



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

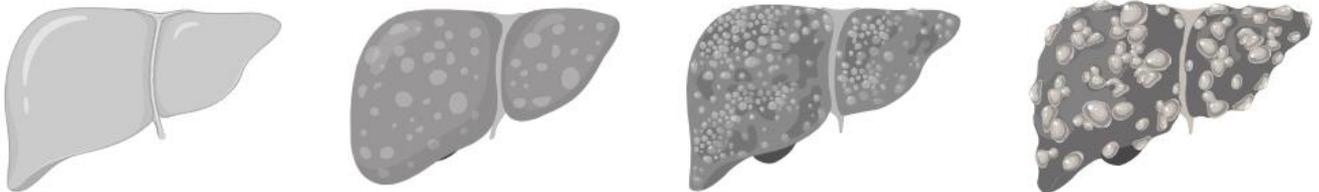
HJ23

Hospital Universitari Joan XXIII
ICS Camp de Tarragona

DESREGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Ángela Pastor Senovilla

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Gerard Aragonès, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, gerard.aragones@urv.cat

Supervisora: Dra. María Teresa Auguet, Departamento de Medicina y Cirugía, tauguet.hj23.ics@gencat.cat

Julio 2020

Yo, Ángela Pastor Senovilla, con DNI 70268901Z, soy concedora de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio* en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en Julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competenciesnuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 2 de julio de 2020



(firma)

ÍNDICE

Agradecimientos	5
Datos del centro	6
Resumen y palabras clave	7
Abreviaciones	8
Introducción	10
1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)	10
1.1 Definición.....	10
1.2 Prevalencia, incidencia y factores de riesgo	10
1.3 Clasificación	12
1.4 Comorbilidades y mortalidad	13
1.5 Fisiopatología de la EHGNA. Hipótesis del múltiple “hit”.....	14
1.6 Diagnóstico y pronóstico.....	16
1.7 Tratamiento	17
2. <i>Toll-like receptors</i> y la EHGNA	19
3. Proteínas Notch.....	20
3.1 Vía de señalización de Notch	20
3.2 Patologías implicadas.....	21
3.3 Implicación de Notch en la EHGNA	21
Hipótesis y objetivos	24
Materiales y métodos	25
1. Población de estudio	25
2. Tamaño de la muestra.....	25
3. Análisis histopatológicos del hígado	25
4. Análisis bioquímicos	25
5. Extracción de ARN y PCR cuantitativa	26
6. Análisis estadístico.....	27
Resultados	28
1. Características básicas de la población de estudio	28
2. Evaluación de los receptores Notch y la expresión de los ligandos según la histología hepática	29
3. Correlaciones entre la expresión hepática de HES5 con la expresión hepática de otros receptores y ligandos de Notch	29
4. Correlaciones de la expresión de los receptores y ligandos de Notch con los parámetros de biología hepática y parámetros metabólicos de la glucosa	30

5. Correlaciones del receptor Notch del hígado y la expresión de los ligandos con los genes implicados en el metabolismo de los lípidos y los parámetros bioquímicos de los lípidos	30
6. Correlaciones de los receptores y ligandos Notch del hígado con los niveles circulantes de citocinas	31
7. Correlaciones de los receptores y ligandos Notch del hígado con los TLRs	32
Discusión	33
Conclusión	37
Bibliografía.....	39
Autoevaluación	42

I. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación cito y a las que agradezco enormemente su ayuda.

A mi familia, en especial a mis padres, por darme la educación necesaria para llegar hasta donde estoy, por creer en mí y apoyarme en todo momento.

A mis amigos y a todas las personas que me han acompañado durante estos años, por sus ánimos y su apoyo constante.

A Gerard Aragonès por tutorizar el trabajo y asesorarme durante la realización del mismo.

Y, por último, me gustaría mostrar mi agradecimiento a la Dra. María Teresa Auguet, por confiar en mí desde el primer momento y brindarme la oportunidad de poder realizar las prácticas, así como el trabajo final de grado en su grupo de investigación. Pero, sobre todo, a Laia Bertrán, por haber sido mi mentora y haberme ofrecido su ayuda de manera desinteresada, por haber dedicado tanto tiempo en supervisar el trabajo, por aconsejarme y guiarme en mi futuro como biotecnóloga.

Gracias.

II. DATOS DEL CENTRO

Este Trabajo Final de Grado se ha realizado a partir de los datos obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo por el Grupo de Enfermedades Metabólicas Asociadas a la Insulino-Resistencia (GEMMAIR), acreditado por la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación (AGAUR) y reconocido por la Universidad Rovira i Virgili (URV). Pertenece al Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV).

El IISPV es un instituto de investigación biomédica de la provincia de Tarragona, siendo un centro de referencia tanto a nivel nacional como internacional. Se fundó en 2005 en el marco de un convenio de colaboración científica interinstitucional entre el Instituto Catalán de la Salud (Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Hospital Universitario Sant Joan de Reus y Hospital Universitario Instituto Pere Mata) y la URV.

Tiene como finalidad promover, desarrollar, gestionar y difundir la investigación, el conocimiento científico y tecnológico, la docencia y la formación en el ámbito de las ciencias de la vida y de la salud.

Se organiza en tres áreas diferentes de investigación: Nutrición y Metabolismo, Neurociencias y Salud Mental, y Salud y Medio Ambiente. El área de Nutrición y Metabolismo está formada por numerosos grupos de investigación que cuentan con personal capacitado y, entre los que se encuentra GEMMAIR, liderado por la Dra. María Teresa Auguet y cuyo objetivo principal es el estudio de la fisiopatología de la obesidad y síndrome metabólico, así como de la hepatopatía grasa asociada.

III. RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es el trastorno hepático más común y afecta aproximadamente al 25% de la población mundial. Esta enfermedad comprende desde la esteatosis simple (ES) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis y fibrosis. La biopsia hepática es la técnica de referencia para la detección de la EHNA, pero es una prueba muy invasiva, por lo que se necesitan nuevas alternativas para su diagnóstico.

Las proteínas de la vía de señalización Notch se han visto implicadas en el desarrollo de la fibrosis, por lo que la desregulación de esta vía parece desempeñar un papel en la patogenia de la EHGNA. El objetivo de este estudio fue analizar la relación entre la vía Notch, el metabolismo lipídico y los receptores TLR.

Se evaluó el nivel de expresión hepática de los diferentes genes estudiados en el tejido hepático de una cohorte de mujeres con obesidad mórbida con histología hepática normal o con EHGNA. Se observó una disminución en la expresión de HES5 que se correlacionó positivamente con la expresión de HES1, HEY1 y Notch3. Además, HES5 se correlacionó positivamente con SREBP1c. Se vio una correlación de Notch3 con varios genes del metabolismo lipídico hepático. Al analizar la asociación entre las proteínas Notch y los niveles circulantes de citocinas, se observó una correlación positiva entre la expresión de HES5 y los niveles de IL-13, y entre HEY1 e IL-6. Por su parte, Notch2 se correlacionó positivamente con TLR2, TLR4 y TLR9, así como Notch1 se correlacionó positivamente con TLR9.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la expresión hepática de las proteínas y ligandos de Notch en relación con las vías del metabolismo lipídico hepático podría tener un papel en la patogénesis de la EHGNA, aunque se necesitan estudios adicionales para confirmar estos resultados.

Palabras clave: esteatohepatitis, esteatosis, obesidad, receptores *toll-like*

IV. ABREVIACIONES

ABCA1, proteína transportadora de casetes de unión a ATP subfamilia A miembro 1

ABCG1, proteína transportadora de ATP G1

ACC1, acetil-CoA carboxilasa 1

AGL, ácidos grasos libres

Akt, serina/treonina quinasa

ALP, fosfatasa alcalina

ALT, alanina aminotransferasa

AST, aspartato aminotransferasa

CCR2, receptores de quimiocina CC tipo 2

CCR5, receptores de quimiocina CC tipo 5

CHC, carcinoma hepatocelular

CPT1A, carnitina palmitoiltransferasa 1a

CROT, carnitina O-octanoiltransferasa

DDL, ligando de proteína similar a delta

DMT2, diabetes mellitus tipo 2

ECC, enfermedad cardiaca coronaria

ECV, enfermedad cardiovascular

EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólica

EHNA, esteatohepatitis no alcohólica

ES, esteatosis simple

FAS, ácido graso sintasa

FoxO1, proteína de caja de horquilla O1

FXR, receptor X farnesoide

G6pc, subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa

GGT, gamma-glutamyl transferasa

GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1

HbA1c, hemoglobina glicosilada

HDL, lipoproteínas de alta densidad

HES, *hairy enhancer of Split*

HES1, factor de transcripción 1 de la familia HES

HES5, factor de transcripción 5 de la familia HES

HEY, familia relacionada con Hes

HEY1, factor de transcripción 1 de la familia HEY

HEY2, factor de transcripción 2 de la familia HEY

HGNA, hígado graso no alcohólico

HN, hígado normal

HOMA1, modelo de homeostasis de insulino-resistencia

IL-10, interleucina 10

IL-13, interleucina 13

IL-17, interleucina 17

IL-1 β , interleucina 1 β

IL-22, interleucina 22

IL-6, interleucina 6

IL-8, interleucina 8

IMC, índice de masa corporal

IRM, imagen por resonancia magnética

JNK, quinasa c-Jun N-terminal

LDL, lipoproteínas de baja densidad

LOXL-2, lisil oxidasa 2

LPS, lipopolisacáridos

LXR- α , receptor hepático X alfa

MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1

mTOR, diana de la rapamicina en mamífero

MyD88, respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NECD, dominio extracelular de Notch

NF- κ B, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NICD, dominio intracelular de Notch

NOTCH1, factor de transcripción 1 de la familia Notch

NOTCH2, factor de transcripción 2 de la familia Notch

NOTCH3, factor de transcripción 3 de la familia Notch

NOTCH4, factor de transcripción 4 de la familia Notch

OM, obesidad mórbida

PAD, presión arterial diastólica

PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos

PAS, presión arterial sistólica

PI3K, fosfoinositol 3-quinasa

PPAR, receptores activados por proliferadores de peroxisomas

PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina

RI, resistencia a la insulina

RT-qPCR, PCR cuantitativa en tiempo real

SM, síndrome metabólico

SREBP1c, proteína 1c de unión a elementos reguladores de esteroides

TC, tomografía computarizada

TG, triglicéridos

TLR, receptores tipo *toll*

TLR2, receptor 2 tipo *toll*

TLR4, receptor 4 tipo *toll*

TLR9, receptor 9 tipo *toll*

TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa

tPAI-1, inhibidor del activador de plasminogeno total 1

VLDL, lipoproteína de muy baja densidad

V. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

1.1 DEFINICIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM) y se define como la acumulación excesiva de grasa en el hígado en pacientes que no consumen alcohol en cantidades significativas (<20 g/día en hombres y <10 g/día en mujeres). La EHGNA se está convirtiendo en un problema de salud cada vez más importante ya que se considera la causa más común de enfermedad hepática crónica en el mundo occidental, y su incidencia está aumentando rápidamente.¹

La EHGNA comprende una variedad de afecciones hepáticas que se extienden desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica. Esta enfermedad comienza con la acumulación de grasa en el hígado, el cual puede permanecer graso sin alterar la función hepática, lo que se denomina esteatosis simple (ES). Sin embargo, debido a diversos factores como la obesidad, la dislipemia o la edad, la ES puede progresar a una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y acabar provocando complicaciones como fibrosis, cirrosis y, en última instancia, carcinoma hepatocelular (CHC). En este punto, el trasplante de hígado puede llegar a ser indispensable para evitar la muerte del paciente.¹

1.2 PREVALENCIA, INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO

La prevalencia real de la EHGNA en la población general se desconoce y probablemente se sobreestime debido a la ausencia de un método de cribado aceptado, a que la determinación del estadio de la enfermedad requiere un procedimiento diagnóstico invasivo y a que no existe consenso sobre su caracterización. No obstante, la estimación más precisa de la prevalencia global de la EHGNA es aproximadamente del 25%, una cifra reportada por primera vez en 2005 en el estudio de Dionysos² y confirmada posteriormente por Younossi et al.,³ quienes describieron en el año 2016 que las tasas más altas reportadas se registraron en Oriente Medio (32%), América del Sur (31%), Estados Unidos (30%), Asia (24%) y Europa (24%), mientras que la prevalencia más baja se registró en África (14%). Los últimos datos obtenidos sobre la epidemiología de la EHGNA en el año 2020 confirman la prevalencia del 25% en la población mundial.⁴

Respecto a Europa, las tasas de prevalencia de la EHGNA varían entre los diferentes países. Un estudio llevado a cabo en Alemania determinó que la prevalencia del hígado graso por ultrasonido era del 29,9%. Se han descrito tasas similares en Italia (25%), España (25,8%) y Reino Unido (26,4%). En Europa del Este, la prevalencia de la enfermedad fue del 22,6% en Hungría y del 20% en Rumania.^{4,5}

