envían “señales” (liberación de adipocitoquinas, hormonas, otros factores desconocidos) que reclutan localmente a los macrófagos. Esta comunicación activa entre adipocitos y macrófagos autopropaga el estado patológico inflamatorio. La resistencia a la insulina en los adipocitos aparece como consecuencia de todo lo anterior, causando la liberación de AG libres hacia los tejidos, en especial al músculo esquelético, al hígado y a las células β-pancreáticas, así como al corazón y al lecho vascular. Cusi et al. (2010).

CHF, insuficiencia cardíaca congestiva; CRP, proteína C reactiva; HGP producción hepática de glucosa; IL-6, interleuquina-6; JNK, quinasa N-terminal de c-Jun; NAFLD, hepatopatía grasa no alcohólica; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; NF-κB, factor nuclear-κB; T2DM, diabetes mellitus tipo 2; TNF-α factor de necrosis tumoral α.

El depósito intrahepático de grasa puede ser el resultado de un aumento del aporte de AG libres hacia el hígado y/o de un aumento en la oxidación lipídica hepática y/o de una disminución de la síntesis/secreción de las VLDL y/o por la *novo* lipogénesis hepática. De las causas anteriores, el aumento del flujo de AG libres hacia el hígado se considera el más importante.

La mayoría de los AG circulantes (alrededor del 95% en las personas delgadas y del 86% en las personas obesas) provienen de la lipólisis de la grasa subcutánea y el resto proviene del tejido grasa visceral. La primera causa de aumento del flujo de AG hacia el hígado es la debida al aumento en la ingesta calórica y de las grasas aportadas por la dieta. El tejido grasa visceral es también una fuente hepática importante de AG, no sólo

porque es altamente lipolítico, sino porque además libera estos AG directamente dentro de la circulación venosa portal, con el consiguiente obligado paso hepático<sup>118</sup>. Tras ser captados por el hepatocito, los AG pueden ser reesterificados para formar TG, o ser oxidados.

Los pacientes con EHNA, independientemente de su grado de obesidad, tienen aumentada la lipólisis, y aumentadas las concentraciones en plasma de AG, tanto durante el ayuno como durante la infusión de insulina en la realización del clamp euglucémico hiperinsulinémico<sup>119</sup>. Mediante la determinación de la concentración en plasma de  $\beta$ -hidroxibutirato (indicador de la de la oxidación hepática de AG) y de la oxidación lipídica total se ha demostrado que la oxidación hepática de AG está aumentada en las personas que padecen una HGNA<sup>119,120</sup>.

La *novo* lipogénesis hepática es la síntesis endógena de AG. En condiciones normales ésta aporta menos del 5% del total de los AG hepáticos. En la HGNA, la *novo* lipogénesis está aumentada y representa más de un 26% de la recién sintetizada VLDL, mientras que la dieta sólo representa el 14,9%, y el 59% restante proviene de la lipólisis a nivel del tejido adiposo<sup>121</sup>. La *novo* lipogénesis sólo produce AG saturados, y los estudios realizados en humanos sobre la composición de los TG hepáticos muestran un exceso relativo AG saturados y una deficiencia en AG poliinsaturados<sup>122</sup>. Este último dato puede ser un reflejo del aumento de la *novo* lipogénesis.

El hígado es la principal fuente de TG circulantes. Una vez formados, los TG son liberados a la circulación general en forma de VLDL. Aquí, nuevamente los estudios demuestran que la síntesis de TG y su liberación como VLDL están aumentados en las personas con una HGNA<sup>123</sup>.

### **4.3.2. HGNA y resistencia hepática a la insulina**

La RI es el factor más reproducible y fundamental en el desarrollo de la HGNA. La RI permite el acúmulo de grasa en los hepatocitos por dos mecanismos: lipólisis e hiperinsulinemia<sup>90</sup>.

Estudios metabólicos en humanos y en animales demuestran la existencia de una fuerte relación entre la obesidad visceral, esteatosis hepática y RI<sup>90,94</sup>. La consecuencia de la RI en los tejidos periféricos (músculo esquelético, tejido adiposo) es la disminución en la captación de glucosa. Sin embargo, a nivel hepático, la resistencia hepática a la insulina se traduce en una disminución en la síntesis de glucógeno y un aumento de la gluconeogénesis provocando un aumento de la producción hepática de glucosa<sup>94</sup>.

La secuencia etiopatogénica donde la esteatosis hepática precede a la resistencia hepática a la insulina ha sido demostrada en ratas sometidas durante un corto período de tiempo a una dieta rica en grasas. La resistencia hepática a la insulina podría ser debida a una disminución de la tirosín fosforilación del sustrato del receptor de la insulina 1 y 2 (IRS-1 y IRS-2) estimulada por la insulina. Estos cambios están asociados a la activación de la proteína quinasa C-épsilon (PKC-épsilon) y la quinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK1). Finalmente, el acúmulo hepático de grasa disminuye la activación por parte de la insulina de la glucógeno sintetasa y aumenta la gluconeogénesis<sup>124</sup>.

En humanos, la causa primaria de esteatosis podría estar centrada en defectos en la actividad mitocondrial y relacionada con la dificultad para la  $\beta$ -oxidación de los AG. Estos defectos mitocondriales podrían tener una base genética que podría verse agravada por el envejecimiento y por factores medio ambientales como una ingesta importante de grasas saturadas. Una vez establecida la esteatosis, ésta podría causar entonces la RI hepática<sup>125</sup>. Por el contrario, existe una clara asociación entre la esteatohepatitis demostrada histológicamente, la resistencia periférica a la insulina y varias de las características que definen el SM y, por todo ello, es lógico pensar que la resistencia periférica a la insulina tiene un papel etiopatogénico en esta forma de HGNA<sup>102</sup>.

Una cuestión clave en la patogénesis de la EHNA sería conocer si la resistencia hepática a la insulina, cuyo origen estaría en el hígado esteatósico, puede ser el inicio del daño celular y de la inflamación hepática que se produce en la EHNA. Existen estudios que muestran que esto último es posible por un mecanismo molecular que bloquearía la señal del receptor hepático a la insulina<sup>126</sup>. En el músculo y en el hígado, la RI favorece la acumulación intracelular de AG y sus metabolitos, produciéndose la activación de la proteína quinasa C. La proteína quinasa C cataliza la fosforilación de serina/treonina del receptor de la insulina y de sus proteínas, IRS-1 e IRS-2, lo que dificulta la fosforilación de tirosina necesaria para obtener una señalización fisiológica. Estos efectos sobre IRS-2 son críticos para el receptor hepático a la insulina<sup>94,125</sup>.

En la EHNA, se ha constatado un aumento en la expresión del citocromo P450 2E1 (CYP2E1). Esto se traduce en un aumento del estrés oxidativo asociado a una disminución de la señal del receptor de la insulina<sup>127</sup>. Otra molécula candidata a intervenir en la transición entre ES y EHNA es TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  podría aumentar la RI hepática vía la activación de la quinasa IKK- $\beta$ , o de la quinasa JNK1, o por la inducción de IL-6<sup>94</sup>.

En otra hipótesis, la ES y la EHNA podrían estar producidas por el efecto combinado de una severa RI periférica y el fracaso relativo de las adipocitoquinas en su intento de contrarrestar los efectos del hiperinsulinismo y la hiperglicemia en ayunas sobre el recambio hepático lipídico. Aquí nos encontramos con algunos estudios que atribuyen a niveles bajos de Adiponectina en suero la diferencia entre EHNA y ES<sup>128</sup>. Adiponectina facilita el transporte de los AG al interior mitocondrial para su  $\beta$ -oxidación y suprime la síntesis hepática de AG, lo que contrarrestaría los efectos de los altos niveles de insulina en plasma. Además, experimentalmente la administración de Adiponectina en ratones obesos KK-Ay previene el daño hepático al inhibir la síntesis y/o liberación de TNF- $\alpha$ <sup>129</sup>.

### 4.3.3. Transición de esteatosis a esteatohepatitis

Los factores responsables de la evolución desde la esteatosis hasta la esteatohepatitis son objeto de una intensa investigación y especulación, pero actualmente permanecen sin aclarar. Un primer intento de proporcionar una explicación racional sobre la fisiopatología de la progresión del daño hepático fue el “two-hits model”<sup>130</sup>. En este modelo, el daño celular hepático aparece cuando la capacidad de los hepatocitos para almacenar grasas de forma segura es sobrepasada. Así, estos AG se convierten en tóxicos para la célula en un proceso fisiopatológico que se denomina **lipotoxicidad**. La lipotoxicidad puede causar muerte celular por el efecto directo de los mediadores lipídicos en la apoptosis. Por otro lado, la liberación de los lípidos oxidados y de sus productos de peroxidación puede ser el instrumento en el reclutamiento celular y mantenimiento de la respuesta inflamatoria que caracteriza a la esteatohepatitis<sup>94</sup>. Así, se entiende que la esteatosis representa un primer paso (“first hit”) para la aparición de la esteatohepatitis, pero que un segundo paso (“second hit”) es necesario para causar el daño celular y la inflamación mantenida que caracterizan a esta entidad<sup>130</sup>.

Un resumen actualizado del “two-hit model of NASH pathogenesis” podría ser el siguiente<sup>90,131</sup>:

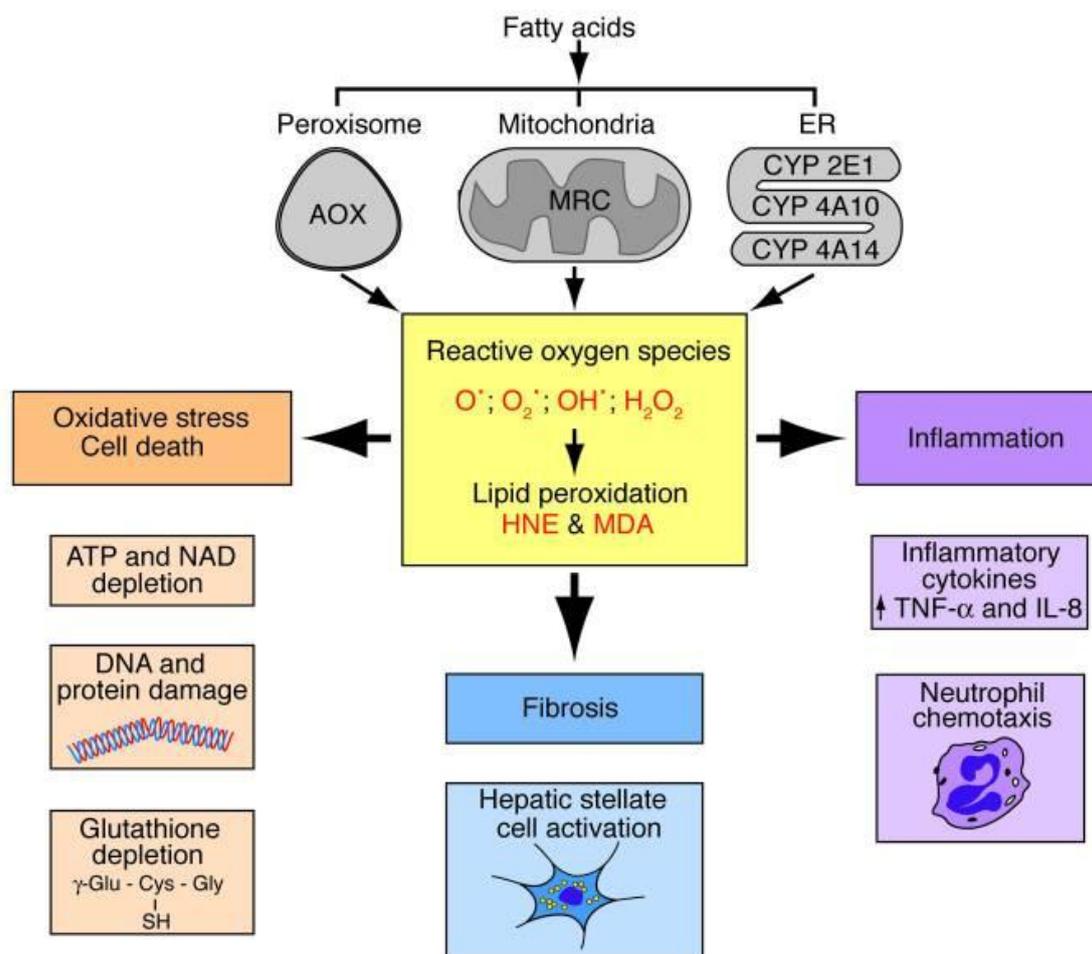
- En la primera fase el factor clave es una RI periférica por infrarregulación de los IRS-1, en particular en el tejido adiposo. Ello es consecuencia de una sobreproducción constitutiva de adipocitoquinas, al aumentar la masa celular y, quizás, de la inducción de citoquinas en el contexto de un proceso inflamatorio subclínico. El principal mediador parece ser el TNF- $\alpha$  y ciertos polimorfismos

de éste podrían representar una susceptibilidad genética a la RI. La pérdida de la señalización insulínica de los tejidos periféricos (músculo y tejido adiposo) induce lipólisis e hiperinsulinemia. El exceso de AG circulantes, tras su captación por un hígado que permanece sensible a la acción de la insulina, sirve de sustrato para la lipogénesis. Los TG producidos se acumulan al estar deteriorada la capacidad hepática de excreción en forma de VLDL. La esteatosis del hepatocito induce cierta agresión oxidativa que se ve contrarrestada (adaptación hepatocelular) por diversos sistemas antioxidantes y por la sobreexpresión de UCP mitocondriales de la fosforilación oxidativa. Ello mantiene viable al hepatocito, aunque lo hace vulnerable a agresiones posteriores.

- En la segunda fase, el factor clave es el estrés oxidativo hepatocelular, que surge del desequilibrio entre una mayor agresión oxidativa y el agotamiento de los sistemas antioxidantes. La agresión oxidativa se produce por un exceso de radicales libres de oxígeno/especies reactivas de oxígeno (RLO)/ERO) generados a partir de la oxidación de AG, de manera directa por  $\beta$ -oxidación peroxisomal y  $\Omega$ -oxidación microsomal, y de forma indirecta por  $\beta$ -oxidación mitocondrial, que conduce a sobreproducción de cofactores enzimáticos de la fosforilación oxidativa que saturan la cadena respiratoria. Los RLO/ERO provocan peroxidación lipídica de la membrana celular hepática con producción de aldehídos reactivos [malondialdehído (MDA) e hidroxialquileo (HNE)], inducción de citoquinas mediante la activación del NF- $\kappa$ B [TNF- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) e IL-8] y expresión del ligando Fas. Todos estos factores promueven los fenómenos histológicos típicos de la esteatohepatitis:

- a) apoptosis/necrosis celular (RLO/ERO, ligando Fas, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ );
- b) inflamación de predominio polimorfonuclear (HNE e IL-8)
- c) fibrosis (MDA, HNE, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ )

Además, la incorporación de los AG dicarboxílicos, generados en la  $\Omega$ -oxidación microsomal, del TNF- $\alpha$  y de los aldehídos reactivos a la cadena respiratoria mitocondrial, causa mayor producción de RLO/ERO, con lo que se crea un círculo vicioso.

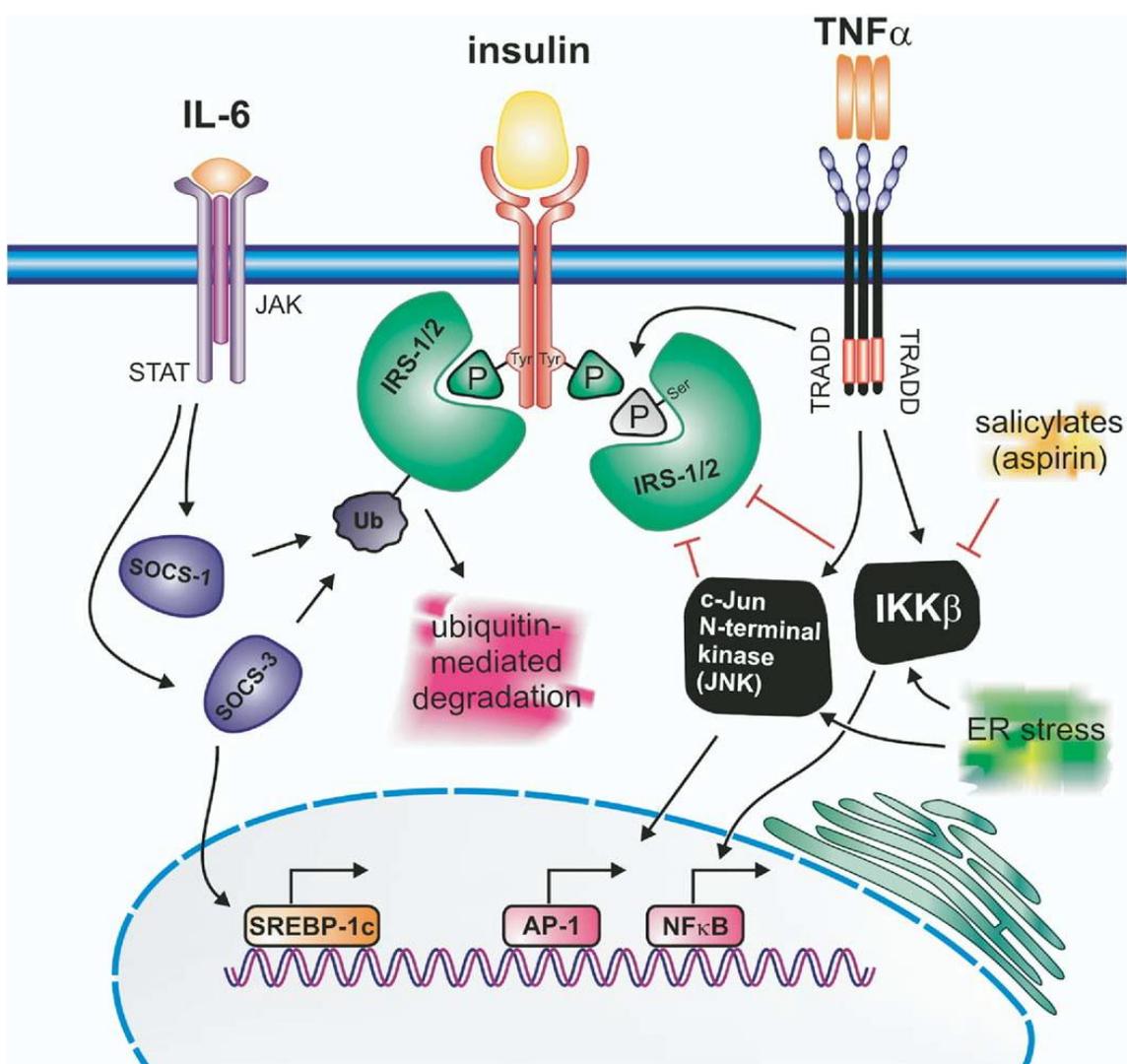


**Figura 9. Mecanismo de la lipotoxicidad en la HGNA.** Las ERO se forman a través de procesos oxidativos dentro de la célula. En la mitocondria, el deterioro en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial conduce a la formación de aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno. La acumulación de AG en el citosol aumenta la oxidación de AG en los peroxisomas y el retículo endoplasmático (ER). La  $\beta$ -oxidación peroxisomal inicial es catalizada por acil-CoA oxidasa (AOX) que forma peróxido de hidrógeno a través de la donación de electrones al oxígeno molecular. La  $\Omega$ -oxidación microsomal es catalizada por enzimas del citocromo P450 (CYP) 2E1,4A10 y 4A14, los cuales forman ERO a través de la donación de electrones al oxígeno molecular mediada por flavoproteínas. Los AG poliinsaturados (PUFAs) son muy susceptibles a la peroxidación lipídica por las ERO. Los subproductos de la peroxidación de los PUFAs son aldehídos, tales como el hidroxialquileno (HNE) y malondialdehído (MDA). Estos aldehídos son en sí mismos citotóxicos y pueden difundir libremente al espacio extracelular a afectar a las células distantes. Las ERO y los aldehídos inducen estrés oxidativo y la muerte celular a través de la depleción de ATP y NAD, daño del ADN y las proteínas y también consumiendo el glutatión. Además, ERO y los aldehídos inducen la inflamación a través de la producción de citocinas proinflamatorias, que conducen a la quimiotaxis de los neutrófilos. En el espacio extracelular, HNE y MDA actúan como potentes factores quimiotácticos para los neutrófilos. Por último, las ERO y los productos de la peroxidación lipídica puede conducir a la fibrosis mediante la activación de las células hepáticas estrelladas las cuales sintetizan el colágeno y perpetúan la respuesta inflamatoria. Browning et al. (2004).

Existen investigadores que no están de acuerdo con el hecho de que la esteatosis *per se* juegue un papel principal en la progresión a EHNA de la HGNA. Estos investigadores argumentan que los TG intrahepáticos son probablemente relativamente inertes y que, por lo tanto, no tóxicos en un modo directo. En el estudio de Yamaguchi et al.<sup>132</sup> trabajando en un modelo animal de EHNA donde se inhibió la síntesis hepática de TG, se observó que se incrementaba la actividad CYP2E1, el daño oxidativo celular, la inflamación y la fibrosis hepática. Estos autores sugieren que el almacenamiento de TG a nivel hepático podría representar un mecanismo de protección contra la citotoxicidad de los AG.

## 4.4 Adipocitoquinas y la HGNA

La obesidad no sólo se asocia al desarrollo de hipertensión arterial y diabetes tipo 2, sino que también tiene efectos negativos sobre el funcionamiento hepático. En la actualidad existen importantes evidencias que demuestran que la HGNA es un componente más del SM<sup>90,133</sup>. La RI ha sido identificada como el factor fundamental en la fisiopatología de la HGNA<sup>134</sup>. La RI es determinada por una compleja interacción entre factores genéticos, factores nutricionales y factores relacionados con el estilo de vida. Hoy en día, además, conocemos de la existencia de unos mediadores solubles sintetizados por las células del sistema inmune y del tejido adiposo, las adipocitoquinas, que parecen estar involucradas en las manifestaciones y progresión de la HGNA y, lo que es más importante, en la regulación de la actividad de la insulina<sup>135,136</sup> (**Figura 10**). La identificación de los mecanismos que provocan y median en la HGNA relacionada con la obesidad es un tema actual de investigación y en los últimos años se han realizado progresos substanciales. Las citoquinas están involucradas tanto en la fisiología del hígado sano, como en la fisiopatología de muchas enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Estas proteínas están producidas por casi todos los tipos celulares que forman el tejido hepático y juegan un papel fundamental en el funcionalismo y la regeneración hepática<sup>135,136</sup>.



**Figura 10. Regulación de la EHNA y la resistencia a la insulina (RI). Vías y mediadores implicados.** TNF- $\alpha$  y otras citoquinas como IL-6 están implicadas en la producción de RI. Otros factores del sistema inmune como las proteínas SOCS (1,2 y 7), también están implicadas en este proceso. SOCS-1 y SOCS-3 pueden promover la degradación proteosómica de IRSs mediada por ubiquitinas, y también aumentan la transcripción del factor SREBP-1c, que es un regulador clave de la síntesis hepática de AG. En los últimos años, han sido identificadas vías intracelulares que están críticamente involucradas en la patogénesis de la RI. El estrés del retículo endoplasmático (RE) y varias quinasas como JNK e IKK son de gran importancia no sólo porque activan las vías inflamatorias, sino porque aumentan la RI. El estrés del RE conduce a un aumento en la RI a través de la activación de JNK y la consiguiente fosforilación de serina en IRS-1. Tilg et al. (2006).

Las citoquinas son unos mediadores clave en la inflamación hepática, la muerte celular hepática, la colestasis y la fibrosis hepática<sup>137</sup>, así como en la regeneración del hepatocito tras su lesión<sup>138</sup>. La síntesis de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 es uno de los primeros acontecimientos en los procesos donde se produce daño celular hepático. Estas dos citoquinas desencadenan la producción de otras citoquinas y el conjunto conduce a la activación del fenómeno de reclutamiento de células inflamatorias y el inicio del proceso de curación del tejido hepático, el cual incluye la fibrogénesis.

