

EL PAPEL DE mTOR EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MAYO 2018



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

ELIA MARTÍNEZ ESTEVE
CO-DIRIGIDO POR DR. JORGE JOVEN MARIED Y NOEMÍ CABRÉ CASARES

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	4
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	5
INTRODUCCIÓN	6
<i>Obesidad y síndrome metabólico</i>	6
<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)</i>	7
Definición e incidencia en la población	7
Patogénesis	8
NAFLD y metabolismo energético	10
Evaluación del estado metabólico	11
NAFLD y autofagia	13
Diagnóstico	14
Tratamiento	15
HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
<i>Población de estudio</i>	17
<i>Obtención de muestras</i>	17
<i>Determinaciones clínicas y bioquímicas</i>	17
<i>Estudio histológico</i>	18
<i>Western Blot</i>	19
<i>Microscopía electrónica de transmisión</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	20
RESULTADOS	21
<i>Estudio clínico y bioquímico</i>	21
<i>Análisis histológico del tejido hepático</i>	22
<i>Análisis del estado de las mitocondrias hepáticas</i>	23
<i>Evaluación del metabolismo energético</i>	25
<i>Autofagia</i>	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	32
AUTOEVALUACIÓN	36
ANEXO	37
AGRADECIMIENTOS	38

DATOS DEL CENTRO

He realizado mi Trabajo de Fin de Grado en base a las tareas realizadas en las Prácticas Externas, las cuales han consistido en una estancia desde febrero hasta mayo de 2018 en la Unitat de Recerca Biomèdica (URB). Han sido co-tutorizadas por el Dr. Jorge Joven Maried y la estudiante de doctorado Noemí Cabré Casares.

La URB es una unidad de investigación perteneciente al Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) centrada en la temática de las patologías metabólicas.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Introducción. En los últimos años ha habido un incremento en la incidencia de la obesidad y sus comorbilidades asociadas, como es el caso de la NAFLD. Esta patología abarca un espectro de daño hepático, que incluye la esteatosis y la esteatohepatitis, llegando incluso a desencadenar la cirrosis hepática o el hepatocarcinoma. La NAFLD además es una patología metabólica, por lo que tanto el metabolismo energético como la disfunción mitocondrial tienen un papel crucial en su desarrollo. Por este motivo, nuestro objetivo fue evaluar el papel de mTORC1 en la progresión de la NAFLD y su relación con el metabolismo energético y la autofagia.

Metodología. Fueron evaluados los parámetros clínicos, bioquímicos e histológicos de una población de estudio formada por 270 pacientes de obesidad clase III. Se clasificó a los pacientes según la progresión de NAFLD que presentaban para realizar una comparación entre los perfiles de expresión de AMPK, mTORC1 y algunos componentes de la maquinaria de autofagia mediante Western Blot. También se comparó el estado de las mitocondrias hepáticas mediante microscopía electrónica de transmisión.

Resultados. Observamos diferencias significativas en el estado del hígado y en los parámetros bioquímicos entre los pacientes de NAFL y los de NASH. Además, los pacientes de NASH mostraron una menor activación de AMPK y un incremento en la activación de mTORC1. Por consiguiente, el proceso de autofagia se encontraba significativamente reducido en los pacientes de NASH respecto a los de NAFL.

Conclusión. Se ha establecido que la disfunción mitocondrial y la reducción del proceso de autofagia asociadas a la esteatosis hepática tienen un papel fundamental en la progresión de la NAFLD hacia la esteatosis hepática.

Palabras clave. AMPK, autofagia, disfunción mitocondrial, mTORC1, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, obesidad.

INTRODUCCIÓN

Obesidad y síndrome metabólico

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, y se debe a un desequilibrio energético en la relación calorías consumidas-calorías gastadas. El método más usado para clasificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), que se define como el peso en kilos entre el cuadrado de su altura en metros ($IMC = kg/m^2$) [1]. En función del IMC es posible clasificar a la población obesa en tres categorías, tal y como muestra la Tabla 1. El concepto “*obesidad mórbida*” se refiere a una obesidad de clase II que presenta una comorbilidad relevante asociada o a la obesidad de clase III [2].

Tabla 1. Clasificación de los individuos obesos en función de su índice de masa corporal [3].

IMC (kg/m^2)	Clase de obesidad
25,0 – 29,9	Clase I: sobrepeso
30,0 – 39,9	Clase II: obesidad
> 40	Clase III: obesidad extrema

Actualmente, en los países desarrollados, y en especial los subdesarrollados, sufren una pandemia de obesidad debida al estilo de vida moderno, que conlleva hábitos alimentarios poco saludables y una reducción de la actividad física. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, de 1975 a 2016 la prevalencia global de la obesidad se ha triplicado, siendo en 2016 un 13% de la población mundial obesa [1]. Estos hechos son alarmantes debido a que la obesidad constituye un factor de riesgo para otras patologías, como son la diabetes *mellitus* tipo II (DMT2), las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer [1, 4].

La obesidad tiene una relación directa con las comorbilidades asociadas al síndrome metabólico. El término síndrome metabólico alude a un grupo de desórdenes metabólicos que caracteriza a las personas con riesgo de padecer diabetes y enfermedades cardiovasculares. Su definición más reciente lo describe como una afección que incluye tres de las siguientes cinco patologías: hiperglicemia o DMT2, hipertriglicemia, niveles de colesterol HDL bajos, hipertensión y talla de cintura aumentada. El síndrome metabólico es muy común entre individuos obesos, aunque no es exclusivo, de forma que encontramos pacientes obesos que no presentan síndrome metabólico, y también individuos que padecen síndrome metabólico con un $IMC < 30$ [5].

Una de las comorbilidades asociadas a la obesidad es la patología conocida como NAFLD, del inglés “*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*”. Además de a la obesidad, la NAFLD se

encuentra asociada a la DMT2 y a la dislipidemia. A pesar de la estrecha relación existente entre la obesidad y la NAFLD, se ha demostrado que la obesidad no es ni necesaria ni suficiente para el desarrollo de NAFLD [6].

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

Definición e incidencia en la población

La NAFLD consiste en una acumulación anormal de grasa en el hígado no asociada al consumo desmesurado de alcohol ni a otros factores causantes de esteatosis hepática. Se considera NAFLD si entre el 5% y el 10% del peso total del hígado corresponde a materia grasa [5].

Esta patología se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico. Debido al rápido incremento de éste en la población mundial, se trata de la causa más común de enfermedades hepáticas en los países no asiáticos [7]. Además, es muy común entre pacientes obesos, pero también puede darse en individuos con un IMC dentro de los parámetros de normalidad y sin factores de riesgo metabólicos, siendo este caso mucho menos usual (80% vs. 16%) [4]. Algunos expertos consideran que las enfermedades crónicas del hígado constituyen “*La epidemia del Siglo XXI*”, paralelamente a la obesidad. Esta afirmación se debe a que el 24% de la población mundial presenta NAFLD, y en concreto en España tiene una prevalencia del 24,8% de la población adulta [8]. La gran relevancia de encontrar un tratamiento efectivo para la NAFLD reside en el impacto que ejercen las complicaciones de dicha patología en el estado de salud del paciente – a pesar de que la principal causa de mortalidad en los pacientes con NAFLD sea una enfermedad cardiovascular [9].

El hígado graso no alcohólico comprende un amplio espectro de patologías hepáticas, las cuales van desde esteatosis simple con acumulación de grasa hasta la cirrosis. En primer lugar, como se ha descrito anteriormente, encontramos “*Non-Alcoholic Fatty Liver*” (NAFL), estadio que se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado en forma de gotas lipídicas y puede clasificarse según los datos de la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los pacientes de NAFLD en función de la presencia de esteatosis [10].

Grado NAFL	% hepatocitos afectados
0	<5%
1	5-33%
2	33-66%
3	>66%

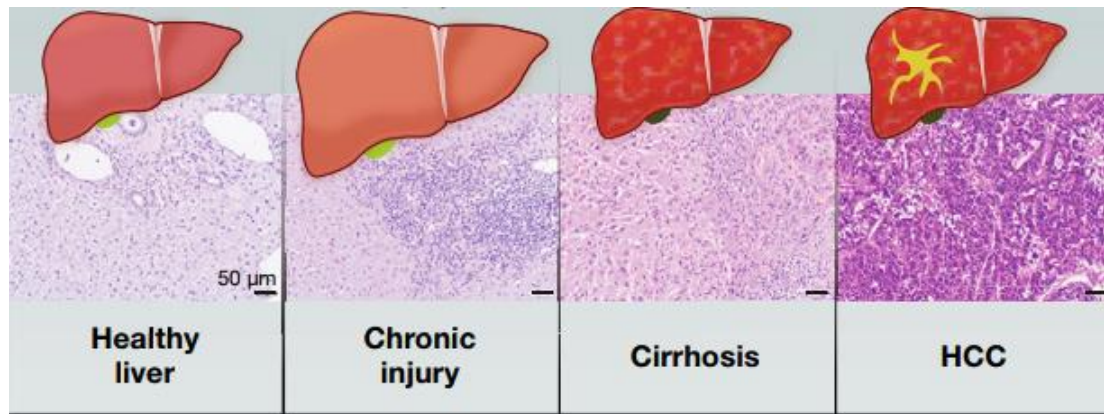


Figura 1. Representación de la posible progresión del hígado en pacientes de NAFLD. Imagen adaptada de Marquardt and Thorgeirsson (2014) [11].

Parte de los pacientes presentarán inflamación, función hepática reducida e indicios de fibrosis, conjunto de afecciones denominado “*Non-Alcoholic Steatohepatitis*” (NASH), que constituye un factor de riesgo para la cirrosis hepática. A su vez, la NAFLD incrementa el riesgo de padecer hepatocarcinoma (Figura 1) [12].

Patogénesis

Tanto la resistencia a la insulina como el estrés oxidativo y las cascadas inflamatorias tienen un papel importante en la patogénesis de la NAFLD. Actualmente se han conseguido avances en la comprensión del mecanismo de acumulación de grasa en el hígado. A pesar de que la progresión de la patogénesis de la NAFLD aún no ha podido ser establecida, se han propuesto diferentes hipótesis. La primera fue la hipótesis del “*two hit*”, representada en la Figura 2. Ésta afirmaba que la NAFLD es una enfermedad progresiva en la que la resistencia a la insulina (primer “*hit*”) provoca un mayor flujo de ácidos grasos libres al hígado. Si los ácidos grasos no son oxidados ni secretados se desencadena la esteatohepatitis. La esteatosis hepática predispone al hígado a los segundos “*hits*”: disfunción mitocondrial, liberación de citoquinas y adipoquinas y estrés del retículo endoplasmático. La teoría del “*two hit*” ha sido modificada para sugerir que la NAFLD puede deberse a “*multi-hits*” que ocurren en paralelo, proceso en el que la resistencia a la insulina provoca un aumento en la lipogénesis y en la captación de ácidos grasos libres por el hígado. Este incremento global en la cantidad de ácidos grasos desarrolla un ambiente de lipotoxicidad que predispone al daño hepático mediante el estrés oxidativo, la activación de rutas fibrogénicas y de las células hepáticas estrelladas, así como de la alteración en la expresión de adipoquinas, conduciendo de NASH a fibrosis [14].