Además, se han identificado variaciones en la prevalencia entre diferentes grupos étnicos de la población. Mientras que la prevalencia más alta de la EHGNA en EE.UU. se observó en hispanos seguidos por individuos blancos no hispanos, la prevalencia más baja se observó en afroamericanos. Esto puede deberse a una mayor frecuencia de variantes de riesgo genético como el polimorfismo genético PNPLA3, en particular la variante rs738409.⁶

En 2008, Romeo et al.⁷ informaron que el polimorfismo de un solo nucleótido PNPLA3 en el residuo 148 en la secuencia de ADN, lo que resulta en una sustitución de metionina por isoleucina, era un determinante genético de la EHGNA. Desde entonces, la correlación entre PNPLA3 y la EHGNA se ha estudiado en profundidad. Posteriormente, Aragonès et al.⁸ observaron que la expresión de PNPLA3 en el hígado aumentó en mujeres caucásicas con obesidad mórbida y EHGNA, por lo que se demostró una relación entre PNPLA3 y los grados histológicos de la enfermedad. En línea con estas investigaciones, Li et al.⁹ llevaron a cabo un metanálisis para verificar las asociaciones entre el polimorfismo y la susceptibilidad a desarrollar CHC. Los resultados concluyeron que existe una asociación significativamente mayor entre el polimorfismo rs738409 y el riesgo de CHC en las poblaciones estudiadas. Curiosamente, esta variante genética es dos veces más frecuente en los hispanos que en los afroamericanos (40% frente a 19%). Por lo tanto, se demostró que rs738409 está fuertemente relacionada con la susceptibilidad de los pacientes con EHGNA a presentar esteatosis, esteatohepatitis, fibrosis y CHC.¹

A pesar de los resultados relativamente robustos sobre la prevalencia de la EHGNA, los datos sobre la incidencia de EHGNA y EHNA son bastante limitados. Se ha visto que oscilan entre 28,01 y 52,34 por 1000 personas/año.¹⁰

A parte de la posesión de la variante genética rs738409, la edad también es un importante factor de riesgo para la EHGNA. Se ha observado que a medida que aumenta la edad, también lo hace la prevalencia de la EHGNA y de la fibrosis asociada a la EHNA. Se ha determinado menos de un 20% de prevalencia en menores de 20 años, mientras que los mayores de 60 presentan una prevalencia de más del 40%. Aunque hay una menor prevalencia en niños (2,6%) en comparación con los adultos, esta aumenta de manera considerable en los niños obesos, que oscilan entre el 10 y el 80%.⁶

Además de la edad, estudios anteriores sugirieron que el género femenino estaba asociado a un mayor riesgo de EHGNA. Sin embargo, los hombres de joven a mediana edad tienen un mayor riesgo que las mujeres de la misma edad a padecer EHGNA. En consecuencia, las mujeres premenopáusicas tienen una prevalencia relativamente baja. No obstante, la prevalencia en mujeres aumenta después de los 50 años, alcanzando su punto máximo entre los 60 y 69 años y disminuyendo después de los 70 años. Este hecho se ha atribuido a cambios naturales en la fisiología femenina, como resistencia a la insulina (RI), obesidad, distribución adiposa y hormonas sexuales.¹¹

Fumar, el consumo de alcohol, así como la dieta son otros factores de riesgo asociados con la EHGNA. Las dietas que siguen un modelo occidentalizado caracterizadas por un consumo excesivo de carnes rojas, alimentos procesados, grasas saturadas y azúcares refinados, se asocian con una mayor probabilidad de desarrollar SM y posterior EHGNA.¹² Con respecto al alcohol, se ha sugerido que el consumo moderado (una bebida alcohólica al día) es protector para la EHGNA. Un estudio en ratones ob/ob mostró que cantidades moderadas de alcohol produjeron menos esteatosis, inflamación y menos transaminasas en comparación con los controles.¹³ Por otro lado, en un estudio retrospectivo, Akhavan et al.¹⁴ demostraron que fumar está significativamente asociado con la EHGNA, así como que el tabaquismo pasivo aumenta la prevalencia de padecer la enfermedad.

Estos datos determinan que la prevalencia de la EHGNA se expande paralelamente con el aumento global de la obesidad y otras comorbilidades como la diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2) y el SM. El SM engloba una serie de características como el aumento de la circunferencia de la cintura (es decir, obesidad), hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión sistémica.¹⁵ Las personas que presentan SM tienen predisposición a

desarrollar diabetes y enfermedad cardiovascular. Se ha visto que hasta un 75% de las personas con diabetes tienen EHGNA, además de mostrar un riesgo muy alto de desarrollar EHNA y progresar a un estado de cirrosis y fibrosis.¹²

1.3 CLASIFICACIÓN

Como ya se ha mencionado anteriormente, la EHGNA se define como la acumulación excesiva de grasa en más del 5% de los hepatocitos con poco o ningún consumo de alcohol. Esta patología comprende tanto la ES como la EHNA.¹⁶

La ES es la retención anormal de grasa en forma de triglicéridos en el hígado. Inicialmente, los hepatocitos presentan pequeñas vacuolas intracitoplasmáticas de grasa (liposomas) alrededor del núcleo, proceso que se conoce como esteatosis microvesicular, donde múltiples gotas de grasa se acumulan en las células hepáticas y no desplazan el núcleo ubicado en el centro. Sin embargo, esta puede avanzar hasta una esteatosis macrovesicular que se caracteriza porque el tamaño de las vacuolas aumenta, empujando el núcleo hacia la periferia de la célula.¹⁷ Por tanto, la ES se puede clasificar en diferentes niveles. La esteatosis de grado 1 se refiere a menos del 33% de los hepatocitos. En cambio, en los grados 2 y 3, la grasa está presente en, al menos, un 33 o 66% de los hepatocitos, respectivamente.¹⁸

La EHNA incluye la presencia de esteatosis, inflamación lobular y balonamiento hepatocelular (acúmulo de agua y proteínas en el citoplasma del hepatocito) con o sin fibrosis. Mientras que la ES es generalmente benigna y no progresiva, la EHNA puede evolucionar hacia la cirrosis y, en determinados casos, progresar a CHC (Figura 1).¹⁹

Por otro lado, la fibrosis hepática es el resultado de la respuesta de cicatrización del hígado por lesiones repetidas. Después de una lesión hepática, las células se regeneran y reemplazan aquellas que son necróticas o apoptóticas. Este proceso está asociado con una respuesta inflamatoria y un depósito de proteínas de matriz extracelular, incluido el colágeno fibrilar. Si la lesión hepática persiste, la regeneración del hígado falla y conduce a una cirrosis hepática avanzada, donde el tejido cicatrizante sustituye al parénquima normal, dejando disfuncional al tejido afectado.²⁰

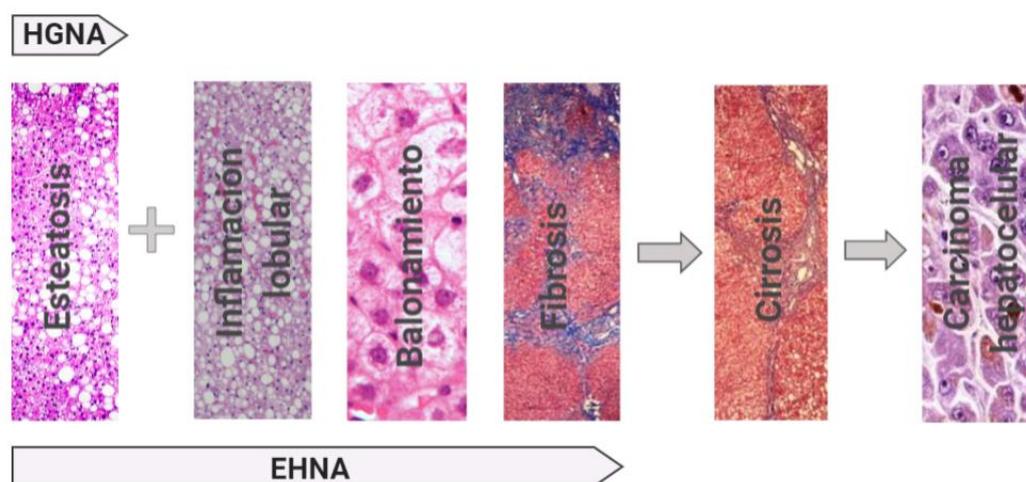


Figura 1. Progresión de la EHGNA (enfermedad del hígado graso no alcohólico). La forma benigna de la EHGNA, HGNA (hígado graso no alcohólico), progresa a EHNA (esteatohepatitis no alcohólica) con o sin fibrosis. Posteriormente, la EHNA conduce a cirrosis y en última instancia, a carcinoma hepatocelular. Fuente: Elaboración propia

1.4 COMORBILIDADES Y MORTALIDAD

La carga clínica de la EHGNA no se limita solamente a la morbilidad y mortalidad relacionadas con el hígado ya que se ha demostrado que la EHGNA es una enfermedad multisistémica.²¹ La EHGNA se encuentra fuertemente asociada al SM (obesidad, RI, hiperlipidemia combinada, DMT2 e hipertensión), por lo que también está relacionada con enfermedades extrahepáticas como la apnea del sueño, cáncer colorrectal, osteoporosis, psoriasis y diversas endocrinopatías como el síndrome del ovario poliquístico, según se muestra en la Figura 2.

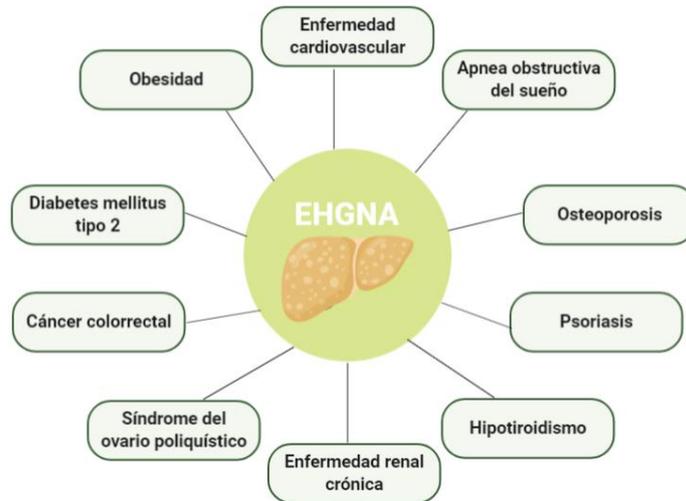


Figura 2. Principales comorbilidades asociadas a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Fuente: Elaboración propia

La Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición 2015-2016 determinó que las principales causas de muerte de pacientes con EHGNA fueron enfermedad cardiovascular (9,3%) y malignidad por neoplasia (5%) y el porcentaje de mortalidad de las complicaciones relacionadas con la enfermedad hepática fueron del 0,4%.²²

Diversos estudios han mostrado que la EHGNA no solo está asociada con la morbilidad y mortalidad relacionadas con el hígado, sino que también puede desempeñar un papel en el desarrollo de enfermedades coronarias, alteraciones en la estructura y función cardíaca, valvulopatía y arritmias.²³ Hasta la fecha, la evidencia ha indicado que la enfermedad cardíaca coronaria (ECC) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con EHGNA.²²

La DMT2 tiene el vínculo biológico más claro con la progresión de la enfermedad, ya que, hasta el 75% de las personas con DMT2 padecen EHGNA, mientras que la prevalencia de EHGNA en diabéticos asintomáticos tipo 2 es del 20%.¹³ Además, hay una carga significativa de fibrosis avanzada en individuos con DMT2 que va del 5% al 7%.²⁴ Sung et al.²⁵ demostraron en 2012 que existe una fuerte asociación adicional entre el hígado graso y la diabetes incidente, independientemente de la resistencia a la insulina. Posteriormente, Park et al.²⁶ mostraron que la tasa de incidencia de DMT2 aumentó progresivamente de acuerdo con la gravedad de la EHGNA (normal: 7,0%, leve: 9,8%, moderada a severa: 17,8%). Estos resultados se confirmaron más tarde en un estudio donde los pacientes que padecían EHGNA en lugar de HGNA, tenían más probabilidades de ser diabéticos (56% frente a 21%) y aquellos que tenían fibrosis avanzada o cirrosis, fueron más propensos a ser diabéticos que aquellos sin fibrosis avanzada (89% frente a 47%).²⁷

Por otro lado, la obesidad -específicamente la adiposidad visceral- provoca un aumento en la acumulación hepática de ácidos grasos libres, así como una disminución en su oxidación, y una alteración en el metabolismo de la glucosa, lo que contribuye a la RI. También implica la producción de citocinas proinflamatorias que finalmente resulta en disfunción endotelial y aterosclerosis. Así pues, se ha demostrado que la EHGNA está fuertemente relacionada con la obesidad ya que las probabilidades de padecer la enfermedad aumentan significativamente con el riesgo de enfermedad metabólica y un índice de masa corporal (IMC) alto.²⁸

Respecto a las enfermedades cardiovasculares, gran cantidad de artículos han informado una fuerte asociación entre la EHGNA y varios marcadores de aterosclerosis subclínica, como aumento del grosor de la íntima-media carotídea, aumento de la calcificación de la arteria coronaria y rigidez de la pared arterial, y alteración de la vasodilatación mediada por flujo. Todas estas asociaciones son independientes de los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y de las características del SM.^{29,30} Además, se han encontrado datos que relacionan la EHGNA con anomalías en la estructura y función cardíaca tanto en individuos pediátricos como en adolescentes y adultos, lo que hace suponer que los pacientes tienen cambios tempranos en el metabolismo del sustrato miocárdico. Curiosamente, otros estudios han demostrado que la EHGNA se relaciona de forma independiente con un intervalo QTc prolongado, un predictor de arritmias ventriculares y muerte súbita cardíaca. Este hecho podría explicar el aumento de la mortalidad por ECV asociada con la EHGNA. Finalmente, la presencia de esclerosis valvular aórtica y la fibrilación auricular también se han relacionado con EHGNA.²¹ Los hallazgos de todos estos estudios respaldan la afirmación de que la EHGNA se asocia significativamente con un aumento de la mortalidad y morbilidad por ECV.²³

1.5 FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO. HIPÓTESIS DEL MÚLTIPLE "HIT"

El hígado desempeña un papel clave en el metabolismo de los lípidos, importando ácidos grasos libres (AGLs) y fabricando, almacenando y exportando lípidos. Los trastornos en alguno de estos procesos pueden alterar diversas vías metabólicas e inducir la RI, conduciendo al desarrollo de la EHGNA.