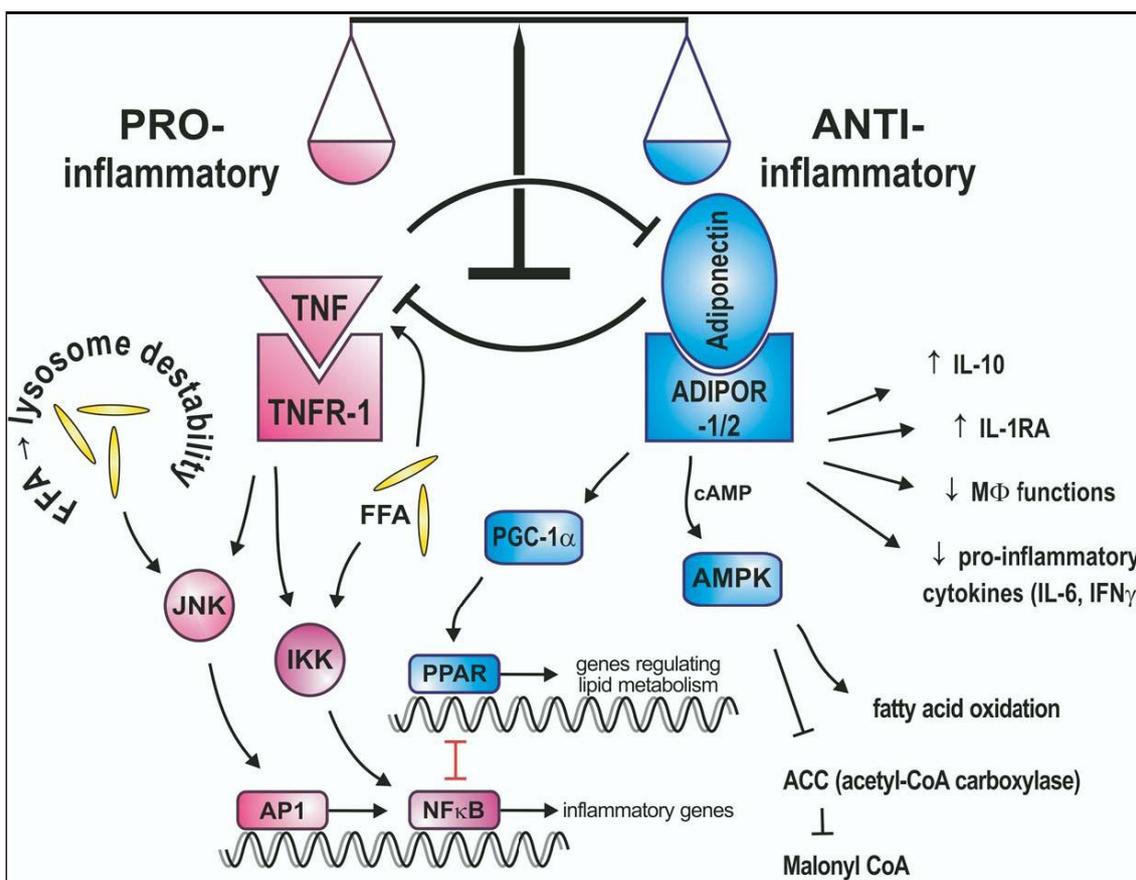
Se han demostrado aumentos en los niveles circulantes y en la expresión hepática de TNF- $\alpha$  en los pacientes con EHNA. Crespo et al.<sup>139</sup> demostraron un aumento de la expresión hepática de TNF- $\alpha$  y de TNFR1 en pacientes con EHNA comparados con pacientes con ES. Además, en este mismo estudio, los pacientes con grados más avanzados de fibrosis, también presentaban un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  a nivel hepático. Sabemos que TNF- $\alpha$  actúa como un modulador de la sensibilidad a la insulina, tanto a nivel sistémico como a nivel hepático, y que ciertos polimorfismos de esta molécula se asocian con una mayor incidencia de RI y de EHNA<sup>140</sup>. Todo lo anterior en su conjunto convierte a TNF- $\alpha$  en una citoquina con un papel principal al mediar en la interacción entre los depósitos de grasa tisulares, la acción de la insulina y el proceso inflamatorio.

La Leptina inhibe la acción de la insulina, y la elevación de los niveles de Leptina empeoran la RI y el metabolismo lipídico. La resistencia periférica a la insulina y unos niveles circulantes elevados de Leptina pueden favorecer la oxidación de AG y la producción de ERO, promoviendo la fibrogénesis hepática<sup>141</sup>. En los pacientes con EHNA, los niveles circulantes de Leptina se correlacionan positivamente con el contenido hepático de grasa (esteatosis), el grado de fibrosis e inflamación hepática, y con los niveles séricos de glucosa, insulina, péptido C, lípidos y ALT. Sin embargo, los niveles séricos de Leptina no son un factor predictivo independiente del grado de inflamación y/o fibrosis hepática<sup>142</sup>.

De forma similar, los niveles séricos de Resistina están aumentados en la EHNA correlacionando con la resistencia hepática a la insulina, el contenido hepático de grasa<sup>143</sup> y el grado histológico de inflamación<sup>144</sup>.

En el otro lado de la balanza, el de la protección, tenemos a Adiponectina cuyos niveles circulantes están disminuidos en los pacientes con HGNA y relacionados de forma inversa con la RI hepática, el contenido hepático de grasa, el grado de inflamación y de la extensión de la fibrosis hepática. Unos niveles circulantes elevados de TNF- $\alpha$  y bajos de Adiponectina han demostrado ser unos predictores independientes de EHNA en los pacientes con HGNA<sup>145</sup>.

En resumen, en condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre las adipocitoquinas de perfil antiinflamatorio y las de perfil proinflamatorio. En la fisiopatología de la HGNA y de su forma evolutiva, la EHNA, está presente la RI. En la génesis de la RI está la pérdida del equilibrio fisiológico, en favor de los factores más proinflamatorios, del perfil de las adipocitoquinas (**Figura 11**).



**Figura 11.** TNF- $\alpha$ , es una citoquinas proinflamatoria que es sintetizada por muchos tipos celulares, incluidos los adipocitos. Adiponectina está producida por los adipocitos y posee importantes funciones metabólicas e inmunológicas. En condiciones fisiológicas debe existir un equilibrio en la síntesis y actividad de estas dos moléculas. Este equilibrio es de gran importancia en ciertas enfermedades y es su pérdida lo que lleva a la situación de IR e inflamación crónica. Tilg et al. (2006).



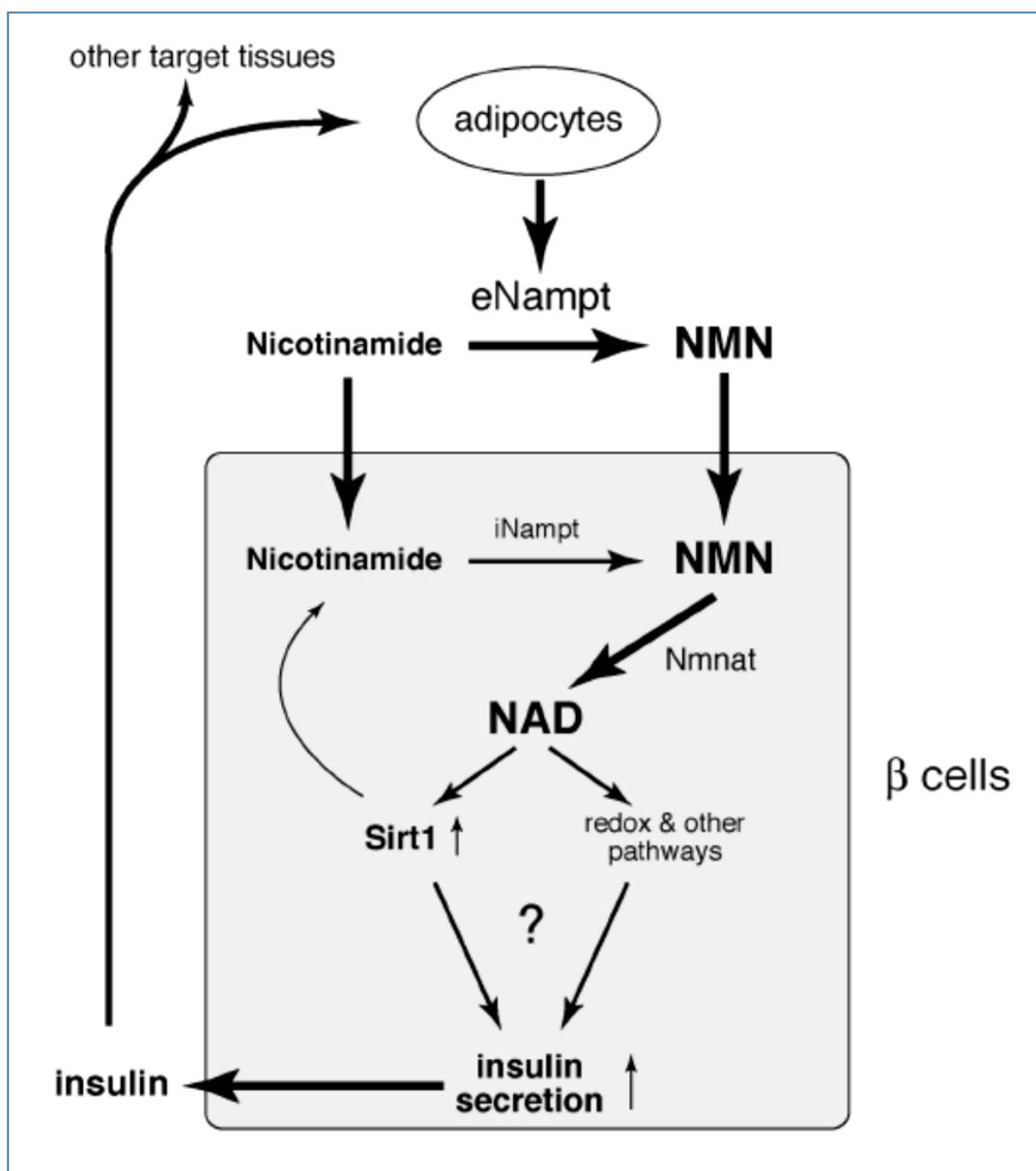
## 5. Visfatina, una nueva adipocitoquina

Visfatina, también conocida como pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), y como Nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt) es una proteína de 52 KDa, identificada por primera vez en 1994 como una adipocitoquina que acelera la maduración de las células precursoras de los linfocitos B en presencia de IL-7 y stem cell factor<sup>146</sup>.

Visfatina es una proteína con un alto grado de conservación en la escala evolutiva, y así se han descrito proteínas homólogas en bacterias, animales invertebrados como las esponjas y en los peces. Dentro de un mismo organismo, su producción ha sido demostrada en diferentes tipos celulares que incluyen las células del epitelio amniótico, los monocitos/macrófagos y en los neutrófilos<sup>136</sup>.

Varios años después de su descubrimiento inicial se demostró que Visfatina tenía a nivel intracelular una función enzimática responsable de catalizar el paso limitante en la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), al catalizar la conversión de nicotinamida a nicotinamida mononucleótido (NMN). NAD es una coenzima que juega un papel clave en las vías energéticas celulares y en las reacciones de oxidorreducción. Investigaciones recientes han demostrado que NAD está implicado en procesos tan diversos como reacciones inmunológicas, procesos inflamatorios, funciones biológicas y en el desarrollo del cáncer. Así, Visfatina/Nampt intervine en la regulación del metabolismo energético celular al poder regular los niveles celulares de NAD. Visfatina/Nampt a nivel intracelular actúa como una fosforribosiltransferasa tipo II, dimérica, en la biosíntesis de NAD<sup>147</sup>.

Una tercera descripción de esta molécula fue realizada por científicos japoneses al referirse a esta proteína como una adipocitoquina de producción principalmente por el tejido graso visceral y, por esta razón, la bautizaron con el nombre Visfatina. Estos científicos describieron que Visfatina tenía propiedades insulíniméticas, pero éstas no han podido ser confirmadas por otros investigadores y los resultados de este trabajo han sido retirados<sup>148,149</sup>. Revollo et al.<sup>150</sup>, demostraron que la actividad extracelular de Visfatina/Nampt no tiene efectos insulíniméticos ni *in vitro* ni *in vivo*, pero sí tiene una importante actividad en la biosíntesis de NAD. Así, la inhibición de la actividad de Visfatina se traduce a nivel de la célula  $\beta$ -pancreática en un déficit en la secreción de insulina estimulada por la glucosa tanto *in vitro* como *in vivo* y, todo ello, sugiere que la biosíntesis de NAD mediada por Visfatina es un punto de vital importancia para la regulación de la homeostasis de la glucosa.



**Figura12. Modelo de regulación de la secreción de insulina en la célula  $\beta$ -pancreática por Nampt/Visfatina.** Nampt/Visfatina controla el paso limitante en la biosíntesis de NAD a nivel extracelular e intracelular. eNampt, Visfatina extracelular; iNampt, Visfatina intracelular; NMN, nicotinamida mononucleótido ; Nmnat, nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa. Revollo et al. (2007).

## 5.1 Visfatina: Aspectos moleculares

El gen que codifica Visfatina/PBEF/Nampt está localizado en el genoma humano en el brazo largo del cromosoma 7 entre 7q22.1 y 7q31.33, y codifica un polipéptido de 491 aminoácidos de un peso molecular de 52 kDa. Visfatina/PBEF/Nampt es una proteína homodimérica cuya secuencia tiene una escasa similitud con otras fosforribosiltransferasas de tipo II<sup>151</sup>.

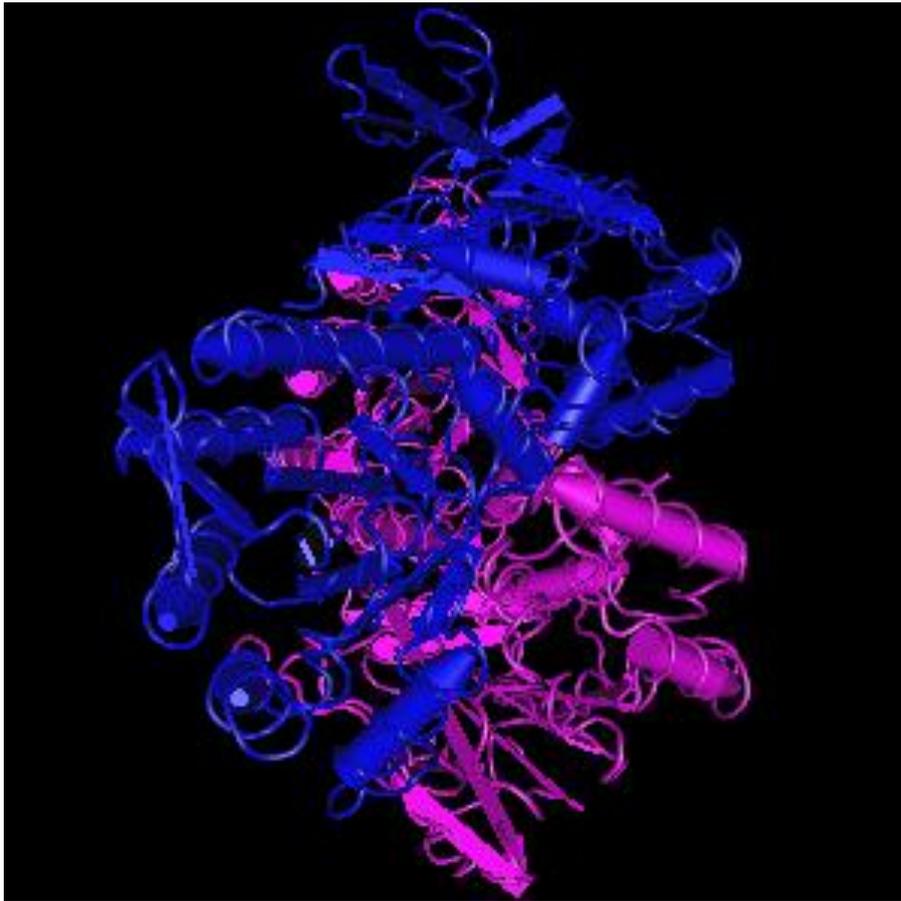
Nicotinamide phosphoribosyltransferase [Homo sapiens]						
1	MNPAAEAEFN	ILLATDSYKV	THYKQYPPNT	SKVYSYFECR	EKKTENSKLR	KVKYEETVIFY
61	GLQYILNKYL	KGKVVTKKEI	QEAKDVYKEH	FQDDVFNEKG	WNYILEKYDG	HLPIEIKAVP
121	EGFVIPRGNV	LFTVENTDPE	CYWLTNWIET	ILVQSWYPIT	VATNSREQKK	ILAKYLLETS
181	GNLDGLEYKL	HDFGYRGVSS	QETAGIGASA	HLVNFKGTDT	VAGLALIKKY	YGTKDPVPGY
241	SVPAAEHSTI	TAWGKDHEKD	AFEHIVTQFS	SVPVSVVSDS	YDIYNACEKI	WGEDLRHLIV
301	SRSTQAPLII	RPDSGNPLDT	VLKMLEILGK	KFPVTENSKG	YKLLPPYLRV	IQGDGVDINT
361	LQEIVEGMKQ	KMWSIENIAF	GSGGGLLQKL	TRDLLNCSFK	CSYVVTNGLG	INVKDPVAD
421	PNKRSKKGRL	SLHRTPAGNF	VTLEEGKGD	EEYGQDLLHT	VFKNGKVTKS	YSFDEIRKNA
481	QLNIELEAAH	H				

**Figura 13.** Secuencia de aminoácidos de Visfatina. National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2008.

Visfatina tiene dos locus activos en la interfase de la proteína dimérica, lo que sugiere que la dimerización es esencial para la actividad catalítica de esta enzima. La extensión de la interfaz dimérica es de 807 nm<sup>2</sup> y está formada por 10 segmentos de cada subunidad. Un total de 89 residuos polares e hidrofóbicos forman la interfaz, y 42 puentes de hidrógeno están involucrados en las interacciones intramoleculares<sup>152,153</sup>.

Cada monómero consta de 491 residuos que forman 19 cadenas beta y 13 hélices alfa y está organizado en 2 dominios estructurales. El segundo dominio estructural consiste en un plegado alternativo de la estructura clásica (β/α)<sub>8</sub>barril. La localización intramolecular de las dos moléculas de NMN, producto de la acción enzimática de Visfatina, está cerca del centro de la estructura (β/α)<sub>8</sub>barril<sup>153</sup>.

La discusión sobre si Visfatina es una proteína que carece de una secuencia de señal típica para su secreción, o se secreta activamente, o alcanza el suero por difusión pasiva tras la muerte celular, sigue hoy abierta<sup>136</sup>.



**Figura 14.** Estructura Visfatina/Nampt/Pre-B-cell colony enhancing factor humana . NCBI. (2011).

## 5.2 Visfatina: Aspectos funcionales

### 5.2.1 Efectos extracelulares. Una citoquina proinflamatoria

La expresión de Visfatina se encuentra aumentada en varias patologías de tipo inflamatorio como la sepsis, el daño pulmonar agudo, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades inflamatorias renales y en el infarto agudo de miocardio entre otras<sup>154-156</sup>. Visfatina, en humanos, induce la producción de varias citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y en especial de IL-6) en los monocitos CD14+ de sangre periférica, las cuales se sabe contribuyen a disminuir la sensibilidad a la insulina. Además, en los monocitos humanos, Visfatina aumenta la expresión de superficie de moléculas coestimuladoras como CD54, CD40 y CD80. En ratones, la administración de Visfatina también incrementa en especial los niveles circulantes de IL-6. Este

aumento de IL-6 es paralelo al aumento de su expresión génica en los tejidos, principalmente a nivel intestinal<sup>156</sup>. Por lo tanto, Visfatina parece ser un inductor muy potente de IL-6 tanto *in vivo* como *in vitro* y, por otro lado, sabemos que IL-6 participa en la patogénesis de la RI que se asocia a la obesidad visceral<sup>157</sup>. En el estudio de Li et al.<sup>158</sup> se muestra como Visfatina a nivel extracelular parece inducir, por mecanismo no enzimático, la producción de IL-6 por parte de los macrófagos, lo cual reafirmaría su papel como citoquina.

Visfatina ha sido también implicada en los procesos de inflamación vascular siendo capaz de estimular la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) en cultivo de células musculares lisas de la aorta humana<sup>159</sup>. La inducción de ONSi fue paralela a la activación de NF- $\kappa$ B, y de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2). Esta actividad proinflamatoria no era inhibida por el bloqueo del receptor a de la insulina, lo que negaría un posible efecto insulínimimético por parte Visfatina. En cambio, la administración de NMN exógeno, el producto de la actividad enzimática de Visfatina, también producía inducción de la ONSi y activó NF- $\kappa$ B, mientras que usando un inhibidor de Visfatina como es APO866 se previno esta activación. Estos autores sugieren que la actividad extracelular de Visfatina puede desempeñar un papel proinflamatorio directo en la inflamación vascular<sup>159</sup>. Otros estudios han investigado los efectos de Visfatina sobre las células endoteliales. Lee et al.<sup>160</sup>, reportaron que Nampt extracelular induce a varias citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8) y a varias moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) en las células endoteliales humanas a través de la activación de NF- $\kappa$ B. Visfatina, induce también la secreción de MCP-1 y de su receptor CCR2 en las células endoteliales humanas. Esta inducción por parte de Visfatina es dosis dependiente y en ella participan de nuevo las vías de la NF- $\kappa$ B y de la proteína quinasa 13 (PK13)<sup>161</sup>. En definitiva, todos estos estudios sugieren que Visfatina puede tener un efecto sobre la función vascular y jugar un papel en la inflamación vascular y la aterosclerosis.

### **5.2.2 Efectos intracelulares. La función enzimática**

NAD es un importante cofactor regulador de varias de las vías del metabolismo celular actuando como sustrato de varios enzimas dependientes de NAD. Estas reacciones enzimáticas dependientes de NAD son catalizadas por varias familias enzimáticas,

incluyendo una familia de acetiltransferasas, las sirtuinas y otra de poli-ADP ribosiltransferasas (PARPs).

Las sirtuinas son unas deacetiltransferasas dependientes de NAD que regulan la actividad de una gran variedad de factores de transcripción y enzimas, que controlan procesos metabólicos en el tejido adiposo, muscular, hepático y pancreático; en especial en procesos relacionados con la obesidad y el envejecimiento. Revollo et al.<sup>162</sup> fueron los primeros autores que relacionaron la biosíntesis de NAD con las sirtuinas. En su estudio realizado en cultivo celular de fibroblastos de ratón, se demostraba que Visfatina era el componente limitante en la biosíntesis de NAD a nivel intracelular. El aumento en la dosis de Visfatina en el cultivo celular se traducían en un aumento en los niveles intracelulares de NAD y en un aumento de la actividad transcripcional del dominio catalítico de Sirtuina2-alfa (Sir2-alfa). Sir2 interviene en la determinación de la vida útil celular en los eucariotas inferiores, existiendo evidencias crecientes de que su proteína homóloga en los mamíferos, sirtuina1 (SIRT1), es también una proteína relacionada con la longevidad celular. El incremento en la actividad de Visfatina proporciona protección contra la muerte celular, y precisa de una vía de síntesis mitocondrial de NAD intacta, así como de las deacetiltransferasas mitocondriales dependientes de NAD; sirtuina3 (SIRT3) y sirtuina4 (SIRT4)<sup>163</sup>. La actividad de SIRT1 es NAD-dependiente y, a nivel de las células musculares lisas vasculares, la sobreexpresión simultánea de SIRT1 y Visfatina, alarga notablemente la vida útil de estas células. Por lo tanto, el efecto de SIRT1 en envejecimiento celular es claramente dependiente de NAD<sup>164</sup>. Visfatina podría afectar también la longevidad de las células humanas por otros mecanismos. Van der Veer et al.<sup>165</sup> demostraron que la introducción del gen de Visfatina en células humanas pertenecientes a la musculatura lisa vascular retrasaba el proceso de envejecimiento, alargaba su vida útil y mejoraba la resistencia celular al estrés oxidativo. Este efecto fue paralelo a la mejora en la degradación de la proteína tumoral 53 (p53) mediada por SIRT1 a través de Visfatina.

Poli-ADP ribosiltransferasa 1 (PARP-1) pertenece a la familia enzimática de las PARPs y actúa como coactivador transcripcional de NF- $\kappa$ B, el factor más importante de transcripción de la inflamación<sup>166</sup>. PARP-1 es también dependiente de NAD y, en estudios recientes, se ha investigado la relación entre los dos enzimas dependientes de NAD; PARP-1 y SIRT1. Rajamohan et al.<sup>167</sup> encontraron que el estrés celular conduce a la acetilación de PARP-1, dando como resultado su activación. En esta situación, SIRT1 se une y desacetila a PARP-1, bloqueando su actividad, y protegiendo de la muerte

celular mediada por la activación de PARP-1. SIRT1, también regula disminuyendo, la actividad transcripcional del gen promotor de PAPR-1. Estos autores demostraron así, que la actividad de PAPR-1 está bajo el control de SIRT1.

Para intentar clarificar la importancia de Visfatina en los procesos inflamatorios, Busso et al.<sup>168</sup> han realizado estudios usando APO866, un inhibidor farmacológico de Visfatina, y demostrando que esta inhibición disminuía la inflamación de procesos como la artritis y la sepsis. La expresión de Visfatina estaba aumentada en ratones a los que se les provocaba artritis y, en este modelo, la inhibición competitiva específica con APO866 de Visfatina mostraba una eficacia similar en la prevención de la artritis a la que se consigue con la utilización de etanercept, un fármaco antiTNF. Además, se producía un descenso significativo de varias citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6). *In vitro*, la administración de APO866 en células inflamatorias peritoneales de ratón y en células dendríticas y monocitos humanos indujo una significativa depleción del contenido de NAD intracelular. La inhibición farmacológica de la función enzimática de Visfatina en las células de ratón y humanas inhibía la síntesis de citoquinas inflamatorias inducida por el lipopolisacárido y HKSA (heat-killed *Staphylococcus aureus*). Este estudio demostraba de forma convincente que Visfatina es un mediador proinflamatorio y mostraba una relación directa entre esta enzima/citoquina y el metabolismo de NAD<sup>168</sup>.

