



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Chloé Joana Gil Parodi y Marcel Zurita García

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado de Medicina

El papel de RUNX1 en la patogenia de la enfermedad
del hígado graso no alcohólico (EHGNA)

Dirigido por la Dra. *Maria Teresa Auguet Quintillà*

HJ23

Hospital Universitari **Joan XXIII**
ICS Camp de Tarragona

TARRAGONA

2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. EHGNA.....	5
1.1. DEFINICIÓN EHGNA.....	5
1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	5
1.2.1. EHGNA.....	5
1.2.2. EHNA.....	5
1.2.3. Relación con el síndrome metabólico. Factores de riesgo y comorbilidades.....	5
1.2.3.1. Obesidad.....	6
1.2.3.1.1. “Lean” EHGNA.....	6
1.2.3.2. Diabetes.....	6
1.2.3.3. Otros factores de riesgo.....	6
1.2.4. Variación geográfica.....	7
1.2.5. Poblaciones específicas.....	7
1.2.5.1. Mujeres.....	7
1.2.5.2. Infancia.....	8
1.3. HISTORIA NATURAL.....	8
1.3.1. Complicaciones extrahepáticas.....	9
1.4. PATOGENIA.....	9
1.4.1. Mecanismos de daño hepático.....	10
1.4.1.1. Patogenia de EHGNA.....	10
1.4.1.1.1. Esteatosis hepática.....	10
1.4.1.1.2. Lipotoxicidad hepática.....	10
1.4.1.2. Patogenia de EHNA.....	10
1.4.1.2.1. Mecanismos de lesión e inflamación de los hepatocitos.....	10
1.4.1.2.2. Mecanismo de la fibrogénesis.....	11
1.4.1.2.3. Mecanismo de hepatocarcinogénesis.....	11
1.4.2. Alteración del tejido adiposo.....	11
1.4.2.1. Relación con la obesidad.....	11
1.4.2.2. Relación con la diabetes mellitus.....	11
1.4.3. Alteración gastrointestinal.....	12
1.4.3.1. Microbiota intestinal. Disbiosis.....	12
1.4.3.1.1. Alteración de la permeabilidad y sistema inmune intestinal.....	12
1.4.3.1.2. Microbioma tisular y sistémico.....	13
1.4.3.2. Factores dietéticos.....	13
1.4.3.3. Las hormonas intestinales.....	13
1.5. DIAGNÓSTICO.....	13
1.5.1. Diagnóstico de la EHGNA.....	14
1.5.1.1. Anamnesis y exploración física.....	14
1.5.1.2. Pruebas de laboratorio.....	14
1.5.1.3. Pruebas de imagen.....	14
1.5.2. Diagnóstico de EHNA.....	14
1.5.2.1. Histología. Biopsia Hepática.....	15
1.5.2.2. Técnicas no invasivas.....	15
1.5.2.2.1. Biomarcadores. Sistemas de puntuación (scores).....	15
1.5.2.2.2. Los nuevos tests en sangre de fibrosis.....	16
1.5.2.2.3. Medición de la rigidez del hígado (elastografía).....	16
1.5.2.2.3.1. Elastografía de transición (ET).....	16
1.5.2.2.3.2. Otras técnicas de elastografía.....	17
1.5.2.2.4. Otras técnicas diagnósticas en investigación.....	17

1.5.3.	Despistaje	17
1.6.	TRATAMIENTO.....	17
1.6.1.	Modificaciones del estilo de vida.....	17
1.6.2.	Tratamiento farmacológico	18
1.6.2.1.	Tratamiento de las comorbilidades metabólicas	18
1.6.2.1.1.	Antidiabéticos	18
1.6.2.1.2.	Hipolipemiantes.....	18
1.6.2.2.	Antioxidantes y terapias citoprotectoras	18
1.6.2.2.1.	Antioxidantes.....	18
1.6.2.2.2.	Ácidos biliares y sus vías de señalización	19
1.6.2.3.	Microbiota y modulación del eje intestino-hígado	19
1.6.2.4.	Nuevas y potenciales dianas terapéuticas	20
1.6.3.	Trasplante de hígado	20
2.	RUNX1	20
2.1.	Definición y funciones	20
2.2.	Relación de RUNX con la EHGNA.....	20
	HIPÓTESIS	21
	OBJETIVOS	21
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
1.	Sujetos	22
2.	Tamaño de la muestra.....	22
3.	Patología hepática	22
4.	Análisis bioquímicos	23
5.	Expresión genética en hígado.....	23
6.	Análisis estadístico	23
	RESULTADOS	23
1.	Características basales de los sujetos.....	23
2.	Evaluación de la abundancia relativa de ARNm de RUNX1 en el hígado según la histología hepática.....	25
3.	Evaluación de la abundancia relativa de ARNm de algunos genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático y TLRs según la histología hepática.....	25
4.	Correlaciones de la expresión hepática relativa de RUNX1 con diferentes parámetros relacionados con la EHGNA	26
	DISCUSIÓN	27
	LIMITACIONES	28
	CONCLUSIONES	28
	BIBLIOGRAFIA	29
	ANEXOS.....	31
	ANEXO 1: Variación geográfica de EHGNA y EHNA	31
	ANEXO 2: Sistemas de puntuación (scores) /modelos predictivos	32
	ANEXO 3: Tests de fibrosis	33
	ANEXO 4: Nuevos fármacos en estudio para el tratamiento de EHGNA.....	34