En condiciones fisiológicas, la síntesis de triglicéridos (TG) se estimula para eliminar el exceso de AGLs. Los TG pueden almacenarse como gotas de lípidos dentro de los hepatocitos o secretarse a la sangre como lipoproteína de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés).³¹ La acumulación de TG en el citoplasma de los hepatocitos es una característica distintiva de la EHGNA y surge de un desequilibrio entre la adquisición de lípidos (captación de ácidos grasos y lipogénesis de *novo*) y la eliminación (oxidación mitocondrial de ácidos grasos y exportación como VLDL), tal y como se muestra en la Figura 3.

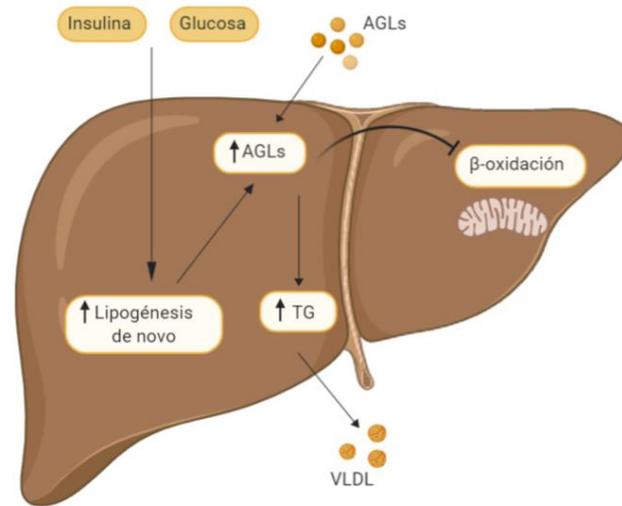


Figura 3. La característica distintiva de la EHGNA es la acumulación de TG en el citoplasma de los hepatocitos como resultado de un desequilibrio entre la entrada y salida de lípidos: 1) aumento en la absorción de AGLs derivada de la circulación debido al aumento de la lipólisis del tejido adiposo y/o de la dieta; 2) aumento en los niveles de glucosa e insulina en respuesta a la ingesta de carbohidratos que promueve la lipogénesis de novo; 3) disminución en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos; 4) disminución en la secreción hepática de TG al empaquetarse en VLDL. EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; AGLs, ácidos grasos libres. Fuente: Elaboración propia

Por ello, el proceso de desarrollo y progresión de la EHGNA es complejo y multifactorial. Se han descrito diferentes teorías, siendo la "hipótesis de dos "hits"" una de ellas. El "primer "hit"" incluye la acumulación de TG y AGLs en los hepatocitos. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia, típicamente asociada con el aumento de peso u obesidad, parecen ser los componentes claves del "primer "hit"" que resulta en esteatosis. El "segundo "hit"" activa las cascadas inflamatorias e implica consecuentemente, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y peroxidación de lípidos, que conduce al daño de los hepatocitos, inflamación y desarrollo de la esteatohepatitis.¹

Sin embargo, actualmente este punto de vista tan simple ha sido sustituido por la "hipótesis del múltiple "hit"". ¹ Esta hipótesis considera el desequilibrio en el metabolismo de los lípidos y la resistencia a la insulina como "primer "hit"", lo que lleva al desarrollo de la esteatosis hepática. Después del desarrollo de la esteatosis, el hígado se vuelve más vulnerable a múltiples daños que pueden actuar en paralelo, incluyendo las toxinas bacterianas derivadas del intestino, el desequilibrio de adipocina/citocina, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, lipotoxicidad, desregulación de la apoptosis de hepatocitos, disbiosis intestinal y liberación de factores profibrogénicos y mediadores proinflamatorios. Estos factores pueden estimular colectivamente la inflamación, apoptosis, fibrosis y, finalmente, la disfunción hepática o el desarrollo de un tumor (Figura 4).¹⁶

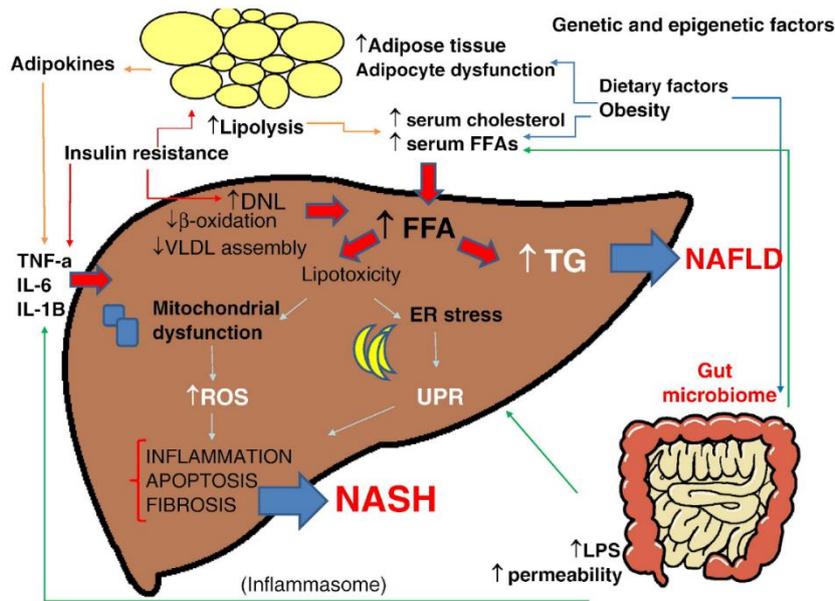


Figura 4. Mecanismos implicados en la hipótesis del múltiple "hit" para el desarrollo de la EHGNA. Los factores dietéticos y ambientales, junto con la obesidad, conducen a niveles séricos elevados de FFA y CH, desarrollo de resistencia a la insulina, proliferación y disfunción de los adipocitos y cambios en el microbioma intestinal. La resistencia a la insulina promueve la disfunción del adipocito, induce la lipólisis y la liberación de adipocinas y citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, que también contribuyen a mantener el estado de resistencia a la insulina. En el hígado, la resistencia a la insulina amplifica la DNL. Por otra parte, el aumento de FFA hepáticos promueve, por un lado, la síntesis y acumulación de TG y por otro, causa disfunción mitocondrial, por lo que aumenta la producción de ROS y estrés del ER con activación de UPR, lo que conduce a inflamación hepática. FFA, ácidos grasos libres; DNL, lipogénesis de novo; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; CH, colesterol; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-6, interleucina-6; IL-1 β , interleucina-1 β ; TG, triglicéridos; ROS, especies reactivas de oxígeno; ER, retículo endoplásmico; UPR, respuesta de proteína desplegada; LPS, lipopolisacáridos; NAFLD, enfermedad del hígado graso no alcohólico; NASH, esteatohepatitis no alcohólica. Fuente: "The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)" (Buzzetti et al., 2016) ¹

1.6 DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

La Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas, el Colegio Americano de Gastroenterología y la Asociación Americana de Gastroenterología establecieron un enfoque basado en cuatro directrices para el diagnóstico de la EHGNA. Estipularon que el diagnóstico de la EHGNA requiere (1) evidencia de esteatosis hepática, ya sea a través de imágenes o por histología; (2) ausencia de consumo de alcohol en cantidades significativas; (3) ausencia de otras etiologías de hepatopatía; y (4) ausencia de otras causas de esteatosis hepática.¹² Algunas de las causas secundarias comunes de la esteatosis hepática son la hepatitis B y C crónica, consumo elevado de alcohol, uso de medicamentos como corticosteroides, nutrición parenteral, enfermedad de Wilson, enfermedad biliar, hepatitis autoinmune y desnutrición.¹²

Se debe sospechar la EHGNA en pacientes obesos, diabéticos o que presenten un SM, así como en aquellos individuos cuyas funciones hepáticas se encuentren anormales en las pruebas bioquímicas o cuyas imágenes hepáticas sugieran hígado graso. Sin embargo, la EHGNA permanece asintomática en una proporción significativa de pacientes, por lo que es con frecuencia una enfermedad infradiagnosticada.^{15,32}

La esteatosis hepática se puede identificar a través de métodos invasivos o no invasivos como son las pruebas serológicas o pruebas de imagen, tal y como se muestra en la Figura 5.

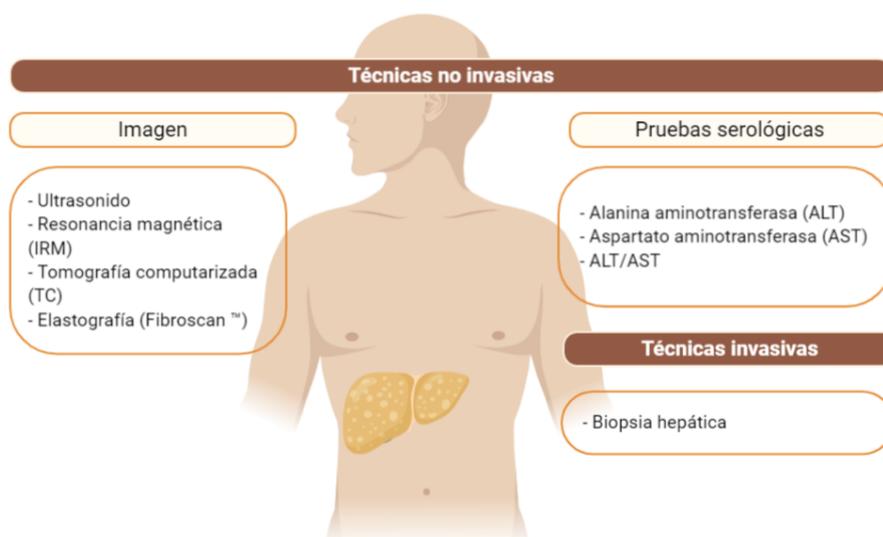


Figura 5. Principales técnicas diagnósticas para la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA). Fuente: Elaboración propia.

La ecografía, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética del hígado (IRM) son las principales técnicas de imagen utilizadas para el diagnóstico de la EHGNA. Generalmente, alrededor del 30% de la esteatosis hepática debe estar presente para que estas tecnologías puedan detectar la enfermedad.³²

Aunque estos métodos de diagnóstico por imágenes pueden evaluar esteatosis hepática y/o cirrosis, ninguno puede determinar la fibrosis y EHNA. La evaluación no invasiva de fibrosis y EHNA se puede llevar a cabo mediante elastografía. Esta técnica evalúa la rigidez hepática, que se ha correlacionado con la cantidad de fibrosis en el hígado. La elastografía transitoria o Fibroscan® tiene una precisión de, aproximadamente, el 90% en la detección de fibrosis avanzada y cirrosis.³³

Dentro de las pruebas invasivas, la biopsia hepática es la técnica *gold standard*. No sólo confirma el diagnóstico de la EHNA, sino que da información sobre el grado de fibrosis, esteatosis y necroinflamación.³² Debe considerarse en aquellos pacientes con hígado graso que después de técnicas de imagen, anormalidades de laboratorio y/o métodos no invasivos, presentan un mayor riesgo de padecer EHNA y fibrosis avanzada.³⁴ No obstante, puede originar graves complicaciones clínicas como dolor, sangrado intraperitoneal, infección y lesión accidental de otros órganos.³³

Dado que actualmente la biopsia de hígado sigue siendo la técnica de referencia, hay un gran interés en el desarrollo de biomarcadores no invasivos para diagnosticar tanto la fibrosis hepática como la cirrosis.³²

1.7 TRATAMIENTO

El mejor enfoque para la gestión de la EHGNA genera controversia debido a la comprensión incompleta de la enfermedad. Los objetivos principales del tratamiento son mejorar la esteatosis y prevenir la progresión, por lo que un cambio del estilo de vida y el tratamiento de los factores de riesgo son fundamentales para manejar la enfermedad.³² Las intervenciones médicas y quirúrgicas actúan como tratamientos de segunda línea (Figura 6).