### 5.3 Visfatina, obesidad y resistencia a la insulina

Aunque se ha detectado expresión mRNA y secreción de Visfatina en los preadipocitos, su producción aumenta considerablemente tras su diferenciación a adipocitos maduros, lo cual sugiere una posible implicación de esta adipocitoquina en el desarrollo y la diferenciación de los adipocitos y, por lo tanto, en el control de la adiposidad<sup>148</sup>.

Así, se ha observado que en ratones KKAY, un modelo experimental de obesidad y DM2, los niveles circulantes de Visfatina estaban significativamente incrementados durante el desarrollo de la obesidad. Ello estaba acompañado de incrementos en la expresión génica de Visfatina en el tejido adiposo visceral, pero no en el hígado ni en el tejido adiposo subcutáneo. Además, la alimentación de ratones con una dieta rica en grasas conducía a una elevación de los niveles circulantes de Visfatina, acompañados de un aumento de su expresión génica a nivel de la grasa mesentérica, lo que sugiere que Visfatina podría jugar un papel en el desarrollo de la obesidad y la RI<sup>148</sup>.

Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado estos resultados y han creado controversia sobre el posible papel de Visfatina en el desarrollo de la obesidad. Así, el estudio de Klöting et al.<sup>169</sup>, no encontró cambios significativos en la expresión del gen de Visfatina en adipocitos de ratas WOKW, un modelo poligénico de síndrome metabólico, al compararlas con ratas Dark Agouti sin sobrepeso. El estudio de Choi et al.<sup>170</sup> se examinó la expresión de Visfatina, Adiponectina y TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo visceral de ratas Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), que son genéticamente obesas e insulín resistentes. Estas ratas fueron tratadas con Rosiglitazona, fármaco agonista del receptor activador de la proliferación de los peroxisomas tipo gamma (PPAR- $\gamma$ ), lo que produjo un descenso en los niveles séricos de glucosa e insulina, un aumento en la expresión de mRNA de Visfatina y Adiponectina en el tejido graso visceral de las ratas que recibieron tratamiento y, por el contrario, un descenso de la expresión génica de TNF- $\alpha$ . Este estudio sugiere que la sobreexpresión de Visfatina en el tejido adiposo visceral podría ser un mecanismo mediante el cual los agonistas de los PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$  mejorarían la sensibilidad a la insulina en ratas OLETF.

Respecto al papel de Visfatina en la obesidad humana, los diferentes trabajos realizados han mostrado resultados contradictorios. Así, algunos estudios apoyan una correlación positiva de los niveles plasmáticos de Visfatina con la obesidad visceral<sup>148</sup>. En cambio, otros estudios como el de Berndt et al.<sup>157</sup> no encontraron ninguna relación entre los niveles plasmáticos de Visfatina y la masa grasa visceral en sujetos obesos medida mediante el uso de TC. No obstante, sí que observaron que la expresión del ARNm de Visfatina en la grasa visceral estaba significativamente correlacionada con el IMC y con el porcentaje de grasa corporal total, mientras que la expresión génica de Visfatina en la grasa subcutánea no guardaba relación con el IMC. Estos hallazgos sugieren que los niveles de expresión génica de Visfatina en la grasa visceral están correlacionados con medidas antropométricas globales de la obesidad, pero no con cantidad de la grasa visceral<sup>157</sup>. Recientemente, nuestro grupo ha publicado resultados que valoran la relación entre Visfatina y la obesidad<sup>171</sup>. Analizamos la expresión génica de Visfatina en el tejido graso visceral y subcutáneo en pacientes con obesidad mórbida. Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión génica de Visfatina en el tejido graso en las pacientes con obesidad mórbida respecto a un grupo control de mujeres sin sobrepeso con independencia de la presencia de DM2. La expresión de ARNm de Visfatina no correlacionaba con el IMC en la cohorte de mujeres con obesidad extrema. Además, no encontramos diferencias en la expresión de Visfatina entre el tejido graso

visceral y el subcutáneo. En cambio, dicha expresión génica, sí correlacionaba fuertemente con la expresión en el tejido graso de otras adipocitoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6.

Por otro lado, existen trabajos que han asociado de forma inversa los niveles circulantes de Visfatina y el desarrollo de obesidad. En este sentido, en un estudio realizado sobre un pequeño grupo de personas genéticamente predispuestas a la RI y la dislipemia, no se encontró asociación ni en el grupo problema, ni en el grupo control constituido por personas sanas, ni en la combinación de ambos grupos, entre los niveles circulantes de Visfatina y la adiposidad corporal total. En cambio, sí se produjo una correlación positiva con los niveles de HDL-C y negativa con los niveles de TG circulantes. Los autores sugieren que los niveles circulantes de Visfatina correlacionan de forma negativa con el tejido graso visceral y la RI. Sin embargo, esta correlación negativa desaparecía tras ajustar la cohorte en función del perfil lipídico<sup>172</sup>. En el estudio de Pagano et al.<sup>173</sup> se mostraba que la expresión de Visfatina en el tejido adiposo visceral de humanos obesos se encontraba aumentada y correlacionaba de forma positiva con el IMC. En cambio, la expresión en el tejido adiposo subcutáneo y los niveles circulantes de Visfatina disminuían en la obesidad y correlacionaban de forma negativa con el IMC. En cuanto a los estudios en humanos que relacionan Visfatina y RI, Chen et al.<sup>174</sup> demostraron que la concentración de Visfatina circulante en pacientes con DM2 estaba incrementada y que ello se acompañaba de una disminución de los niveles de Adiponectina, mientras que los niveles de Resistina permanecían invariables. Sin embargo, otros estudios no encontraron ninguna correlación entre los niveles plasmáticos de Visfatina y diversos parámetros indicadores de RI, tales como el índice HOMA, lo que sugiere que la Visfatina no está relacionada con la RI en humanos<sup>157,173</sup>. En este sentido y, contrariamente a lo hallado en roedores, Hammarstedt et al.<sup>175</sup> observaron que ni la expresión génica ni los niveles circulantes de Visfatina estaban regulados en humanos por las tiazolidinedionas, en concreto por pioglitazona. Así, concluyen que la Visfatina no contribuye en los efectos insulino sensibilizantes que poseen estos fármacos.

## 5.4 Visfatina y enfermedades hepáticas

Pocos son los estudios que, hasta el momento actual, han investigado en humanos el papel de Visfatina en la HGNA. Moschen et al.<sup>176</sup> en un estudio donde analizaban los

niveles circulantes y la expresión hepática de varias adipocitoquinas (Adiponectina, Leptina, Resistina y Visfatina) demostraron que los niveles circulantes de Visfatina estaban aumentados en pacientes obesos con HGNA, y que los niveles circulantes y la expresión de ARNm hepática de esta adipocitoquina disminuían de forma significativa tras la pérdida de peso a los 6 meses de haberse realizado una cirugía bariátrica. Se obtuvieron biopsias hepáticas pareadas en 18 pacientes, antes de la cirugía bariátrica y 6 meses tras la realización de la misma, y se realizó tinción con técnicas de inmunohistoquímica para Visfatina de las biopsias. Con esta metodología se obtuvo una valoración semicuantitativa de la expresión de esta proteína a nivel hepático, observándose una significativa disminución en dicha expresión tras la pérdida de peso inducida por la cirugía. En base a estos resultados, estos autores sugieren que la elevación de los niveles circulantes de Visfatina en pacientes obesos con una HGNA podría tener un origen hepático. En otro reciente estudio, se demostró la existencia de correlación entre los niveles circulantes de Visfatina y la histología hepática, pudiéndose predecir en las personas con unos niveles circulantes altos de Visfatina la posible existencia de una inflamación hepática portal en los pacientes con HGNA<sup>177</sup>. Catalán et al.<sup>178</sup>, en su estudio observaron que los niveles circulantes de Visfatina y su expresión hepática correlacionaban positivamente con los niveles de las enzimas hepáticas (AST, ALT y GGT). Además, estos autores encontraron correlación positiva entre los niveles circulantes de Visfatina, con parámetros inflamatorios como son la PCR y el fibrinógeno, así como con el perfil lipídico (niveles circulantes de de TG, colesterol-total y LDL-colesterol). En resumen, los resultados de los estudios anteriores parecen relacionar la HGNA con niveles séricos elevados de Visfatina, y ello parecería sugerir que el hígado puede ser una fuente importante de producción de esta adipocitoquina en pacientes con inflamación hepática.

Existen, por otro lado, datos que relacionan otras enfermedades hepáticas, como las hepatitis víricas, con Visfatina. En Polonia, Kukla et al.<sup>179</sup> estudiaron los niveles circulantes de Visfatina y la histología hepática en 70 individuos de peso corporal normal (35 mujeres/35 hombres) que presentaban una hepatopatía crónica por el virus C genotipo 1b. Los individuos estudiados no consumían alcohol, no eran diabéticos ni intolerantes a la glucosa y no presentaban otra razón que no fuese la hepatitis C para la inflamación hepática. Los niveles en suero de Visfatina estuvieron significativamente elevados en los pacientes que presentaban una hepatitis crónica C respecto a los de un grupo de individuos control normopeso y sin infección crónica por el virus C. Desde el

punto de vista histológico, los niveles de Visfatina se correlacionaron de forma negativa con el grado de actividad necroinflamatoria y no se pudo establecer relación entre los niveles circulantes de Visfatina y el grado de fibrosis hepática. Estos autores sugieren que Visfatina participa en la regulación del proceso inflamatorio del hepatocito en la hepatitis C crónica, otorgándole un papel hepatoprotector a esta citoquina. De nuevo los datos publicados sobre el tema son nuevamente contradictorios. Huang et al.<sup>180</sup> estudiaron retrospectivamente 102 pacientes Taiwaneses con hepatitis crónica C no tratada comparándolos con un grupo de 97 adultos sanos. En los pacientes con hepatitis C crónica, los niveles circulantes de Visfatina no se vieron influenciados ni por el serotipo viral, ni por la carga viral, ni por la respuesta al tratamiento (interferón alfa y ribavirina), aunque demostraron tener una tendencia a estar más elevados que los de los individuos del grupo control, pero sin llegar a la significación estadística. En cambio y, a diferencia con el estudio polaco, sí se encontró que los pacientes con hepatitis C crónica con una actividad necroinflamatoria moderada o severa tenían unos niveles significativamente superiores de Visfatina en comparación con los que presentaban una actividad leve. Además, los pacientes con grados avanzados de fibrosis (F3-4) tenían unos niveles de Visfatina también significativamente superiores que los que tenían fibrosis en un grado leve (F0-2).

En resumen, parece que los niveles circulantes de Visfatina serían capaces de señalar la existencia de un proceso inflamatorio a nivel hepático, si bien la razón fisiopatológica de esta relación y su posible capacidad para establecer el grado de afectación histológica estarían aún por determinar.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Teniendo en cuenta que:

1. En humanos se ha demostrado la capacidad de diferentes tejidos, como el adiposo y el hepático, tanto para la expresión del gen de la PBEF/Nampt/Visfatina como para la secreción de PBEF/Nampt/Visfatina proteica.
2. Los datos disponibles hasta la fecha relacionan positivamente a los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina, así como los niveles circulantes de otras adipocitoquinas proinflamatorias, con la presencia y grado de la obesidad. En cambio, las referencias acerca de la relación entre los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina y su expresión génica a parte de en el tejido graso, como es el caso del tejido hepático, son escasas y en algunos casos contradictorias.
3. Datos disponibles recientemente relacionan los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina con diferentes parámetros del síndrome metabólico y con la presencia de su manifestación hepática, el hígado graso no alcohólico. Las relaciones entre los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina, su expresión génica en tejido hepático, la obesidad, y la presencia y tipo histológico de la enfermedad hepática no alcohólica: esteatosis simple o esteatohepatitis no alcohólica, están escasamente estudiadas.
4. La biopsia hepática es, a día de hoy, el método de referencia para el diagnóstico, control evolutivo y pronóstico de la hepatopatía grasa no alcohólica. En la actualidad no disponemos de un marcador clínico, ni bioquímico, ni de ningún modelo matemático validado que combinando datos clínicos con bioquímicos, cuantifique la probabilidad de presentar una hepatopatía grasa no alcohólica histológicamente avanzada o su evolución desde la esteatosis simple a la esteatohepatitis no alcohólica. Estudios recientes han intentado relacionar los niveles circulantes de Visfatina con la presencia y grado de la hepatopatía grasa no alcohólica.



## **Los objetivos del presente estudio son:**

1. Analizar los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina en un grupo de mujeres con obesidad mórbida y su relación con las diferentes variables clínicas que conforman el síndrome metabólico.
2. Analizar la relación entre los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina y su expresión génica en tejido hepático con presencia de la hepatopatía grasa no alcohólica en un grupo de mujeres con obesidad mórbida.
3. Analizar la relación entre los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina y su expresión génica en tejido hepático en relación con la presencia o ausencia de diabetes mellitus tipo 2 en un grupo de mujeres con obesidad mórbida.
4. Valorar la utilización clínica de la determinación de los niveles circulantes de PBEF/Nampt/Visfatina como biomarcador de la presencia y grado de la hepatopatía grasa no alcohólica.



# **III. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**



## III. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. *Pacientes y procedimientos*

Este estudio fue aprobado para su realización por el Comité Ético del Centro. Todas las mujeres incluidas fueron informadas de su participación en el estudio y firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión en el presente estudio de investigación.

En este estudio se analizaron, mediante ELISA, los niveles circulantes de diferentes adipocitoquinas y citoquinas: Adiponectina, RBP4, Resistina, Lipocalina 2, Visfatina, TNFR2, IL-6 y de la PCR; en 133 mujeres caucásicas de descendencia europea residentes en la provincia de Tarragona.

Estas mujeres se dividieron en 2 grupos: un primer grupo control de 40 mujeres con un IMC comprendido entre 18 y 25 Kg/m<sup>2</sup>, y un segundo grupo de 93 mujeres que presentaban obesidad mórbida (OM) con un IMC > 40 Kg/m<sup>2</sup>.

La histología hepática y la expresión hepática de Visfatina fue analizada en 5 casos del grupo control de mujeres normopesas y en 86 casos del grupo de mujeres con OM. En los 5 casos del grupo control la histología hepática fue normal. En el grupo con OM se encontraron 18 casos con una histología hepática normal (HN) y 68 casos donde la histología hepática era compatible con la presencia de una HGNA. El diagnóstico de HGNA fue realizado según los siguientes criterios: 1) histología hepática compatible, 2) ingesta de alcohol < 10 g/día, 3) exclusión de otras causas de enfermedad hepática. Las muestras de tejido hepático fueron teñidas con hematoxilina-eosina y con el tricrómico de Manson, y valoradas por hepatopatólogos experimentados utilizando una modificación de los métodos de puntuación propuestos por Brunt et al.<sup>181</sup> y Kleiner et al.<sup>182</sup>. De acuerdo con la histología hepática y su IMC, los pacientes fueron clasificados en 4 grupos:

- **Grupo 1.** Mujeres con normopeso e histología hepática normal, n=5
- **Grupo 2.** Mujeres con OM e histología hepática normal, n=18
- **Grupo 3.** Mujeres con OM e histología hepática de esteatosis simple, n=24
- **Grupo 4.** Mujeres con OM e histología hepática de esteatohepatitis no alcohólica, n=44

La biopsia hepática fue indicada en las pacientes con OM si se demostraba la existencia de criterios clínicos y bioquímicos en análisis sucesivos de una posible enfermedad hepática o en caso de observarse alteraciones macroscópicas a nivel hepático durante la realización de la cirugía bariátrica laparoscópica. Así, la biopsia hepática fue realizada durante la práctica de la cirugía laparoscópica, sólo en aquellos pacientes que cumplían los criterios anteriores, y con el fin de establecer la posible presencia de una enfermedad hepática. En las mujeres del grupo control, la biopsia hepática se había indicado con fines diagnósticos, a fin de excluir una patología hepática.

El grupo control de mujeres normopesas y el grupo problema de mujeres con OM presentaban edades similares sin diferencias estadísticamente significativas. Todas las mujeres del grupo problema habían presentado un peso estable con fluctuaciones menores al 2% del peso corporal durante al menos los tres meses previos a la práctica de la cirugía. Se excluyeron del estudio: (1) pacientes que usaban medicaciones que se cree alteran la actividad de Visfatina o sus niveles circulantes (p.e. medicaciones hipolipemiantes, antihipertensivos o diuréticos), (2) pacientes con DM2 en tratamiento con insulina o en tratamiento con medicaciones que influyen sobre los niveles endógenos de insulina, (3) pacientes menopáusicas, postmenopáusicas o en tratamiento con anticonceptivos orales, (4) pacientes con alteraciones de la función hormonal tiroidea y (5) pacientes que presentaban enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, enfermedades infecciosas o enfermedades neoplásicas activas.

En el grupo de mujeres con OM y siguiendo los criterios del Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus de la OMS<sup>183</sup>, 31 pacientes cumplían los criterios diagnósticos de DM2. Todas las pacientes con DM2 habían tenido un control glucémico estable en los 6 meses previos al estudio.

Ninguna de las pacientes del grupo control era hipertensa, dislipémica, ni diabética; ni tomaba medicación alguna que pudiese modificar los anteriores factores de riesgo cardiovascular.

## 2. Metodología de laboratorio

### 2.1 Medida de los parámetros antropométricos

Se evaluaron como medidas antropométricas de los pacientes incluidos en el estudio: el IMC (calculado como el peso en kilos dividido por cuadrado de la talla expresada en metros) y el PC, expresado en centímetros.

La presión arterial se ha determinado con las pacientes en posición supina en el brazo derecho y tras 10 minutos de descanso; utilizándose un tensiometro estándar y un manguito de la medida apropiada.

### 2.2 Determinaciones bioquímicas

Los estudios de laboratorio incluyeron las determinaciones séricas de: glucosa en ayunas en mg/dl, insulina basal en mU/l, hemoglobina glicosilada en % (HbA1c), HDL-C en mg/dl, TG en mg/dl y transaminasas: AST, ALT, Gamma glutamiltransferasa (GGT) y Fosfatasa alcalina (FA) todas ellas expresadas en U/l. Todas las determinaciones se realizaron mediante un analizador automático convencional. La RI se calculó utilizando el modelo de evaluación de homeostasis versión 2 de IR (HOMA2-IR)<sup>184</sup>, que se completó con la Calculadora HOMA versión 2.2.2 proporcionada por el Centro de Diabetes, Endocrinología y Metabolismo de Oxford ([www.dtu.ox.ac.uk/homa](http://www.dtu.ox.ac.uk/homa)).

Los niveles circulantes de Visfatina (AdipoGen Inc., Seúl, Corea), Adiponectina (Linco Research, Inc., St. Charles, EE.UU.), Resistina (Biovendor, Modrice, República Checa), Lipocalina 2 (Biovendor, Modrice, República Checa), IL-6 (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, EE.UU.) y TNFR2 (Biosource Europe SA, Nivelles, Bélgica) se midieron por duplicado utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado enzima (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante. RBP4 se midió por nefelometría (Siemens Healthcare Care Diagnostics GmbH, Marburg, Alemania). Todas las moléculas se midieron en muestras de suero.

## 2.3 Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

El ARN total de tejido hepático se aisló de acuerdo con el protocolo del fabricante de Mini Kit RNeasy (Qiagen, Barcelona, España). Es ARN total del tejido adiposo visceral y subcutáneo se aisló de acuerdo con el protocolo del fabricante de Midi Kit RNeasy (Qiagen, Barcelona, España). El ARN fue digerido con ADNasa I (set de ADNasa libre de ARNasa, Qiagen). El ADNc fue sintetizado utilizando la misma cantidad de ARN total en todas las muestras con el kit High Capacity ARN-to-ADNc (Applied Biosystems, Madrid, España). La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) cuantitativa se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, que contenía 10 ng del ADNc transcrito inversamente, 10  $\mu$ l de Master Mix de Taq Man Fast Universal PCR (Applied Biosystems) y 1  $\mu$ l de cada sonda Taq Man prediseñadas por Applied Biosystems® para la detección de Visfatina, Adiponectina, Resistina, TNF- $\alpha$ , IL-6, y para GAPDH que se utilizó como gen de referencia. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos utilizando el 7900HT Fast Real-Time PCR systems (Applied Biosystems).

## 3. Estudio estadístico

Todos los valores se expresan como la media (DE) (desviación estándar) y se analizaron con el paquete estadístico del programa SPSS / PC + para Windows (v.19.0 Chicago, Illinois, EE.UU.). Las diferencias entre grupos se calcularon utilizando la t de Student o la prueba One-way ANOVA. La fuerza de asociación entre variables se calculó utilizando el método de Pearson para las variables paramétricas y el test de correlación de Rho de Spearman para variables no paramétricas. El test Two-way ANOVA se llevó a cabo para examinar el efecto de la histología del HGNA (HN, ES y EHNA) y la presencia de diabetes como variables independientes, en los niveles circulantes de Visfatina y su expresión de ARNm hepática. El análisis de regresión logística se utilizó para predecir la variable categórica dicotómica (presencia de EHNA) a partir de un conjunto de variables predictoras (variables metabólicas o adipocitoquinas). Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

Se calcularon las curvas de eficacia diagnóstica o curvas ROC (Reciver Operator Characteristic) con el fin de evaluar el rendimiento como biomarcador de los niveles

circulantes de Visfatina en el diagnóstico de HGNA y EHNA, en comparación con la biopsia hepática que es el método actual de referencia. Los tres valores de corte óptimos fueron seleccionados en base a obtener un primer punto de corte de alta sensibilidad (90%), un segundo punto de corte que priorizaba la especificidad (90%) y, un tercero, que incluía la mejor combinación de sensibilidad y especificidad de acuerdo con el mayor índice de Youden.



## **IV. RESULTADOS**



## IV. RESULTADOS

### 1. Niveles séricos de Visfatina en el normopeso y en la obesidad mórbida

En la **Tabla R1.1** se describen las características basales del grupo de mujeres control normopesas (IMC < 25 Kg/m<sup>2</sup>) y del grupo problema de mujeres con obesidad mórbida (OM) (IMC > 40 Kg/m<sup>2</sup>). Las mujeres con OM presentan aumentos significativos del PC, la TAs y TAd, la glucemia basal, la insulinemia basal, la HbA1c, el HOMA2-IR, TG y las transaminasas (AST, ALT y FA) respecto al grupo control. Por el contrario, los niveles de HDL-C están significativamente disminuidos en grupo de mujeres con OM respecto al grupo control. Aplicando los criterios de definición del SM de la ATP III<sup>79</sup>, cumplían con los mismos el 86% de las mujeres con OM, frente al 2,5% de las mujeres del grupo control.

**Tabla R1.1.** Características basales de la cohorte de estudio.

	<b>CONTROL</b> (n=40)		<b>OBESIDAD MÓRBIDA</b> (n=93)		<b>Valor p</b>
<b>EDAD (años)</b>	43.18	(13.86)	45.79	(10.59)	n.s.
<b>PESO (kg)</b>	56.90	(6.96)	122.28	(17.07)	*
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21.93	(1.86)	47.92	(6.69)	*
<b>PC (cm)</b>	75.38	(8.43)	130.88	(11.70)	*
<b>TAs (mmHg)</b>	118.76	(12.66)	134.79	(20.98)	*
<b>TAd (mmHg)</b>	71.71	(8.77)	77.33	(15.51)	*
<b>GLUCEMIA (mg/dL)</b>	90.59	(10.45)	116.91	(37.75)	*
<b>INSULINEMIA (mU/L)</b>	7.98	(3.94)	19.06	(17.40)	*
<b>HbA1c (%)</b>	4.57	(0.29)	5.94	(1.63)	*
<b>HOMA2-IR</b>	1.04	(0.53)	2.44	(2.11)	*
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	64.34	(14.65)	40.84	(9.23)	*
<b>TRIGLIC (mg/dL)</b>	98.32	(53.67)	164.29	(67.58)	*
<b>AST (U/L)</b>	21.36	(7.56)	46.08	(32.97)	*
<b>ALT (U/L)</b>	20.08	(13.79)	44.48	(25.85)	*
<b>GGT (U/L)</b>	20.59	(29.68)	32.63	(33.82)	n.s
<b>FA (U/L)</b>	61.58	(20.50)	71.47	(21.01)	*

Media (desviación estándar). \* Diferencias significativas vs. al grupo control (p<0.05).