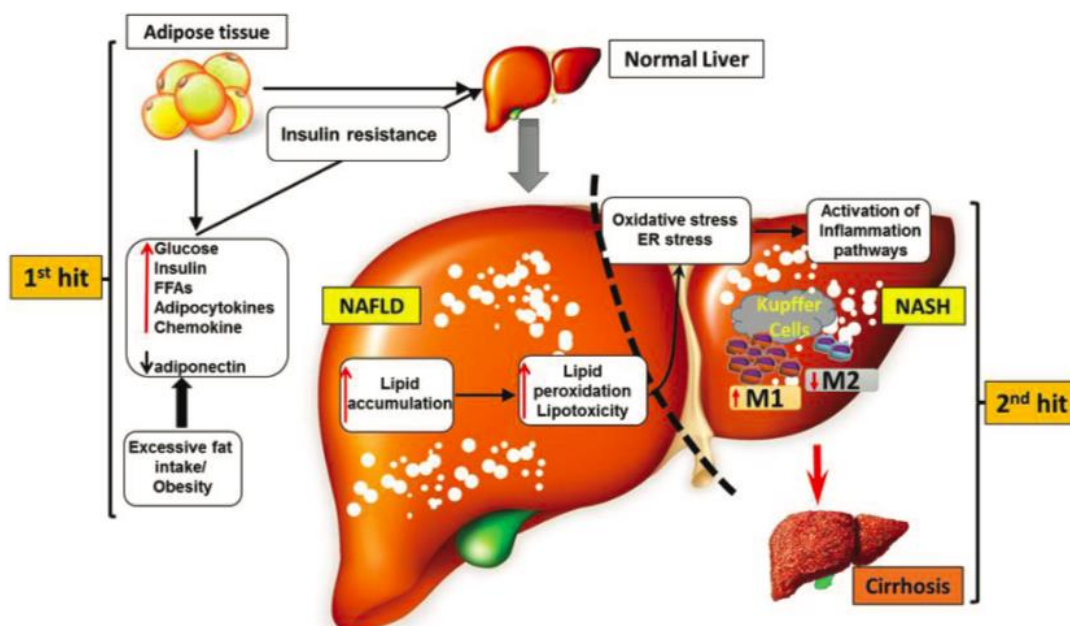


Figura 2. Representación esquemática de la patogénesis de la NAFLD mediante la hipótesis del "two hit". Imagen extraída de Xu et al. (2015) [13].

El tejido adiposo tiene una gran relevancia en el balance energético, ya que en él se almacena el exceso de energía consumido en forma de triglicéridos, que provienen tanto de la dieta como de la lipogénesis *de novo* (DNL). Además, el tejido adiposo libera ácidos grasos al torrente sanguíneo cuando hay un requerimiento energético en otro tejido [15]. En un cuadro de obesidad en el que se ingiere un exceso calórico, la masa total de tejido adiposo se ve incrementada mediante procesos de hiperplasia (el aumento en el número de adipocitos) o de hipertrofia (el incremento del tamaño celular). Este incremento tiene como objetivo el almacenamiento del exceso de energía consumido [16]. El tejido adiposo sufre una remodelación debido a un aumento de su tamaño, pero en ocasiones una incorrecta innervación y vascularización resulta en hipoxia y una disfunción de los adipocitos [6].

La lipoproteína lipasa (LPL) contribuye al almacenamiento de lípidos tras la ingesta, de forma que su actividad se ve aumentada ante una ingesta hiper-calórica. Sin embargo, la LPL se vuelve resistente a la insulina en individuos con obesidad mórbida, provocando hiperinsulinemia [15]. En condiciones normales, la insulina inhibe la lipólisis en el tejido adiposo. En pacientes obesos resistentes a la insulina la tasa lipolítica se verá aumentada, por lo que se liberará una mayor cantidad de ácidos grasos a la circulación sistémica, que tendrán como destino final el hígado. Los lípidos acumulados en el hígado podrán ser oxidados mediante la β -oxidación de ácidos grasos, que tiene lugar en las mitocondrias hepáticas, o podrán ser esterificados, transformándose así en triacilglicéridos. Los triglicéridos pueden pasar a la circulación en forma de "very low density lipoproteins" (VLDL) o ser almacenados en gotas lipídicas o "lipid droplets", dando lugar a esteatosis hepática [17].

La acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos provoca un incremento en la tasa de β -oxidación lipídica, proceso que tiene lugar en la matriz mitocondrial [4]. El gran flujo de entrada de ácidos grasos en los hepatocitos durante la NAFLD provoca una sobrecarga mitocondrial, incrementando la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), además de la necesidad de rutas de degradación alternativas, como la ω -oxidación peroximal, que libera aldehídos citotóxicos [18]. El estrés oxidativo resultante provoca daños estructurales en las mitocondrias, como un aumento de tamaño o la pérdida de la cresta mitocondrial. La disfunción mitocondrial acaba resultando en daño hepático, inflamación y la iniciación y progresión de fibrosis [4].

NAFLD y metabolismo energético

El hígado es un órgano con alta actividad metabólica que gobierna el metabolismo energético de todo el organismo. Conecta las rutas metabólicas llevadas a cabo en diferentes tejidos, como el músculo esquelético y el tejido adiposo. Se ha identificado gran cantidad de nutrientes, hormonas y señales neuronales que relacionan el metabolismo de la glucosa, de los lípidos y de los aminoácidos en el hígado. Por este motivo, los errores en la transducción de señales hepáticas predisponen al individuo a padecer desórdenes metabólicos como la NAFLD o la DMT2 [19].

Los hepatocitos muestran una gran flexibilidad a la hora de escoger entre la glucosa y los ácidos grasos como fuente energética. Esta elección está regulada por nutrientes y por señales hormonales. Tras la ingesta, la glucosa abunda en el torrente sanguíneo, por lo que los hepatocitos activan la glicólisis. Los intermediarios glicolíticos se utilizan para la síntesis de lípidos y aminoácidos. Debido a las bajas concentraciones de glucosa presentes en circulación durante el ayuno, los hepatocitos proceden a la β -oxidación de ácidos grasos para la obtención de energía [19].

Dentro del metabolismo energético podemos destacar el metabolismo de la glucosa, cuya ruta principal es la glicólisis, que oxida parcialmente la glucosa a piruvato en el citosol. El piruvato es transportado a la matriz mitocondrial, donde será oxidado por completo mediante el ciclo de Krebs. Como ruta anabólica destacada encontramos la gluconeogénesis, proceso mediante el cual se obtiene glucosa a partir de precursores como lactato, piruvato, glicerol o aminoácidos [19].

En un contexto de alta presencia de carbohidratos, los hepatocitos convierten la glucosa presente en ácidos grasos mediante la DNL, proceso en el que interviene la enzima "*Fatty Acid Sintasa*" (FASN) y cuyo metabolito intermediario principal es el citrato. En condiciones de déficit energético, las reservas lipídicas pueden utilizarse para la obtención de ATP mediante la β -oxidación de los ácidos grasos, que tiene lugar en la matriz mitocondrial. El hígado capta los ácidos grasos libres de la circulación sistémica, provenientes directamente de la dieta o del tejido adiposo. A partir de estos ácidos

grasos se producen fosfolípidos, con un importante papel estructural, o triacilgliceroles (TAG), la estructura de almacenaje lipídica. Los TAG pueden ser almacenados en “*lipid droplets*” o devueltos al torrente sanguíneo en forma de “*Very Low Density Lipoproteins*” (VLDL) [19].

Evaluación del estado metabólico

La NAFLD deriva de desequilibrios metabólicos, por lo que es posible evaluar el grado de avance de la patología a través sensores moleculares de energía, como la “*AMP-activated protein kinase*” (AMPK) y la diana de la rapamicina (mTOR, del inglés “*mammalian target of rapamycin*”) [19]. La interacción entre estas dos moléculas se encuentra representada de manera esquemática en la Figura 3.

AMPK es un complejo enzimático que actúa como sensor energético celular, ya que es activada en condiciones de déficit de energía. Su función es la inhibición de rutas anabólicas para favorecer las rutas catabólicas, consiguiendo ahorrar recursos energéticos y adquiriendo energía extra. En consecuencia, provoca un aumento en la oxidación de ácidos grasos y evita la DNL mediante la modulación de la transcripción de genes relacionados con estas rutas metabólicas y regulando la biogénesis mitocondrial en el hígado [20]. AMPK es regulada mediante su activación por fosforilación o por alosterismo cuando el ratio AMP:ATP aumenta. En estas condiciones, la kinasa LKB1 fosforila AMPK en el residuo Thr172. Además, se unen dos moléculas de AMP a los dos sitios de unión de la subunidad reguladora gamma de AMPK, induciendo un cambio conformacional que protege al residuo Thr172 de la desfosforilación [21, 22]. La combinación de la activación alostérica y por fosforilación aumenta con un factor de x1000 la actividad kinasa de AMPK [20].

La ruta de señalización de AMPK juega un papel crucial en la regulación del metabolismo lipídico del hígado mediante su efecto en el metabolismo energético, por lo que es una molécula imprescindible para el mantenimiento del equilibrio energético a nivel celular y orgánico. Por todo ello, existe una creciente evidencia de que AMPK es una diana terapéutica representativa para la intervención de enfermedades metabólicas [20].

Junto con AMPK, cabe destacar el efecto de mTOR en el metabolismo energético. Se trata de una serina/treonina kinasa ubicua en células eucariotas que integra señales de crecimiento acerca de la disponibilidad de nutrientes y energía. Esta molécula promueve la proliferación celular en condiciones favorables y la autofagia si las condiciones no son favorables [23]. Existe en forma de dos grandes complejos altamente conservados, mTORC1 y mTORC2 [24].

La actividad de mTORC1 está regulada por el metabolismo de algunos aminoácidos, como es el caso de la leucina y la glutamina. La glutamina es el aminoácido más abundante en el torrente sanguíneo y es degradado hasta α -cetoglutarato (α KG)

principalmente mediante la glutaminólisis. Este proceso consta de dos desaminaciones consecutivas, llevadas a cabo por la glutaminasa (GLS) y la glutamato deshidrogenasa (GDH). La leucina actúa como activador alostérico de la GDH, por lo que en presencia de glutamina y leucina se produce un aumento en la cantidad intracelular de α KG [25]. Además, se ha comprobado que la glutaminólisis activa la señalización de mTORC1 mediante el α KG, que favorece la unión de una molécula de GTP a una GTPasa Rag A o B. Rag A/B interactúa entonces con Rag C o D de la membrana lisosomal formando un heterotrímetro que reclutará a mTORC1 en la superficie del lisosoma. Una vez localizado en la membrana lisosomal, mTORC1 es activado por Rheb [26].