Se ha estudiado que la pérdida de peso a través de la restricción calórica y el aumento de la actividad física mejoran la función e histología del hígado. Una dieta isocalórica baja en grasas y rica en hidratos de carbono ayuda a controlar la EHGNA y reducir la RI.³²

Además de la pérdida de peso de forma natural, también se usan medicamentos como orlistat y sibutramina para controlar el peso. Orlistat es un inhibidor de lipasas que previene la absorción de grasa en el hígado y el intestino, mientras que la sibutramina es un antagonista de la recaptación de serotonina y suprime el apetito. Ambos fármacos han demostrado disminuir la esteatosis hepática y los niveles de transaminasas séricas, pero presentan graves efectos secundarios.³⁵

Por su parte, la cirugía bariátrica es un método práctico para las personas que padecen obesidad y diabetes con HGNA, ya que provoca una pérdida de peso, reduce la inflamación y mejora la supervivencia a largo plazo.³²

Varias intervenciones farmacéuticas se han utilizado para tratar tanto el HGNA como la EHNA. Se han estudiado ampliamente los efectos de los antioxidantes, ya que el estrés oxidativo se considera un mecanismo clave en la lesión hepatocelular y progresión de la enfermedad. La vitamina E es el antioxidante más estudiado y su administración se asocia con una mejoría en todos los parámetros histológicos, como la esteatosis, la inflamación lobular y la fibrosis, en comparación con el grupo control.³²

La administración de fármacos hipolipemiantes se ha evaluado en pacientes con EHGNA y se ha visto que el uso de estatinas puede mejorar los resultados adversos relacionados con la EHNA en pacientes con enfermedades concurrentes, como hiperlipidemia, DMT2 y SM.³² Las tiazolidinedionas, son agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y tienen amplios efectos en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como en la biología vascular y la inflamación. Se han llevado a cabo diversos estudios que han demostrado que la pioglitazona mejora la histología hepática en pacientes con y sin DMT2 con EHNA.³⁴

Por otro lado, se ha mostrado interés en investigar el papel de los agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) como agentes terapéuticos en pacientes con EHGNA.¹⁵

Se ha visto que los ligandos sintéticos que activan el receptor X farnesoide (FXR), como el ácido obeticólico, mejoran la sensibilidad a la insulina y presentan efectos antiinflamatorios y antifibróticos. Otra vía potencial que impulsa la actividad de FXR es la liberación de los factores de crecimiento FGF19 y FGF21.¹⁵

Otras posibles dianas metabólicas son los agentes antihipertensivos como los ácidos grasos omega-3 y los bloqueadores de los receptores de angiotensina. Por otro lado, los agentes antiapoptóticos como el glutatión o los inhibidores de caspasas, los mecanismos antifibróticos como inhibidores de la lisil oxidasa-2 (LOXL-2) y el ARNip de la proteína de choque térmico 47, también se están considerando como posibles dianas terapéuticas para la terapia de la EHGNA.¹⁵

Las vías proinflamatorias que involucran la señalización de la apoptosis quinasa-1 (ASK-1)-JNK, MAP quinasas, ERK y NFκB son mediadores de la inflamación y, por lo tanto, objetivos potenciales para la terapia. Friedman et al.³⁶ observaron que la inhibición de los receptores de quimiocina CC tipo 2 (CCR2) y tipo 5 (CCR5) redujo la progresión de la fibrosis a corto plazo. Además, se están estudiando como inhibidores de citocinas

proinflamatorias, la pentoxifilina y el tocilizumab (inhibidores de TNF e IL-6, respectivamente).

Finalmente, la modulación de la microbiota intestinal con prebióticos, probióticos o antibióticos se está estudiando como posible diana para prevenir la disbiosis intestinal, la cual ya se ha visto anteriormente que está fuertemente ligada a la progresión de la enfermedad.¹⁵

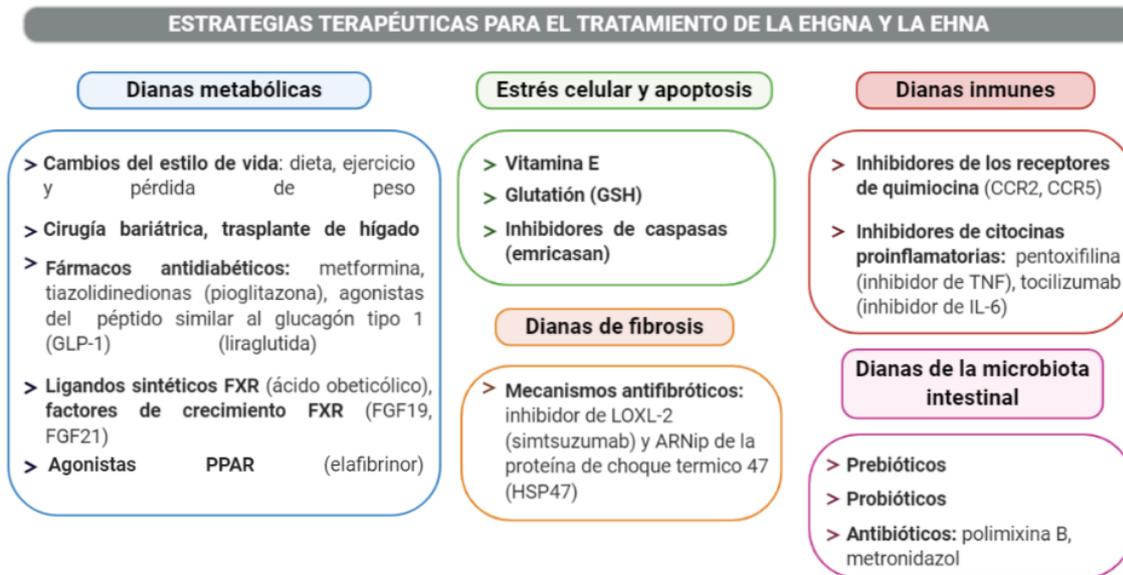


Figura 6. Principales estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EHGNA y la EHNA. EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcoh6lico; EHNA, esteatohepatitis no alcoh6lica; FXR, receptor X farnesoide; PPAR, receptores activados por proliferadores de peroxisomas; LOXL-2, lisil oxidasa-2; TNF, factor de necrosis tumoral, TNF; IL-6, interleucina-6. Fuente: Elaboraci6n propia.

2. TOLL-LIKE RECEPTORS Y LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Uno de los mecanismos implicados en la fisiopatología de la EHGNA es el proceso de la disbiosis intestinal. En este sentido, los receptores tipo Toll (o *toll-like receptors*, TLRs) son receptores que median el reconocimiento de patrones moleculares conservados de origen microbiano y regulan las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Se ha observado que desempeñan un papel fundamental en la fisiología y fisiopatología del hígado, ya que en pacientes con enfermedad hepática crónica se produce un aumento de la translocaci6n de bacterias intestinales.³⁷ En consecuencia, los componentes de las bacterias intestinales denominados patrones moleculares asociados a pat6genos (PAMPs, por sus siglas en ingl6s), se acaban liberando a la circulaci6n sangu6nea debido a la disbiosis intestinal promovida por factores como una dieta alta en grasas y, a trav6s de la vena porta, llegan a las c6lulas hepáticas donde activan los TLRs desencadenando la producci6n de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas, a su vez, inducen la acumulaci6n de lípidos en los hepatocitos, la muerte celular y promueven la fibrosis hepática.^{38,39}

Por tanto, la patogénesis de la EHGNA se ha asociado con los TLR, incluidos TLR2, TLR4 y TLR9, los cuales reconocen lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos, y ADN bacteriano, respectivamente (Figura 7).

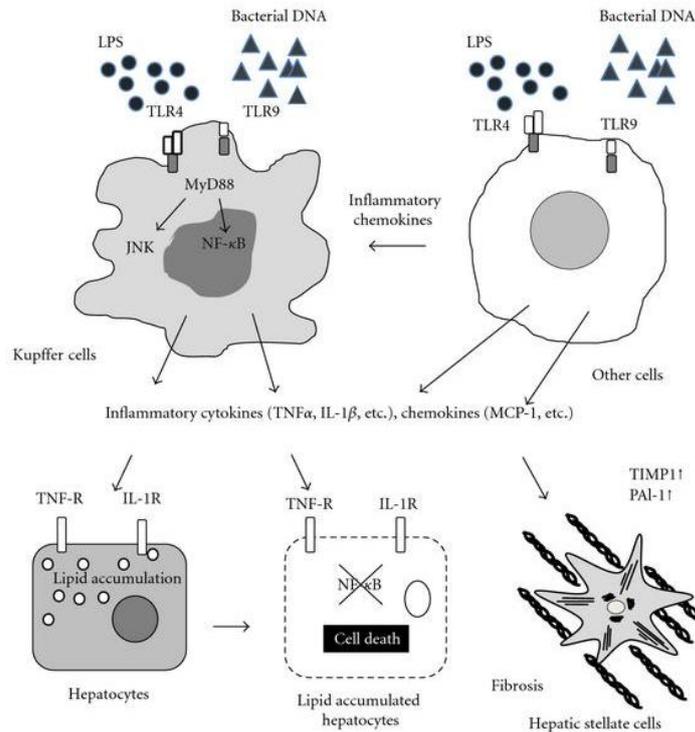


Figura 7. TLR y su señalización en la EHGNA. Las células de Kupffer responden a los ligandos TLR como el LPS y el ADN bacteriano a través del TLR4 y TLR9, respectivamente. Tras la unión TLR, MyD88, una molécula adaptadora, es reclutada para transmitir las señales que activan NF-κB y JNK. Las células de Kupffer activadas producen citoquinas inflamatorias como TNF α e IL-1 β y quimiocinas como MCP-1 (CCL2). Estas citoquinas y quimiocinas inflamatorias inducen la acumulación de lípidos en los hepatocitos y la muerte celular. Además, TNF α e IL-1 β promueven la fibrosis hepática mediante la activación de células estrelladas hepáticas. Otras células, incluidas las células hepáticas residentes, las células infiltradas en el hígado y los macrófagos de tejido adiposo producen diversos mediadores en respuesta a los ligandos TLR. Estas vías también contribuyen al desarrollo de la EHGNA. LPS, lipopolisacáridos; TLR4, toll-like receptor 4; TLR9, toll-like receptor 9; MyD88, respuesta primaria de diferenciación mielóide 88; NF-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; JNK, quinasa c-Jun N-terminal; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-1 β , interleucina 1 β ; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1. Fuente: "Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic fatty liver disease" (Miura et al., 2010)⁴⁰

3. PROTEÍNAS NOTCH

3.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

Las proteínas Notch son una familia de receptores involucrados, por un lado, en la diferenciación celular durante la embriogénesis, participando en diferentes procesos como la expresión de genes en la somitogénesis, la vasculogénesis y la regulación de las células madre endocárdicas y hematopoyéticas, entre otras. Por otra parte, también participan en la homeostasis de diferentes tejidos, como el pulmón, la piel, el hígado o el intestino.⁴¹ La vía de señalización Notch además tiene un importante papel en la regulación del desarrollo y función del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo. Tiene implicaciones en el SM a través de la regulación de la especificación de los macrófagos M1 frente a M2, entre otros mecanismos.⁴²

Existen pocos genes diana de Notch, siendo la familia de los *hairly enhancer of split* (HES) y los relacionados con Hes (HEY) los mejor caracterizados. Estos genes ejecutan gran parte de los procesos biológicos y parece que juegan un papel clave en la fibrosis hepática.⁴³

3.2 PATOLOGÍAS IMPLICADAS

La señalización de Notch está implicada en el desarrollo de diversos sistemas como el sistema nervioso central, el cardiovascular, el respiratorio o el endocrino, entre otros. Una alteración en la vía Notch se vincula a una gran variedad de enfermedades tanto neoplásicas como no neoplásicas. Mutaciones en el gen Notch3 causan la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL, por sus siglas en inglés). Otros trastornos ocasionados por mutaciones en la vía de Notch son el síndrome de Alagille, síndrome de Hajdu-Cheney, enfermedades valvulares aórticas, disostosis espondilocostal, accidente cerebrovascular isquémico o enfermedad pleiotrópica hereditaria.⁴⁴

Además, los individuos que portan mutaciones en Notch se han relacionado con el cáncer, concretamente con la leucemia linfoblástica aguda (LLA-T), el cáncer de pulmón, de piel, de hígado, de mama o de próstata.⁴⁵