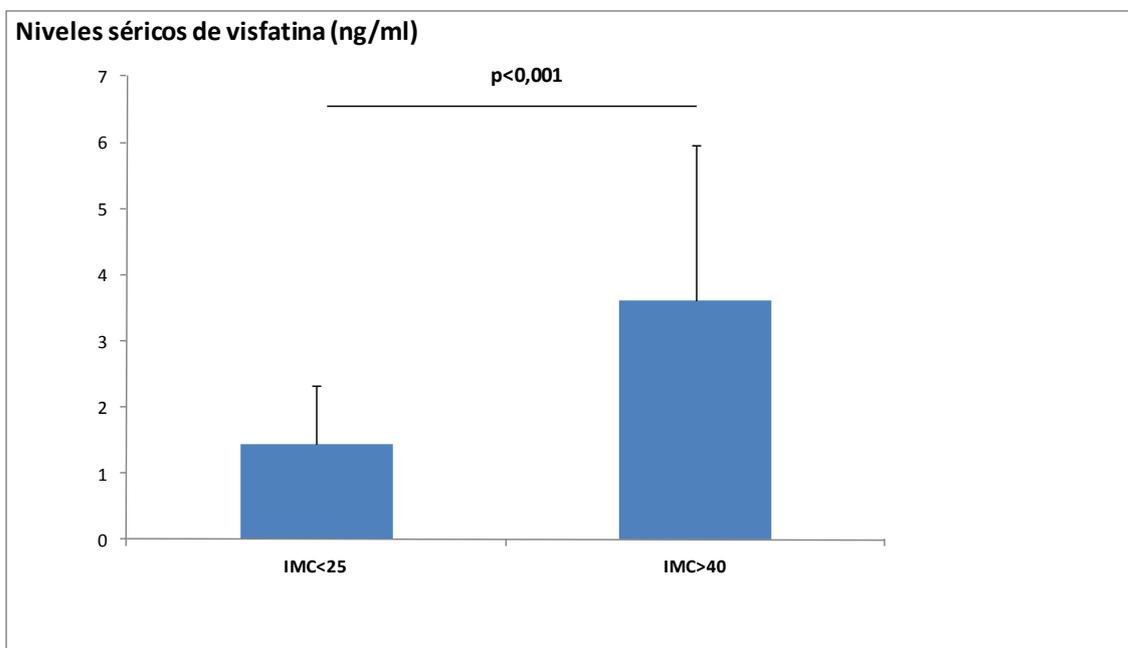
El análisis de los niveles circulantes de las adipocitoquinas y citoquinas estudiadas comparando ambos grupos se muestra en la **Tabla R1.2**. En él se observa como los niveles circulantes de Visfatina (**Figura R1**), Lipocalina 2, Resistina, TNFR2, IL-6 y

PCR, están significativamente elevados en la OM respecto al grupo control. En cambio los niveles circulantes de Adiponectina están significativamente disminuidos en la OM respecto al grupo control.

**Tabla R1.2. Niveles de Adipocitoquinas circulantes**

	CONTROL (n=40)		OBESIDAD MÓRBIDA (n=93)		Valor p
VISFATINA (ng/mL)	1.43	(0.89)	3.60	(2.36) *	<0.001
ADIPONECTINA (µg/mL)	16.27	(7.75)	6.96	(3.02) *	<0.001
LIPOCALINA 2 (ng/mL)	69.61	(26.86)	76.23	(27.65) *	0.042
RBP4 (mg/dL)	3.01	(1.03)	3.33	(2.00)	n.s.
RESISTINA (ng/mL)	3.96	(1.56)	5.30	(1.69) *	0.042
TNFR2 (ng/mL)	3.37	(1.84)	5.15	(2.14) *	0.011
IL-6 (pg/mL)	1.50	(1.94)	3.05	(2.19) *	0.001
PCR (mg/dL)	0.18	(0.53)	1.10	(0.88) *	<0.001

Media (desviación estándar). \* Diferencias significativas vs.al grupo control (p<0.05).



**Figura R1.** Niveles séricos de Visfatina en mujeres no obesas (IMC < 25 Kg/m<sup>2</sup>) y en mujeres con obesidad mórbida (IMC > 40 Kg/m<sup>2</sup>).

## 2. Niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida en normoglucémicos y en diabéticos tipo 2

Se analizaron los niveles circulantes de Visfatina en el grupo de mujeres con OM en función de la presencia o no de DM2. Como era de esperar, los niveles de glucosa en ayunas y de HbA1c eran más altos en el subgrupo de mujeres con DM2. Dichos niveles en el subgrupo de mujeres sin DM2 estaban dentro de los valores definidos por la OMS<sup>183</sup> como normales. El análisis estadístico demostraba por un lado, la ausencia de diferencias significativas entre las mujeres mórbidas sin DM2 y las DM2 en los parámetros que definen el SM y la RI: el PC, la TAs y TAd, insulinemia basal, HOMA2-IR, HDL-C y TG. En cambio, sí se demostraba un aumento significativo en los niveles circulantes de AST, ALT y GGT en el subgrupo de mujeres con OM y DM2 respecto al subgrupo de mujeres con OM sin DM2 (**Tabla R2.1**).

**Tabla R2.1** Características basales del grupo de mujeres con obesidad mórbida en relación con la presencia o ausencia de DM2.

	<b>OBESIDAD MÓRBIDA</b>				Valor p
	No DM2 (n=62)		DM2 (n=31)		
<b>EDAD (años)</b>	46.74	(11.10)	46.77	(9.59)	n.s.
<b>PESO (kg)</b>	121.13	(14.99)	124.54	(14.99)	n.s.
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	47.72	(6.66)	48.30	(20.88)	n.s.
<b>PC (cm)</b>	131.06	(11.02)	130.53	(6.66)	n.s.
<b>TAs (mm Hg)</b>	135.24	(17.46)	133.98	(6.83)	n.s.
<b>TAd (mm Hg)</b>	78.17	(13.94)	75.82	(11.02)	n.s.
<b>GLUCOSA (mg/dL)</b>	96.63	(11.02)	158.17	(13.71)	* <b>&lt;0.001</b>
<b>INSULINEMIA (mU/L)</b>	18.47	(10.25)	20.19	(17.46)	n.s.
<b>HbA1c (%)</b>	5.11	(0.42)	7.43	(26.88)	* <b>&lt;0.001</b>
<b>HOMA2-IR</b>	2.23	(1.07)	2.86	(13.94)	n.s.
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	42.29	(9.91)	38.03	(18.48)	n.s.
<b>TRIGLIC (mg/dL)</b>	153.30	(27.74)	185.92	(11.02)	n.s.
<b>AST (U/L)</b>	36.81	(64.38)	65.00	(39.72)	* <b>&lt;0.001</b>
<b>ALT (U/L)</b>	38.19	(16.51)	57.54	(10.25)	* <b>0.001</b>
<b>GGT (U/L)</b>	25.00	(18.67)	48.16	(26.85)	* <b>0.006</b>
<b>FA (U/L)</b>	69.33	(19.35)	75.83	(0.42)	n.s.

Media (desviación estándar). \* Diferencias significativas entre pacientes diabéticos y no diabéticos ( $p < 0.05$ ).

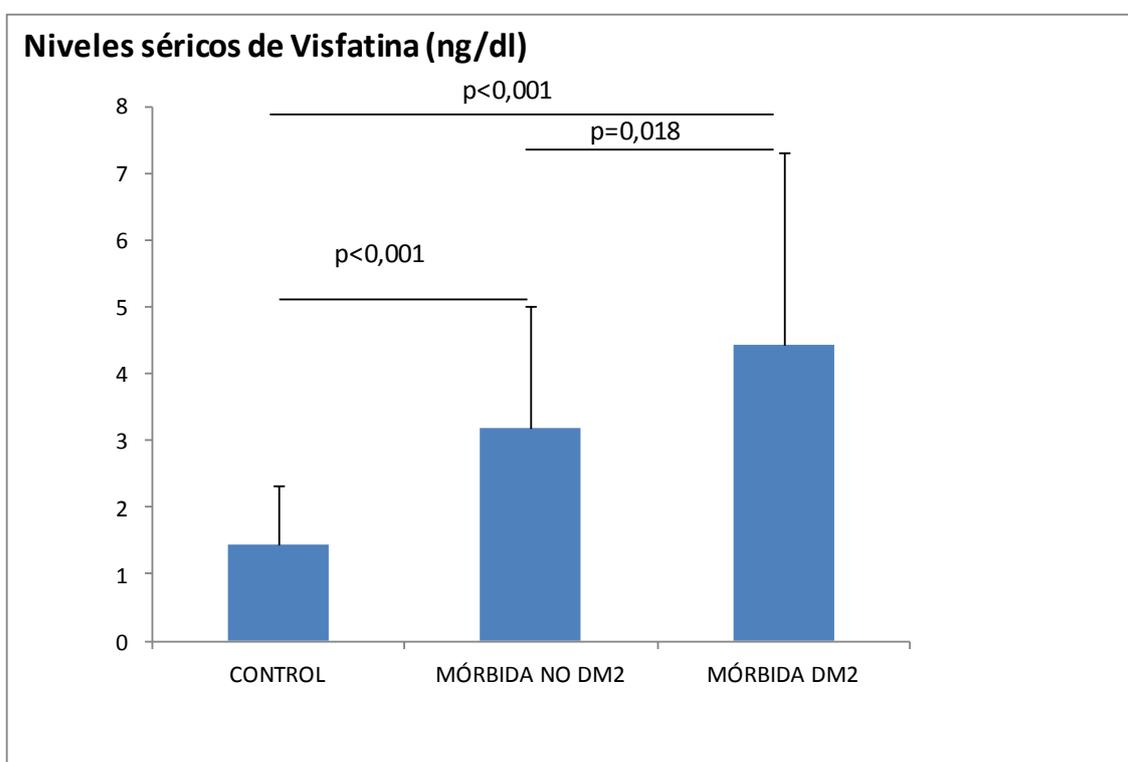
Así mismo, en el análisis de las adipocitoquinas y citoquinas estudiadas comparando ambos subgrupos que se muestra en la **Tabla R2.2**, se observa como los niveles circulantes de Visfatina (**Figura R2**) y PCR estaban significativamente elevados en las

mujeres diabéticas con OM respecto a las no diabéticas. Lo contrario ocurre con Adiponectina, cuyos niveles circulantes estaban significativamente disminuidos en las mujeres con OM y diabetes. En cambio, Lipocalina 2, RBP4, Resistina, TNFR2 e IL-6 no mostraban variaciones al comparar ambos subgrupos.

**Tabla R2.2.** Niveles de Adipocitoquinas circulantes en la obesidad mórbida en relación con la presencia o ausencia de DM2.

	OBESIDAD MÓRBIDA		Valor p
	No DM2 (n=62)	DM2 (n=31)	
VISFATINA(ng/mL)	2.72 (1.83)	4.16 (2.87)	* <b>0.018</b>
ADIPONECTINA (µg/mL)	7.73 (3.00)	5.24 (2.29)	* <b>0.004</b>
LIPOCALINA 2 (ng/mL)	78.42 (28.28)	68.65 (25.71)	n.s.
RBP4 (mg/dL)	3.49 (2.04)	4.07 (1.91)	n.s.
RESISTINA (ng/mL)	4.60 (1.80)	3.90 (1.34)	n.s.
TNFR2 (ng/mL)	5.15 (2.03)	5.40 (2.42)	n.s.
IL-6 (pg/mL)	2.71 (1.48)	3.78 (3.18)	n.s.
PCR (mg/dL)	0.93 (0.82)	1.39 (0.92)	* <b>0.041</b>

Media (desviación estándar). \* Diferencias significativas entre pacientes diabéticos y no diabéticos ( $p < 0.05$ ).



**Figura R2.** Niveles séricos de Visfatina en mujeres con obesidad mórbida en relación con la presencia de DM2. CONTROL: mujeres normopeso.

### 3. Relación de los niveles séricos de Visfatina con las variables bioquímicas y los niveles circulantes de adipocitoquinas en la obesidad mórbida

El análisis de la relación entre los niveles circulantes de Visfatina en el grupo de mujeres con OM y los diferentes parámetros bioquímicos y metabólicos determinados, muestra la existencia de una correlación positiva de los niveles séricos de Visfatina con las enzimas hepáticas: ALT, AST, GGT, FA (**Tabla R3.1**). No se encontró correlación con los parámetros antropométricos (IMC, PC), ni con los metabólicos (glucemia basal, insulinemia basal, HbA1c, HOMA2-IR, HDL-C, TG).

**Tabla R3.1** Correlación de los niveles circulantes de Visfatina y variables bioquímicas y metabólicas en la obesidad mórbida.

Parámetros generales	OBESIDAD MÓRBIDA (n=93)	
	R	Valor p
IMC	0.101	n.s.
PC (cm)	-0.040	n.s.
GLUCOSA (mg/dL)	0.100	n.s.
INSULINA (mU/L)	-0.131	n.s.
HbA1c (%)	0.088	n.s.
HOMA2-IR	-0.100	n.s.
HDL-C (mg/dL)	-0.181	n.s.
TRIGLICERIDOS (mg/dL)	0.044	n.s.
AST (U/L)	0.367	<b>0.001</b>
ALT (U/L)	0.393	<b>&lt;0.001</b>
GGT (U/L)	0.254	<b>0.021</b>
FA (U/L)	0.245	<b>0.019</b>

*Test de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas (p<0.05).*

En el análisis de los niveles circulantes de Visfatina del grupo de mujeres con OM en relación con los niveles circulantes de las diferentes adipocitoquinas estudiadas se encontró una correlación positiva con los niveles circulantes de IL-6 y con la PCR. El resto de adipocitoquinas valoradas, Adiponectina, Lipocalina 2, RBP4, Resistina y TNFR2, no mostraron correlación. (**Tabla R3.2**).

**Tabla R3.2.** Correlaciones entre niveles circulantes de Visfatina y adipocitoquinas.

Adipo/citoquinas	OBESIDAD MÓRBIDA (n=93)	
	R	valor p
ADIPONECTINA (µg/mL)	-0.088	n.s.
LIPOCALINA 2 (ng/mL)	0.361	n.s.
RBP4 (mg/dL)	-0.060	n.s.
RESISTINA (ng/mL)	0.003	n.s.
TNF-R2 (ng/mL)	-0.132	n.s.
IL-6 (pg/mL)	0.496	<b>&lt;0.001</b>
PCR (mg/dL)	0.241	<b>0.049</b>

Test de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA

Se estudiaron los niveles circulantes de Visfatina y su relación con la presencia de HGNA y su tipo histológico: ES o EHNA en el grupo de mujeres con OM. Se obtuvieron muestras de tejido hepático de un total de 86 pacientes y se clasificaron siguiendo criterios histológicos en 3 subgrupos: HN (18 casos), ES (24 casos) y EHNA (44 casos). En el análisis basal de estos 3 subgrupos se observa un aumento significativo en las cifras de AST, ALT y GGT en los grupos de ES y de EHNA respecto al subgrupo de pacientes sin alteración de la histología hepática. No se observan diferencias entre los tres subgrupos en el resto de parámetros analizados: edad, peso, IMC, PC, TAs, TAd, glucosa basal, insulinemia basal, HbA1c, HOMA2-IR, HDL-C y TG (Tabla R4.1).

**Tabla R4.1.** Características basales del grupo de mujeres con obesidad mórbida en función de la histología hepática.

OBESIDAD MÓRBIDA											
	HÍGADO NORMAL (n=18)	ESTEATOSIS SIMPLE (n=24)		ESTEATOHEPATITIS (n=44)		V	p <sup>1</sup>	V	p <sup>2</sup>	V	p <sup>3</sup>
EDAD (Años)	44.05 (10.71)	46.79	(10.34)	47.55	(11.11)	n.s.		n.s.		n.s.	
PESO (kg)	122.62 (15.43)	123.74	(16.94)	122.79	(18.14)	n.s.		n.s.		n.s.	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	48.46 (7.33)	48.13	(8.27)	48.02	(5.66)	n.s.		n.s.		n.s.	
PC (cm)	133.85 (14.90)	125.33	(6.63)	132.48	(11.54)	n.s.		n.s.		n.s.	
TAs (mm Hg)	134.00 (15.58)	138.00	(14.48)	133.66	(26.34)	n.s.		n.s.		n.s.	
TAd (mm Hg)	76.38 (15.69)	76.54	(12.02)	78.99	(17.73)	n.s.		n.s.		n.s.	
GLUCOSA (mg/dL)	103.11 (27.96)	128.35	(41.35)	119.06	(38.61)	n.s.		n.s.		n.s.	
INSULINEMIA (mU/L)	17.48 (11.19)	16.96	(9.36)	21.24	(22.73)	n.s.		n.s.		n.s.	
HbA1c (%)	5.30 (0.80)	6.23	(1.83)	6.14	(1.82)	n.s.		n.s.		n.s.	
HOMA2-IR	2.13 (1.31)	2.31	(1.21)	2.74	(2.75)	n.s.		n.s.		n.s.	
HDL-C (mg/dL)	40.02 (9.68)	39.39	(10.37)	41.21	(8.10)	n.s.		n.s.		n.s.	
TRIGLIC (mg/dL)	158.32 (44.76)	172.37	(73.98)	165.70	(73.56)	n.s.		n.s.		n.s.	
AST (U/L)	31.91 (11.01)	53.18	(48.12) *	48.58	(27.03) *	<b>0.048</b>		<b>0.004</b>		n.s.	
ALT (U/L)	32.47 (11.79)	48.83	(29.71) *	48.11	(27.31) *	<b>0.021</b>		<b>0.005</b>		n.s.	
GGT (U/L)	19.94 (10.40)	34.38	(23.45) *	38.01	(24.90) *	<b>0.013</b>		<b>0.025</b>		n.s.	
FA (U/L)	65.35 (18.92)	68.33	(19.24)	75.26	(22.62)	n.s.		n.s.		n.s.	

Media (desviación estándar). V p<sup>1</sup>: Comparación entre el subgrupo con hígado normal y el subgrupo con esteatosis simple. V p<sup>2</sup>: Comparación entre el subgrupo con hígado normal y el subgrupo con esteatohepatitis no alcohólica. V p<sup>3</sup>: Comparación entre el subgrupo de esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica. \* Diferencias significativas p<0.05.

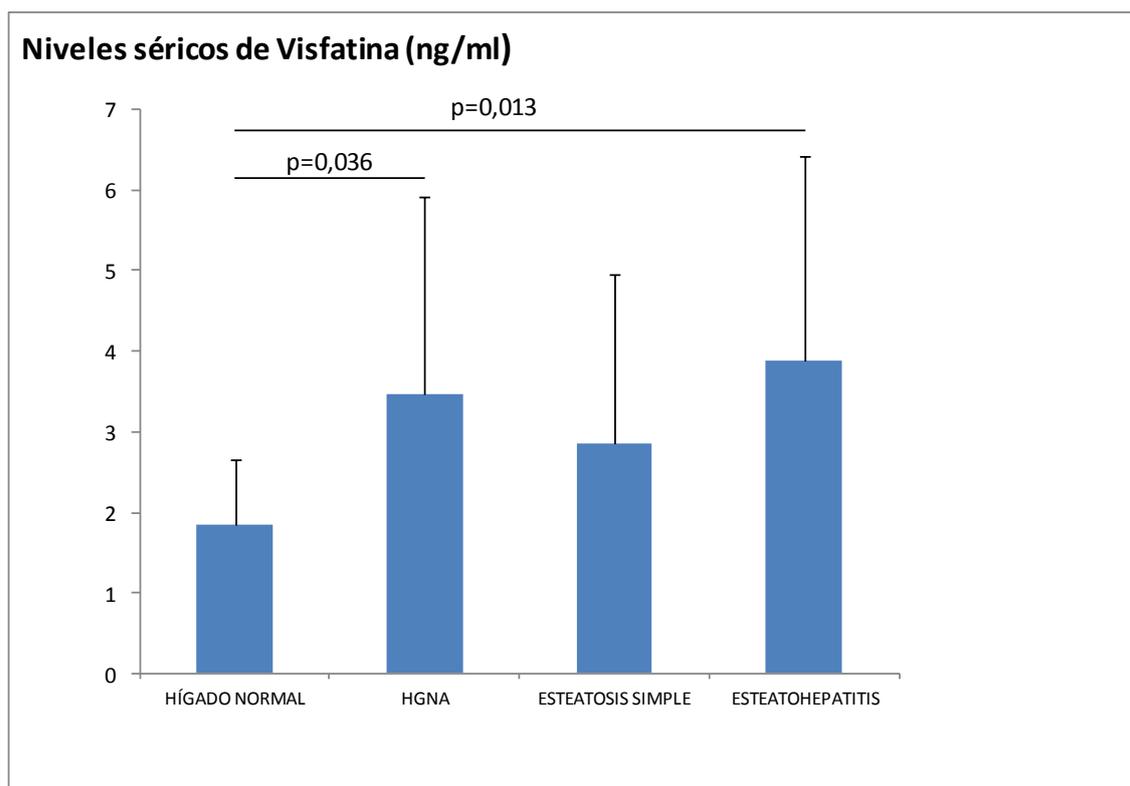
El análisis basal de las adipocitoquinas estudiadas comparando los 3 subgrupos se muestra en la **Tabla R4.2**. En él se observa como los niveles circulantes de Visfatina están significativamente elevados únicamente en el subgrupo de mujeres con OM que presentan una histología hepática compatible con EHNA en comparación con las que presentan una histología hepática normal (**Figura R4**). También, observamos como los niveles circulantes de RBP4 están significativamente aumentados tanto en el subgrupo de ES como en el de EHNA, respecto al subgrupo de mujeres con OM con histología hepática normal. No se observan diferencias entre los 3 subgrupos en los niveles circulantes de Adiponectina, Lipocalina 2, Resistina, TNFR2, IL-6 y PCR.

En este apartado creemos de interés resaltar **la ausencia de diferencias significativas entre los niveles circulantes de Visfatina de las mujeres no obesas pertenecientes al grupo control y las mujeres con OM con una histología hepática normal** [Niveles Visfatina del grupo control vs OM con histología hepática normal: 1.43 (DE=0.89) vs 1.85 (DE=0.81); p= n.s.].

**Tabla R4.2. Niveles circulantes de adipocitoquinas en la obesidad mórbida en función de la histología hepática.**

OBESIDAD MÓRBIDA										
	HÍGADO NORMAL (n=18)		ESTEATOSIS SIMPLE (n=24)		ESTEATOHEPATITIS (n=44)		V p <sup>1</sup>	V p <sup>2</sup>	V p <sup>3</sup>	
VISFATINA (ng/mL)	1.85	(0.81)	2.86	(2.10)	3.88	(2.55)	*	n.s.	<b>0.013</b>	n.s.
ADIPONECTINA (µg/mL)	7.99	(2.55)	6.32	(3.92)	6.98	(2.49)		n.s.	n.s.	n.s.
LIPOCALINA 2 (ng/mL)	94.7	(28.13)	68.1	(17.83)	71.7	(31.68)		n.s.	n.s.	n.s.
RBP-4 (mg/dL)	2.53	(0.49)	4.06	(1.90)	3.68	(2.41)	*	<b>0.030</b>	<b>0.048</b>	n.s.
RESISTINA (ng/mL)	4.52	(1.82)	4.45	(2.02)	4.26	(1.37)		n.s.	n.s.	n.s.
TNFR2 (ng/mL)	4.02	(1.63)	5.69	(2.72)	5.56	(1.68)		n.s.	n.s.	n.s.
IL-6 (pg/mL)	2.45	(1.41)	3.37	(2.85)	3.16	(1.97)		n.s.	n.s.	n.s.
PCR (mg/dL)	0.67	(0.49)	1.02	(0.84)	1.26	(1.00)		n.s.	n.s.	n.s.

Media (desviación estándar). V p<sup>1</sup>: Comparación entre el subgrupo con hígado normal y el subgrupo con esteatosis simple. V p<sup>2</sup>: Comparación entre el subgrupo con hígado normal y el subgrupo con esteatohepatitis no alcohólica. V p<sup>3</sup>: Comparación entre el subgrupo de esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica. \* Diferencias significativas p<0.05.



**Figura R4. Niveles séricos de Visfatina en mujeres con obesidad mórbida en relación con la presencia de HGNA.**

## 5. Niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2

Se estudiaron los niveles circulantes de Visfatina en el grupo de mujeres con OM y su relación con la presencia de HGNA y su tipo histológico (ES o EHNA), dividiendo a las pacientes en función de la presencia o ausencia de DM2 (**Tabla R5.1**). Se encontró un aumento significativo del valor de las transaminasas (AST, ALT, GGT y FA) en las mujeres diabéticas que presentaban histología de EHNA.

El 100% de las pacientes con DM2 presentaron una histología hepática compatible con una HGNA (44,8% una ES y 55,2% una EHNA). En las pacientes con OM no diabéticas presentaban una HGNA el 68,4%, aunque hasta en un 71,8% era del tipo EHNA.

**Tabla R5.1.** Características del grupo de obesas mórbidas de acuerdo con el tipo histológico de HGNA y la presencia o ausencia de DM2.