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos con diferentes grados de daño hepático. En cuanto su epidemiología, la EHGNA ha presentado un aumento exponencial en los últimos años representando un problema de salud muy prevalente y relevante a nivel mundial. Respecto a su historia natural, se trata de una enfermedad crónica que evoluciona lentamente en diversos estadios que incluyen esteatosis simple (ES), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y diferentes grados de fibrosis. La patogenia de esta enfermedad aún se desconoce en gran parte, aunque la evidencia actual apunta a la participación de múltiples factores o "multiple hits", donde se ven involucrados principalmente tres sistemas: hepático, tejido adiposo y gastrointestinal. Debemos diferenciar entre el diagnóstico de ES, que se puede realizar mediante analíticas o pruebas de imagen y de EHNA, cuyo gold estándar diagnóstico continua siendo la biopsia hepática, aunque se están investigando profundamente métodos no invasivos. Actualmente no existe un tratamiento farmacológico específico para la EHGNA, limitándose al control de los factores de riesgo cardiovascular y comorbilidades; no obstante, existen múltiples dianas terapéuticas prometedoras con vistas a su incorporación en un futuro próximo.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de un elemento posiblemente implicado en la patogenia de la EHGNA, conocido como RUNX1 (del inglés, Runt-related transcription factor 1). RUNX1 es un factor de transcripción con una función proangiogénica y directamente involucrado con la inflamación, aunque su papel en la EHNA sigue sin estar claro. En este estudio, se analizó la abundancia de ARNm hepático de RUNX1 mediante RT-qPCR, en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida (OM) y EHGNA. Asimismo, se estudiaron otros factores relacionados con la patogenia, como genes del metabolismo lipídico y receptores tipo Toll (TLR). Se dividió la población según hígado normal (HN, n = 28) o EHGNA (n = 41) y posteriormente se subdividió el grupo de EHGNA de acuerdo al grado histológico en ES (n = 24) o EHNA (n = 17). Se encontró que la expresión hepática de RUNX1 fue superior en pacientes con ES respecto a HN o EHNA, y paralelamente se halló una mayor abundancia de ARNm hepático de FAS y TLR2 en EHGNA. Asimismo, se encontró una correlación positiva de RUNX1 hepático con la expresión de FAS hepático. En conclusión, el RUNX1 hepático parece estar involucrado en los primeros pasos de EHGNA, pero en estadios avanzados como la EHNA, parece inhibirse. Esto representa una nueva información importante sobre la señalización de RUNX1 en el contexto de EHGNA y EHNA, sugiriendo una función protectora en estadios iniciales para intentar reparar el hígado.

RESUM

La malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) es caracteritzada per l'acumulació de greix en els hepatòcits amb diferents graus de dany hepàtic. Pel que fa a la seva epidemiologia, la MFGNA ha presentat un augment exponencial en els últims anys representant un problema de salut molt prevalent i rellevant a nivell mundial. Respecte a la seva història natural, es tracta d'una malaltia crònica que evoluciona lentament en diversos estadis que inclouen esteatosis simple (ES), esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA) i diferents graus de fibrosi. La patogènia d'aquesta malaltia encara es desconeix en gran part, encara que l'evidència actual apunta a la participació de múltiples factors o "multiple hits", on es veuen involucrats principalment tres sistemes: hepàtic, teixit adipós i gastrointestinal. Hem de diferenciar entre el diagnòstic d'ES, que es pot realitzar mitjançant analítiques o proves d'imatge i de EHNA, en la que el gold estàndard diagnòstic continua sent la biòpsia hepàtica, encara que s'estan investigant profundament mètodes no invasius. Actualment no existeix un tractament farmacològic específic per a la MFGNA, limitant-se a el control dels factors de risc cardiovascular i comorbiditats; no obstant, hi ha múltiples dianes terapèutiques prometedores amb previsió de la seva incorporació en un futur pròxim.