Tras su activación, mTORC1 promueve el crecimiento celular mediante gran cantidad de sustratos que controlan la traducción de mRNA, biogénesis de ribosomas y activación de la transcripción [24]. mTORC1 también participa de forma activa en el bloqueo de la autofagia, lo que evita el reciclaje de proteínas y promueve la carcinogénesis. Además, en condiciones de déficit energético, AMPK se encuentra activa y reduce indirectamente la señalización de mTORC1 [23].

Por lo tanto, el papel de mTOR es crucial, ya que se caracteriza por ser un regulador del crecimiento celular y del estado metabólico, y su desregulación contribuye a la aparición de enfermedades como la diabetes, la obesidad o el cáncer. En su ruta de señalización participan varios proto-oncogenes. Además, 60-80% de cánceres tienen activada la ruta de señalización de mTOR [24].

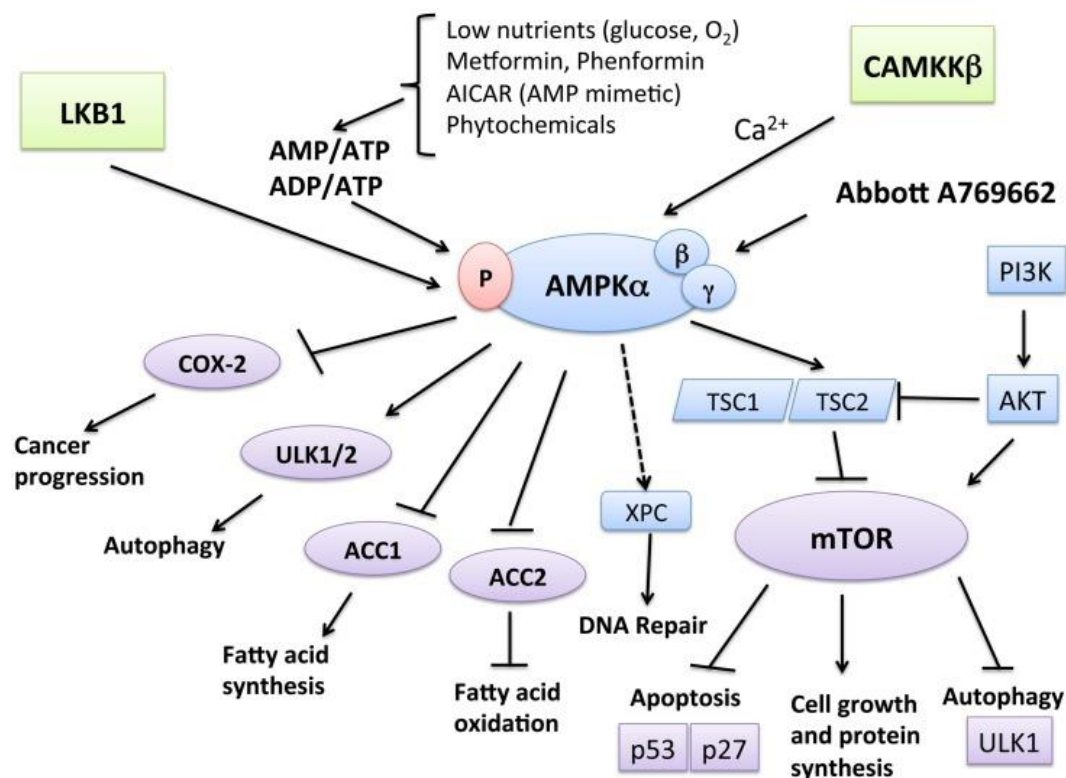


Figura 3. Ruta de señalización AMPK/mTOR. Muestra la interacción entre ambas moléculas, así como sus dianas más representativas. Imagen extraída de Kim and He (2013) [27].

NAFLD y autofagia

El término autofagia se refiere a un proceso mediante el cual la célula lleva a cabo una auto-digestión de sus propios componentes gracias a la liberación de un cargo citoplasmático en el lisosoma. La autofagia proporciona nutrientes para mantener las funciones vitales celulares durante el ayuno, pero también permite a la célula eliminar orgánulos innecesarios o dañados, proteínas con plegamiento erróneo y patógenos intracelulares [28]. La autofagia es un proceso imprescindible, tanto por tratarse de una respuesta adaptativa al estrés celular como por mantener la homeostasis celular mediante la eliminación de componentes potencialmente peligrosos [30].

El proceso de autofagia puede ser altamente selectivo, en el caso de que sea provocado por componentes celulares dañados o por un patógeno intracelular. Sin embargo, los procesos de autofagia provocados por carencias nutricionales son relativamente no selectivos [30]. Se han identificado al menos tres procesos diferentes en cuanto a la funcionalidad y a la manera de liberar el cargo en el lisosoma: la autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia, siendo este último el principal mecanismo catabólico regulado de degradación proteica y de orgánulos [28, 29].

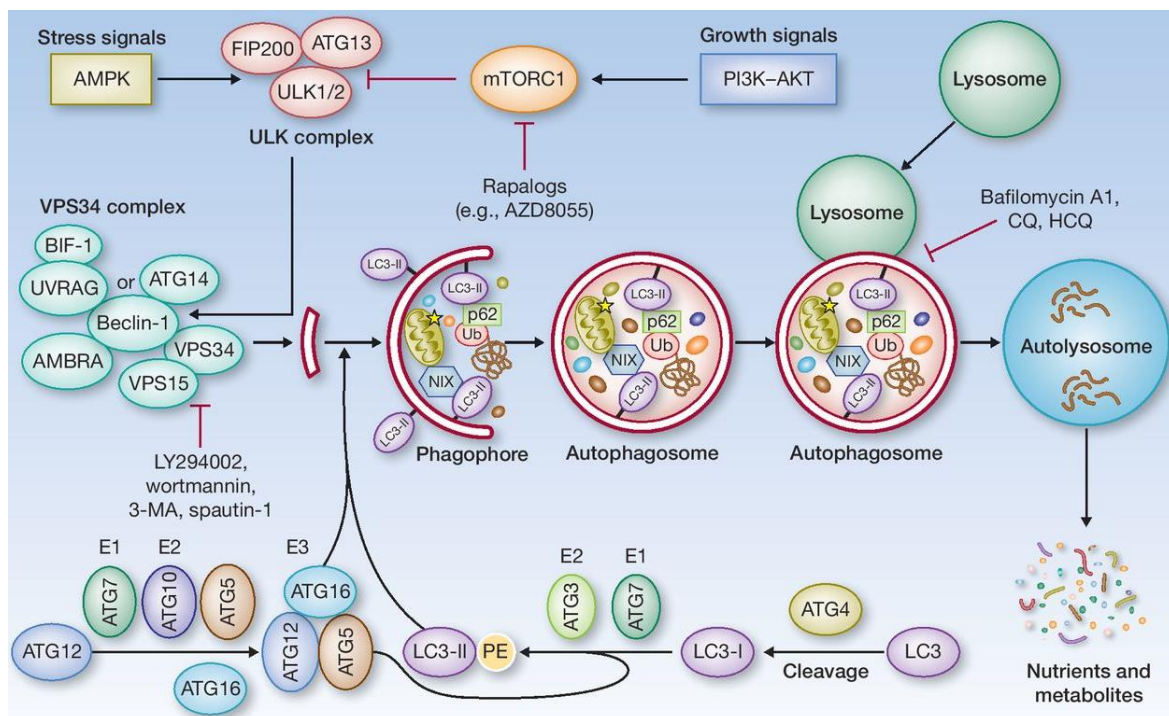


Figura 4. El proceso de autofagia: simplificación de la regulación metabólica y moléculas implicadas. Imagen obtenida de Cicchini *et al.* (2015) [31].

Dentro de los procesos específicos de macroautofagia encontramos el que es conocido como mitofagia, encargado de la degradación de mitocondrias dañadas, un hecho imprescindible para la salud celular, ya que las mitocondrias disfuncionales pueden alterar el funcionamiento del ciclo de Krebs e incrementar el estrés oxidativo. El proceso

de mitofagia, representado de manera esquemática en la Figura 4, es activado tras una despolarización de la membrana mitocondrial, que puede resultar de la falta de equivalentes reductores, el estado de hipoxia o el transporte de electrones erróneo [32].

Uno de los mecanismos de mitofagia mejor conocidos es la ruta Pink1-Parkin. Pink1 es una serina/treonina kinasa que se encuentra anclada a la membrana mitocondrial. Cuando la mitocondria sufre una despolarización, Pink1 es estabilizada en la membrana mitocondrial externa, desde donde fosforila a la proteína Parkin, una ubiquitina-ligasa citosólica E3, para reclutarla en la mitocondria dañada. Parkin ubiquitina entonces varias proteínas de la membrana externa mitocondrial, entre ellas las *“mitochondrial fusion proteins”* 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) y la *“translocase of outer mitochondrial membrane 20”* (TOM20). Tras la ubiquitinación, la *“selective autophagy adapter protein”*, conocida como p62, se une a la membrana mitocondrial. p62 actuará como receptor de autofagosomas positivos en *“microtubule-associated protein 1 light-chain 3”* (LC3) [33]. El autofagosoma que contiene la mitocondria dañada se fusionará con un lisosoma para su degradación. Este proceso está mediado por la proteína lisosomal *“lysosomal-associated membrane protein 2”* (LAMP2) [34].

Diagnóstico

Para evaluar el estado de los pacientes de NAFLD existen diferentes métodos diagnósticos disponibles. El más exacto es la biopsia de hígado, pero se trata de un método invasivo, por lo que no es posible utilizarlo en estudios poblacionales [35].

Las transaminasas hepáticas, como la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT), actúan como biomarcadores de daño hepático. Sin embargo, sólo se encuentran a concentraciones elevadas en aproximadamente el 20% de los pacientes de NAFLD, por lo que estas enzimas no pueden ser consideradas como un buen marcador [4]. A pesar de ello, las transaminasas, junto con los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en el suero se utilizan en combinación con el IMC, la distribución de grasa, la edad, el género, los hábitos saludables y la historia familiar para predecir la progresión del paciente [35].

En cuanto a las técnicas diagnósticas no invasivas, encontramos disponibles la ultrasonografía, la tomografía por resonancia magnética y la espectroscopía por resonancia magnética de protones, siendo esta última la más precisa por tratarse de una técnica cuantitativa. El método con mayor disponibilidad es la ultrasonografía. Presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% cuando el hígado presenta un $\geq 20\%$ de grasa. Desafortunadamente, conlleva dificultades técnicas en los pacientes con obesidad mórbida, por lo que los resultados obtenidos son poco fiables [4].