	ESTEATOSIS SIMPLE				V p <sup>1</sup>	ESTEATOHEPATITIS				V p <sup>2</sup>
	No DM2 (n=11)		DM2 (n=13)			No DM2 (n=28)		DM2 (n=16)		
EDAD (años)	46.18	(13.34)	47.31	(7.20)	n.s.	47.50	(11.69)	47.63	(10.37)	n.s.
PESO (kg)	128.91	(20.27)	119.00	(10.84)	n.s.	119.71	(10.88)	127.99	(25.90)	n.s.
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	51.36	(10.33)	45.16	(4.45)	n.s.	46.67	(3.62)	50.00	(7.79)	n.s.
PC (cm)	124.67	(9.02)	125.67	(6.02)	n.s.	131.97	(8.23)	133.40	(16.43)	n.s.
TAs (mm Hg)	138.36	(18.01)	137.69	(11.11)	n.s.	134.96	(18.64)	131.50	(36.46)	n.s.
TAd (mm Hg)	81.27	(13.12)	72.54	(9.92)	n.s.	78.88	(14.47)	79.17	(22.74)	n.s.
GLUCOSA (mg/dL)	95.95	(7.91)	155.77	(40.61)	* <b>&lt;0.001</b>	98.50	(9.64)	158.71	(42.79)	* <b>&lt;0.001</b>
INSULIN EMIA(mU/L)	19.78	(9.45)	14.85	(8.98)	n.s.	19.07	(10.64)	24.91	(35.04)	n.s.
HbA1c (%)	5.04	(0.42)	7.03	(2.03)	* <b>0.011</b>	5.13	(0.48)	7.88	(1.97)	* <b>&lt;0.001</b>
HOMA2IR	2.53	(1.20)	2.14	(1.23)	n.s.	2.28	(0.92)	3.59	(4.47)	n.s.
HDL-C (mg/dL)	42.67	(12.30)	36.61	(7.78)	n.s.	42.18	(8.82)	39.58	(6.68)	n.s.
TRIGLIC (mg/dL)	144.49	(46.64)	195.96	(87.12)	n.s.	157.25	(80.12)	180.50	(59.90)	n.s.
AST (U/L)	36.70	(21.26)	66.92	(60.36)	n.s.	40.70	(15.57)	66.70	(38.51)	* <b>0.049</b>
ALT (U/L)	44.00	(26.81)	52.54	(32.29)	n.s.	39.24	(16.74)	68.27	(35.97)	* <b>0.025</b>
GGT (U/L)	39.45	(29.55)	30.08	(14.85)	n.s.	21.08	(15.50)	73.28	(63.76)	* <b>0.017</b>
FA (U/L)	74.73	(22.24)	62.92	(14.01)	n.s.	69.04	(15.85)	86.87	(28.79)	* <b>0.039</b>

Media (desviación estándar). V p<sup>1</sup>: Comparación entre no DM2 y DM2 en esteatosis simple. V p<sup>2</sup>: Comparación entre no DM2 y DM2 en esteatohepatitis no alcohólica. Diferencias significativas p <0.05.

El resultado del análisis de las adipocitoquinas estudiadas en este apartado se muestra en la **Tabla R5.2**. En él se observa como los niveles circulantes de Visfatina están significativamente elevados únicamente en el subgrupo de mujeres con OM no

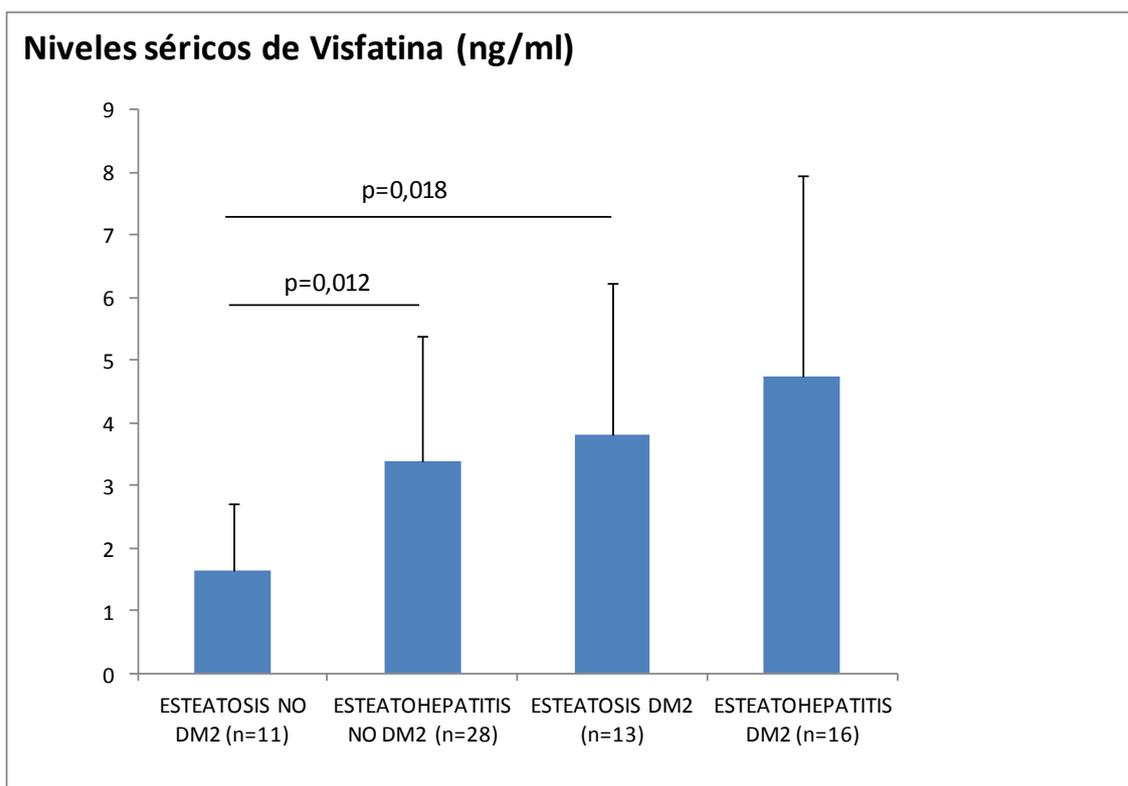
diabéticas que presentan una histología hepática compatible con EHNA en comparación con las que presentan una histología hepática de ES (**Figura R5**). En la cohorte de mujeres diabéticas, aunque los niveles de Visfatina circulantes eran más elevados en la EHNA, estos no eran significativamente mayores que los encontrados en las pacientes con ES. En la **Figura R5**, también se muestra como los niveles de Visfatina son significativamente superiores en las pacientes con ES diabéticas respecto a las no diabéticas.

En el resto de adipocitoquinas estudiadas no se encontraron diferencias de interés al comparar la presencia de HGNA (ES o EHNA) en función de la presencia o no de DM2.

**Tabla R5.2.** Niveles circulantes de adipocitoquinas en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA en normoglucémicos y en DM2.

	NO DIABETES 2				V p <sup>1</sup>	DIABETES 2				V p <sup>2</sup>	
	ESTEATOSIS SIMPLE (n=11)		ESTEATOHEPATITIS (n=28)			ESTEATOSIS SIMPLE (n=13)		ESTEATOHEPATITIS (n=16)			
VISFATINA (ng/ml)	1.63	(1.09)	3.39	(1.99)	*	0.012	3.80	(2.43)	4.75	(3.19)	n.s.
ADIPONECTINA (µg/mL)	7.74	(4.62)	7.49	(2.41)	n.s.	n.s.	4.75	(2.30)	5.89	(2.46)	n.s.
LIPOCALINA 2 (ng/mL)	71.03	(19.97)	75.52	(34.97)	n.s.	n.s.	64.82	(15.62)	63.43	(23.31)	n.s.
RBP-4 (mg/dL)	3.56	(1.00)	3.75	(2.90)	n.s.	n.s.	4.61	(2.58)	3.53	(0.78)	n.s.
RESISTINA (ng/mL)	4.92	(2.24)	4.41	(1.56)	n.s.	n.s.	3.93	(1.71)	3.96	(0.88)	n.s.
TNFR2 (ng/mL)	6.42	(2.62)	5.14	(1.60)	n.s.	n.s.	4.90	(2.75)	6.45	(1.57)	n.s.
IL-6 (pg/mL)	2.66	(1.27)	2.99	(1.77)	n.s.	n.s.	4.16	(3.89)	3.50	(2.46)	n.s.
PCR (mg/dL)	0.75	(0.46)	1.23	(1.03)	n.s.	n.s.	1.05	(1.03)	1.58	(0.90)	n.s.

Media (desviación estándar). V p<sup>1</sup>: Comparación entre esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica en pacientes no DM2. V p<sup>2</sup>: Comparación entre esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica en pacientes con DM2. Diferencias significativas p < 0.05.



**Figura R5.** Niveles séricos de visfatina en la obesidad mórbida en relación con el tipo histológico de HGNA en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2.

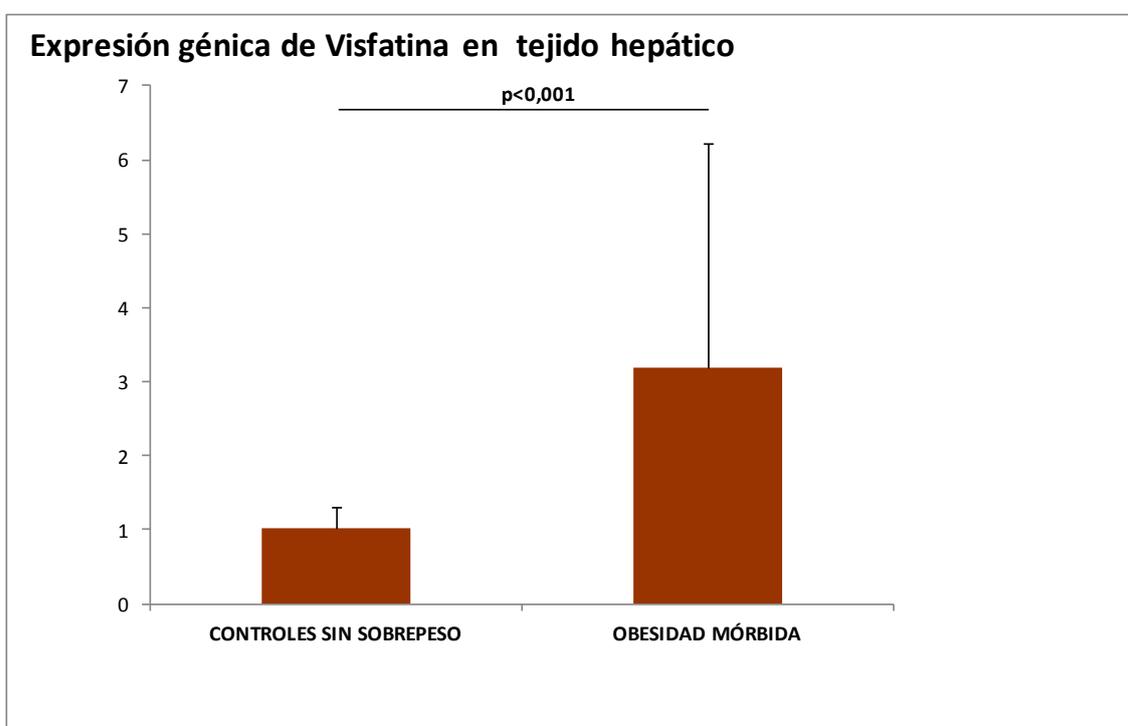
## 6. Influencia de la HGNA y la presencia de diabetes mellitus tipo 2 sobre los niveles séricos de Visfatina en la obesidad mórbida

Los resultados presentados hasta ahora demuestran que los niveles circulantes de Visfatina están significativamente aumentados en las mujeres con OM, y que el aumento de dichos niveles circulantes guarda relación con la presencia de DM2 y/o la existencia de una HGNA.

Se practicó el test ANOVA two-way en el grupo de mujeres con OM para determinar el efecto conjunto de la histología hepática (HN, ES o EHNA) y la presencia o ausencia de DM2 sobre los niveles circulantes de Visfatina. La variable dependiente, niveles circulantes de Visfatina, presentaba una distribución normal para los grupos formados por las dos variables independientes. Los resultados mostraron que la histología hepática era el único factor con un efecto significativo sobre los niveles circulantes de Visfatina [ $F(2,80)=4.056$ ,  $p=0.021$ ]. En cambio el efecto de la presencia de DM2 no era estadísticamente significativo [ $F(2,80)=3.912$ ,  $p=0.052$ ]. Además, tampoco se produjo interacción estadísticamente significativa al asociar los dos cofactores frente a los niveles circulantes de Visfatina [ $F(2,80)=0.076$ ,  $p=0.927$ ].

## 7. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en normopeso y en la obesidad mórbida

En una segunda parte del trabajo se estudio la expresión génica de Visfatina en tejido hepático, comparando el grupo control de individuos normopeso (n=5) con el grupo de mujeres con OM (n=58). Los resultados se representan en la **Figura R7**, muestran un aumento significativo de la expresión génica hepática de Visfatina en las mujeres con OM respecto al grupo de mujeres control. [OM:3.19 (DE=3.04) vs Control: 1.03 (DE=0.27),  $p < 0.001$ ].

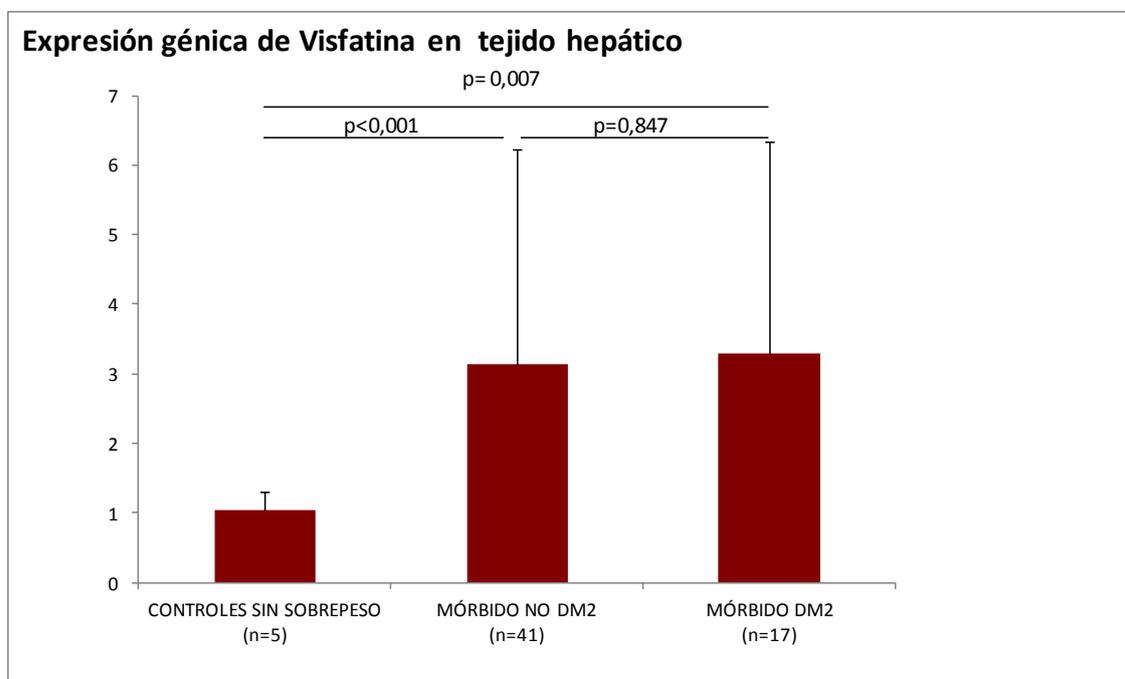


**Figura R7.** Expresión relativa de mRNA de Visfatina en tejido hepático. Controles sin sobrepeso=1.03 (DE=0.27), n=5; Grupo de mujeres con obesidad mórbida=3.19 (DE=3,04), n=58.

## 8. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en la obesidad mórbida en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2

Al estudiar la expresión génica en tejido hepático de Visfatina en el grupo de mujeres con OM en función de la presencia o no de DM2, los resultados mostraban que no existían diferencias entre ambos subgrupos, y se constató que ambos subgrupos tenían una expresión génica significativamente aumentada respecto al grupo de mujeres con

normopeso. [Control delgado=1.03±0.27; Grupo obesas mórbidas: NO DM2= 3.14 (DE=3.08), DM2= 3.29 (DE=3.06) (**Figura R8**).



**Figura R8.** Expresión mRNA de visfatina en tejido hepático. Control delgado=1.03 (DE=0.27), Grupo obesas mórbidas: NO DM2=3.14 (DE=3.08), DM2=3.29 (DE=3.06).

## 9. Relación de la expresión génica en tejido hepático de Visfatina con variables bioquímicas y metabólicas en la obesidad mórbida

El análisis de la expresión génica de Visfatina en tejido hepático en el grupo de mujeres con OM en relación con los diferentes parámetros bioquímicos y metabólicos determinados, mostró la existencia de una correlación positiva de la expresión génica de Visfatina con la insulinemia basal ( $r=0.428$ ,  $p=0.003$ ) y el HOMA2-IR ( $r=0.415$ ,  $p=0.005$ ) (**Tabla R9**). En cambio, la expresión de Visfatina en tejido hepático no mostró correlación con los niveles de glucemia basal, HbA1c, HDL-C, TG o con las transaminasas (AST, ALT, GGT, FA).

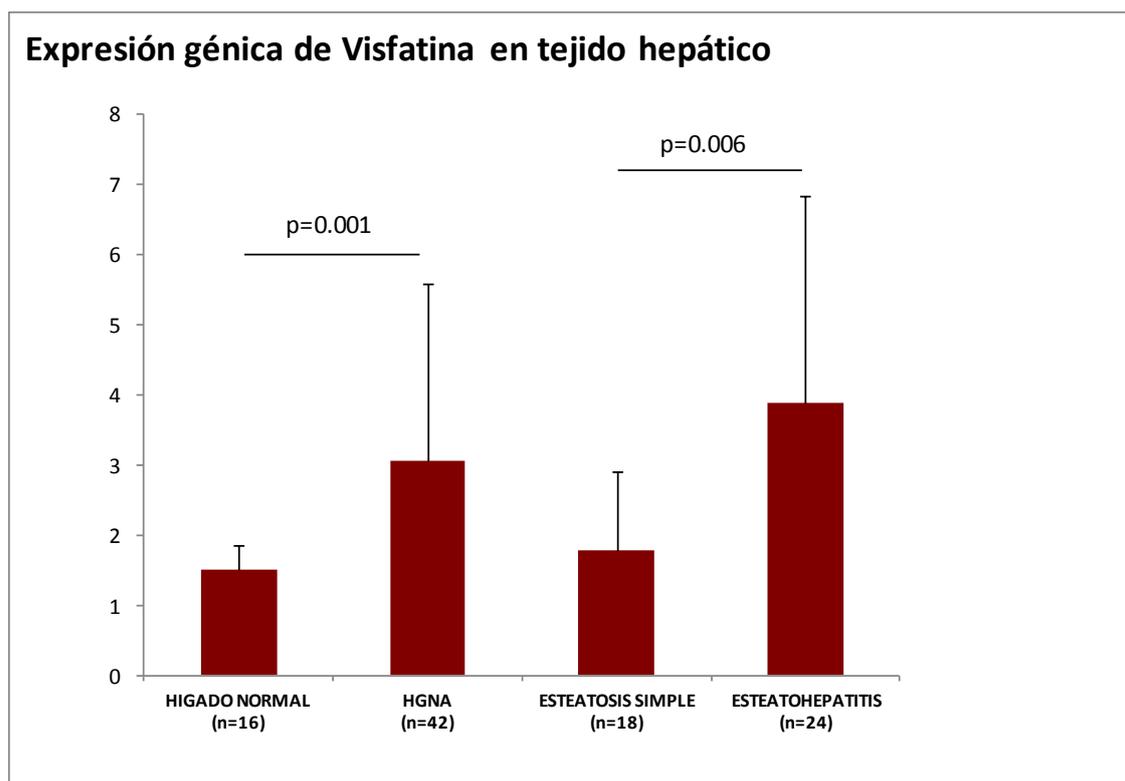
**Tabla R9.** Correlación entre la expresión génica de Visfatina en tejido hepático con las variables bioquímicas y metabólicas.

Parámetros Generales	Expresión génica hepática (n=58)	
	R	Valor p
IMC	-0.130	n.s.
PC (cm)	-0.052	n.s.
GLUCOSA (mg/dL)	0.066	n.s.
INSULINA(mU/L)	0.428	<b>0.003</b>
HbA1c (%)	0.079	n.s.
HOMA2-IR	0.415	<b>0.005</b>
HDL-C (mg/dL)	-0.030	n.s.
TRIGLICERIDOS (mg/dL)	0.059	n.s.
AST (U/L)	-0.068	n.s.
ALT (U/L)	-0.019	n.s.
GGT (U/L)	0.013	n.s.
FA(U/L)	-0.212	n.s.

Test de correlación de Pearson. Correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 10. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en la obesidad mórbida en relación con la presencia y tipo histológico de HGNA

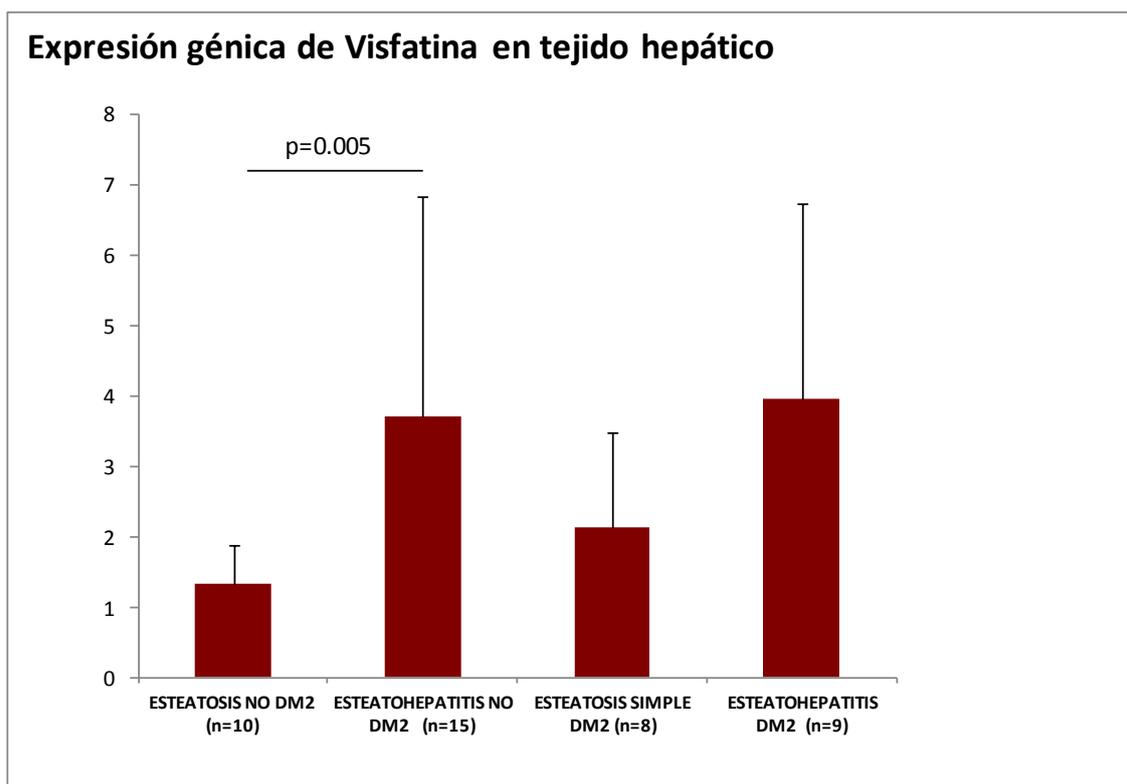
Al estudiar la expresión génica de Visfatina en tejido hepático en función de la presencia de HGNA, los resultados fueron los siguientes: La expresión hepática de Visfatina está significativamente aumentada en el grupo de mujeres con OM y HGNA, en comparación con el de las mujeres con OM cuya histología hepática era normal [HN: 1.50 (DE=0.35); HGNA: 3.05 (DE=2.53),  $p=0.001$ ]. Al subclasificar las pacientes con HGNA en ES vs EHNA, la expresión hepática de Visfatina era significativamente mayor en la EHNA respecto a la ES [ES: 1.77 (DE=1.14); EHNA: 3.88 (DE=2.95);  $p=0.006$ ] (**Figura R10**).



**Figura R10.** Expresión de Visfatina en tejido hepático en la obesidad mórbida en relación con la presencia de HGNA y su tipo histológico. Hígado normal: 1.50 (DE=0.35) vs HGNA: 3.05 (DE=2.53),  $p=0.001$ ; Esteatosis hepática: 1.77 (DE=1.14) vs Esteatohepatitis no alcohólica: 3.88 (DE=2.95),  $p=0.006$ .