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi d'un element possiblement implicat en la patogènia de la MFGNA, conegut com RUNX1 (de l'anglès, Runt-related transcription factor 1). RUNX1 és un factor de transcripció amb una funció proangiogènica i directament involucrat amb la inflamació, tot i que el seu paper en l'EHNA segueix sense estar clar. En aquest estudi, es va analitzar l'abundància d'ARNm hepàtic de RUNX1 mitjançant RT-qPCR, en una cohort de dones amb obesitat mòrbida (OM) i MFGNA. Així mateix, es van estudiar altres factors relacionats amb la patogènia, com gens del metabolisme lipídic i receptors tipus Toll (TLR). Es va dividir la població segons fetge normal (FN, n = 28) o MFGNA (n = 41) i posteriorment es va subdividir el grup de MFGNA d'acord al grau histològic en ES (n = 24) o EHNA (n = 17). Es va trobar que l'expressió hepàtica de RUNX1 era superior en pacients amb ES respecte a FN o EHNA, i paral·lelament es va trobar una major abundància d'ARNm hepàtic de FAS i TLR2 en MFGNA. Així mateix, es va trobar una correlació positiva de RUNX1 hepàtic amb l'expressió de FAS hepàtic. En conclusió, el RUNX1 hepàtic sembla estar involucrat en els primers passos de MFGNA, però en estadis avançats com l'EHNA, sembla inhibir-se. Això representa una nova informació important sobre la senyalització de RUNX1 en el context de MFGNA i EHNA, suggerint una funció protectora en estadis inicials per intentar reparar el fetge.

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the accumulation of fat in hepatocytes with varying degrees of liver damage. Regarding its epidemiology, NAFLD has increased exponentially in last years, representing a very prevalent and relevant health problem worldwide. Concerning its natural history, it is a chronic disease that evolves slowly in various stages that include simple steatosis (SS), non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and different degrees of fibrosis. The pathogenesis of this disease is still largely unknown, although current evidence points to the participation of multiple factors or "multiple hits", where three main systems are involved: liver, adipose tissue and gastrointestinal tract. We must differentiate between the diagnosis of SS, which can be made by analytical or imaging tests, and NASH, whose gold standard for diagnosis continues to be liver biopsy, although non-invasive methods are being thoroughly investigated. Currently there is no specific pharmacological treatment for NAFLD, limiting itself to the control of cardiovascular risk factors and comorbidities; however, there are multiple promising therapeutic targets that are expected to be incorporated in the near future.

This work has focused on the study of an element possibly involved in the pathogenesis of NAFLD, known as RUNX1 (Runt-related transcription factor 1). RUNX1 is a transcription factor with a proangiogenic function and directly involved with inflammation, although its role in NASH remains unclear. In this study, RUNX1 mRNA hepatic expression was analysed by RT-qPCR in a cohort of women with morbid obesity (MO) and NAFLD. Furthermore, other factors related to pathogenesis were studied, such as lipid metabolism genes and Toll-like receptors (TLR). The population was divided according to normal liver (NL, n = 28) or NAFLD (n = 41) and subsequently the NAFLD group was subdivided according to histological grade into SS (n = 24) or NASH (n = 17). It was found that the hepatic expression of RUNX1 was higher in patients with SS compared to NL or NASH, and in parallel a greater abundance of hepatic mRNA of FAS and TLR2 was found in NAFLD. Additionally, a positive correlation of hepatic RUNX1 with the expression of hepatic FAS was observed. In conclusion, liver RUNX1 appears to be involved in the first steps of NAFLD, but in advanced stages such as NASH, it seems to be inhibited. This represents important new information on RUNX1 signalling in the context of NAFLD and NASH, suggesting a protective role in early stages in attempting to repair the liver.