Tratamiento

En la actualidad, las terapias para la NAFLD establecidas en el mundo clínico se centran principalmente en la pérdida de peso, ya que la obesidad mórbida se asocia a una prevalencia más alta de la fibrosis avanzada, confirmando que la fibrosis severa y la cirrosis son más comunes entre los pacientes de NAFLD con obesidad mórbida [36]. Se ha probado que el ejercicio físico junto con las dietas saludables orientadas a la pérdida de peso, especialmente la dieta Mediterránea [17], tienen un efecto beneficioso en los pacientes de NAFLD [7, 4].

La cirugía bariátrica es una buena opción, ya que mediante estudios a largo plazo se ha demostrado que es posible revertir NASH y el estado fibrótico [17]. Esta intervención además provoca pérdida de peso y mejora los síntomas del síndrome metabólico [4]. A día de hoy no hay ningún fármaco aprobado para el tratamiento de la NASH [7]. Sin embargo, se ha demostrado que la metformina revierte la esteatosis hepática mediante la activación de AMPK. Además, se ha comprobado que la adiponectina reduce la cantidad de triglicéridos en el hígado y reestablece la sensibilidad a la insulina, también mediante la activación de AMPK [4].

HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La ingesta excesiva de alimentos y las dietas ricas en grasas de baja calidad están estrechamente relacionadas con la obesidad. Esta condición provoca un desequilibrio metabólico que desencadena diferentes comorbilidades asociadas, como la NAFLD. Dentro de esta patología encontramos un espectro de progresión en el daño hepático, que puede ir desde esteatosis hepática (NAFL) hasta esteatohepatitis (NASH), provocando finalmente cirrosis hepática. La disfunción mitocondrial y la regulación del metabolismo energético tienen un papel importante en la regulación de la autofagia. Por ello, creemos que la activación de mTOR es un hecho crucial en la progresión de la NAFLD al modular el proceso de autofagia y promover la disfunción mitocondrial.

Una vez establecida esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Establecer las diferencias clínicas e histológicas entre los pacientes de NAFL y los pacientes de NASH.
- Evaluar el estado de las mitocondrias hepáticas en ambos grupos de pacientes.
- Estudiar el grado de activación del nexo AMPK/mTOR y su relación con el proceso de autofagia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se diseñó un estudio observacional con pacientes que presentaban obesidad mórbida de tipo III ($\text{IMC} < 40 \text{ kg/m}^2$) y que se sometieron a cirugía bariátrica de tipo gastrectomía vertical. Los criterios establecidos para delimitar la población del estudio fueron los siguientes: participantes mayores de 25 años que presentaban un IMC mayor de 40 y como mínimo una comorbilidad asociada (DMT2, hipertriglicemia o dislipemia). Además, fueron excluidos aquellos que presentaban un consumo diario de alcohol mayor a 20 g, enfermedades infecciosas, patologías autoinmunes e inflamatorias o cáncer. Teniendo en cuenta todos los aspectos detallados, el grupo de estudio estaba formado por 270 pacientes con obesidad mórbida.

El Comité Ético de Investigación Clínica de l'Institut d'investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV) del Hospital Universitario Sant Joan de Reus aprobó el estudio, así como todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Obtención de muestras

Las muestras de tejido sanguíneo para los análisis bioquímicos y hematológicos fueron obtenidas justo antes de la intervención quirúrgica. Éstas fueron transportadas en hielo con la mayor brevedad posible desde el Hospital Universitario Sant Joan de Reus hasta las instalaciones de la Unitat de Recerca Biomèdica. Una vez allí, las muestras fueron procesadas para la obtención de suero y plasma (centrifugación a 2500 rpm durante 15 min), y conservadas a -80°C para los análisis posteriores.

Durante la intervención también se obtuvieron biopsias hepáticas, siempre de la misma localización y por el mismo especialista con el fin de reducir al máximo la variabilidad entre individuos.

En cuanto a la conservación de las muestras de hígado, una parte se conservó en formol para los análisis histológicos, y el resto se almacenó a -80°C para estudios adicionales.

Determinaciones clínicas y bioquímicas

A partir de las historias clínicas de los pacientes, pertenecientes al Hospital Universitario Sant Joan de Reus, se obtuvieron las siguientes variables clínicas: edad, sexo, IMC y presencia de DMT2, hipertriglicemia y dislipidemia.

Los diferentes parámetros bioquímicos se obtuvieron a partir de las muestras de suero mediante pruebas estándar en el sistema Analytics P800 Roche modular (Roche

Diagnostics, Basilea, Suiza). Las concentraciones de colesterol LDL se estimaron mediante la fórmula de Friedewald [37]. Los datos de resistencia a la insulina fueron obtenidos mediante sistema automatizado Sysmex XE 2100 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Estas determinaciones bioquímicas fueron llevadas a cabo por el Laboratorio de Referencia del Sud.

Estudio histológico

En primer lugar, las muestras conservadas en formol fueron procesadas para deshidratarlas y proceder a la inclusión en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes con un grosor de 2 μ m mediante un microtomo de mano. A dichos cortes se les realizaron las tinciones Hematoxilina-Eosina (H&E), Sirius Red y Tricrómico de Masson con el fin de evaluar las posibles lesiones hepáticas mediante un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E600, Madrid, España). Todas las biopsias fueron revisadas por el patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Sant Joan de Reus utilizando el sistema propuesto por Kleiner *et al.* (2005) [38].

Los pacientes se clasificaron según las principales características de la NAFLD. Primeramente se evaluó el grado de esteatosis hepática (porcentaje de hepatocitos que contienen gotas de grasa) y se dividieron las muestras en diferentes grupos: sin esteatosis o grupo 0 ($\leq 5\%$), esteatosis leve o 1 (6-33%), esteatosis moderada o 2 (34-66%) y esteatosis severa o 3 ($>66\%$). Posteriormente, se evaluó la presencia de glóbulos hepatocelulares o el “*Balloning Degeneration*” (hepatocitos con forma cuboide y coloración pálida) y se clasificaron en tres grados: 0, en el caso de que no hubiera presencia; 1, si había pocos y 2, si había en abundancia. Por último, se evaluó la inflamación lobular (locus de inflamación del tejido) con un aumento x200 y las muestras se clasificaron de la siguiente forma: 0, sin locus; 1, <2 locus; 2, 2-4 locus y 3, >4 locus.

Para la valoración y discriminación de los pacientes con NASH se utilizó la puntuación “*The NAFLD Activity Score*” (NAS). Esta puntuación surge de la suma de las puntuaciones de esteatosis (0-3), globos hepatocelulares (0-2) e inflamación lobular (0-3). Los pacientes con una puntuación de NAS ≥ 5 fueron diagnosticados de NASH.

Por último, se evaluó el grado de fibrosis mediante la puntuación descrita por la asociación NASH Clinical Research Network (NASH-CRN). En base a esta puntuación, se clasificó a los pacientes en diferentes estadios: F0, sin fibrosis patológica; F1, fibrosis presinusoidal o periportal; F2, fibrosis perisinusoidal y portal/periportal sin puente; F3, fibrosis en puente y F4, cirrosis.

Western Blot

Para la determinación de proteínas mediante Western-Blot se realizaron homogenados con 30 mg de tejido hepático y 300 μ L de un tampón de lisis sacarosa 0,25 M, Pefabloc 1 Mm, y 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Alemania), utilizando un sonicador (Branson Sonifer 150, Thistle Scientific, Glasglow, Reino Unido). Finalmente, la concentración de proteína se cuantificó mediante NanoDrop (ThermoFisher, Madrid, España).

Tabla 3. Muestra la combinación de anticuerpos primario y secundario optimizada para cada una de las proteínas estudiadas.

	Ac primario	Dilución	Ac secundario	Dilución
FASN	Rabbit α -human/mouse <i>Cell signaling #3180</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000
TOM20	Rabbit mAb <i>Cell signaling #42406</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000
AMPK	Rabbit α -human/mouse <i>Cell signaling #2532S</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000
pAMPK	Rabbit α -human/mouse <i>Cell signaling #2531</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000
mTOR	Rabbit α -human/mouse <i>Cell signaling #2972</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/1000
pmTOR	pmTOR (Ser2448) Antibody <i>Cell signaling #2971</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/1000
pS6	pS6 Antibody <i>Cell signaling #4856</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/1000
p4EBP1	p4E-BP1 Antibody <i>Cell signaling #2855</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/1000
ATG7	Purified Rabbit polyclonal antibody ATG7 ABGENT (AP1813c)	1/100	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/1000
LC3B	LC3B Antibody <i>Cell Signaling #2775S</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000
p62	Rabbit α -human <i>Cell signaling #5114</i>	1/1000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000
LAMP2A	Abcam ab125068	1/2000	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/1000
FAH	Anti-FAH Millipore #ABN526	1/500	Goat α -rabbit HRP Dako ref P0448	1/5000

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS con gradiente del 8-14%, en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Seguidamente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF a través del sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, Madrid, España).

A continuación, dependiendo de la proteína a estudiar, se añadió una solución de bloqueo de BSA o leche al 5% a las membranas y se realizó la exposición de la membrana a los anticuerpos primario y secundario, recogidos en la Tabla 3. La detección quimioluminiscente se realizó mediante el reactivo de detección de Western-Blotting Amersham™ ECL Select™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y el sistema ChemiDoc (Bio-Rad, Madrid, España). Por último, las bandas fueron cuantificadas gracias al programa Image Lab (Version 3.0 build 11, Bio-Rad Laboratories).

Microscopía electrónica de transmisión

Una pequeña porción de las biopsias de tejido hepático se procesó para la observación mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras seleccionadas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón cacodílico 0,1 M a pH 7,4. Una vez depositadas en glutaraldehído, se enviaron a la Unitat de Microscòpia i Tècniques Nanomètriques del Servei de Recursos Científics i Tècnics (Universitat Rovira i Virgili). Esta unidad procedió a la inclusión en tetraóxido de osmio (OsO_4) y a la deshidratación en una secuencia de soluciones de acetona, para entonces ser impregnadas en concentraciones crecientes de resina en acetona. Se realizaron secciones de 500 nm, y se tiñeron con azul de toluidina al 1%. Mediante un cuchillo de diamante se obtuvieron cortes de tan solo 70 nm, a los que se sometió a una doble tinción con acetato de uranilo y citrato.

Finalmente, las muestras procesadas fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Hitachi, Tokio, Japón) con el objetivo de observar el estado de las mitocondrias de los pacientes con obesidad.

Análisis estadístico

Para evaluar nuestra hipótesis, se aplicaron diferentes pruebas estadísticas a los resultados obtenidos. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución normal de nuestras variables. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas por la prueba T-Student en el caso de variables paramétricas, con el test U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas y mediante la prueba de chi-cuadrado para las variables categóricas. Para ello, se utilizaron los programas SPSS 22.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) y el GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los valores con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos en todos los análisis.