## 11. Expresión génica de Visfatina en el tejido hepático en la obesidad mórbida en relación con el tipo histológico de HGNA en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2

Estudiamos también la expresión hepática de Visfatina en el grupo de pacientes con OM de acuerdo con el tipo de HGNA desarrollado (ES o EHNA) y la presencia o ausencia de DM2 (**Figura R11**). La expresión hepática de Visfatina en las pacientes no diabéticas era significativamente mayor en las que presentaban criterios histológicos de EHNA que las que los tenían de ES [ES: 1.32 (0.57) vs EHNA: 3.71 (3.12);  $p=0.005$ ]. En cambio, en la mujeres que tenían diabetes, la expresión hepática de Visfatina fue similar en ES y en EHNA [ES: 2.1 (1.37) vs EHNA: 3.96 (2.76);  $p=n.s.$ ].

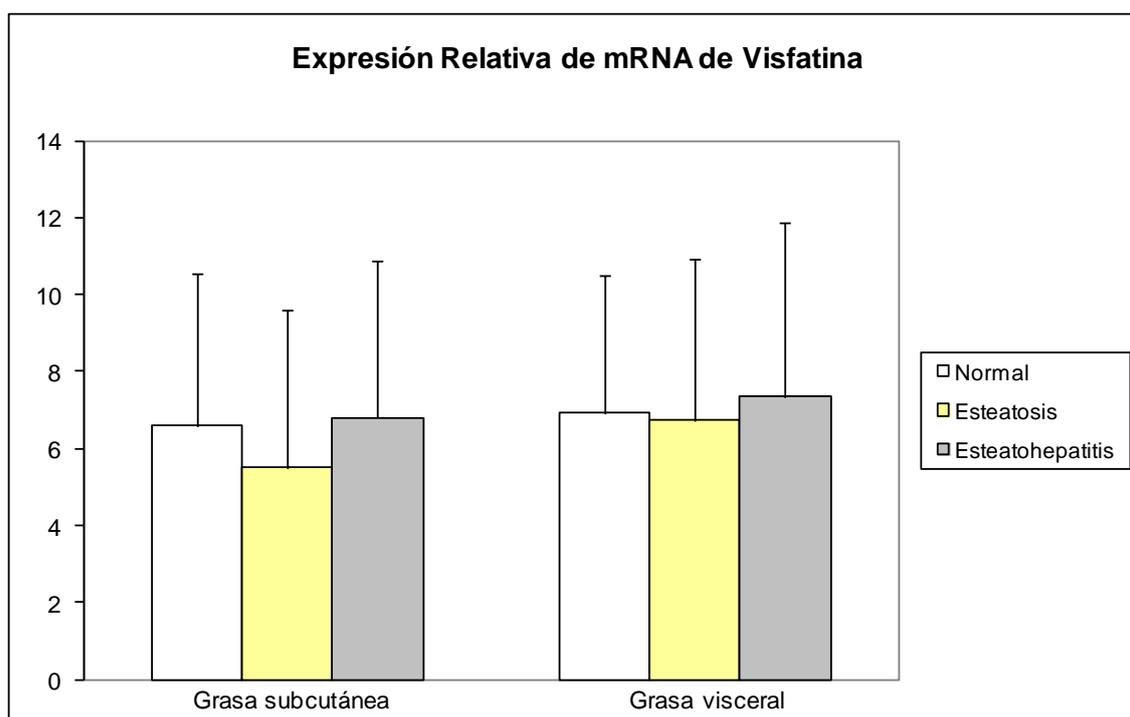


**Figura R11.** Expresión de Visfatina en tejido hepático en la obesidad mórbida en relación con la presencia de HGNA en normoglucémicas y en diabéticas tipo 2. No DM2: ES: 1.32 (0.57) vs EHNA: 3.71 (3.12),  $p=0.005$ ; DM2: ES: 2.12 (1.37) vs EHNA: 3.96 (2.76),  $p=n.s.$

## 12. Expresión génica de Visfatina en el tejido adiposo subcutáneo y visceral en la obesidad mórbida en relación con el tipo histológico de HGNA

Se valoraron los niveles de expresión génica de Visfatina en el tejido adiposo subcutáneo y visceral en la cohorte de pacientes con OM, subclasificando las pacientes en función de la histología hepática. La expresión de Visfatina en ambos tejidos adiposos era similar y sus niveles eran independientes de la histología hepática [Grasa subcutánea: HN=6.59 (3.95), ES=5.49 (4.10), EHNA=6.80 (4.06); Grasa visceral: HN=6.92 (3.58), ES=6.73 (4.18), EHNA=7.35 (4.53)] (**Figura R12**).

Comparamos, también en la cohorte de OM, la expresión relativa de Visfatina a nivel de los tres tejidos estudiados y constatamos que la expresión hepática era casi unas tres veces inferior a la de los dos tejidos adiposos [Grasa subcutánea=0.042 (0.026), Grasa visceral= 0.035 (0.030), Hígado=0.014 (0.013)].



**Figura R12.** Expresión génica de Visfatina en tejido adiposo subcutáneo y visceral en la obesidad mórbida en relación con el tipo histológico de HGNA. [Grasa subcutánea: Hígado normal=6.59 (3.95), ES=5.49 (4.10), EHNA=6.80 (4.06) p=ns; Grasa visceral: Hígado normal=6.92 (3.58), ES=6.73 (4.18), EHNA=7.35 (4.53), p=ns].

### 13. Influencia de la HGNA y de la presencia de diabetes mellitus tipo 2 sobre la expresión génica hepática de Visfatina en la obesidad mórbida

Los resultados sobre la expresión génica de Visfatina en tejido hepático expuestos hasta el momento muestran un aumento de su expresión en las pacientes con OM. Este aumento de la expresión génica de Visfatina se produce en las pacientes con HGNA y, de forma significada, en las que presentan EHNA. En cambio, en la OM con histología hepática normal no se produce aumento de la expresión hepática de Visfatina. En este caso no parece que la presencia de diabetes influya en la expresión en el tejido hepático de Visfatina.

Se practicó el test ANOVA two-way sobre el grupo de mujeres con OM para determinar el efecto conjunto de la histología hepática (HN, ES o EHNA) y la presencia o ausencia de DM2 sobre la expresión génica de Visfatina en el tejido hepático. Los resultados mostraron que la histología hepática era el único factor con un efecto significativo sobre la expresión génica hepática de Visfatina [F(2,53)=5.575, **p=0.024**]. En cambio, el

efecto de la presencia de DM2 no era estadísticamente significativo [F (2,53)=0.495, p=0.486)]. Tampoco se produjo interacción estadísticamente significativa al asociar los dos cofactores frente a la expresión en tejido hepático de Visfatina [F (2,53)=0.587, p=0.449)].

#### 14. Relación de los niveles circulantes y la expresión génica en tejido hepático de Visfatina con el grado de esteatosis y esteatohepatitis en la obesidad mórbida

En la cohorte de mujeres con OM, los niveles circulantes de Visfatina ( $r=0.229$ ,  $p=0.027$ ) y su expresión en tejido hepático ( $r=0.609$ ,  $p<0.001$ ) correlacionaban con el grado de EHNA y no con el grado de ES. Aplicando el test de correlación Ro de Spearman para variables no paramétricas, este mismo patrón se repetía al analizar las mujeres con OM no diabéticas en las que los niveles circulantes de Visfatina ( $r=0.354$ ,  $p=0.004$ ) y la expresión génica en tejido hepático ( $r=0.629$ ,  $p<0.001$ ) correlacionaban significativamente con el grado de EHNA, mientras que no mostraban correlación con el grado de ES (niveles circulantes:  $r=0.214$ ,  $p=0.095$ ; expresión génica:  $r=-0.222$ ,  $p=0.192$ ). En cambio, en las mujeres con OM diabéticas, no se encontró correlación entre los niveles circulantes y su expresión génica hepática, ni con el grado de ES (niveles circulantes:  $r=-0.030$ ,  $p=0.878$ ; expresión génica:  $r=0.278$ ,  $p=0.296$ ), ni con el grado de EHNA (niveles circulantes:  $r=0.151$ ,  $p=0.444$ ; expresión génica  $r=0.452$ ,  $p=0.079$ ).

#### 15. Valoración del efecto de Visfatina sobre la presencia de esteatohepatitis no alcohólica

Evaluamos el efecto que los niveles circulantes de Visfatina tienen en la presencia a nivel hepático de EHNA, comparándolo con el de algunas de las variables metabólicas en la globalidad de la cohorte de mujeres con OM y usando un análisis multivariante de regresión logística. Las variables introducidas en el primer paso fueron: Visfatina, glucosa basal, insulinemia basal, IMC, TG, HDL-C y ALT. La categoría de referencia fue la ausencia de EHNA. Los resultados del análisis multivariante indicaron que, entre todas las variables incluidas en el modelo, Visfatina era la única y la que mayor efecto tenía en la variabilidad de la presencia de ENHA (**Tabla R15.1**). Sin embargo, este efecto no llegaba a ser estadísticamente significativo en la aplicación del último paso de la regresión logística (B=1.208, CI 95% 0.975-1.497,  $p=0.084$ ).

**Tabla R15.1** Efecto de Visfatina sobre la presencia de EHNA en comparación con variables metabólicas.

		Exp(B)	95,0% C.I.for	EXP(B)	Valor p
<b>PASO 1</b>	VISFATINA	1.335	1.010	1.764	<b>0.042</b>
	GLUCOSA	0.994	0.976	1.012	n.s.
	INSULINA	1.027	0.986	1.070	n.s.
	IMC	0.980	0.896	1.072	n.s.
	TRIGLICERIDOS	1.000	0.992	1.008	n.s.
	HDL-C	1.033	0.960	1.111	n.s.
	ALT	0.996	0.945	1.049	n.s.
<b>PASO 2</b>	VISFATINA	1.335	1.013	1.761	<b>0.040</b>
	GLUCOSA	0.994	0.976	1.012	n.s.
	INSULINA	1.027	0.986	1.070	n.s.
	IMC	0.980	0.896	1.072	n.s.
	HDL-C	1.033	0.961	1.110	n.s.
	ALT	0.996	0.945	1.049	n.s.
<b>PASO 3</b>	VISFATINA	1.347	1.039	1.746	<b>0.025</b>
	GLUCOSA	0.994	0.976	1.011	n.s.
	INSULINA	1.027	0.986	1.070	n.s.
	IMC	0.980	0.896	1.072	n.s.
	HDL-C	1.034	0.967	1.107	n.s.
<b>PASO 4</b>	VISFATINA	1.338	1.035	1.731	<b>0.026</b>
	GLUCOSA	0.994	0.977	1.012	n.s.
	INSULINA	1.029	0.986	1.073	n.s.
	HDL-C	1.037	0.971	1.109	n.s.
<b>PASO 5</b>	VISFATINA	1.315	1.026	1.686	<b>0.030</b>
	INSULINA	1.027	0.983	1.074	n.s.
	HDL-C	1.039	0.972	1.110	n.s.
<b>PASO 6</b>	VISFATINA	1.255	1.001	1.574	<b>0.049</b>
	INSULINA	1.024	0.983	1.068	n.s.
<b>PASO 7</b>	VISFATINA	1.208	.975	1.497	0.084

Variables introducidas en el paso 1: Visfatina, Glucosa, Insulina, IMC, Triglicéridos, HDL-C y ALT.

Finalmente, evaluamos el efecto que los niveles circulantes de Visfatina tienen en la presencia a nivel hepático de EHNA, comparándolo con el de otras adipocitoquinas en la cohorte de mujeres obesas no diabéticas. Las variables introducidas en el primer paso fueron: Visfatina, Adiponectina, Resistina, Lipocalina 2, RBP4, IL-6 y TNFR2. La categoría de referencia fue la ausencia de EHNA. Los resultados del análisis multivariado de regresión logística indicaron que, entre todas las adipocitoquinas incluidas en el modelo (**Tabla R15.2**), Visfatina era la única que tenía un efecto sobre la

variabilidad de EHNA y dicho efecto era estadísticamente significativo ( $B=3.010$ , CI 95% 1.203-7.531,  $p=0.019$ ). Este modelo explicaba un 34% de la variabilidad de la EHNA (Nagelkerke R Square=0.338).

**Tabla R15.2** Efecto de Visfatina sobre la variabilidad de la presencia de EHNA en comparación con otras adipocitoquinas.

		Exp(B)	95,0% C.I.for	EXP(B)	Valor p
<b>PASO 1</b>	VISFATINA	2.931	1.111	7.729	<b>0.030</b>
	ADIPONECTINA	1.000	1.000	1.000	n.s.
	RESISTINA	0.848	0.511	1.409	n.s.
	LIPOCALINA 2	1.006	0.975	1.038	n.s.
	IL-6	1.101	0.599	2.024	n.s.
	RBP4	1.131	0.660	1.939	n.s.
	TNFR2	0.993	0.636	1.548	n.s.
<b>PASO 2</b>	VISFATINA	2.933	1.114	7.720	<b>0.029</b>
	ADIPONECTINA	1.000	1.000	1.000	n.s.
	RESISTINA	0.847	0.514	1.396	n.s.
	LIPOCALINA 2	1.006	0.976	1.038	n.s.
	IL-6	1.101	0.598	2.025	n.s.
	RBP4	1.132	0.661	1.936	n.s.
<b>PASO 3</b>	VISFATINA	2.987	1.149	7.766	<b>0.025</b>
	ADIPONECTINA	1.000	1.000	1.000	n.s.
	RESISTINA	0.849	0.517	1.394	n.s.
	LIPOCALINA 2	1.007	0.977	1.039	n.s.
	RBP4	1.136	0.670	1.928	n.s.
<b>PASO 4</b>	VISFATINA	3.078	1.181	8.026	<b>0.021</b>
	ADIPONECTINA	1.000	1.000	1.000	n.s.
	RESISTINA	0.855	0.518	1.411	n.s.
	RBP4	1.120	0.659	1.905	n.s.
<b>PASO 5</b>	VISFATINA	3.187	1.205	8.433	<b>0.020</b>
	ADIPONECTINA	1.000	1.000	1.000	n.s.
	RESISTINA	0.830	0.508	1.357	n.s.
<b>PASO 6</b>	VISFATINA	3.213	1.206	8.558	<b>0.020</b>
	RESISTINA	.842	.520	1.364	n.s.
<b>PASO 7</b>	VISFATINA	3.010	1.203	7.531	<b>0.019</b>

*Variables introducidas en el paso 1: Visfatina, Adiponectina, Resistina, Lipocalina 2, IL-6, RBP4 y TNFR2*

## 16. Evaluación de los niveles circulantes de Visfatina como biomarcador de HGNA y esteatohepatitis no alcohólica

Se evaluó el grado de eficacia diagnóstica de los niveles circulantes de Visfatina al utilizarlos como biomarcador de HGNA y EHNA en la cohorte general de pacientes con OM y en la subcohorte de pacientes con OM no diabéticas (**Tabla R16**), ambas cohortes incluían pacientes con histología hepática normal, ES y EHNA.

Para el diagnóstico de HGNA y valorando la cohorte general de pacientes con OM se obtuvo un nivel óptimo de corte para Visfatina de 2,42 ng/ml con un área bajo la curva (AUC) de 0,72, con una sensibilidad del 61% y una especificidad del 80%. En el subgrupo de OM no diabéticas el nivel óptimo de corte de Visfatina fue de 2,43 ng/ml con una AUC de 0,72, con una sensibilidad y especificidad del 53% y del 93%, respectivamente.

Para el diagnóstico de EHNA, Visfatina tuvo una AUC de 0,70, con una sensibilidad del 71% y una especificidad del 64% para un nivel circulante de 2,31 ng/ml al valorar la cohorte general. En la población no diabética, la AUC fue del 0,79, con una sensibilidad del 64% y una especificidad del 84% para un nivel circulante de Visfatina de 2,43 ng/ml. El valor predictivo negativo (VPN) tanto para la cohorte general como para la población no diabética era del 91%.

**Tabla R16.** Niveles circulantes de Visfatina como biomarcador de HGNA y EHNA.

Visfatina circulante	AUROC (CI 95%)	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR +	LR -
HGNA Cohorte completa	0.72 (0.608-0.838)	0,78	88	7	69	19	0,94	1,8
		3,46	39	93	93	40	5,91	0,6
		(Youden)	2,42	61	80	91	49	4,55
NO Diabéticas	0.72 (0.58-0.856)	0,78	90	7	69	23	0,96	1,5
		2,43	53	93	95	46	7,37	0,5
		(Youden)	2,43	53	93	95	46	7,37
EHNA Cohorte completa	0.70 (0.586-0.819)	1,58	91	39	25	95	1,49	0,2
		4,6	27	89	36	84	2,45	0,8
		(Youden)	2,31	71	64	31	91	1,95
NO Diabéticas	0.79 (0.661-0.911)	1,62	89	48	28	95	1,72	0,2
		3,33	43	88	45	87	3,57	0,6
		(Youden)	2,43	64	84	48	91	4,02



# V. DISCUSIÓN



## V. DISCUSIÓN

Los conocimientos actuales sobre la existencia de PBEF/Nampt/Visfatina se remontan a finales del siglo XX<sup>146</sup>, pero no es hasta iniciado ya el presente siglo XXI en que investigadores japoneses<sup>148</sup> le dan un verdadero protagonismo a esta molécula al postular que podría poseer propiedades insulíniméticas. Estos investigadores deciden bautizar a esta proteína con el nombre de Visfatina al pensar que su principal fuente de producción estaba localizada a nivel del tejido graso visceral. Posteriormente, las propiedades insulíniméticas de Visfatina no han podido ser confirmadas por otros científicos<sup>149,150</sup>, pero lo que sí se ha conservado es el nombre de Visfatina que nos recuerda su origen en la “visceral fat”.

En el presente estudio se han valorado los niveles circulantes y la expresión génica en el tejido hepático, el tejido adiposo subcutáneo y visceral de Visfatina en un grupo homogéneo de mujeres con OM, y su relación con el desarrollo de la HGNA. Además, se ha evaluado las interacciones de Visfatina con otras adipocitoquinas potencialmente implicadas en el desarrollo de la HGNA y de su forma progresiva la EHNA.

Es importante comentar que el estudio se centró en un grupo de pacientes con obesidad extrema, lo que determina que el grupo objeto de valoración presenta una importante RI y una elevada presencia de los parámetros que definen el SM. Aplicando los criterios de definición de la ATP III para el SM<sup>79</sup>, el 86% de las mujeres de la cohorte con OM cumplían con la definición de SM (cumplían 3 o más criterios de este síndrome) frente a un 2,5% de las mujeres del grupo control normopesas.

Los resultados iniciales del estudio muestran el aumento significativo en los niveles circulantes de las adipocitoquinas de conocido perfil proinflamatorio: Lipocalina 2<sup>55</sup>, Resistina<sup>56</sup>, TNFR2<sup>61</sup>, IL-6<sup>42</sup>, PCR<sup>71</sup> y Visfatina<sup>171</sup> y la disminución de las adipocitoquinas de perfil antiinflamatorio como es la Adiponectina<sup>37</sup> en el grupo de mujeres con OM al compararlos con el grupo control de mujeres con un IMC normal. Este resultado es acorde con los conocimientos actuales que demuestran que en la obesidad se produce un estado de disfunción del tejido adiposo que conduce a un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, proaterogénicas y prodiabetogénicas, generándose un estado inflamatorio crónico de bajo grado<sup>28,31,37</sup>.

El aumento en la obesidad de los niveles circulantes de Visfatina ya ha sido reportado por diferentes autores en la literatura médica<sup>157,178,185</sup>. En el estudio prospectivo de Haider et al.<sup>185</sup> se determinaron, entre otras adipocitoquinas, los niveles circulantes de Visfatina en un grupo de 31 pacientes (28 mujeres) con OM previamente a la realización de cirugía bariátrica con banda gástrica y seis meses después de la realización de dicha cirugía. Basalmente, en este estudio, se observó que los niveles plasmáticos de Visfatina eran significativamente superiores en las mujeres OM respecto a un grupo control de mujeres delgadas sanas y que la pérdida de peso tras la realización de la cirugía bariátrica producía un descenso en los niveles circulantes de Visfatina. Manco et al.<sup>186</sup> también observaron un descenso en los niveles circulantes de Visfatina en su estudio de diez mujeres con OM que perdían más del 20% de su IMC inicial a los dos años de haber sido sometidas a una cirugía de derivación biliopancreática. En un trabajo más reciente, Moschen et al.<sup>176</sup>, estudiando también un grupo pacientes con OM a los que sometieron a cirugía bariátrica, demostraron el descenso en los niveles circulantes de Visfatina tras la pérdida de peso conseguida seis meses después de la colocación por laparoscopia de una banda gástrica ajustable. Filippatos et al.<sup>187</sup> en su estudio encuentran un incremento en los niveles circulantes de Visfatina en personas con sobrepeso y obesidad que cumplen criterios de SM frente a personas con similares características ponderales que no han desarrollado un SM.

Nuestros resultados mostraban claramente el aumento en los niveles circulantes de Visfatina en la cohorte de mujeres con OM, pero no encontramos correlación entre los niveles circulantes de Visfatina y el IMC. Otros autores, como Berndt et al.<sup>157</sup> en su estudio en 189 personas con grados variables de obesidad (95 varones/94 mujeres), sí encontraron una correlación positiva de los niveles circulantes de Visfatina con el IMC y porcentaje de grasa corporal, pero la correlación no existía con la masa grasa visceral cuando ésta fue calculada mediante el uso de TC. En el estudio de Haider et al.<sup>185</sup>, antes mencionado, se concluía que el IMC, los niveles de insulina y el HOMA eran los factores independientes que mejor predecían los niveles circulantes de Visfatina. En nuestro estudio tampoco se encontró correlación entre los niveles circulantes de Visfatina y los niveles de los parámetros metabólicos estudiados, incluidos los de insulínresistencia (insulinemia basal, HOMA2-IR), ni con los niveles circulantes de Adiponectina, Lipocalina 2, RBP4, Resistina y TNFR2. En cambio, sí se demostró una significativa correlación de los niveles circulantes de Visfatina con las transaminasas (AST, ALT y GGT) y con los niveles circulantes de IL-6 y la PCR.

El aumento de los niveles circulantes de Visfatina en las personas con DM2 que se observa en nuestros resultados, también ha sido observado en estudios previos<sup>174,188,189</sup>. Además, el subgrupo de pacientes con OM y DM2, presentaba unas cifras de transaminasas (ALT, AST y GGT) significativamente aumentadas y clínicamente patológicas en comparación con las del subgrupo con OM no diabético. El resto de adipocitoquinas analizadas, Lipocalina 2, RBP4, Resistina, TNFR2, IL-6 no mostraron diferencias en relación con la presencia de DM2, a excepción de Adiponectina que estaba significativamente disminuida y de la PCR que estaba significativamente aumentada en las mujeres diabéticas. Es difícil encontrar una única razón que permita entender el por qué del aumento de los niveles de Visfatina en la diabetes mellitus. Interesante es el estudio de López-Bermejo y colaboradores<sup>188</sup> donde demuestran que los niveles circulantes de Visfatina están aumentados en la DM2 y en la DM1 de larga evolución, en comparación con los de personas no diabéticas o con una DM2 de reciente diagnóstico. Para estos autores, los niveles circulantes de Visfatina no están determinados por la sensibilidad a la insulina, sino por la capacidad de secreción de insulina de la célula  $\beta$ -pancreática. Así, como conclusión lanzan la hipótesis que relaciona el aumento de los niveles circulantes de Visfatina con el deterioro progresivo de la función  $\beta$ -pancreática que se produce durante el curso evolutivo en el tiempo de la DM2. En el estudio de Retnakaran et al.<sup>189</sup> también encuentran unos niveles circulantes de Visfatina significativamente mayores en las personas con DM2, pero estos autores no encuentran correlación entre los niveles circulantes de Visfatina y los parámetros antropométricos (IMC, PC), los niveles de ALT, el perfil lipídico, la glucemia basal, el HOMA-IR, la función  $\beta$ -pancreática medida mediante el HOMA-B, o los niveles circulantes de Adiponectina. Además, en este estudio los niveles circulantes de Visfatina correlacionan de forma independiente con los niveles circulantes de Resistina. Otros autores han sugerido que Visfatina podría tener una actividad insulínimimética y ello explicaría el aumento de sus niveles circulantes en la DM2, por un mecanismo similar al que en estos pacientes produce el hiperinsulimismo de las fases iniciales de la enfermedad<sup>148,185,190</sup>. Esta actividad insulínimimética no ha podido ser confirmada ni *in vivo* ni *in vitro* por otros investigadores<sup>150</sup>. Lo que sí ha sido demostrado es que Visfatina a nivel de la célula  $\beta$ -pancreática es un factor crítico en la vía biosintética de NAD. La inhibición de la actividad de Visfatina a nivel de la célula  $\beta$ -pancreática se traduce en un déficit en la secreción de la insulina estimulada por la glucosa, sugiriendo

todo ello que la síntesis de NAD mediada por Visfatina es de vital importancia en la regulación de la homeostasis de la glucosa<sup>150</sup>.