3.3 IMPLICACIÓN DE NOTCH EN LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Tal y como se ha comentado anteriormente, la señalización de Notch es importante para el desarrollo adecuado del sistema biliar y también está implicada en la regeneración y reparación del hígado, el metabolismo hepático, la fibrosis y el CHC.⁴⁶

Se ha visto que la vía de señalización de Notch está fuertemente ligada al metabolismo lipídico y de glúcidos en los hepatocitos, tal como muestra la Figura 8. La desregulación de esta vía puede dar lugar a distintas complicaciones como desbalance metabólico, que, en consecuencia, favorece la acumulación de lípidos en el hepatocito, la RI y el estrés celular.⁴⁶

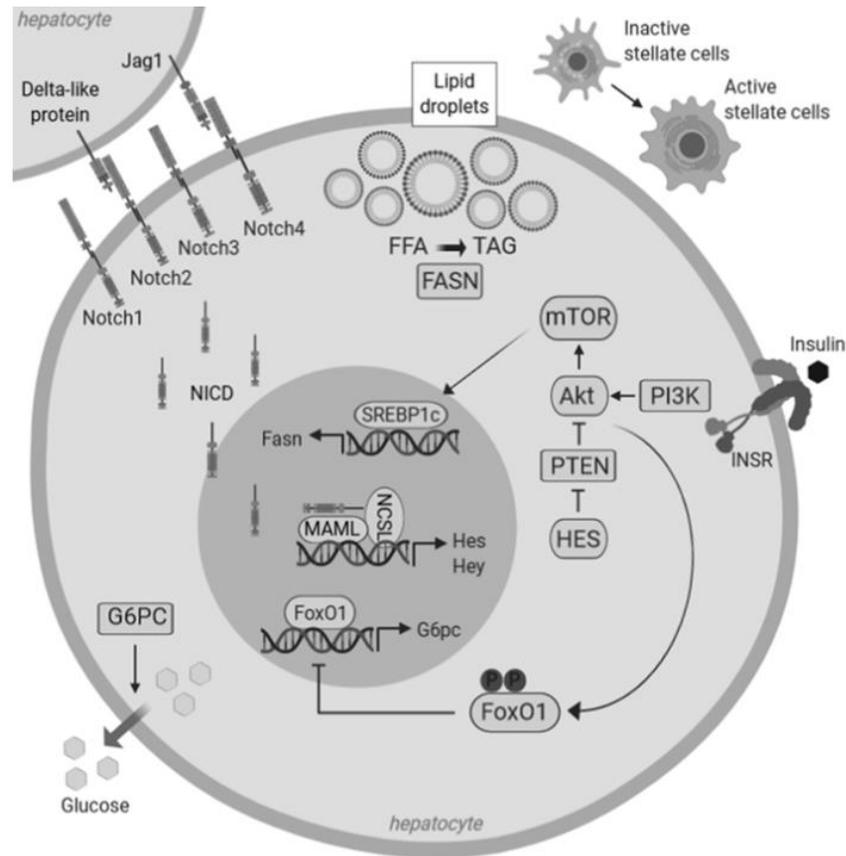


Figura 8. La vía de señalización de Notch regula la gluconeogénesis y la lipogénesis de los hepatocitos y activa las células inflamatorias. La señalización de Notch comienza con la interacción entre el ligando de proteína similar a delta (DDL, por sus siglas en inglés) o el ligando Jag1 y los receptores Notch1-4. Los receptores Notch son proteínas transmembrana que están compuestas por un dominio extracelular (NECD), uno transmembrana (TM) y un dominio intracelular (NICD).⁴⁷ Cuando el ligando se une al NECD, induce la escisión proteolítica y la liberación del NICD, que ingresa en el núcleo y promueve la supervivencia y la diferenciación mediada por PI3K a través de la represión de HES por parte de PTEN. En este momento, la vía de la insulina-PI3K-Akt activa mTOR, que a su vez activa Srebp1c, un factor clave que promueve la transcripción de Fasn. Fasn es una enzima limitadora de la tasa de lipogénesis y promueve la síntesis de TAG favoreciendo la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma.⁴⁸ Esta acumulación inicia diversas respuestas inflamatorias en otras células, lo que resulta en la activación de las células estrelladas hepáticas, generando un microambiente inflamatorio.⁴⁹ Además, la señalización de Notch regula la producción hepática de glucosa mediante la sinergia con FoxO1, esta proteína activa la transcripción de G6pc que promueve el transporte de la glucosa al exterior celular. Cuando FoxO1 es fosforilado por Akt, este se excluye del núcleo y por tanto se evita la transcripción de G6pc, dando lugar a la acumulación de glucosa en el hepatocito. Jag1, Jagged1; PI3K, fosfoinositol 3-quinasa; HES, hairy enhancer of split; PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina; Akt, serina/treonina quinasa; mTOR, diana de la rapamicina en mamífero; Srebp1c, proteína de unión del elemento regulador del estero1-1c; Fasn, ácido graso sintasa; TAG, triglicéridos; FoxO1, proteína de caja de horquilla-O1; G6pc, subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa. Fuente: "Deregulation of hepatocyte Notch signaling in relation with hepatic lipid metabolism in obese women with non-alcoholic fatty liver disease" (Auguet et al., 2020 (article in press))

La activación de esta vía promueve una estimulación del sistema inmune que da lugar a la inflamación de bajo grado en el hígado. La continuidad de este estado proinflamatorio es dañino para el tejido hepático, por lo que se activan mecanismos de fibrosis que pueden dar lugar a la cirrosis, la disfunción hepática e incluso la muerte. La acumulación lipídica y la activación continuada del sistema inmune en los hepatocitos promovida por la vía de señalización de Notch, favorece la progresión de la esteatosis a esteatohepatitis y posteriormente a fibrosis.

La activación de Notch actúa favoreciendo la patogenia de la EHGNA en sinergia con la activación de la vía de los TLRs en el hígado. Como ya se ha mencionado, los TLR son receptores de reconocimiento de patrones involucrados en la detección y eliminación de antígenos extraños.³⁸ Diversos estudios han demostrado que los TLR juegan un papel importante en la fisiopatología de una variedad de enfermedades hepáticas, incluida la EHGNA. Se ha visto que estos receptores se expresan en todos los tipos de células del hígado, incluyendo hepatocitos, células de Kupffer o células estrelladas hepáticas, entre otras.⁵⁰

La interacción de los TLR con sus ligandos específicos conduce a la producción de varias citocinas necesarias para las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas, por lo que se ha sugerido que estos receptores activan indirectamente las vías Notch en la EHGNA. Ambos cooperan para inducir la producción de citocinas inflamatorias como TNF, IL-6 e IL-12 y activar los genes diana de Notch, incluidos los represores transcripcionales HES1 y HEY1. Este último participa en la regulación de la autorrenovación de células de cáncer de hígado.³⁸

VI. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La activación de la vía de Notch promueve la acumulación de lípidos en los hepatocitos y el desbalance del metabolismo de la glucosa. Debido a estos factores y a que la activación de Notch se ha relacionado con la de los TLRs -receptores fuertemente ligados a la progresión de la EHGNA- es plausible hipotetizar que la desregulación de la vía de señalización de Notch está fuerte y directamente relacionada con la patogenia de la EHGNA y con los diferentes grados de la enfermedad.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue **explorar el papel de la ruta de señalización hepática de las proteínas Notch en la patogénesis de la EHGNA** en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida. Además, como objetivos secundarios se pretendió tanto estudiar la relación entre la expresión de los genes Notch y los receptores TLRs, como analizar la asociación del metabolismo lipídico hepático con la expresión de los receptores y ligandos de la vía Notch.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población de estudio:

La cohorte de estudio consistió en 57 pacientes del Hospital Universitario Joan XXIII (HUJXXIII) de Tarragona, todas ellas mujeres caucásicas, con obesidad mórbida (OM) ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$). Con la colaboración del Servicio de Cirugía del Hospital Universitario Sant Joan de Reus, se llevó a cabo una cirugía bariátrica laparoscópica, con el fin de obtener biopsias hepáticas para el diagnóstico clínico de los pacientes. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB) y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para poder participar en esta investigación médica del Grupo de Estudio de Enfermedades Metabólicas Asociadas a la Insulino-Resistencia (GEMMAIR).

Los criterios de exclusión utilizados durante la investigación fueron los siguientes: (1) sujetos con un consumo de alcohol superior a 10 g/día; (2) individuos que padecen enfermedades hepáticas, inflamatorias, infecciosas o neoplasias agudas o crónicas; (3) mujeres menopáusicas o sometidas a un tratamiento basado en anticonceptivos; (4) pacientes diabéticos que toman pioglitazona o insulina; y (5) pacientes tratados con antibióticos en las 4 semanas previas a la operación.

2. Tamaño de la muestra:

Aceptando un riesgo α de 0,05 y uno β menor de 0,2 en un contraste bilateral, son necesarios 20 sujetos por grupo para detectar diferencias $\geq 0,2$ unidades. Se asume una desviación estándar común de 0,3.

3. Análisis histopatológicos del hígado:

Las muestras de hígado fueron examinadas por hepatopatólogos expertos del Servicio de Anatomía Patológica del HUJXXIII. Se utilizaron los métodos descritos anteriormente por Kleiner et al.,⁵¹ quienes llevaron a cabo una tinción del tejido hepático con hematoxilina y eosina y una tinción tricómica de Masson. Posteriormente, se estableció un sistema de puntuación según las características histológicas de los pacientes. En este estudio, las mujeres con OM se subclasificaron en tres grupos: histología hepática normal (HN) ($n=20$), ES (esteatosis micro/macrovesicular sin inflamación ni fibrosis, $n=21$) y EHNA (grados 1-2 de Brunt, $n=15$). Es importante destacar que ninguno de los pacientes de la cohorte con EHNA presentaba fibrosis.

4. Análisis bioquímicos:

Todos los pacientes se sometieron a evaluaciones físicas, antropométricas y bioquímicas para la determinación de los siguientes parámetros: edad, peso, índice de masa corporal (IMC), glucosa, insulina, HOMA1, hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP), presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD). Las muestras de sangre se obtuvieron tanto de sujetos obesos con OM como de sujetos control ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$). En el laboratorio clínico del HUJXXIII se obtuvo el plasma de las muestras de sangre y se almacenó a -

80°C. Los parámetros bioquímicos se examinaron usando un analizador automático convencional después de 12 horas de ayuno. La resistencia a la insulina (RI) se evaluó mediante el modelo de homeostasis de RI (HOMA1).

Los niveles de citocinas circulantes en plasma de interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), inhibidor del activador de plasminogeno total-1 (tPAI-1), proteínas quimiotácticas de monocitos-1 (MCP-1) y adiponectina se determinaron con una técnica de inmunoensayo multiplex en formato sándwich y con paneles de citoquinas miliplex (MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 (HADK1MAG-61K, Millipore, 331 Billerica, MA, USA) y MILLIPLEX MAP Human High-Sensitivity T Cell Panel (HSTCMAG28SK, 332 Millipore, Billerica, MA, USA)), siguiendo las instrucciones del desarrollador en el instrumento Bio-Plex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) en el Centro de Ciencias Ómicas (COS) de Reus asociado a la Universidad Rovira i Virgili.

Los niveles circulantes de interleucina 22 (IL-22), interleucina 13 (IL-13), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 17 (IL-17) fueron medidos por duplicado a través de un inmunoensayo enzimático (ELISA) según las instrucciones del desarrollador (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) en el laboratorio del Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) asociado al HUIJXXIII.

5. Extracción de ARN y PCR cuantitativa:

Las muestras de hígado se recogieron después de la cirugía bariátrica y se conservaron a 4°C en la solución de estabilización RNAlater (Qiagen, Hilden, Alemania). Este reactivo inactiva las ribonucleasas (ARNasa) y protege el ARN celular en muestras de tejido y células intactas y no congeladas. Posteriormente, las muestras se procesaron y almacenaron a -80°C en el laboratorio del IISPV.

La extracción y purificación del ARN total del tejido hepático se llevó a cabo utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Barcelona, España). La transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) se realizó con el kit de alta capacidad de ARN a ADNc (Applied Biosystems, Madrid, España). La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se llevó a cabo a través del ensayo TaqMan diseñado previamente por Applied Biosystems para la detección de los genes descritos en la Tabla 1. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos utilizando los sistemas de PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.).