RESULTADOS

Estudio clínico y bioquímico

La determinación de los parámetros clínicos y bioquímicos mostrados en la Tabla 4 se obtuvo a partir de las muestras de sangre de la población de estudio (n=270), formada por pacientes con obesidad de clase III.

Tabla 4. Principales características clínicas y bioquímicas del grupo de estudio.

	NAFL	Uncertain NASH	NASH
	(n=130)	(n=87)	(n=53)
Clinical characteristics			
Male, n (%)	29 (22.3)	23 (26.4)	18 (33.9)
Age, years	47 (41 - 57)	51 (42 - 59)	50 (42 - 58)
BMI, kg/m ²	45.7 (42.3 - 51.6)	48.6 (43.5 - 53.0) ^a	46.6 (42.5 - 51.9)
T2DM, n (%)	45 (34.6)	37 (42.5) ^a	29 (54.7) ^{b,c}
Hypertension, n (%)	76 (58.4)	57 (66.6)	41 (77.3) ^{b,c}
Dyslipidaemia, n (%)	40 (30.7)	35 (40.2)	23 (43.3) ^{b,c}
Medication, %			
Metformin	31 (23.8)	26 (29.8)	20 (37.7) ^b
Insulin	7 (5.3)	9 (10.3)	7 (13.2)
Sulfonylureas	7 (5.3)	3 (3.4)	7 (13.2)
ACEIs+ARABS	48 (36.9)	39 (44.8)	26 (49)
Diuretics	12.7 (9.7)	14 (16.1)	8 (15.1)
Statins	21 (15.9)	21 (24.1)	12 (22.6)
Complete blood count			
Hemoglobin, g/dL	13.0 (12.4 - 14.1)	13.2 (12.3 - 14.4)	13.4 (12.1 - 14.4) ^{b,c}
Leukocytes, x10 ⁹ /L	7.6 (6.2 - 9.6)	8.1 (6.5 - 9.4)	7.8 (6.6 - 8.7)
Platelets, x10 ⁹ /L	207.5 (184 - 254)	219.5 (188.5 - 257.7)	225.0 (179.0 - 249.5)
Ferritin, µg/L	55.0 (24.8 - 87.0)	32.1 (14.2 - 71.7) ^a	97.4 (24.5 - 202.45) ^{b,c}
Biochemical variables			
Total cholesterol, mmol/L	4.9 (4.5 - 5.4)	4.8 (4.1 - 5.6)	4.9 (4.3 - 5.5)
HDL-cholesterol, mmol/L	1.4 (1.1 - 1.7)	1.3 (0.9 - 1.4)	1.1 (0.9 - 1.4) ^{b,c}
LDL-cholesterol, mmol/L	2.8 (2.4 - 3.5)	2.9 (2.5 - 3.6)	2.8 (2.4 - 3.9)
Triglycerides, mmol/L	1.5 (1.1 - 2.0)	1.7 (1.4 - 2.2)	1.7 (1.2 - 2.3) ^{b,c}
Glucose, mmol/L	6.8 (6.0 - 8.4)	7.5 (6.4 - 9.9) ^a	7.8 (6.2 - 11.4) ^{b,c}
Insulin, pmol/L	97.9 (41.8 - 152.4)	83.3 (52.2 - 139.5) ^a	109.2 (65.1 - 193.7) ^{b,c}
HOMA-IR	4.1 (1.8 - 6.7)	4.4 (2.4 - 9.5) ^a	6.1 (3.4 - 8.7) ^{b,c}
Albumin, g/L	43.0 (40.0 - 44.0)	41.0 (36.0 - 44.0)	41.0 (36.6 - 44.0)
AST, µKat/L	0.5 (0.4 - 0.7)	0.5 (0.4 - 0.7)	0.7 (0.5 - 1.2) ^{b,c}
ALT, µKat/L	0.5 (0.3 - 0.8)	0.5 (0.4 - 0.7)	0.7 (0.5 - 1.2) ^{b,c}
GGT, µKat/L	0.3 (0.2 - 0.4)	0.3 (0.2 - 0.7)	0.5 (0.3 - 0.7) ^{b,c}
CRP, mg/L	5.1 (4.3 - 7.0)	5.6 (3.5 - 6.6)	5.8 (4.8 - 7.1)

ACEIs: angiotensin-converting-enzyme inhibitor; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; ARA-II: angiotensin II receptor antagonists; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; GGT: γ-glutamyl transpeptidase; HDL: high-density lipoprotein; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL: low-density lipoprotein; T2DM: type 2 diabetes mellitus. Diferencias significativas (p<0.05). **a** NAFL vs Uncertain NASH. **b** NAFL vs NASH. **c** Uncertain NASH vs NASH.

Observando los datos mostrados en la Tabla 4 se puede afirmar que no hay diferencias significativas en la población de estudio en cuanto a la edad ni el sexo. Además, el IMC fue considerablemente homogéneo gracias a los criterios de selección de pacientes, siendo todos ellos obesos de clase III. Todos estos datos hacen que la población de estudio sea homogénea, aportando consistencia a los resultados obtenidos.

Se evaluó la presencia de comorbilidades asociadas a la obesidad – DMT2, hipertensión y dislipidemia –, observándose un claro incremento en la incidencia de éstas en el grupo de pacientes NASH respecto al resto. A su vez, el porcentaje de pacientes que recibe medicación específica para la comorbilidad o comorbilidades que padece fue mayor en los pacientes de NASH. En cuanto al hematocrito, se observó un aumento significativo en la concentración de hemoglobina y de ferritina en los pacientes con NASH. En cambio, los niveles de leucocitos y plaquetas no mostraron cambios destacables.

Respecto a los parámetros bioquímicos analizados, en los pacientes con NASH se observó un incremento en la concentración de colesterol HDL y de triglicéridos. Sin embargo, el colesterol LDL y el colesterol total no sufrieron cambios significativos. Tanto la concentración de insulina como la de glucosa eran significativamente más altas en las muestras de sangre del grupo de pacientes con NASH. Este hecho se relacionó con el incremento del valor medio de HOMA-IR obtenido, indicando un mayor índice de resistencia a la insulina en los pacientes con NASH respecto al resto. No se observaron cambios relevantes en la concentración de albúmina, indicador de la cantidad de proteína en sangre, ni en la de proteína C reactiva (CRP), marcador de inflamación. No obstante, las transaminasas analizadas se vieron aumentadas de forma considerable en los pacientes NASH, indicando la presencia de un mayor daño hepático en este grupo de individuos respecto al resto.

Análisis histológico del tejido hepático

A pesar de que la NAFLD está asociada a la obesidad, la mayoría de los pacientes con obesidad tienen un hígado normal o presentan una simple NAFL. Tal y como se muestra en la tabla del Anexo 1, el grado de esteatosis y de inflamación fue considerablemente heterogéneo entre los pacientes obesos. Por este motivo, se realizó un estudio histológico de las biopsias de hígado obtenidas de todos los pacientes. Tal y como muestra la Figura 5, mediante las tinciones Hematoxilina & Eosina (H&E), Sirius Red y Tricrómico de Masson se pudo comprobar que existían diferentes grados de avance de la NAFLD en el grupo de estudio.

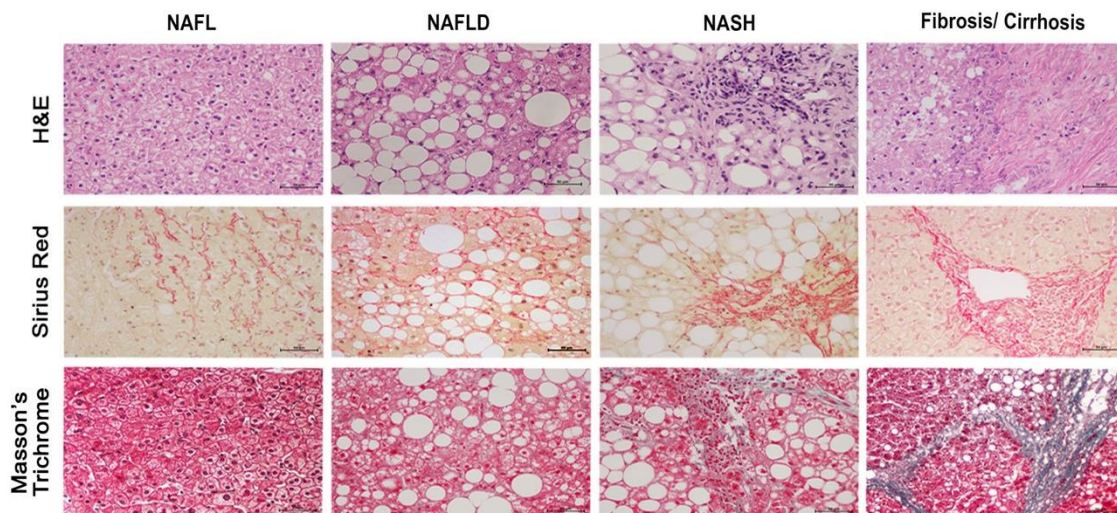


Figura 5. Micrografías de tejido hepático representativas de los diferentes grados de NAFLD presentes en el grupo de estudio.

En primer lugar, observamos que los pacientes con NAFL únicamente presentan indicios de acumulación de lípidos en forma de “*lipid droplets*”. Estas gotas lipídicas tienen mayor tamaño y se encuentran en mayor proporción en los pacientes con NAFLD y con NASH. En ellos, además, existe una clara desestructuración histológica del tejido hepático. Luego, se evaluó la presencia de fibrosis mediante la tinción de Tricrómico de Masson. Observamos que la fibrosis comienza a aparecer en los pacientes con NASH, y se hace considerablemente más evidente en los de cirrosis hepática.

Análisis del estado de las mitocondrias hepáticas

Se realizó un estudio para determinar el estado de las mitocondrias hepáticas. La finalidad de éste era establecer una relación clara entre la disfunción mitocondrial y el progreso desde una esteatosis hepática sin riesgo o NAFL hasta NASH.

Se escogieron 24 muestras de tejido hepático del grupo NAFL y otras 24 del grupo NASH; fueron procesadas y observadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Se determinaron cambios tanto cualitativos como cuantitativos en las mitocondrias de los hepatocitos de pacientes de NASH. Como se puede observar en la Figura 6, los pacientes de NASH presentan cambios evidentes en la morfología mitocondrial, como por ejemplo la pérdida de la estructura de la cresta mitocondrial. Además, el tamaño de éstas era más pequeño y se encontraban en menor abundancia.