En este contexto, decidimos abordar el estudio sobre la posible relación entre Visfatina y la manifestación hepática del SM, la HGNA. Existen en la literatura médica diversos trabajos que relacionan los niveles circulantes de Visfatina y la inflamación hepática. En este sentido, es interesante un reciente estudio polaco que analizó los niveles circulantes de Visfatina en un grupo de pacientes con hepatitis C crónica sin sobrepeso, ni DM2, demostrando que estaban significativamente aumentados en estos pacientes con hepatitis crónica al compararlos con individuos sanos sin hepatitis<sup>179</sup>. En sus conclusiones, los autores sugieren que Visfatina podría jugar un papel clave en la regulación del proceso inflamatorio hepático. Muy recientemente, Moschen y colaboradores<sup>191</sup> han publicado un estudio donde relacionan a Visfatina con la inflamación hepática, tanto aguda como crónica. Estudiaron 83 pacientes con cirrosis hepática de diferentes etiologías (alcohólica, vírica, idiopática) y observaron un aumento significativo de los niveles circulantes y de la expresión hepática de Visfatina en estos pacientes, comparándolos con un grupo control individuos sanos. No observaron diferencias en los niveles circulantes de Visfatina en función de la etiología de la hepatopatía, ni en función de la severidad de la misma, valorada mediante la escala de Child-Turcotte-Pugh. En la segunda parte de este estudio, se trabajó con un modelo experimental de hepatitis en ratones. Primero se inducía una sobreexpresión hepática de Visfatina en los ratones y, posteriormente, se les producía una hepatitis aguda mediante la administración endovenosa de concanavalina A. Los ratones así tratados aumentaban más de 40 veces sus niveles de expresión hepática de Visfatina a las 6 horas de haber recibido el tratamiento. Este aumento en la expresión de ARNm procedía de los hepatocitos, las células de Kupffer y las células endoteliales de los sinusoides hepáticos. Los ratones, a los que previo a la administración de concanavalina A se les había inducido la expresión hepática de Visfatina, desarrollaron unas lesiones histológicas hepáticas más severas, unas cifras superiores de AST y ALT, y una mayor expresión hepática de la quimioquina murina de acción proangiogénica 1 (CXCL-1), IL-6 e IL-1 $\beta$  que los ratones que no habían sufrido la inducción. En cambio, no hubo diferencias en la expresión hepática de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-10. A otro grupo de ratones se administró FK866 previa a la inducción de la hepatitis aguda. FK866 es un inhibidor no competitivo específico de Visfatina capaz de producir un déficit intracelular de NAD<sup>+</sup>. La administración de FK866 redujo las áreas de necrosis desarrolladas a nivel hepático,

la apoptosis de los hepatocitos y las cifras de AST y ALT. Además, se produjo una disminución relativa en la expresión hepática de CXCL-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-10. En este interesante trabajo, se demuestra el aumento de la expresión hepática y de los niveles circulantes de Visfatina en la hepatitis humana y en los modelos de hepatitis experimentales, y se señala un papel clave para esta adipocitoquina en los fenómenos inflamatorios hepáticos. En otro estudio, Aller et al.<sup>177</sup> valoraron pacientes con HGNA no diabéticos y, entre otros resultados, encontraron que los pacientes que presentaban inflamación portal hepática tenían unos niveles significativamente más altos de Visfatina sérica, insulinemia, HOMA y masa grasa.

Nuestra cohorte de pacientes con OM fue dividida en función de la presencia o ausencia histológica de la HGNA. En presencia de HGNA histológica, los niveles circulantes de Visfatina estaban significativamente aumentados en la cohorte de mujeres con OM. Dichos niveles eran mayores en la EHNA que en la ES, pero las diferencias no eran suficientes como para diferenciar entre ambas entidades. Es más, en el subgrupo de pacientes con OM que no habían desarrollado una HGNA, los niveles circulantes de Visfatina eran similares a los de las mujeres del grupo control. No existían diferencias entre los tres subgrupos (HN, ES y EHNA) en los parámetros que definen el SM (PC, TA, glucemia, TG y HDL-C), y los que valoran la IR (insulinemia, HOMA2-IR). Al añadir la presencia de DM2 en la valoración de la HGNA, Visfatina estaba aumentada en la EHNA en comparación con la ES, tanto en las DM2 como en las no DM2 y en este último subgrupo de OM no diabéticas los niveles circulantes de Visfatina, sí eran capaces de diferenciar entre EHNA y ES. Jarrar et al.<sup>192</sup>, obtuvieron unos resultados bastante diferentes, ya que no encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de Visfatina en pacientes OM en función de la presencia o ausencia de una HGNA. Además, en este estudio, en los pacientes con una EHNA los niveles de Visfatina y de IL-6 eran menores que en la ES. Estos autores llegan a postular que Visfatina e IL-6 tendrían un papel hepatoprotector y que su disminución favorecería el paso desde la ES a la EHNA.

Resumiendo lo expuesto hasta ahora, los niveles circulantes de Visfatina están aumentados en la OM y, en especial, en las pacientes que además son diabéticas. No parece existir consenso en la literatura sobre si realmente la obesidad y/o la DM2 son las directamente responsables de la elevación de los niveles circulantes de Visfatina, ya que los resultados de las investigaciones actuales sobre su posible correlación con el IMC, PC y con los parámetros de medición de la IR son cuanto menos contradictorios.

En nuestro estudio, los niveles circulantes de Visfatina muestran una excelente correlación con las transaminasas, parámetro de utilidad clínica en la valoración de la inflamación hepática, y con los niveles circulantes de IL-6 y PCR. IL-6 y la PCR son citoquinas de un conocido perfil proinflamatorio y, en los seres humanos, IL-6 está reconocida como el principal factor estimulador de la síntesis y secreción de PCR por parte de los hepatocitos<sup>193</sup>. En nuestros resultados, los niveles circulantes de Visfatina están aumentados en la OM en presencia de la HGNA. En la OM no diabética, dichos niveles elevados de Visfatina son significativamente superiores en la EHNA en comparación con la ES. Globalmente, el conjunto de nuestros resultados parecen relacionar los niveles circulantes de Visfatina con la presencia de la HGNA en su forma progresiva que es la EHNA, más que con la existencia de una obesidad extrema y la RI.

En la segunda parte de nuestro estudio, valoramos cómo era la expresión génica de Visfatina a nivel hepático. Se observó un aumento significativo de su expresión hepática en el grupo de mujeres con OM comparado con al grupo control. A nivel hepático, la expresión génica de Visfatina no se mostró influenciada por la presencia de DM2. Nuevamente, la presencia histológica de HGNA se asociaba a una expresión hepática de Visfatina mayor que la existente en la población con OM que no había desarrollado una HGNA, siendo esta última similar a la que mostraba el grupo control. Además, en presencia de HGNA, la expresión hepática de Visfatina fue significativamente superior en las mujeres con OM que habían desarrollado una EHNA en comparación a las que presentaban una ES, y este mismo patrón de expresión se mantenía en el subgrupo de OM no diabéticas. Por último, se establecía una correlación positiva entre la expresión hepática de Visfatina y los parámetros que valoran la RI (insulinemia y HOMA2-IR), no encontrándose correlación con el resto de parámetros valorados, incluidos los parámetros de adiposidad (IMC y PC) y las transaminasas. Estos resultados parecen señalar como nexo de unión entre la expresión hepática de Visfatina y la EHNA al factor fisiopatogénico más importante y reconocido en el desarrollo de la HGNA que es la RI.

Escasos son los estudios publicados que hacen referencia a cómo es la expresión en el tejido hepático de Visfatina. El más interesante y completo es probablemente el de Moschen et al.<sup>176</sup>. Estos autores estudiaron 30 pacientes obesos (IMC > 35) a los que se les realizó una cirugía bariátrica, objetivando una disminución significativa en los niveles séricos y de la expresión hepática de Visfatina tras la pérdida de peso

conseguida seis meses después de someter a los pacientes a la cirugía. Tras la cirugía, también mejoraron de forma significativa los niveles de AST, ALT y GGT, la glucemia en ayunas, la insulinemia, el HOMA, la PCR y el TNF- $\alpha$ . Del mismo modo se observó, que tras la cirugía y la pérdida de peso, se producía una mejoría en el grado de esteatosis y de EHNA en las biopsias hepáticas de control realizadas. Se realizó una valoración semicuantitativa de la presencia de Visfatina en el tejido hepático mediante técnicas de inmunohistoquímica a partir del estudio de las biopsias pareadas de 18 pacientes, observándose una disminución en la expresión de esta proteína en las biopsias obtenidas al conseguirse la reducción ponderal seis meses después de la colocación de la banda gástrica ajustable por cirugía laparoscópica. En sus conclusiones, estos autores sugieren que el tejido hepático puede ser una fuente de origen importante de la Visfatina circulante en los pacientes obesos. El estudio de Catalán et al.<sup>178</sup>, abordó también el tema de la expresión en el tejido hepático de Visfatina en un número pequeño de pacientes (11 casos). Estos autores describieron que los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina correlacionaban de forma positiva con las concentraciones de AST y ALT. Además, vieron como los niveles circulantes de Visfatina correlacionaban con el IMC y con los niveles circulantes de TG, colesterol total y LDL-colesterol. Finalmente, estos autores comentan que la asociación de Visfatina con los niveles de los TG y los enzimas hepáticos invitan a creer en la participación por parte de esta proteína en el desarrollo de la dislipemia, la HGNA y la inflamación crónica de bajo grado que acompaña a la obesidad. Kukla et al.<sup>194</sup>, también estudiaron la expresión hepática de Visfatina en la HGNA en pacientes con OM. Obtuvieron una biopsia hepática en 40 pacientes con obesidad extrema que fueron sometidos a cirugía bariátrica. La expresión hepática de Visfatina fue mayor en presencia de fibrosis hepática y dicha expresión establecía una buena correlación con el grado de fibrosis. No encontraron diferencias en la expresión hepática de Visfatina entre la ES y la EHNA y, al valorar la actividad inflamatoria hepática mediante el NAS (NAFLD Activity Score), ésta no correlacionó con la expresión hepática de Visfatina. Estos autores sugieren la participación de Visfatina en la patogénesis y progresión de la HGNA, pero no encontraron una asociación de la expresión hepática de esta proteína, ni con la esteatosis ni con la inflamación hepática. En este trabajo, llama la atención que la expresión de Visfatina fue determinada usando técnicas de inmunohistoquímica y que no se menciona cómo eran los niveles circulantes de Visfatina de los pacientes estudiados.

Llegado este punto, había una cuestión que no podíamos eludir y es la que hace referencia a cómo es la expresión de Visfatina en el tejido graso de nuestra cohorte de estudio, y por ello nos decidimos a analizar en paralelo ambos tejidos: el adiposo y el hepático. Los conocimientos sobre la expresión de Visfatina en el tejido adiposo que tenemos hasta el momento actual son nuevamente contradictorios. Inicialmente, se sugirió que la expresión génica de Visfatina estaba preferentemente representada por el tejido adiposo visceral<sup>148</sup>, pero esta observación no ha sido confirmada por otros investigadores como Berndt et al.<sup>157</sup> y Chang et al.<sup>195</sup> que no encontraron diferencias en la expresión de mRNA de Visfatina entre el tejido graso visceral y el subcutáneo. Recientemente, nuestro grupo ha analizado la expresión génica de Visfatina en el tejido graso visceral y subcutáneo trabajando sobre la misma cohorte de pacientes con OM que hemos descrito en el actual estudio<sup>171</sup>. Este trabajo mostraba el aumento de la expresión génica de Visfatina en el tejido graso en las pacientes con OM respecto a un grupo control, con independencia de la presencia de DM2. La expresión de Visfatina en el tejido adiposo no correlacionaba con el IMC en la cohorte de OM y no se hallaron diferencias de expresión entre el tejido graso visceral y el subcutáneo. Si existió una fuerte correlación entre la expresión en el tejido graso de Visfatina con la de TNF- $\alpha$  e IL-6. Así, disponíamos de este estudio ya publicado, los datos de la expresión en tejido adiposo en la cohorte de mujeres con OM y los analizamos en función de la presencia de la HGNA. La expresión relativa de Visfatina en el tejido graso subcutáneo y visceral era mayor que la del tejido hepático, casi unas tres veces superior. En el tejido adiposo subcutáneo y visceral, la expresión de Visfatina era independiente de la histología hepática (HN, ES o EHNA).

En resumen, los hallazgos más sobresalientes de nuestro estudio son los que hacen referencia, por un lado, al aumento significativo de los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina en el grupo de mujeres con OM no diabéticas que presentan una HGNA en su forma histológica más severa y progresiva que es la EHNA. Además, apoyando estos resultados, encontramos una fuerte correlación entre los niveles circulantes y la expresión génica hepática de Visfatina con el grado de histológico de la EHNA, en el grupo de mujeres con obesidad extrema no diabéticas. En el análisis multivariado de regresión logística, se señalaba de nuevo a los niveles circulantes de Visfatina como el factor más determinante para la presencia de una EHNA. Un segundo hallazgo que queremos destacar es la circunstancia de que en ausencia de HGNA los

niveles circulantes y la expresión génica hepática de Visfatina en las mujeres con OM eran similares a las de las mujeres sanas sin sobrepeso.

Los factores de riesgo más claramente identificados como asociados a la HGNA son la obesidad, la DM2 y la hipertriglicerinemia<sup>90,94</sup>. Estimaciones realizadas calculan que entre un 70-80% de los pacientes con DM2 desarrollan una HGNA<sup>90</sup>. El contenido graso hepático es en promedio un 80% superior en las personas con DM2 respecto a las no diabéticas, siendo ello independiente del grado de obesidad y la distribución grasa<sup>196</sup>. Existe un conjunto de factores que se han relacionado con la severidad de la HGNA, siendo los más importantes nuevamente, el desarrollo de DM2, la existencia de un SM, la obesidad y la edad. El desarrollo de una EHNA y la posibilidad de su progresión a cirrosis y fallo hepático son más frecuentes en los pacientes con DM2 que en los individuos no diabéticos<sup>94</sup>. En nuestra cohorte de estudio, el 100 % de la mujeres con OM y DM2 presentaban una HGNA: el 44,8% una ES y el 55,2% una EHNA. En la población diabética estudiada, los niveles circulantes de Visfatina eran mayores que los de las mujeres no diabéticas, pero en cambio la expresión hepática de Visfatina fue independiente de la presencia de la DM2. Ante esta situación, decidimos valorar cuál de los dos factores, la DM2 y/o la histología hepática, tenía una mayor influencia en la determinación de los niveles circulantes y la expresión hepática de esta adipocitoquina. En ambas ocasiones fue la histología hepática el factor que de forma estadísticamente significativa más pesaba en la determinación de los niveles y la expresión hepática de Visfatina. No creemos, sin embargo que la respuesta a la pregunta pueda ser tan sencilla, ya que no debemos olvidar la existencia demostrada, en diferentes trabajos, de una estrecha relación entre los niveles extracelulares de Visfatina por un lado y su actividad enzimática intracelular por otro, en la compleja regulación de la homeostasis de la glucosa<sup>150,188</sup>. En conclusión, pensamos que serán necesarios la realización de nuevos estudios que ayuden a concretar el verdadero carácter y profundidad de la relación entre Visfatina, HGNA y la diabetes mellitus.

Finalmente, evaluamos la utilidad clínica de la determinación de los niveles circulantes de Visfatina en el diagnóstico de la EHNA. Los niveles circulantes de Visfatina mostraron tener una alta precisión global en el diagnóstico de la EHNA. Así, el AUC de Visfatina en la cohorte de mujeres con OM no diabéticas fue de 0,79, lo cual es elevado si lo comparamos con el estándar de referencia que es la biopsia hepática, cuyo

AUC sería de 1. Este valor fue sólo ligeramente inferior de 0,70, cuándo se valoró en conjunto toda la cohorte con OM. En la cohorte de mujeres con OM no diabéticas se calculó un valor de corte para los niveles circulantes de Visfatina de 2,43 ng/ml, siendo la sensibilidad y especificidad del 64% y 84%, respectivamente. Muy interesante es el valor predictivo negativo (VPN) del 91% para diagnosticar o descartar EHNA (HN, ES, EHNA), que encontramos entre las mujeres con OM no diabéticas. Este VPN, también era de un 91% cuando se valoró la cohorte al completo. Este elevado VPN indica que los niveles circulantes de Visfatina serían de una utilidad mayor para excluir una EHNA que para asegurar su diagnóstico. Así, en las mujeres con OM, la determinación de los niveles circulantes de Visfatina podría ser considerada de utilidad como biomarcador de preevaluación de EHNA, permitiendo decidir de forma más objetiva la necesidad de realizar una biopsia hepática. En nuestro conocimiento, está sería la primera vez que Visfatina es evaluada de forma satisfactoria como un marcador biológico de EHNA. Recientemente, otros potenciales marcadores de EHNA han sido evaluados. Shen et al.<sup>197</sup> realizaron un estudio en población china con sobrepeso valorando la utilidad de la determinación de la citoqueratina 18 (CK-18), que es un marcador apoptosis celular, rasgo característico de la EHNA. Sus resultados indicaron que la determinación de CK-18 era un mejor marcador biológico para el diagnóstico de HGNA y EHNA que los otros dos marcadores valorados en este estudio: la proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria (AFABP) y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). CK-18 obtuvo una AUC de 0,70 en el diagnóstico de EHNA, con una sensibilidad y especificidad del 66%, valores sensiblemente inferiores a los obtenidos en nuestro estudio para Visfatina. Estos autores concluyeron que el uso de la determinación de CK-18 podía tener importantes implicaciones clínicas en el diagnóstico de la EHNA y ahorrar la realización de hasta un 30% de biopsias hepáticas en pacientes en seguimiento por HGNA. Aller et al.<sup>177</sup> también intentaron definir en su estudio un valor de Visfatina circulante con significado histológico. Estos autores estudiaron a un grupo de pacientes con HGNA no diabéticos encontrando la presencia de inflamación portal en los pacientes con unos niveles significativamente más altos de Visfatina, insulinemia, HOMA y masa grasa. La probabilidad de presentar inflamación portal aumentaba 1,11 veces por cada aumento de 1 ng/ml en la concentración circulante de Visfatina. Finalmente, definieron como un nivel elevado de Visfatina circulante aquel que superaba los 13,07 ng/ml. Con este criterio el 62,5% de los

pacientes que presentaban una inflamación portal en la histología hepática superaban el valor de corte establecido.

Los resultados del presente estudio en una cohorte específica de mujeres con OM han permitido establecer una relación entre la EHNA con los niveles circulantes y la expresión génica hepática de Visfatina sin la interferencia de factores de confusión. Respecto a la existencia de diferencias entre sexos en relación a los niveles de circulantes y la expresión génica en los tejidos de Visfatina es, como no podía ser de otro modo, un tema en debate. En este sentido, MacLaren et al.<sup>198</sup> evaluaron la regulación de las hormonas sexuales sobre la expresión de Visfatina en 3T3-L1 preadipocitos y adipocitos sugiriendo que la progesterona (15%) y la testosterona (33-44%) disminuían la expresión *in vitro* de Visfatina en los preadipocitos murinos, mientras que no afectaba a la de los adipocitos maduros. En estudios con humanos, Chen et al.<sup>174</sup> no encontró diferencias en los niveles circulantes de Visfatina entre hombres y mujeres. Berndt et al.<sup>157</sup> tampoco encontró diferencias entre ambos sexos, ni en los niveles circulantes de Visfatina, ni en su expresión de mRNA en el tejido graso visceral o subcutáneo.

Un punto que creemos necesita un comentario es el que hace referencia a la enorme cantidad de resultados paradójicos que sobre Visfatina se han publicado en la literatura. Una de las razones que hoy sabemos justifican en parte estos resultados contradictorios es la relacionada con las diferentes metodologías que se han utilizado en la medición de los niveles de Visfatina. Los estudios clínicos iniciales utilizaban técnicas comerciales de ELISA que sólo reconocían la región carboxiterminal de Visfatina y que mostraban una gran variabilidad en el valor de sus determinaciones. Así, se determinaron asociaciones fisiopatológicas inconsistentes como fue el relacionar los niveles circulantes de Visfatina con la obesidad central y el IMC. Actualmente, se usan técnicas de ELISA que reconocen la molécula completa de esta proteína humana. Estos kits más modernos, exactos y menos variables han sido comparados con los usados inicialmente y se ha constatado que las determinaciones antiguas infravaloraban los niveles circulantes de Visfatina del orden de entre 100 y 200 veces<sup>189</sup>.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los niveles circulantes de Visfatina en mujeres con OM están significativamente aumentados y ello se encuentra relacionado

con la presencia en estas pacientes de una HGNA. El hallazgo más sobresaliente es que, en el subgrupo de mujeres con OM no diabéticas, los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina están significativamente aumentados en la forma progresiva y más grave de esta enfermedad, la ENHA. Además, hemos demostrado la existencia de una correlación firme entre los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina con el grado histológico de la EHNA. Por último, nuestros resultados sugieren que los niveles circulantes de Visfatina podrían ser de utilidad como biomarcador de EHNA en las mujeres con OM no diabéticas con el objetivo de evitar la realización de biopsias hepáticas innecesarias en las pacientes en estudio por una HGNA.

La importancia clínica de nuestros actuales resultados debe ser confirmada mediante la futura realización de nuevos estudios prospectivos en cohortes poblacionales que incluyan pacientes con diferentes grados de obesidad y pertenecientes a ambos sexos. Solo así, será posible obtener la confirmación de si los niveles circulantes de Visfatina son útiles como biomarcador independiente de la existencia de una EHNA, y de si esta adipocitoquina juega un papel protagonista en la fisiopatología de la HGNA.

## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

### En la cohorte estudiada de mujeres con obesidad mórbida:

1. **Los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina están aumentados de forma significativa comparados con los de las mujeres del grupo control normopeso.** Así mismo, se encuentran aumentados significativamente los niveles circulantes de Lipocalina 2, Resistina, del receptor de tipo 2 del Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , Interlequina-6 y de la proteína C reactiva y disminuidos los niveles circulantes de Adiponectina. Estos resultados concuerdan con la presencia de un estado inflamatorio crónico de bajo grado existente en la obesidad.

2. **Los niveles circulantes de Visfatina correlacionan positivamente con los valores séricos de las transaminasas (Aspartato aminotransferasa, Alanina aminotransferasa, gammaglutamiltransferasa y Fosfatasa alcalina) y con los niveles circulantes de Interlequina-6 y de la proteína C reactiva.** Estas correlaciones sugieren una posible relación entre Visfatina y el fenómeno de inflamación hepática.

3. **La expresión hepática de Visfatina correlaciona positivamente con la insulinemia y el HOMA2-IR.** Esta relación es de gran relevancia clínica ya que la resistencia a la insulina es el factor fisiopatológico más reconocido en el desarrollo de la hepatopatía grasa no alcohólica.

4. **En presencia de diabetes mellitus tipo 2, los niveles circulantes de Visfatina, de la proteína C reactiva y de transaminasas (Aspartato aminotransferasa, Alanina aminotransferasa, gammaglutamiltransferasa) son significativamente más altos que los hallados en las mujeres con obesidad mórbida no diabéticas.** Los niveles circulantes de Adiponectina se encuentran significativamente disminuidos en presencia de diabetes mellitus tipo 2. En cambio, no se han observado diferencias en la expresión hepática de Visfatina en relación con la presencia de diabetes mellitus tipo 2.

La existencia de elevados niveles circulantes de Visfatina en los pacientes con DM2 ha sido constatada en diferentes estudios, aunque ésta no parece estar relacionada con la expresión hepática de esta adipocitoquina en las pacientes con obesidad mórbida.

Nuevos estudios son necesarios para analizar en profundidad la relación entre Visfatina y la enfermedad diabética.

**5. En presencia de hepatopatía grasa no alcohólica, demostrada histológicamente, los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina están aumentados de forma significativa respecto a los de las pacientes con obesidad mórbida con histología hepática normal.**

**6. Aunque los niveles circulantes de Visfatina son mayores en la esteatohepatitis no alcohólica que en la esteatosis simple, las diferencias no permiten distinguir entre estas dos formas histológicas de la hepatopatía grasa no alcohólica. En cambio, la expresión hepática de Visfatina es significativamente mayor en la esteatohepatitis no alcohólica que en la esteatosis simple.**

**7. Las mujeres con una histología hepática normal, sean obesas mórbidas o normopeso tienen unos niveles circulantes y una expresión hepática de Visfatina similares.**

**8. La expresión génica de Visfatina en el tejido adiposo subcutáneo y visceral no presenta diferencias en relación a la histología hepática presente (hígado normal, esteatosis simple o esteatohepatitis no alcohólica).**

**9. Las pacientes con obesidad mórbida no diabéticas tienen los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina significativamente mayores en la esteatohepatitis no alcohólica comparados con la esteatosis simple.** Existe una fuerte correlación entre los niveles circulantes y la expresión hepática de Visfatina con el grado histológico de esteatohepatitis no alcohólica en el subgrupo de mujeres no diabéticas. El análisis multivariado de regresión logística señala a los niveles circulantes de Visfatina como el factor más determinante en relación con la presencia histológica de esteatohepatitis no alcohólica, por encima del resto de parámetros metabólicos (glucemia e insulinemia basal, índice de masa corporal, triglicéridos, HDL-C, Alanina aminotransferasa) y adipocitoquinas (Adiponectina, Resistina, Lipocalina 2, Interlequina-6, proteína transportadora del retinol tipo 4, receptor de tipo 2 del Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ).