Tabla 1. Genes y sus correspondientes referencias detectados a través de la RT-qPCR

GEN	REFERENCIA
LXR α	Hs00173195_m1
FXR	HS00231968_M1
SREBP1c	Hs01088691_m1
ACC1	Hs00167385_m1
FAS	Hs00188012_m1
PPAR α	Hs00947538_m1
CPT1a	Hs00912671_m1
CROT	Hs00221733_m1
ABCA1	Hs01059118_m1
ABCG1	Hs00245154_m1
HES1	Hs00172878_m1
HES5	Hs01387463_g1
HEY1	Hs00232618_m1
HEY2	Hs00232622_m1
NOTCH1	Hs01062014_m1
NOTCH2	Hs01050702_m1
NOTCH3	Hs00166432_m1
NOTCH4	Hs00965889_m1
TLR2	Hs02621280_s1
TLR4	Hs00152939_m1
TLR9	Hs00370913_s1
ARN ribosómico 18S*	Fn04646250_s1

*El ARN ribosómico 18S fue utilizado como gen constitutivo. Receptor hepático X alfa (LXR α); Receptor X farnesoide (FXR); Proteína 1c de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c); Acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1); Ácido graso sintasa (FAS); Receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas- α (PPAR α); Carnitina palmitoiltransferasa-1A (CPT1A); Carnitina O-octanoiltransferasa (CROT); Proteína transportadora de casetes de unión a ATP A1 (ABCA1); Proteína transportadora de ATP G1 (ABCG1); Factor de transcripción 1 de la familia HES (HES1); Factor de transcripción 5 de la familia HES (HES5); Factor de transcripción 1 de la familia HEY (HEY1); Factor de transcripción 2 de la familia HEY (HEY2); Factor de transcripción 1 de la familia Notch (NOTCH1); Factor de transcripción 2 de la familia Notch (NOTCH2); Factor de transcripción 3 de la familia Notch (NOTCH3); Factor de transcripción 4 de la familia Notch (NOTCH4); Receptor 2 tipo Toll (TLR2); Receptor 4 tipo Toll (TLR4); Receptor 9 tipo Toll (TLR9).

6. Análisis estadístico:

Los datos se analizaron a través del programa SPSS / PC + para Windows (versión 23.0; SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). La prueba de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para evaluar la distribución de variables. Las variables continuas se informaron como la media \pm desviación estándar; las variables no continuas se informaron como la mediana y el percentil 25-75 y las variables categóricas se mostraron como recuentos (porcentaje). Los diferentes análisis comparativos se llevaron a cabo mediante la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis, de acuerdo con la presencia de dos o más grupos. La fuerza de la asociación entre variables se calculó utilizando el método de Pearson (variables paramétricas) y la prueba de correlación ρ de Spearman (variables no paramétricas). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

VIII. RESULTADOS

1. Características básicas de la población de estudio:

Se estudiaron las principales características de la cohorte de estudio incluidos los parámetros antropométricos y bioquímicos, tal y como se muestra en la Tabla 2. Los sujetos se clasificaron según su histología hepática como individuos con OM e HN (n=20) y OM con EHGNA (n=37). En ambos grupos, se obtuvieron resultados similares en cuanto la edad, peso, IMC, insulina, HOMA1, HbA1c, colesterol, triglicéridos, GGT, ALP y presión arterial. Sin embargo, los análisis bioquímicos mostraron que las concentraciones de glucosa, AST y ALT eran significativamente mayores en los individuos con EHGNA que en las mujeres con HN.

Tabla 2. Variables antropométricas y bioquímicas de la cohorte de pacientes obesos clasificadas según las características histopatológicas.

VARIABLES	HN	EHGNA	p - valor
	(N = 20) Media \pm DE	(N = 37) Media \pm DE	
Edad (años)	45,33 \pm 10,15	47,81 \pm 9,03	0,321
Peso (kg)	119,70 \pm 16,52	112,86 \pm 13,24	0,086
IMC (kg/m ²)	43,88 \pm 6,43	43,78 \pm 4,69	0,942
Glucosa (mg/dl)	82,96 \pm 20,98	101,88 \pm 46,23*	0,026
Insulina (mUI/l)	11,43 \pm 8,64	11,87 \pm 11,84	0,887
HOMA1	10,51 \pm 15,34	15,32 \pm 21,93	0,462
HbA1c (%)	5,49 \pm 0,30	5,92 \pm 1,14	0,054
Colesterol (mg/dl)	180,83 \pm 32,38	177,14 \pm 44,16	0,733
HDL-C (mg/dl)	46,88 \pm 11,16	42,51 \pm 9,55	0,180
LDL-C (mg/dl)	112,69 \pm 25,26	106,55 \pm 34,06	0,478
Triglicéridos (mg/dl)	105,94 \pm 26,43	128,52 \pm 83,24	0,154
AST (UI/l)	21,88 \pm 10,90	32,48 \pm 22,75*	0,014
ALT (UI/l)	22,36 \pm 8,87	36,04 \pm 23,98*	0,002
GGT (UI/l)	27,80 \pm 33,18	31,04 \pm 32,08	0,659
ALP (UI/l)	65,23 \pm 15,64	68,45 \pm 13,70	0,457
PAS	118,94 \pm 17,02	117,71 \pm 12,465	0,781
PAD	65,684 \pm 10,38	65,92 \pm 9,37	0,934

HN, hígado normal; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; IMC, índice de masa corporal; HOMA1, método de evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina; HbA1c, hemoglobina glicosilada 1c; HDL-C, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-C, colesterol de lipoproteínas de

*baja densidad; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; ALP, fosfatasa alcalina; PAS, presión arterial sistólica, PAD, presión arterial diastólica. La resistencia a la insulina se estimó mediante la evaluación del modelo de homeostasis de la RI (HOMA1). Los datos se expresan como la media \pm DE. *Diferencias significativas entre el grupo con HN y el grupo con EHGNA ($p < 0,05$).*

2. Evaluación de los receptores Notch y la expresión de los ligandos según la histología hepática:

Se evaluó la expresión hepática de los receptores Notch y sus ligandos en una cohorte de mujeres con OM. De todos ellos, se observó una expresión hepática de HES5 significativamente menor en pacientes con EHGNA en comparación a aquellos individuos que tenían una histología hepática normal (Figura 9). Posteriormente, los sujetos con EHGNA se clasificaron en términos de su gravedad histológica en ES y EHNA. En este caso, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los receptores y ligandos de Notch estudiados.

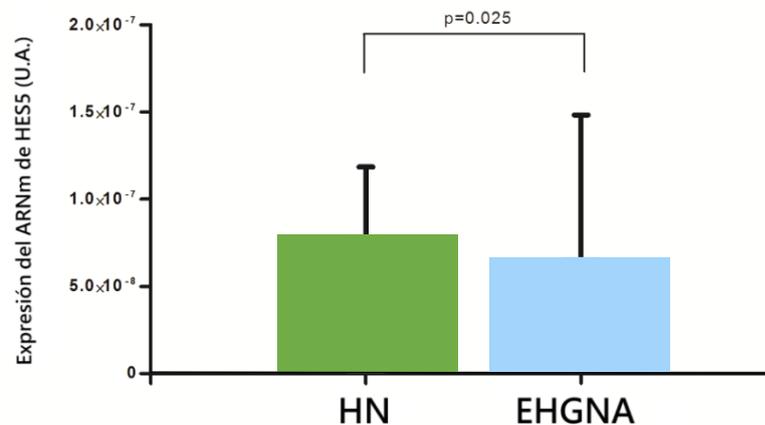


Figura 9. Expresión hepática diferencial de HES5 entre mujeres con OM con histología de HN y mujeres con OM con EHGNA. U.A., unidades arbitrarias; OM, obesidad mórbida; EHGNA, enfermedad de hígado graso no alcohólica. HN; hígado normal. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

3. Correlaciones entre la expresión hepática de HES5 con la expresión hepática de otros receptores y ligandos de Notch:

Al analizar la relación de la expresión hepática de HES5 con los otros receptores y ligandos Notch estudiados, se observó que HES5 se correlacionaba positivamente con HES1, HEY1 y Notch3, tal y como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Correlaciones entre la expresión hepática de HES5 con la expresión del hígado de otros receptores y ligandos Notch

HES5		
	r	p-valor
HES1	0,380	0,004*
HEY1	0,371	0,005*
HEY2	0,172	0,200
NOTCH1	0,180	0,181
NOTCH2	0,025	0,852
NOTCH3	0,334	0,011*
NOTCH4	0,195	0,146

HES, hairy enhancer of split; HES1, factor de transcripción HES-1; HES5, factor de transcripción HES-5; HEY, familia relacionada con Hes; HEY1, factor de transcripción HEY-1; HEY2, factor de transcripción HEY-2. *Diferencias significativas ($p < 0,05$)

4. Correlaciones de la expresión de los receptores y ligandos de Notch con los parámetros de biología hepática y parámetros metabólicos de la glucosa:

Se estudió la asociación de los receptores Notch del hígado y la expresión de los ligandos con los parámetros de la biología hepática. Se demuestra que existe una correlación positiva entre la expresión hepática de HES1 y los niveles de ALT ($r=0,292$, $p=0,029$) y entre HEY1 y GGT ($r=0,284$, $p=0,034$) y Notch4 y GGT ($r=0,297$, $p=0,026$).

5. Correlaciones del receptor Notch del hígado y la expresión de los ligandos con los genes implicados en el metabolismo de los lípidos y los parámetros bioquímicos de los lípidos:

Para conocer el papel de la señalización Notch en la patogénesis de la EHGNA en relación con los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos, se analizó la correlación entre la expresión de los receptores y ligandos Notch del hígado y la expresión hepática de los siguientes genes: LXR α , FXR, SREBP1c, ACC1, FAS, PPAR α , CPT1, CROT, ABCA1 y ABCG1. Los resultados presentados en la Figura 10 indican que, en la cohorte de mujeres con OM, la expresión hepática de HES5 se asoció positivamente con la expresión hepática de algunos genes clave implicados en el metabolismo de los lípidos como ABCG1, CROT y SREBP1c.

Además, la expresión de HEY2 se asoció positivamente con la expresión de SREBP1c ($r=0,2948$, $p=0,0443$), así como la expresión hepática de Notch1 también se asoció positivamente con la expresión de SREBP1c ($r=0,2937$, $p=0,0451$).

En cuanto a los parámetros bioquímicos, también se observó que la expresión de HEY2 hepático se correlaciona negativamente con el colesterol LDL ($r=-0,352$, $p=0,028$). Sin embargo, no se pudo relacionar la expresión hepática de las proteínas y ligandos Notch con otros parámetros metabólicos lipídicos circulantes.

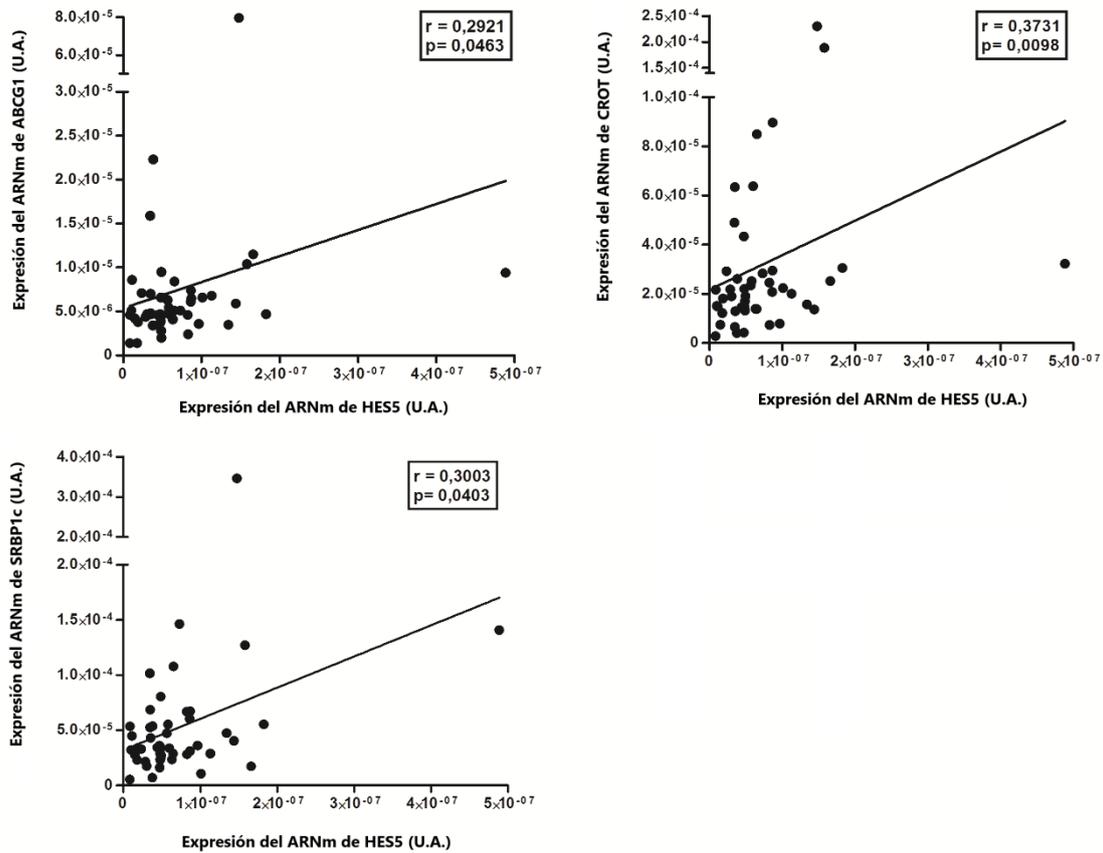


Figura 10. Correlación de la expresión hepática del ligando Notch HES5 con la expresión hepática de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos. ABCG1, proteína transportadora de casetes de unión a ATP-G1; CROT, carnitina O-octanoiltransferasa; SREBP1c, proteína de unión del elemento regulador del estero1-1c; HES, hairy enhancer of split; HES5, factor de transcripción HES-5. La relación entre las variables se calculó utilizando la prueba de correlación r de Spearman. Un valor $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

6. Correlaciones de los receptores y ligandos Notch del hígado con los niveles circulantes de citocinas:

Se estudió la asociación entre la expresión de los receptores y ligandos Notch hepáticos con los niveles circulantes en plasma de citocinas proinflamatorias implicadas en la EHGNA. De todos ellos, solamente se observó una correlación positiva entre la expresión de HES5 y los niveles de IL-13, así como entre HEY1 e IL-6 (Tabla 4).