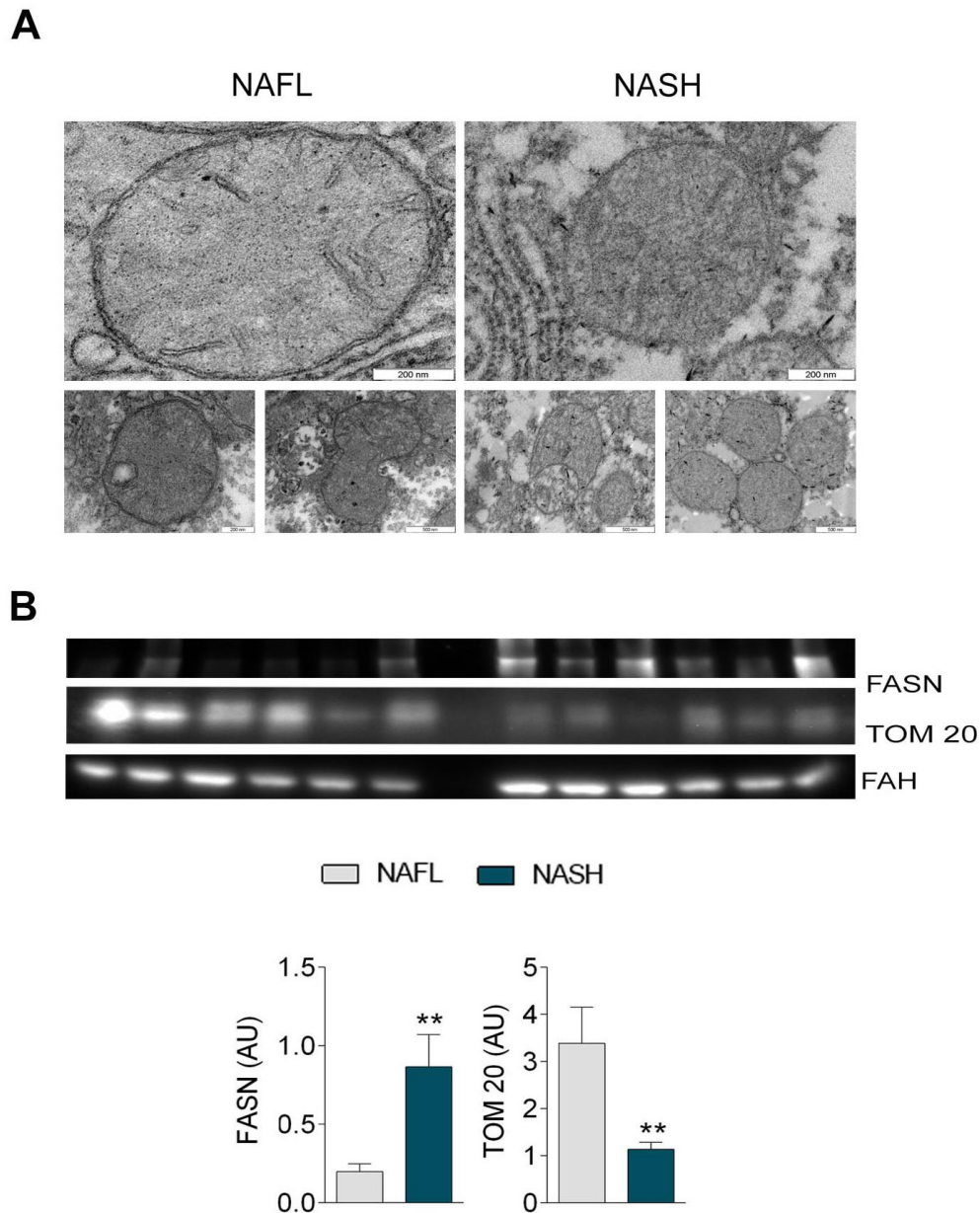


Figura 6. A: Imágenes de TEM que muestran el estado de las mitocondrias hepáticas. B: Resultados de Western Blot para FASN y TOM20, y cuantificación de la expresión.

La validez de los resultados interpretados a partir de las imágenes del TEM fue comprobada mediante la realización de Western Blot de “*Translocase of Outer Membrane*” (TOM20), proteína utilizada como marcador directo del número de mitocondrias, y de “*Fatty Acid Synthase*” (FASN), una enzima clave de la biosíntesis lipídica *de novo*.

La presencia de TOM20 fue significativamente menor en las muestras de los pacientes de NASH respecto a los de NAFL. Este hecho demuestra que la progresión de NAFL hasta NASH implica una reducción considerable del número de mitocondrias hepáticas. En cambio, la enzima FASN está significativamente incrementada en los pacientes de NASH debido a la alta presencia de gotas lipídicas en el hígado.

Evaluación del metabolismo energético

Para evaluar las diferencias existentes en el metabolismo energético de pacientes de NAFL respecto a los pacientes de NASH, se estudió la expresión de dos marcadores representativos del balance energético: AMPK y mTORC1.

Tanto AMPK como pAMPK, su forma activa, fueron detectados y cuantificados en las muestras de hígado mediante la técnica Western Blot. El ratio pAMPK/AMPK resultó significativamente más bajo en los pacientes de NAFL que en los de NASH, indicando que el avance de la patología hacia la esteatohepatitis comporta una disminución en la activación de AMPK (Figura 7).

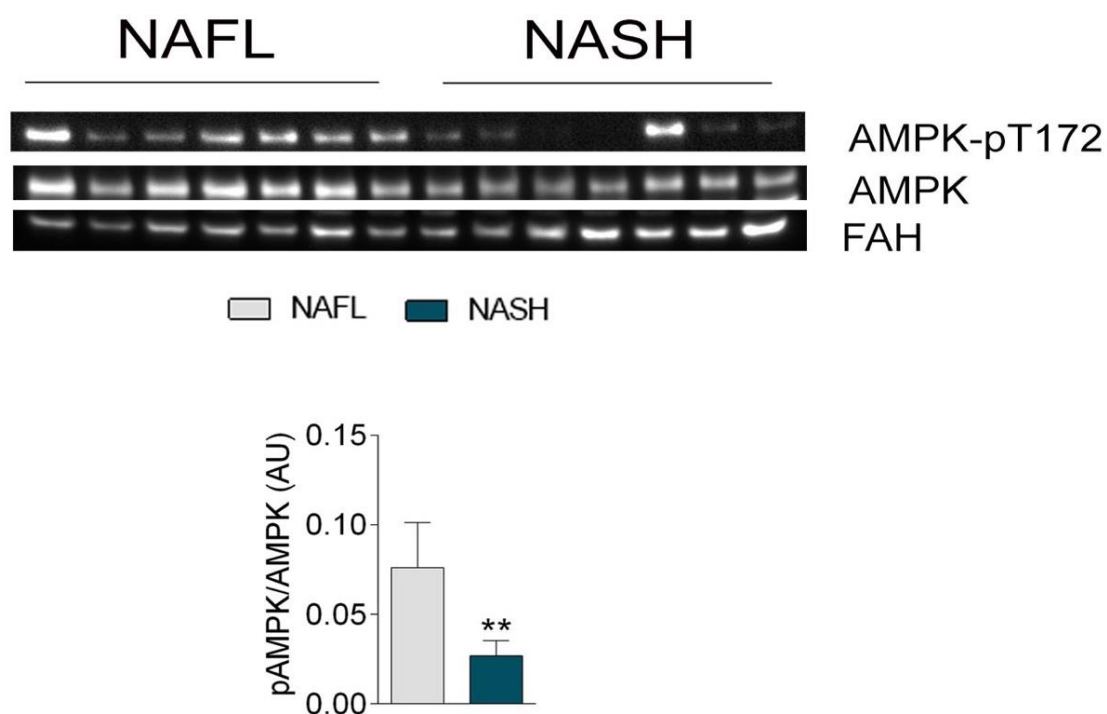


Figura 7. Representación gráfica de los resultados del Western Blot de AMPK y pAMPK y cuantificación de la expresión.

Posteriormente, se estudió la expresión de mTOR y pmTOR (forma activa de mTOR), así como de dos de sus dianas en su forma activa: pS6 y p4EBP1.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en los pacientes de NASH del ratio pmTOR/mTOR, así como de sus dianas, pS6 y p4EBP1 (Figura 8). Este hecho demuestra una clara relación entre la presencia de esteatohepatitis y el incremento en la activación de mTOR.

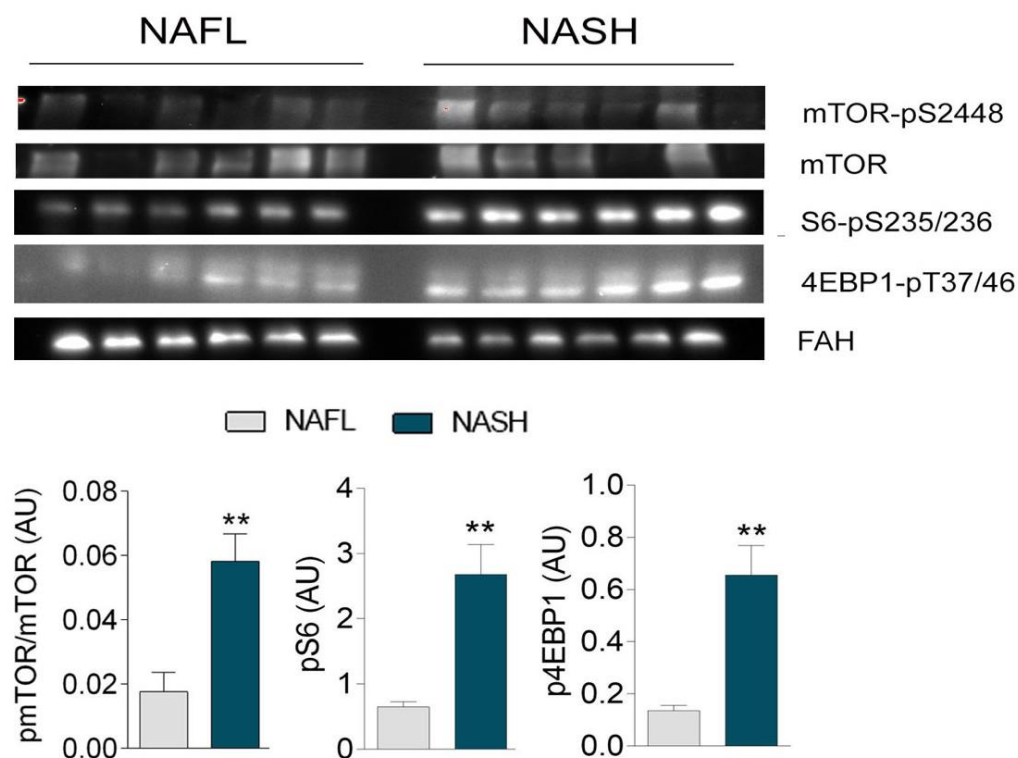


Figura 8. Representación gráfica de los resultados del Western Blot de mTOR, pmTOR, pS6 y p4EBP1, y cuantificación de la expresión en tejido hepático de todos ellos.