**10. Los niveles circulantes de Visfatina muestran una elevada especificidad para el diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica en la población no diabética. Este hallazgo nos sugiere que esta adipocitoquina puede tener utilidad clínica como biomarcador.** Además, su elevado valor predictivo negativo nos señala a los niveles circulantes de Visfatina como una útil herramienta de exclusión de la existencia de una esteatohepatitis no alcohólica, permitiéndonos decidir de forma más objetiva la necesidad de realizar una biopsia hepática en este grupo de pacientes.

#### Conclusión final

La importancia de estos resultados radica en que se establece una relación entre Visfatina y el desarrollo de la hepatopatía grasa no alcohólica, independiente de la existencia de una obesidad extrema y de una insulín resistencia manifiesta, ya que en ausencia del desarrollo de una hepatopatía grasa, ni los niveles circulantes ni la expresión hepática de esta adipocitoquina se ven incrementados respecto a los de la población sana no obesa.

La importancia clínica de nuestros resultados debería ser confirmada mediante la realización de este estudio en otros grupos de obesidad para determinar si los niveles séricos de Visfatina pueden ser utilizados como un marcador no invasivo que nos permita determinar la presencia en la hepatopatía grasa no alcohólica de su forma más grave y evolutiva, la esteatohepatitis no alcohólica.



## VII. BIBLIOGRAFÍA



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet.* 2007; 143:3016-34.
- [2]. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 1999; 282:1523-9.
- [3]. Aranceta Bartrina J, Serra-Magem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B; Grupo Colaborativo SEEDO. Prevalencia de la obesidad en España. *Med Clin.* 2005; 125:460-6.
- [4]. Gutierrez Fisac JL, López E, Banegas JR, Graciani A, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of obesity and overweight in elderly people in Spain. *Obes Res.* 2004; 12:710-5.
- [5]. Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 2009; 373:1083-96.
- [6]. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis *et al.* Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med.* 2010; 363:2211-9.
- [7]. Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA.* 2004; 291:1238-45.
- [8]. Grooves T. Pandemic Obesity in Europe. *BMJ.* 2006; 333:1081.
- [9]. Rubio Herrera M.A. Manual de obesidad mórbida. Ed. Panamericana. 2005. Primera Edición.
- [10]. Mariani-Costantini A. Natural and cultural influences on the evolution of the human diet: background of the multifactorial processes that shaped the eating habits of Western societies. *Nutrition.* 2000; 16:483-6.
- [11]. Henry, S.L.; Barzel, B.; Wood-Bradley, Burke SL, Head GA, Armitage JA. Developmental origins of obesity-related hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39:799-806.
- [12]. Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep.* 2010; 10:498-505.
- [13]. Roche AF, Sievogel RM, Chumlea WC, Webb P. Grading body fatness from limited anthropometric data. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34:2831-8.
- [14]. Flegal KM, Ogden CL, Wei R, Kuczmarski RL, Johnson CL. Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for

Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73:1086-93.

[15]. Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculus disease. *Am J Clin Nutr.* 1956; 4:20-34.

[16]. Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The “metabolically-obese”, normal-weight individual. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34:1617-21.

[17]. Karelis AD, Faraj B, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, *et al.* The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:4145-50.

[18]. Moreno B, Casanueva F y grupo CONVERGE. Identificación, diagnóstico y control del paciente con obesidad abdominal y factores de riesgo cardiovascular y metabólico. *Med Clin (Barc).* 2007; 128:429-37.

[19]. Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, *et al.* Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol.* 1994; 73:460-9.

[20]. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity related health risk. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:379-84.

[21]. Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, *et al.* Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 2008; 22: 1397-409.

[22]. Caballero B, Allen L, Prentice A. *Encyclopedia of human nutrition.* Ed. Elsevier. 2005. Segunda Edición.

[23]. Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 2008; 39:715-28.

[24]. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17:332-41.

[25]. Heilbronn L, Campbell L. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des.* 2008; 14:1225-30.

[26]. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29:2959-71.

[27]. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity related health risk. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:379-84.

[28]. O'Rourke RW. Inflammation in obesity-related disease. *Surgery.* 2009; 145:255-9.

- [29]. Okamoto Y, Higashiyama H, Rong JX, McVey MJ, Kinoshita M, Asano S, *et al.* Comparison of mitochondrial and macrophage content between subcutaneous and visceral fat in db/db mice. *Exp Mol Pathol.* 2007; 83:73-83.
- [30]. Tarantino G, Marra M, Contaldo F, Pasanisi F. Basal metabolic rate in morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Invest Med.* 2008; 31:E24-9.
- [31]. Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Frühbeck G. Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. *Revista Española de Obesidad.* 2008; 6:264-79.
- [32]. Guzik T, Mangalat D, Korbut R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57:505-28.
- [33]. Puglisi MJ, Fernandez ML. Modulation of c-reactive protein, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and adiponectin by diet, exercise, and weight loss. *J Nutr.* 2008; 138: 2293-6.
- [34]. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007; 56:1010-3.
- [35]. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 2004; 30:13-9.
- [36]. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem.* 2004; 279:48487-90.
- [37]. Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life.* 2009; 61:424-30.
- [38]. Nedvidkova J, Smitka K, Kopsky V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res.* 2005; 54:133-40.
- [39]. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116:1784-92.
- [40]. Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG, Cole CR, Ziegler TR. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth and inflammation. *Nutrition.* 2011; 27:269-75.
- [41]. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:772-83.
- [42]. Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, *et al.* Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF $\alpha$ , leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28:993-7.

- [43]. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, *et al.* Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004; 53:1060-7.
- [44]. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000; 148: 209-14.
- [45]. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280:E827-47.
- [46]. Li, M.D. Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight. *Yale J Biol Med*. 2011; 84:1-17.
- [47]. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*. 2008; 14:741-51.
- [48]. Lago F, Diéguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3: 716-24.
- [49]. Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, *et al.* Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med*. 2006; 12:425-32.
- [50]. Hutchinson WL, Coll AP, Gallimore JR, Tennent GA, Pepys MB. Is leptin an important physiological regulator of CRP? *Nat Med*. 2007; 13:17-8.
- [51]. Romero-Corral A, Sierra-Johnson J, López-Jiménez F, Thomas RJ, Singh P, Hoffmann M, *et al.* Relationships between leptin and C-reactive protein with cardiovascular disease in the adult general population. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008; 5:418-25.
- [52]. Gómez-Ambrosi J, Salvador J, Silva C, Pastor C, Rotellar F, Gil MJ, *et al.* Increased cardiovascular risk markers in obesity are associated with body adiposity: role of leptin. *Thromb Haemost*. 2006; 95:991-6.
- [53]. Yan QW, Yang Q, Mody N, Graham TE, Hcu CH, Xu Z, *et al.* The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56:2533-40.
- [54]. Choi KM, Lee JS, Kim EJ, Baik SH, Seo HS, Choi DS, *et al.* Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *Eur J Endocrinol*. 2008; 158:203-7.
- [55]. Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AW, *et al.* Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin Chem*. 2007; 53:34-41.

- [56]. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409:307-12.
- [57]. Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, *et al.* Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *J Biol Chem*. 2001; 276:25651-3.
- [58]. Utzschneider KM, Carr DB, Tong J, Wallace TM, Hull RL, Zraika S, *et al.* Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia*. 2005; 48:2330-3.
- [59]. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation*. 2005; 111:932-9.
- [60]. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, *et al.* Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003; 108:736-40.
- [61]. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukariot Gene Expr*. 2010; 20:87-103.
- [62]. Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Olszanecka-Glinianowicz M, Zurawski A. Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24:1392-5.
- [63]. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolony JM, *et al.* Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005; 436:356-62.
- [64]. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, *et al.* Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006; 354:2552-63.
- [65]. Broch M, Vendrell J, Ricart W, Richart C, Fernández-Real JM. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care*. 2007; 30:1802-6.
- [66]. Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Ramírez B, Silva C, Rotellar F, *et al.* Serum retinol-binding protein 4 is not increased in obesity or obesity-associated type 2 diabetes mellitus, but is reduced after relevant reductions in body fat following gastric bypass. *Clin Endocrinol*. 2008; 69:208-15.
- [67]. Yao-Borengasser A, Varma V, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Lee MJ, *et al.* Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:2590-7.
- [68]. Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: Association with sub-clinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:1971-4.

- [69]. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, *et al.* C reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med.* 1999; 190:1733-40.
- [70]. Nanri, A, Moore M.A, Kono S. Impact of c-reactive protein on disease risk and its relation to dietary factors. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007; 8:167-77.
- [71]. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, *et al.* Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 2003; 107:671-4.
- [72]. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005;366:1197-209.
- [73]. Alegría E, Castellano JM, Alegría A. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Rev Esp Cardiol.* 2008; 61:752-64.
- [74]. Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis.* 2004; 17:35-44.
- [75]. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 2003; 108:1546-51.
- [76]. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988; 37:1595-607.
- [77]. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 2006. [http://www.idf.org/webdata/docs/MetS\\_def\\_update2006.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf)
- [78]. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med.* 1999; 16:442-3.
- [79]. Grundy SM, Cleeman JJ, 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.
- [80]. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet.* 2005; 366:1059-62.
- [81]. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care.* 2005; 28:2745-9.
- [82]. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US. adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 2002; 287:356.

- [83]. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, *et al.* Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002; 28:364-76.
- [84]. Gabriel R, Serrano-Ríos M, Pladevall M. Relationships between visceral adiposity, body size and fat distribution indexes with fasting insulin levels in the Spanish general population. *Can J Cardiol.* 1997; 13 Suppl B:280.
- [85]. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* 2003; 163:427-36.
- [86]. Hernández A, Riera C, Solá E, Oliver M, Martínez M, Morillas C, *et al.* Prevalencia del síndrome metabólico entre pacientes con cardiopatía isquémica. *Med Clin (Barc).* 2003; 121:204-8.
- [87]. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissinen M, *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001; 24:683-9.
- [88]. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and adipokines in health and disease. *Nutrition and Health.* Ed. Humana Press 2007.
- [89]. Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008; 6: 343-68.
- [90]. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002; 16:1221-31.
- [91]. Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med.* 1979; 67:811-6.
- [92]. Ludwig J, Viaggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experience with an hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980; 55:434-8.
- [93]. Moreno-Sánchez D. Epidemiología e historia natural de la hepatopatía grasa no alcohólica primaria. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29:244-54.
- [94]. Farrel G, Larter C. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 43(2 Suppl 1):S99-112.
- [95]. Clark J, Brancat F, Diehl A. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98:960-7.
- [96]. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998; 22:39-47.

- [97]. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, *et al.* Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol.* 1990; 85:1349-55.
- [98]. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology.* 1990; 12:1106-10.
- [99]. Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, *et al.* Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med.* 2005; 22:1141-5.
- [100]. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010; 28:155-61.
- [101]. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, *et al.* Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology.* 2007; 133:496-506.
- [102]. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, *et al.* NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology.* 2002; 35:373-9.
- [103]. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999; 116:1413-9.
- [104]. 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.
- [105]. Teli MR, James OFW, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology.* 1995; 22:1714-9.
- [106]. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA.* 2003; 289:3000-4.
- [107]. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology.* 2000; 32:689-92.
- [108]. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, Suda A, Farrell GC, Byth K, *et al.* Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology.* 2003; 38:420-7.
- [109]. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990; 11:74-80.
- [110]. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1999; 30:1356-62.

- [111]. Chitturi S, Weltman M, Farrell GC, McDonald D, Kench J, Liddle C, *et al.* HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology*. 2002; 36:142-9.
- [112]. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, *et al.* Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology*. 1999; 117:1155-63.
- [113]. Laine F, Bendavid C, Moirand R, Tessier S, Pernin M, Guillygomarch A, *et al.* Prediction of liver fibrosis in patients with features of the metabolic syndrome regardless of alcohol consumption. *Hepatology*. 2004; 39:1639-46.
- [114]. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2005; 25:779-86.
- [115]. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, *et al.* Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2004; 127:1704-13.
- [116]. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, *et al.* Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroscanR): a prospective study. *Gut*. 2006; 55:403-8.
- [117]. Cusi K. The Role of Adipose Tissue and Lipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes *Curr Diab Rep*. 2010; 10:306-15.
- [118]. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000; 21:697-738.
- [119]. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, *et al.* Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005; 48:634-42.
- [120]. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001; 120:1183-92.
- [121]. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005; 115:1343-51.
- [122]. Kotronen A, Seppänen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepää AL, *et al.* Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*. 2009; 58:203-8.
- [123]. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, *et al.* Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia*. 2006; 49:755-65.

- [124]. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, *et al.* Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004; 279:32345-53.
- [125]. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004; 114:147-52.
- [126]. Farrell GC. Signalling links in the liver: Knitting SOCS with fat and inflammation. *J Hepatol.* 2005; 43:193-6.
- [127]. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatic CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280:9887-94.
- [128]. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, *et al.* Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005; 54:117-21.
- [129]. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, *et al.* Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* 2004; 40:19-22.
- [130]. Day CP, James OF. Steatohepatitis a tale of two "hits". *Gastroenterology.* 1998; 114:842-5.
- [131]. Moreno Sánchez D. Pathogenesis of primary nonalcoholic fatty liver disease. *Med Clin (Barc).* 2005; 124:668-77.
- [132]. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007; 4:1366-74.
- [133]. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16:421-7.
- [134]. Marchesini G, Forlani G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology.* 2002; 35: 497-9.
- [135]. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1467-76.
- [136]. Moschen AR, Gerner RR, Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. *Curr Pharm Des.* 2010; 16:1913-20.
- [137]. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2247-50.

- [138]. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996; 274:1379-83.
- [139]. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, *et al.* Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001; 34: 1158-63.
- [140]. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, *et al.* Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002; 122:274-80.
- [141]. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 2003; 144:3765-73.
- [142]. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, *et al.* Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002; 36:403-9.
- [143]. Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawat T, DeFronzo RA. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28:783-9.
- [144]. Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, *et al.* Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:1081-6.
- [145]. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004; 40:46-54.
- [146]. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:1431-7.
- [147]. Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, Gigot D, Urbain J, Leo O, *et al.* Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is upregulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*. 2002; 32:3225-34.
- [148]. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005; 307:426-30.
- [149]. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, *et al.* Retraction. *Science*. 2007; 318:565.

- [150]. Revollo J, Körner A, Mills K, Satoh A, Wang T, Garten A, *et al.* Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab.* 2007; 6:363-75.
- [151]. Sommer G, Garten A, Petzold S, Beck-Sickingler AG, Blüher M, Stumvoll M, *et al.* Visfatin/PBEF/Nampt: Structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clinical Science.* 2008; 115:13-23.
- [152]. Wang T, Zhang X, Bheda P, Revollo JR, Imai S, Wolberger C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD<sup>+</sup> biosynthetic enzyme. *Nat Struct Mol Biol.* 2006; 13:661-2.
- [153]. Kim M K, Lee JH, Kim H, Park SJ, Kim SH, Kang GB, *et al.* Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *J Mol Biol.* 2006; 362:66-77.
- [154]. Ye SQ, Simon BA, Maloney JP, Zambelli-Weiner A, Gao L, Grant A, *et al.* Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:361-70.
- [155]. Brentano F, Schorr O, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, *et al.* Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:2829-39.
- [156]. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, *et al.* Visfatin, an adipocytokine with pro-inflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol.* 2007; 178:1748-58.
- [157]. Berndt J, Kloting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, *et al.* Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes.* 2005; 54:2911-6.
- [158]. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, *et al.* Extracellular Nampt promotes macrophage survival *via* a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem.* 2008; 283:34833-43.
- [159]. Romacho T, Azcutia V, Vazquez-Bella M, Matesanz N, Cercas E, Nevado J, *et al.* Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates proinflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia.* 2009; 52:2455-63.
- [160]. Lee WJ, Wu CS, Lin H, Lee IT, Wu CM, Tseng JJ, *et al.* Visfatin induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway. *Int J Obes (Lond).* 2009; 33:465-72.
- [161]. Adya R, Tan BK, Chen J, Randeve HS. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF)/visfatin induces secretion of MCP-1 in human endothelial cells: role in visfatin-induced angiogenesis. *Atherosclerosis.* 2009; 205:113-9.

- [162]. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:50754-63.
- [163]. Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, *et al.* Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival. *Cell.* 2007; 130:1095-107.
- [164]. Ho C, Van der Veen E, Akawi O, Pickering JG. SIRT1 markedly extends replicative lifespan if the NAD<sup>+</sup> salvage pathway is enhanced. *FEBS Lett.* 2009; 583: 3081-5.
- [165]. Van der Veer E, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, *et al.* Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem.* 2007; 282:10841-5.
- [166]. Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 1534-53.
- [167]. Rajamohan SB, Pillai VB, Gupta M, Sundaresan NR, Birukov KG, Samant S, *et al.* SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:4116-29.
- [168]. Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, Van Gool F, Galli M, *et al.* Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One.* 2008; 3:e2267.
- [169]. Klötting N, Klötting I. Visfatin: gene expression in isolated adipocytes and sequence analysis in obese WOKW rats compared with lean control rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332:1070-2.
- [170]. Choi KC, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, *et al.* Effect of PPAR-alpha and -gamma agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF-alpha in visceral fat of OLETF rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 336:747-53.
- [171]. Terra X, Auguet T, Quesada I, Aguilar C, Luna AM, Hernández M, *et al.* Increased levels and adipose tissue expression of visfatin in morbidly obese women. The relationship with pro-inflammatory cytokines. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Dec 19.
- [172]. Wang P, Van Greevenbroek MM, Bouwman FG, Brouwers MC, Van der Kallen CJ, Smit E, *et al.* The circulating PBEF/NAMPT/visfatin level is associated with a beneficial blood lipid profile. *Pflugers Arch.* 2007; 454:971-6.
- [173]. Pagano C, Pilon C, Olivieri M, Mason P, Fabris R, Serra R, *et al.* Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:3165-70.

- [174]. Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, *et al.* Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:295-9.
- [175]. Hammarstedt A, Pihlajamäki J, Rotter Sopasakis V, Gogg S, Jansson PA, Laakso M, *et al.* Visfatin is an adipokine, but it is not regulated by thiazolidinediones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1181-4.
- [176]. Moschen AR, Molnar C, Wolf AM, Weiss H, Graziadei I, Kaser S, *et al.* Effects of weight loss induced by bariatric surgery on hepatic adipocytokine expression. *J Hepatol.* 2009; 51:765-77.
- [177]. Aller R, Luis DA, Izaola O, Gonzalez Sagrado M, Conde R, Velasco MC, *et al.* Influence of visfatin on histopathological changes of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2009; 54:1772-7.
- [178]. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Silva C, Rotellar F, *et al.* Association of increased visfatin/PBEF/NAMPT circulating concentrations and gene expression levels in peripheral blood cells with lipid metabolism and fatty liver in human morbid obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011; 21:245-53.
- [179]. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, Waluga M, Warakomska I, Berdowska A, *et al.* Visfatin serum levels in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat.* 2010; 17:254-60.
- [180]. Huang JF, Huang CF, Yu ML, Dai CY, Huang CI, Yeh ML, *et al.* Serum visfatin is correlated with disease severity and metabolic syndrome in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26:530-5.
- [181]. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:2467-74.
- [182]. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for on-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41:1313-21.
- [183]. WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization, 2006; 1-46. Available at <http://who.int>
- [184].Wallance TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes care.* 2004; 27:1487-95.
- [185]. Haider DJ, Schindler K, Schaller G, Prager G, Wolzt M, Ludvik B. Increased visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1578-81.
- [186]. Manco M, Fernández-Real JM, Equitani F, Vendrell J, Valera Mora ME, Nanni G, Tondolo V, Calvani M, Ricart W, Gastagneto M, Mingrone G. Effect of massive weight

loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:483-90.

[187]. Filippatos TD, Derdemezis CS, Kiortsis DN, Tselepis AD, Elisaf MS. Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2007; 30:323-6.

[188]. López-Bermejo A, Chico-Julà B, Fernández-Balsells M, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, Ricart W, Fernandez-Real JM. Serum Visfatin increases with progressive B-cell deterioration. *Diabetes.* 2006; 55:2871-5.

[189]. Retnakaran R, Youn BS, Liu Y, Hanley AJ, Lee NS, Park JW, *et al.* Correlation of circulating full-length visfatin (PBEF/NAMPT) with metabolic parameters in subjects with and without diabetes: a cross-sectional study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 69:885-93.

[190]. Haider DG, Schaller G, Kapiotis *et al.* The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetología.* 2006; 49:1909-14.

[191]. Moschen AR, Gerner R, Schroll A, Fritz T, Kaser A, Tilg H. A key role for Pre-B cell colony-enhancing factor in experimental hepatitis. *Hepatology.* 2011; 54:675-86.

[192]. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, *et al.* Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27:412-21.

[193]. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340:448-54.

[194]. Kukla M, Ciupińska-Kajor M, Kajor M, Wyleżoł M, Żwirska-Korczala K, Hartleb M, *et al.* Liver visfatin expression in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease undergoing bariatric surgery. *Pol J Pathol.* 2010; 61:147-53.

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

[196]. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Cornér A, Bergholm R, Yki-Järvinen H. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care.* 2008; 31:165-9.

[197]. Shen J, Chan H, Wong G *et al.* Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol.* 2012; 56:1363-70.

[198]. MacLaren, R., Cui, W., Cianflone, K. Visfatin expression is hormonally regulated by metabolic and sex hormones in 3T3-L1 pre-adipocytes and adipocytes. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9:490-7.



## A1. ANEXO 1. ABREVIATURAS

<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>AFABP</b>	Proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>ApoB</b>	Apolipoproteína B
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>CD40</b>	Scavenger receptor CD40
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>CK-18</b>	Citoqueratina 18
<b>CXCL-1</b>	Quimioquina murina de acción proangiogénica 1
<b>CYP2E1</b>	Citrocromo P450 2E1
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ECV</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>EHNA</b>	Esteatohepatitis no alcohólica
<b>ERK1/2</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ES</b>	Esteatosis simple
<b>FA</b>	Fosfatasa alcalina
<b>FGF21</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
<b>FRCV</b>	Factores de riesgo cardiovasculares
<b>FTO</b>	Gen asociado con la masa grasa y la obesidad
<b>GGT</b>	Gamma glutamiltransferasa
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HDL-C</b>	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
<b>HGNA</b>	Hepatopatía grasa no alcohólica
<b>HKSA</b>	Heat-killed Staphylococcus aureus
<b>HN</b>	Histología hepática normal
<b>HNE</b>	Hidroxialquileo
<b>HOMA2-IR</b>	Modelo de evaluación de la insulín resistencia, versión 2
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular-1
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>IKK-<math>\beta</math></b>	Quinasa IKK- $\beta$
<b>IL-1,1<math>\beta</math>,6,7,10,18</b>	Interleuquina-1,6,7,10,18
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IRS 1 y 2</b>	Substrato del receptor de la insulina
<b>JNK 1</b>	Quinasa c-Jun N-terminal 1
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
<b>MDA</b>	Malonildialdehído
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>Nampt</b>	Nicotinamida fosforribosiltransferasa
<b>NAFLD</b>	Nonalcoholic fatty liver disease
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information

<b>NCEP/ATPIII</b>	National Cholesterol Education Program
<b>NHANES III</b>	Third National Health and Nutritional Examination Survey
<b>NMN</b>	Nicotinamida mononucleótido
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>LHS</b>	Lipasa hormono-sensible
<b>LPL</b>	Lipoproteinlipasa
<b>OM</b>	Obesidad mórbida
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONSi</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>PARPs</b>	Poli-ADP ribosiltransferasas
<b>PBEF</b>	Pre-B cell colony enhancing factor
<b>PC</b>	Perímetro de cintura
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PKC-<math>\epsilon</math></b>	Proteína quinasa C- $\epsilon$
<b>PK13</b>	Proteína quinasa 13
<b>PPAR <math>\alpha</math>, <math>\gamma</math></b>	Receptor activador de proliferación de los peroxisomas tipo $\alpha$ , $\gamma$
<b>p53</b>	Proteína tumoral 53
<b>RBP4</b>	Proteína transportadora de retinol tipo 4
<b>RCV</b>	Riesgo cardiovascular
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RLO</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
<b>SIRT1, 3, 4</b>	Sirtuina tipo 1, 3, 4
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>TAs</b>	Tensión arterial sistólica
<b>TAd</b>	Tensión arterial diastólica
<b>TC</b>	Tomografía computarizada
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante-beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral-alfa
<b>TNFR1 y 2</b>	Receptor de membrana de TNF- $\alpha$ tipo1 y 2
<b>UCP1</b>	Proteína desacoplante 1
<b>VCAM-1</b>	Molécula de citoadhesión vascular-1
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>VPN</b>	Valor predictivo negativo
<b>VPP</b>	Valor predictivo positivo