Tabla 4. Correlación de los receptores y ligandos Notch del hígado con la expresión de diferentes proteínas e interleucinas.

		HES1	HES5	HEY1	HEY2	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4
tPAI (ng/ml)	p-valor	0,499	0,578	0,215	0,241	0,960	0,475	0,667	0,098
	r	-0,098	-0,081	0,178	-0,169	0,007	-0,103	-0,062	-0,237
MCP-1 (pg/ml)	p-valor	0,590	0,847	0,224	0,630	0,310	0,872	0,999	0,462
	r	-0,081	-0,029	-0,183	-0,073	-0,153	0,024	0,000	-0,111
Adipo- nectina (ng/ml)	p-valor	0,795	0,439	0,887	0,313	0,535	0,732	0,268	0,260
	r	-0,037	-0,111	0,020	-0,144	-0,089	0,049	0,158	0,161
TNF- α (pg/ml)	p-valor	0,574	0,666	0,245	0,263	0,556	0,689	0,338	0,779
	r	0,081	0,062	0,166	-0,160	-0,084	-0,057	0,137	-0,040
IL-17 (pg/ml)	p-valor	0,746	0,157	0,268	0,183	0,276	0,986	0,868	0,754
	r	-0,047	-0,205	-0,161	-0,193	0,159	0,003	0,024	-0,046
IL-13 (pg/ml)	p-valor	0,131	0,011*	0,333	0,486	0,232	0,488	0,632	0,577
	r	-0,221	-0,362	0,143	0,103	0,176	0,102	0,071	0,083
IL-10 (pg/ml)	p-valor	0,551	0,348	0,990	0,990	0,632	0,961	0,392	0,647
	r	-0,086	-0,135	0,002	0,002	0,069	-0,007	0,124	0,066
IL-8 (pg/ml)	p-valor	0,391	0,297	0,687	0,858	0,738	0,724	0,821	0,189
	r	0,123	-0,149	0,058	0,026	0,048	0,051	-0,032	-0,187
IL-6 (pg/ml)	p-valor	0,465	0,404	0,029*	0,125	0,545	0,881	0,314	0,581
	r	0,105	0,119	0,307	0,218	0,087	0,022	0,144	-0,079
IL-1 β (pg/ml)	p-valor	0,961	0,941	0,055	0,896	0,988	0,777	0,287	0,229
	r	-0,007	0,011	0,270	-0,019	-0,02	0,041	0,152	-0,172
IL-22 (pg/ml)	p-valor	0,073	0,880	0,316	0,398	0,097	0,134	0,082	0,994
	r	0,256	0,022	0,145	0,122	0,238	0,215	0,249	0,001

HES, hairy enhancer of split; HES1, factor de transcripción HES-1; HES5, factor de transcripción HES-5; HEY, familia relacionada con Hes; HEY1, factor de transcripción HEY-1; HEY2, factor de transcripción HEY-2; tPAI, inhibidor del activador del plasminógeno total 1; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos-1; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-17, interleucina-17; IL-13, interleucina-13; IL-10, interleucina-10; IL-8, interleucina-8; IL-6, interleucina-6; IL-1 β , interleucina-1 β ; IL-22, interleucina-22. *Diferencias significativas ($p < 0,05$)

7. Correlaciones de los receptores y ligandos Notch del hígado con los TLRs:

Al analizar la relación entre los diferentes receptores y ligandos Notch con los principales TLRs involucrados en la enfermedad, se demostró que existe una correlación positiva entre Notch2 y TLR2, TLR4 y TLR9. Por su parte, Notch1 se correlaciona positivamente con TLR9, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Correlación de los receptores y ligandos Notch del hígado con los TLRs.

		HES1	HES5	HEY1	HEY2	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4
TLR2	p-valor	0,414	0,298	0,326	0,525	0,210	0,039*	0,125	0,978
	r	0,122	-0,155	0,122	0,095	0,186	0,303	0,227	0,004
TLR4	p-valor	0,497	0,855	0,611	0,726	0,055	0,014*	0,145	0,828
	r	0,102	0,027	0,102	0,052	0,281	0,355	0,216	0,032
TLR9	p-valor	0,553	0,430	0,531	0,441	0,005*	0,025*	0,264	0,684
	r	0,089	0,118	0,089	-0,115	0,406	0,327	0,166	-0,061

HES, hairy enhancer of split; HES1, factor de transcripción HES-1; HES5, factor de transcripción HES-5; HEY, familia relacionada con Hes; HEY1, factor de transcripción HEY-1; HEY2, factor de transcripción HEY-2; TLR2, receptor toll-like 2; TLR4, receptor toll-like 4; TLR9, receptor toll-like 9.

IX. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras el estudio en una cohorte bien caracterizada de mujeres caucásicas con OM y EHGNA, demuestran que existe una desregulación de HES5, el cual se correlaciona positivamente con la expresión hepática de HES1, HEY1 y Notch3. No obstante, la novedad de esta investigación radica en que las proteínas y ligandos Notch se asocian positivamente con los genes relacionados con el metabolismo lipídico del hígado.

Aunque diversos estudios en roedores han relacionado la activación de la vía de señalización de Notch con la EHGNA, no fue hasta 2013 cuando Valenti et al.⁵² demostraron que un aumento de la activación de la vía Notch se correlacionaba positivamente con la expresión de genes gluconeogénicos y la hiperglucemia en una cohorte de pacientes con OM. En una cohorte de validación, confirmaron la asociación positiva entre los genes de la familia HES/HEY y la resistencia a la insulina, además de demostrar una asociación positiva independiente con el contenido de grasa hepática. Asimismo, observaron que la activación de Notch en el hígado se correlaciona mejor con las medidas de inflamación hepática que con la ES, lo que sugiere que puede utilizarse como un marcador de la transición de ES a EHNA. En este trabajo, a pesar de que se observó una desregulación de HES5 hepática en mujeres con OM y EHGNA, no se pudo demostrar una regulación positiva de la vía de Notch o una asociación con la presencia de EHNA. Por tanto, según los resultados obtenidos, el ligando HES5 se asocia con la esteatosis hepática pero no se puede considerar un buen biomarcador para determinar los diferentes estadios de la EHGNA, ya que su expresión no es significativamente distinta en pacientes con ES frente a pacientes con EHNA. Además, no se consiguió relacionar la expresión hepática de las proteínas y ligandos de Notch con los parámetros metabólicos de la glucosa.

Por otra parte, se ha descrito que el aumento del contenido de lípidos hepáticos puede deberse a la activación inducida por nutrientes de la diana de la rapamicina en mamífero (mTOR). Pajvani et al.⁵³ demostraron que la inhibición de los receptores y ligandos Notch protege el hígado graso inducido por la obesidad y evita la esteatosis, probablemente al producirse una disminución de la lipogénesis de *novo* y un bloqueo del complejo 1 de mTOR (mTORc1). Por el contrario, observaron que la señalización de Notch estabiliza y activa mTORc1, lo que conduce a un aumento de la lipogénesis y el desarrollo del hígado graso. En este sentido, se estudió la relación entre las proteínas y ligandos Notch con los parámetros metabólicos de los lípidos. Se encontró una correlación negativa entre la expresión hepática de HEY2 y el colesterol LDL. Además, se mostró por primera vez que la expresión hepática de HES5 se relacionaba de forma positiva con la expresión hepática de algunos genes clave relacionados con el metabolismo de los lípidos en la cohorte de estudio. Por lo tanto, la señalización de Notch en la EHGNA se asocia con la expresión de SREBP1c, CROT y ABCG1.

En otra investigación, Zhu et al.⁵⁴ describieron que la actividad de la vía de señalización Notch se asocia con la gravedad de la enfermedad, al observar que una activación forzada de la vía en el hepatocito facilitaba la fibrosis. En este estudio, no se pudo estudiar la relación con la fibrosis porque ninguno de los pacientes con EHNA de la cohorte presentaba fibrosis. Esto se podría explicar por el hecho de que la cohorte estaba formada por mujeres de mediana edad sin otra causa de enfermedad hepática que la obesidad y la RI.

En este estudio, se ha descrito una correlación positiva entre las proteínas Notch y los TLR, lo que se ve respaldado por estudios previos en modelos animales que han relacionado la vía Notch con los receptores TLR y los niveles circulantes de citocinas. En 2008, Palaga et al.⁵⁵ descubrieron que diversos agonistas de TLR (TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9) regulaban positivamente la expresión de la proteína Notch1. Ese mismo año, Hu et al.⁵⁶ observaron que las proteínas Notch y los TLR cooperaban para aumentar la producción de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-6 e IL-12, así como para activar HES1 y HEY1. La expresión de estos fue inducida por Pam₃Cys (un ligando de TLR2), LPS (ligando de TLR4) y R848 (ligando de TLR7 y TLR8). Pese a que en este estudio no se pudo demostrar una relación entre Notch1 y los receptores TLR2, TLR3 y TLR4, sí se pudo confirmar que existe una asociación con el TLR9. Adicionalmente, en el presente estudio también se ha podido observar una clara relación entre HEY1 e IL-6, lo que da evidencia de la relación de los ligandos Notch con la activación de los TLR y el desencadenamiento de las cascadas de citocinas proinflamatorias.

En su investigación, Foldi et al.⁵⁷ estudiaron que Notch1 y Notch2 contribuyen a la regulación positiva de Jagged1 en cooperación con la vía TLR. Además, observaron que la expresión de Jagged1, DLL1 y DLL4 aumentó tanto por el ligando TLR4 como por el TLR2. Estos resultados se han podido confirmar en este trabajo, ya que se observó una correlación positiva entre Notch2 y los receptores TLR2, TLR4 y TLR9. Concretamente estos tres TLR se han relacionado ampliamente con la progresión de la EHNA en modelos animales^{58,59,60} y se está empezando a sopesar sobre su uso como diana terapéutica para tratar la EHNA.⁶¹

Posteriormente, Hildebrand et al.⁶² corroboraron todos estos resultados y demostraron que la activación de TLR4 estimula la expresión de DLL1 (el cual interacciona con Notch2), a través de la activación de STAT3. Además, STAT3 induce la señalización Notch mediada por DLL1 y este aumenta la IL-6 estimulada por TLR4. Como la unión de IL-6 al receptor respectivo interviene en la activación de la cascada JAK2 / STAT3, es probable que exista un circuito de retroalimentación positiva entre la ruta de Notch y STAT3, tal y como se muestra en la Figura 11.

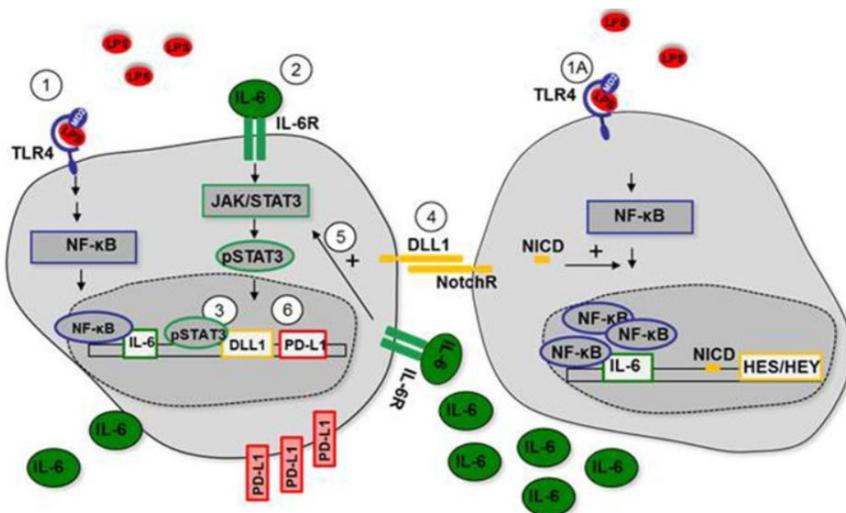


Figura 11. Bucle de retroalimentación positiva entre la señalización de Notch y STAT3 después de la activación de TLR. (1 + 1A) LPS estimula la producción de IL-6 a través de la señalización de NF-κB mediada por TLR4. (2) IL-6 se une al receptor de IL-6 (IL-6R) y estimula la activación de STAT3. (3) STAT3 induce la expresión de DLL1. (4) La DLL1 transmembranal se une al receptor Notch en las células vecinas. El dominio intracelular del receptor de muesca (NICD) se transloca al núcleo, induce la transcripción HES/HEY y media la acumulación de NF-κB en el núcleo. Se mejora la producción de IL-6. (5) La señalización mejorada del receptor de IL-6 estabiliza la activación de STAT3.