Autofagia

El proceso de autofagia es muy importante para el mantenimiento de la homeostasis celular. En presencia de nutrientes, múltiples factores, como las rutas de señalización de AMPK y mTORC1, regulan la autofagia mediante su inhibición.

Para comprobar el estado de activación del proceso de autofagia, se realizó la detección y la posterior cuantificación de algunas proteínas representativas de este proceso catabólico mediante Western Blot. Los componentes de la maquinaria de autofagia estudiados fueron: ATG7, LC3-I, LC3-II y LAMP2A.

Los resultados obtenidos demuestran que los pacientes NASH sufren una disminución en la función de la autofagia en el hígado, ya que la intensidad de las bandas resultó ser menor para LC3-I, LC3-II y LAMP2A. Paralelamente, se observó un aumento significativo en la expresión de ATG7 en los pacientes de NASH (Figura 9).

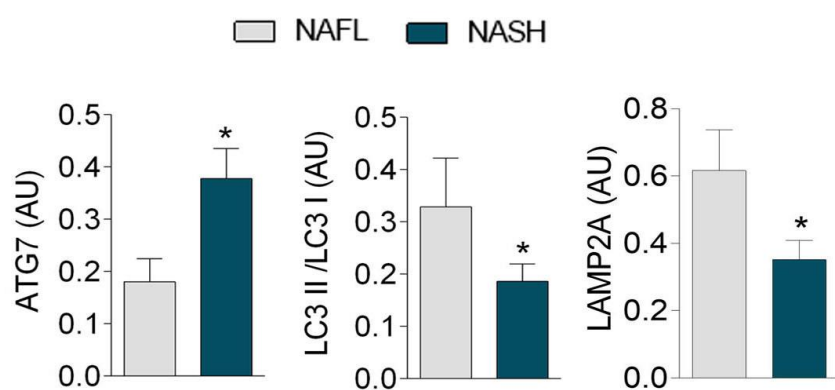
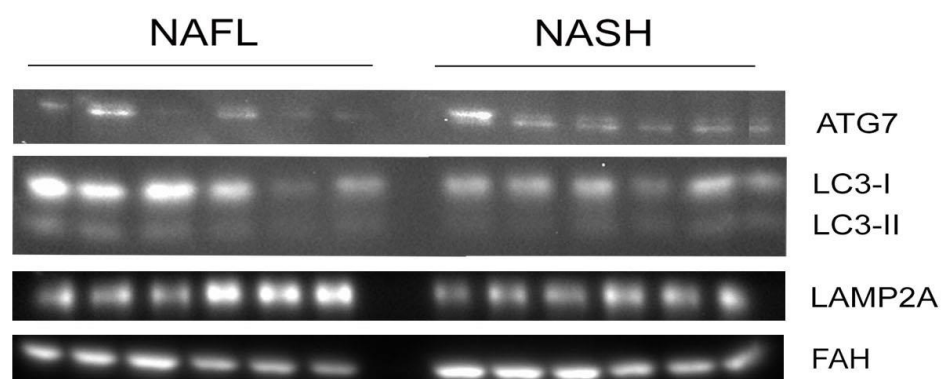


Figura 9. Representación gráfica de los resultados del Western Blot de los componentes de la maquinaria de autofagia ATG7, LC3-I, LC3-II y LAMP2A, y cuantificación de la expresión en tejido hepático de todos ellos.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha producido un enorme cambio en nuestro estilo de vida que ha comportado la eliminación de muchos de los hábitos saludables tradicionales. Actualmente nos comportamos de manera más sedentaria que en el pasado y, además, en nuestro patrón de alimentación se ha sustituido gran parte de los alimentos frescos por otros ultra-procesados que contienen cantidades ingentes de azúcares, grasas y sal. Todos estos cambios en la vida diaria han provocado un gran aumento en la prevalencia mundial de la obesidad, así como en la incidencia de las comorbilidades asociadas, en especial de la NAFLD [39].

En nuestra población de estudio observamos que en pacientes con obesidad extrema existen diferentes estadios de progresión de la NAFLD. Por este motivo, el objetivo principal del estudio fue determinar los mecanismos de progresión, más concretamente, establecer las diferencias metabólicas entre los pacientes de NAFL y los de NASH. Conocer más a fondo la progresión de la patología nos permitirá encontrar posibles biomarcadores y dianas terapéuticas que faciliten el diagnóstico temprano, así como la obtención de un tratamiento efectivo.

Al analizar los datos clínicos observamos que los pacientes, además de NAFLD, padecen otras comorbilidades asociadas, como DMT2, hipertensión y dislipemia, y que recibían medicación específica para cada una de ellas.

Respecto a los datos hematológicos obtenidos, se identificó un incremento significativo en los niveles de hemoglobina y ferritina de los pacientes NASH respecto al resto. Artículos recientes muestran una clara relación entre los niveles de ferritina y hemoglobina y el daño hepático existente en el avance de NAFL a NASH, estableciendo una correlación positiva entre los niveles de estas moléculas y un mayor índice de mortalidad [40-42]. Incluso se ha sugerido como diana terapéutica el metabolismo del hierro [40].

En cuanto al perfil lipídico, observamos que los niveles de colesterol HDL y de triglicéridos fueron considerablemente más altos en los pacientes con NASH, debido a una mayor acumulación de lípidos respecto a los pacientes de NAFL. Además, las concentraciones tanto de glucosa como de insulina eran mayores. Paralelamente, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) era más alto en los pacientes NASH, hecho consistente debido a que la resistencia a la insulina constituye el *“first hit”* en la patogénesis de la NAFLD [14]. Por último, las transaminasas, que constituyen un clásico indicador de daño hepático, sufren un claro incremento en el avance de NAFL a NASH.

A pesar de ello, estas enzimas no han sido validadas como biomarcador específico de NAFLD [43].

Se realizó un estudio histológico con el fin de comprobar los resultados del análisis de los parámetros bioquímicos en el estado del hígado. Se pudo observar que el grado de inflamación y de esteatosis era considerablemente heterogéneo en la población de estudio. Concretamente, los pacientes de NASH presentaban más gotas lipídicas y de mayor tamaño que el resto, junto con un nivel de inflamación y desestructuración del tejido significativamente, además de presentar, en algunos casos, estadios avanzados de fibrosis.

Diversos estudios han relacionado la progresión de NAFLD desde una simple esteatosis hepática hasta esteatohepatitis con la disfunción mitocondrial, ya que se trata de un orgánulo crucial en el metabolismo lipídico [14, 44, 45]. Por este motivo, decidimos llevar a cabo un estudio exhaustivo acerca del estado de las mitocondrias hepáticas de los pacientes. En primer lugar, se estudió su estructura mediante TEM y se concluyó que las mitocondrias hepáticas de los pacientes de NASH eran significativamente más pequeñas, se encontraban en muy baja cantidad y mostraban daños en la estructura de la cresta mitocondrial. Estos resultados fueron corroborados con los niveles significativamente menores de TOM20 en los pacientes con NASH, marcador por excelencia de número de mitocondrias [46].

La cuantificación de FASN sugirió un incremento significativo de la tasa de lipogénesis en los pacientes NASH. Diversos estudios han correlacionado el incremento en la cantidad de FASN con el grado de esteatosis hepática, afirmando además que el aumento en la expresión de esta enzima se encontraba regulado a nivel transcripcional. Este hecho ha sido demostrado mediante la obtención de una correlación positiva entre la expresión de "*sterol regulatory binding protein*" (SREBP1), el principal regulador transcripcional de FASN, y los niveles de expresión del mRNA de FASN, tanto *in vitro* como *in vivo* [47, 48].

Una vez comprobados los cambios en las mitocondrias hepáticas que conlleva la progresión de NAFL a NASH, debido a la gran importancia de este orgánulo en la producción de energía, se decidió evaluar el estado del metabolismo energético de los pacientes. El estudio se llevó a cabo mediante la identificación y cuantificación de AMPK y mTORC1, dos marcadores del balance energético. Los resultados indican que los pacientes de NASH tienen una disminución significativa en la activación de AMPK. Paralelamente, se determinó un incremento en la activación de mTORC1 asociado al avance de NAFL a NASH. AMPK, en presencia de nutrientes, actúa como inhibidor de mTORC1. A su vez, mTORC1 es capaz de inhibir el proceso de autofagia [30]. Debido a la

ruta de señalización que conecta AMPK con mTORC1, la disminución de la actividad de AMPK detectada en los pacientes NASH contribuye a la reducción en la función mitocondrial [20]. Además, la desmesurada activación de mTORC1 asociada a la NASH, provocará la inhibición de la autofagia. Se trata de un proceso imprescindible para la eliminación de componentes celulares dañados, tal y como sería el caso de las mitocondrias disfuncionales presentes en los pacientes de NASH [34], o de los propios lípidos almacenados en “*lipid droplets*” causantes de la esteatosis [49-51].

El desequilibrio entre la desactivación de AMPK y la activación de mTORC1 observado en los pacientes del grupo NASH nos llevó a estudiar más en detalle el proceso de autofagia. Los resultados indicaron una significativa disminución de la expresión de LC3-I, LC3-II y LAMP2A en los pacientes NASH respecto a los pacientes del grupo NAFL, por lo que el avance de la patología comporta una desactivación del proceso de autofagia. Sin embargo, obtuvimos unos niveles significativos de ATG7, importante precursor de la formación de los autofagosomas. Por ello, podemos determinar que, aunque haya un incremento en los precursores del proceso de macro-autofagia, finalmente la formación del autofagosoma no se llega a producir. La desactivación de la autofagia es doblemente perjudicial para los enfermos de NAFLD, ya que necesariamente favorecerá la esteatosis hepática. Por un lado, la inhibición de la mitofagia no permitirá eliminar las mitocondrias disfuncionales, por lo que se incrementará la liberación de ROS y disminuirá la tasa de β -oxidación lipídica [33, 34]. Por otro, no tendrá lugar el proceso de lipofagia y las gotas lipídicas que almacenan los hepatocitos no serán eliminadas [52].

Diversos estudios afirman que el α -cetoglutarato (α KG), el producto final de la ruta de glutaminólisis, tiene un papel importante como activador de mTORC1 [25, 26]. Generalmente, en las células cancerígenas se observa un incremento en la activación de la ruta de glutaminólisis, por lo que la ruta de mTORC1 se encontrará activa [24], provocando una inhibición de la autofagia [23]. Este conjunto de hechos hace de la inhibición del metabolismo de la glutamina, junto con la activación de AMPK, una potencial diana terapéutica para evitar la progresión de la esteatosis hepática hasta el hepatocarcinoma [53, 54].