(6) Se incrementa la expresión de PD-L1 dependiente de STAT3. TLR, receptores de tipo toll; STAT3, transductor de señales y activador de la transcripción-3; LPS, lipopolisacáridos; IL-6, interleucina-6; NF-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; TLR4, receptor de tipo toll-4; DLL1, proteína de tipo delta-1; HES, gen hairy enhancer of split; HEY, gen hairy ears Y-Linked; PD-L1, ligando de muerte programada-1. Fuente: "The Interplay of Notch Signaling and STAT3 in TLR-Activated Human Primary Monocytes" (Hildebrand et al., 2018) ⁶²

Recientemente, Ponziani et al.⁶³ observaron que la IL-13 aumentaba significativamente en pacientes que padecen CHC. Esta interleucina puede inducir la señalización de vías intracelulares como STAT1, STAT6 o NF-κB, por lo que está involucrada en la progresión del tumor. Sin embargo, aunque en este estudio se haya podido correlacionar la expresión de HES5 con los niveles circulantes de IL-13, no se pudieron confirmar estos resultados debido a la ausencia de fibrosis y CHC en pacientes que presentaban EHNA. De todos modos, se puede pensar que esta clara asociación podría ser un dato pronóstico para el futuro desarrollo de la fibrosis en los pacientes con EHNA, ya que la cohorte está compuesta por mujeres de mediana edad sin otra causa de enfermedad hepática que la obesidad y la resistencia a la insulina.

Por último, es importante destacar que, aunque la cohorte permitió establecer relaciones claras entre las mujeres con OM y EHGNA y la desregulación de la proteína Notch hepática y la expresión de los ligandos (sin la interferencia de otros factores como la edad), estos resultados no se pueden extrapolar a hombres, a mujeres de otras edades o a pacientes de peso superior o normal.

X. CONCLUSIÓN

La expresión hepática de los receptores y ligandos Notch parece jugar un papel importante en la regulación de las vías de metabolismo de los lípidos en el hígado. Por un lado, se ha visto que las proteínas Notch presentan una fuerte asociación con los receptores TLR, así como que una desregulación de la vía Notch se encuentra asociada a la patogénesis de la EHGNA. Por otro lado, se ha visto que la expresión hepática de HES5 se correlaciona positivamente con la expresión hepática de algunos genes claves del metabolismo lipídico.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. **2016** Aug 1;65(8):1038–48.
2. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. **2005** Jul 1;42(1):44–52.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. **2016** Jul 1;64(1):73–84.
4. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. **2020** Feb;0(0).
5. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol*. **2019** Mar 1;70(3):531–44.
6. Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med J R Coll Physicians London*. **2018** Jun 1;18(3):245–50.
7. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. **2008** Dec;40(12):1461–5.
8. Aragonès G, Auguet T, Armengol S, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Aguilar C, et al. PNPLA3 expression is related to liver steatosis in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. **2016** Apr 27;17(5).
9. Li J-F, Zheng E-Q, Xie M. Association between rs738409 polymorphism in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) gene and hepatocellular carcinoma susceptibility: Evidence from case-control studies. *Gene*. **2018** Feb 685:143–8.
10. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. **2019** Jun 1;69(6):2672–82.
11. Summart U, Thinkhamrop B, Chamadol N, Khuntikeo N, Songthamwat M, Kim CS. Gender differences in the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Northeast of Thailand: A population-based cross-sectional study. *F1000Research*. **2017** Oct 20;6:1630.
12. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*. **2017** Jun 9(16):715–732.
13. Kanuri G, Landmann M, Priebs J, Spruss A, Löscher M, Ziegenhardt D, et al. Moderate alcohol consumption diminishes the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in ob/ob mice. *Eur J Nutr*. **2016** Apr 1;55(3):115
14. Akhavan Rezayat A, Dadgar Moghadam M, Ghasemi Nour M, Shirazinia M, Ghodsi H, Rouhbakhsh Zahmatkesh MR, et al. Association between smoking and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *SAGE Open Med*. **2018** Jan 6:20503121177452
15. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. **2018** Jul 24(7):908–922.
16. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev*. **2017** Mar 49(2):197–211.
17. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. **2017** Jan 1;37:85–9

18. Coz PI, Martínez MG, González JC, Teresa M, Javier A, García C. Diagnóstico y evaluación del hígado graso no alcohólico. *Endocrinol y Nutr.* **2017** Sep 1(2):6–15.
19. Kleiner DE, Makhlouf HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis.* **2016** Dec 20(2):293–312.
20. Aydin MM, Akçali KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol.* **2018** Jan 29(1):14–21.
21. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol.* **2015** Apr 62(1):47–64.
22. Velarde-Ruiz Velasco JA, García-Jiménez ES, García-Zermeño KR, Morel-Cerda EC, Aldana-Ledesma JM, Castro-Narro GE, et al. Extrahepatic complications of non-alcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol México.* **2019** Oct 84(4):472–81
23. Mantovani A, Ballestri S, Lonardo A, Targher G. Cardiovascular Disease and Myocardial Abnormalities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences.* **2016** Jan 61(5):1246-67.
24. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism.* **2016** Aug 65(8):1096–108.
25. Sung KC, Jeong WS, Wild SH, Byrne CD. Combined influence of insulin resistance, overweight/obesity, and fatty liver as risk factors for type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **2012** Apr 1;35(4):717–22.
26. Ryoo JH, Choi JM, Moon SY, Suh YJ, Shin JY, Shin HC, et al. The clinical availability of non alcoholic fatty liver disease as an early predictor of the metabolic syndrome in Korean men: 5-Year's prospective cohort study. *Atherosclerosis.* **2013** Apr 1;227(2):398–403.
27. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol.* **2015** May 1;62(5):1148–55.
28. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* **2014** Jul 20(28):9330–9337.
29. Abdallah LR, de Matos RC, e Souza YPDM, Vieira-Soares D, Muller-Machado G, Pollo-Flores P. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Its Links with Inflammation and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* **2020** Feb 22(1):1-8.
30. Adams LA, Anstee QM, Tilg H, Targher G. Non-Alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut.* **2017** Jun 1;66(6):1138–53.
31. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol.* **2014** Jul 7:221–239.
32. Pappachan JM, Babu S, Krishnan B, Ravindran NC. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *J Clin Transl Hepatol.* **2017** Dec 5(4):384–393.
33. Graffigna M, Catoira N, Soutelo J, Azpelicueta A, Berg G, Perel C, et al. Diagnosis of hepatic steatosis using clinical, biochemical and imaging methods. *Rev Argent Endocrinol Metab.* **2017** Jan 1;54(1):37–46.
34. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* **2018** Jan 1;67(1):328–57.
35. Singh S, Osna NA, Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol.* **2017** Sep 23(36):6549–6570.

36. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology*. **2018** Jan 67(5):1754–1767.
37. Kiziltas S. Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases. *World J Hepatol*. **2016** Nov 8(32):1354–1369.
38. Lin A, Wang G, Zhao H, et al. TLR4 signaling promotes a COX-2/PGE2/STAT3 positive feedback loop in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Oncoimmunology*. **2015** Aug 5(2):1074376.
39. Aragonès G, Colom-Pellicer M, Aguilar C, et al. Circulating microbiota-derived metabolites: a "liquid biopsy?". *Int J Obes (Lond)*. **2020** Apr 44(4):875–885.
40. Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. **2010** Dec 2010
41. Adams JM, Jafar-Nejad H. The Roles of Notch Signaling in Liver Development and Disease. *Biomolecules*. **2019** Oct 9(10):608.
42. Bi P, Kuang S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. **2015** Mar 26(5):248–255.
43. Zhang K, Zhang Y-Q, Ai W-B, Hu Q-T, Zhang Q-J, Wan L-Y, et al. Hes1 , an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- β /BMP signaling. *World J Gastroenterol*. **2015** Jan 21(3):878.
44. Braune EB, Lendahl U. Notch - a goldilocks signaling pathway in disease and cancer therapy. *Discov Med*. **2016** Mar 21(115):189–96.
45. Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. Cell Press; **2018** Aug 34(4):536–48.
46. Geisler F, Strazzabosco M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology*. **2015** 61(1):382–392.
47. Ni M ming, Wang Y rui, Wu W wen, Xia C cai, Zhang Y he, Xu J, et al. Novel Insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis. *European Journal of Pharmacology*. **2018** May 826:66–74
48. Bi P, Kuang S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. **2015** Mar 26(5):248–255.
49. Romeo S. Notch and Nonalcoholic Fatty Liver and Fibrosis. *N Engl J Med*. **2019** Feb 380(7):681–3.
50. Saghazadeh A, Rezaei N. Introductory Chapter: Toll-Like Receptors. In: *Toll-like Receptors*. IntechOpen; **2020** Jan
51. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. **2005** Jun 41(6):1313–21.
52. Valenti L, Mendoza RM, Rametta R, et al. Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes*. **2013** Dec 62(12):4052-4062.
53. Pajvani UB, Qiang L, Kangsamaksin T, Kitajewski J, Ginsberg HN, Accili D. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTORc1 stability. *Nat Med*. **2013** Aug 19(8):1054-1060.
54. Zhu C, Kim K, Wang X, et al. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Transl Med*. **2018** Nov 10(468).
55. Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SHE, et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol*. **2008** Jan 38(1):174–83.
56. Hu X, Chung AY, Wu I, et al. Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon-gamma pathways. *Immunity*. **2008** Nov 29(5):691-703.

57. Foldi J, Chung AY, Xu H, et al. Autoamplification of Notch signaling in macrophages by TLR-induced and RBP-J-dependent induction of Jagged1. *J Immunol.* **2010** Nov 185(9):5023-5031.
58. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology.* **2013** Feb 57(2):577–89.
59. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* **2007** Oct 47(4):571–9.
60. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. Toll-Like Receptor 9 Promotes Steatohepatitis by Induction of Interleukin-1 β in Mice. *Gastroenterology.* **2010** Jul 139(1):323.
61. Roh YS, Seki E. Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. Vol. 28, *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia).* **2013** Jul 28:38–42.
62. Hildebrand D, Uhle F, Sahin D, Krauser U, Weigand MA, Heeg K. The Interplay of Notch Signaling and STAT3 in TLR-Activated Human Primary Monocytes. *Front Cell Infect Microbiol.* **2018** Jul 8:241.
63. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, et al. Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* **2019** Jan 69(1):107–20.

XII. AUTOEVALUACIÓN

Cuando me reuní con la Dra. Auguet por primera vez estaba inquieta y nerviosa, era la primera vez que me enfrentaba al mundo laboral y, a pesar de no tener experiencia previa en un laboratorio, Teresa depositó su confianza en mí y me dio esta gran oportunidad, que hoy con un poco de tristeza termino. Quisiera darle de nuevo las gracias por ello.

Durante mi estancia de prácticas he comprendido todo lo que hay detrás de una investigación científica y he aprendido que no solo se basa en estar en un laboratorio. Recopilar la información y bibliografía necesaria para realizar este estudio me ha hecho darme cuenta de lo importante que es el trabajo previo para adquirir los conocimientos necesarios, así como el trabajo posterior frente a un ordenador para redactar informes o hacer estadística, entre otras cosas. Todo este proceso ha hecho que mi interés por la biomedicina incremente y me ha ayudado a consolidar los conocimientos adquiridos durante estos años, además de enriquecerme de nuevos.

Este trabajo ha supuesto una motivación para mí y, como consecuencia de ello, creo que he adquirido una actitud muy positiva. Escribirlo ha tenido un gran impacto en mí, ya que he podido reconocer mis puntos débiles, así como mis fortalezas, y, de esta forma, poder mejorarlos. He podido desarrollar mi capacidad de organización, mis habilidades resolutivas y de comunicación, así como el trabajo en equipo. Me siento muy satisfecha con el trabajo realizado, y espero que eso se refleje a la hora de leerlo.

Por todo ello, después de cuatro años puedo decir que cierro una etapa en mi vida para comenzar otra. Como futura biotecnóloga que soy, me siento orgullosa de haber superado esta etapa con creces, una etapa que me ha hecho crecer tanto personal como profesionalmente, que me ha permitido aprender de grandes docentes e investigadores y que me ha hecho sentir parte de la comunidad científica.