CONCLUSIÓN

La NAFLD es una comorbilidad asociada a la obesidad. Sin embargo, en nuestra población de estudio, formada por pacientes con obesidad clase III, encontramos diferentes grados de daño hepático, de forma que algunos de los pacientes presentaban esteatohepatitis (NASH) y otros únicamente cierto grado de esteatosis hepática (NAFL). Por este motivo, se decidió realizar un estudio comparativo entre los pacientes de NAFL y los pacientes de NASH. Durante el estudio se identificaron cambios clínicos entre los dos grupos, así como cambios histológicos en el hígado. También se determinaron diferencias en el estado de las mitocondrias hepáticas, la activación de las moléculas AMPK y mTORC1, y, finalmente, en el proceso de autofagia.

Mediante este estudio, se ha conseguido determinar la gran importancia de la disfunción mitocondrial en la NAFLD, asociada a un desbalance en la ruta de señalización AMPK-mTORC1, hecho que provoca una desactivación de la autofagia. Sin embargo, son necesarios más ensayos para establecer de forma concreta el mecanismo molecular de la NAFLD, y así finalmente conseguir biomarcadores validados de progresión de la patología.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud. 2017 October 18. Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. [accessed 19 April 2018].
- [2] Engin A. (2016). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. Dins Basak A, Engin A (ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 1-17) Switzerland: Springer Nature.
- [3] De Lorenzo A, Soldati L, Sarlo F, Calvani M, Di Lorenzo N, Di Renzo L. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. *World Journal of Gastroenterology*. 2016 January 14;22(2):681-703.
- [4] Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 July 28;20(28):9330-9337.
- [5] Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinology*. 2014 April 8;2(3):901-910.
- [6] Woo Baidal JA, Lavine JE. The intersection of nonalcoholic fatty liver disease and obesity. *Science Translational Medicine*. 2016 January 27;8(323):323rv1.
- [7] Marra F, Gastaldelli A, Svegliati-Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine*. 2008 January 22;2(14):72-81.
- [8] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology*. 2017 September 20;15(1):11-20.
- [9] Malhotra N, Beaton MD. Management of non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World Journal of Hepatology*. 2015 December 28;7(30):2962-2967.
- [10] Ress C, Kaser S. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World Journal of Gastroenterology*. 2016 January 28;22(4):1664-1673.
- [11] Marquardt JU, Thorgeirsson SS. SnapShot: Hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Apr 14;25(4):550
- [12] Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. *Cell Metabolism*. 2017 January 9;27(1):22-41.
- [13] Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules*. 2015 Jul 21;5(3):1563-1579.
- [14] Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014 May 15;15(5):8713-8742.
- [15] Reccia I, Kumar J, Akladios C, Viridis F, Pai M, Habib N, Spalding D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism*. 2017 April 23;72:94-108.

- [16] Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, Varban OA, Finks JF, Zamarron BF, Flesher CG, Chang JS, DelProposto JB, Geletka L, Martinez-Santibanez G, Kaciroti N, Lumeng CN, O'Rourke RW. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Mar;24(3):597-605.
- [17] Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Medicine*. 2017 February 28;15(1):45.
- [18] Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: A tale of "second hit". *World Journal of Gastroenterology* 2013 February 28;19(8):1158-1165.
- [19] Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*. January 2014;4(1):177-197
- [20] Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hébrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiologica* 2009; 196(1):81–98.
- [21] Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in cell biology*. 2016 March;26(3):190-201.
- [22] Rourke JL, Hu Q, Sreter RA. AMPK and Friends: Central Regulators of b Cell Biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2018 February;29(2):111-122.
- [23] Perl A. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015 June;1346(1):33–44.
- [24] Blenis J. TOR, the gateway to cellular metabolism, cell growth and disease. *Cell*. 2017 September 21;171(1):10-13.
- [25] Villar VH, Nguyen TL, Delcroix V, Terés S, Bouche-careilh M, Salin B, Bodineau C, Vacher P, Priault M, Soubeyran P, Durán RV. mTORC1 inhibition in cancer cells protects from glutaminolysis-mediated apoptosis during nutrient limitation. *Nature Communications*. 2017 January 23;8:14124.
- [26] Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, Hall MN. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signalling. *Molecular Cell*. 2012 August 10;47(3):349-358.
- [27] Kim I, He YY. Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2013 July 15;3:175.
- [28] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008 January 11;132(1):27-32.
- [29] Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell*. 2016 July 14;166(2):288-298.
- [30] Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic Control of Autophagy. *Cell*. 2014 December 4;159(6):1263-1276.

- [31] Cicchini M, Karantza V, Xia B. Molecular Pathways: Autophagy in Cancer—A Matter of Timing and Context. *Clinical Cancer Research*. 2015 Feb 1;21(3):498-504.
- [32] Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. 2016 July 28;166(3):555-566.
- [33] Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology*. 2014 November 20;4:6-13.
- [34] Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry*. 2012 April 7;393(7):547–564.
- [35] Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014 June 3;15(6):9924-9944.
- [36] Ciupińska-Kajor M, Hartleb M, Kajor M, Kukla M, Wyleżół M, Lange D, Liszka L. Hepatic angiogenesis and fibrosis are common features in morbidly obese patients. *Hepatology International*. 2013 Mar;7(1):233-240.
- [37] Knopfholz J, Disserol CC, Pierin AJ, Schirr FL, Streisky L, Takito LL, Massucheto Ledesma P, Faria-Neto JR, Olandoski M, da Cunha CL, Bandeira AM. Validation of the friedewald formula in patients with metabolic syndrome. *Cholesterol*. 2014;2014:261878.
- [38] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-1321.
- [39] Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *The American Journal of Managed Care*. 2016 June;22(7):176-185.
- [40] Ryan JD, Armitage AE, Cobbold JF, Banerjee R, Borsani O, Dongiovanni P, Neubauer S, Morovat R, Wang LM, Pasricha SR, Fargion S, Collier J, Barnes E, Drakesmith H, Valenti L, Pavlides M. Hepatic iron is the major determinant of serum ferritin in NAFLD patients. *Liver International*. 2018 Jan;38(1):164-173.
- [41] Hagström H, Nasr P, Bottai M, Ekstedt M, Kechagias S, Hultcrantz R, Stål P. Elevated serum ferritin is associated with increased mortality in non-alcoholic fatty liver disease after 16 years of follow-up. *Liver International*. 2016 Nov;36(11):1688-1695.
- [42] Jiang Y, Zeng J, Chen B. Hemoglobin combined with triglyceride and ferritin in predicting non-alcoholic fatty liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(7):1508-1514.
- [43] Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver International*. 2013 Oct;33(9):1398-1405.

- [44] Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1183-1192.
- [45] Boland ML, Oldham S, Boland BB, Will S, Lapointe JM, Guionaud S, Rhodes CJ, Trevaskis JL. Nonalcoholic steatohepatitis severity is defined by a failure in compensatory antioxidant capacity in the setting of mitochondrial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*. 2018 April 28; 24(16):1748-1765.
- [46] Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T, Gerber AP, Pines O, Rapaport D, Arava Y. Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology*. 2010 Jan; 30(1): 284–294.
- [47] Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, Gäbele E, Kristiansen G, Hartmann A, Hellerbrand C. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2010;3(5):505-514
- [48] Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*. 2016 Sep 17;15(1):159.
- [49] Madrigal-Matute J, Cuervo AM. Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. *Gastroenterology*. 2016;(150):328–339
- [50] Czaja MJ. Function of Autophagy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Science*. 2016 May;61(5):1304-1313.
- [51] Yan S, Huda N, Khambu B, Yin XM. Relevance of autophagy to fatty liver diseases and potential therapeutic applications. *Amino Acids*. 2017 Dec;49(12):1965-1979.
- [52] Zhang Z, Yao Z, Chen Y, Qian L, Jiang S, Zhou J, Shao J, Chen A, Zhang F, Zheng S. Lipophagy and liver disease: New perspectives to better understanding and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Jan;(97):339-348.
- [53] Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews: Cancer*. 2016 Oct;16(10):619-634.
- [54] Villar VH, Merhi F, Djavaheri-Mergny M, Durán RV. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy*. 2015;11(8):1198-1208.

AUTOEVALUACIÓN

La realización de las Prácticas Externas y el Trabajo de Final de Grado en la URB me ha permitido adentrarme en el ámbito de la investigación biomédica, con todo lo que ello conlleva. Además, ha sido una buena oportunidad para informarme de primera mano acerca de la obesidad y sus comorbilidades asociadas, así como de la importancia que tiene el metabolismo energético en nuestro estado de salud.

Respecto a mi desarrollo personal, he podido aprender a realizar diferentes técnicas rutinarias en este campo y he comprobado la gran importancia que tiene saber trabajar en grupo en un laboratorio de investigación.

Durante la realización de mi Trabajo de Final de Grado he mejorado algunos aspectos muy importantes de cara a mi futuro profesional, entre ellos, la búsqueda efectiva de información en diferentes bases de datos y la correcta organización de ésta. También me ha aportado pensamiento crítico, algo imprescindible para la obtención e interpretación de los resultados obtenidos.

ANEXO

Tabla 5. Clinical Research scoring system definitions and scores

Histologic Feature of NAFLD	Definition	Score	Percent with Diagnosis of NASH
			(n=270)
Steatosis Grade			
	≤5%	0	34
	5-33%	1	24
	>33-66%	2	33
	>66%	3	10
Lobular inflammation	No foci	0	21
	<2 foci	1	32
	2-4 foci	2	35
	>4 foci	3	12
Ballooning degeneration	None	0	42
	Few	1	53
	Many	2	5
Fibrosis stage	None	0	17
	Perisinusoidal or periportal	1	21
	Mild, zone 3, perisinusoidal	1A	5
	Moderate, zone 3, perisinusoidal	1B	13
	Portal/periportal	1C	4
	Perisinusoidal and portal/periportal	2	32
	Bridging fibrosis	3	8
	Cirrhosis	4	1
Diagnostic classification	Not steatohepatitis	0	130
	NAS score ≤2		
	Possible/borderline	1	87
	NAS score 3-4		
	Definite steatohepatitis	2	53
	NAS score >5		

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, querría agradecer al Dr. Jorge Joven Maried la gran oportunidad otorgada para realizar las Prácticas Externas y el Trabajo de Fin de Grado, que me permitió incorporarme a las tareas de investigación llevadas a cabo en la Unitat de Recerca Biomèdica. Por otro lado, me gustaría hacer mención de la cálida acogida obtenida por parte de todos los miembros del centro, ya que me han hecho sentir parte del grupo de investigación desde el primer día de mi estancia. Querría destacar el enorme apoyo obtenido por parte de Noemí Cabré Casares, por todo el tiempo invertido en mi aprendizaje y en las correcciones realizadas en el trabajo, y de la Dra. Anna Hernández Aguilera, por tener siempre una solución para todo. En definitiva, la realización de mis Prácticas Externas en la URB ha sido cuanto menos gratificante gracias a la calidad humana del personal investigador y del resto de estudiantes de prácticas.