INTRODUCCIÓN

1. EHGNA

1.1. DEFINICIÓN EHGNA

La **enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)** es una enfermedad crónica caracterizada por la acumulación de grasa hepática en los hepatocitos (1) que deriva en la aparición de esteatosis hepática, en ausencia de un consumo excesivo de alcohol, fármacos o etiología viral (2). Incluye un amplio espectro de situaciones anatomopatológicas/clínicas hepáticas que van desde la esteatosis simple (ES), a la inflamación (**esteatohepatitis no alcohólica o EHNA**), fibrosis, cirrosis, y, por último, al carcinoma hepatocelular (3).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

1.2.1. EHGNA

En las últimas dos décadas, la **EHGNA** ha tenido un aumento exponencial pasando de ser una enfermedad relativamente desconocida a la **causa más frecuente de enfermedad hepática crónica**, con una prevalencia aproximada del 25% a nivel mundial (4,5).

Además, se predice que continuará **aumentando su prevalencia** en gran medida (4) estimándose que llegará a ser del 45% (6), con su consiguiente impacto en el gasto en salud pública (1) y la disminución en la calidad de vida (4). Este crecimiento va ligado al aumento paralelo de la obesidad y la resistencia a la insulina, con las que se relaciona estrechamente, y la falta de un tratamiento farmacológico específico adecuado (4,6).

1.2.2. EHNA

Se estima que la prevalencia de EHNA en la población general oscila entre el 1,5% y 6,45% (1,7). La **EHNA** ya se sitúa como la principal causa a nivel mundial (1) y entre las principales causas en EEUU de enfermedad hepática terminal, hepatocarcinoma y trasplante hepático, estimándose un aumento de la mortalidad relacionada con la EHNA del 178% para el año 2030 (4).

Hasta el año 2013, las principal causa de trasplante hepático en EEUU era la hepatitis C. Con la introducción de la terapia antiviral, el alcohol pasó a ser la primera causa. Actualmente la EHNA se sitúa como la primera causa de trasplante simultáneo de hígado y riñón en EEUU y la segunda indicación más común para trasplante de hígado, y se prevé que se convierta en la número uno muy pronto, debido a su rápido crecimiento, superando la hepatitis alcohólica (1,7). Además, a pesar de que la hepatitis C sigue siendo la causa más frecuente de desarrollo de hepatocarcinoma en los candidatos a trasplante hepático, la EHNA es la causa que está creciendo más (7), lo que se relaciona con el aumento de prevalencia de cirrosis y fibrosis avanzada en pacientes con EHGNA (4).

1.2.3. Relación con el síndrome metabólico. Factores de riesgo y comorbilidades

Las tendencias recientes en la occidentalización de la dieta y el estilo de vida sedentario han aumentado la prevalencia de todos los componentes del **síndrome metabólico** (8): obesidad central, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL, hipertensión arterial y elevación de la glucosa en ayunas (1).

Encontramos una relación bidireccional con el **síndrome metabólico** a través de mecanismos inmunológicos y bioquímicos complejos (3). Los pacientes con EHGNA tienen una alta prevalencia de síndrome metabólico (aproximadamente un 34% a nivel mundial, pero de un 62% en Europa) y viceversa (4). Por una parte, la EHGNA incrementa el riesgo de padecer los componentes del síndrome metabólico (7); asimismo, el aumento en número o gravedad de dichos componentes acrecienta la progresión de EHGNA a EHNA, fibrosis y la mortalidad por todas las causas (4). Por consiguiente, se considera la EHGNA como la **manifestación hepática del síndrome metabólico**

(4,8). Se relaciona especialmente con la obesidad y la diabetes, siendo una enfermedad muy prevalente en estos pacientes (4).

1.2.3.1. Obesidad

La obesidad se ha convertido en un importante problema de salud pública en muchos países contribuyendo a múltiples desórdenes metabólicos como la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipemia, hipertensión, obesidad central y EHGNA. Ha presentado un rápido crecimiento relacionado con los hábitos dietéticos de los países industrializados y actualmente afecta a más de 1.900 millones de adultos en todo el mundo (7).

EHGNA se asocia de forma independiente a la obesidad visceral y subcutánea (9). La encontramos en más del 50% de los casos asociado a obesidad (1), principalmente con obesidad visceral (10). Paralelamente, la mayoría de los pacientes con obesidad (80%) tienen EHGNA (y hasta un 95% en la obesidad mórbida (11)) y, por el contrario, se da en un porcentaje mucho menor (16%) si el índice de masa corporal (IMC) es normal y no existen factores de riesgo metabólicos (10). Se correlaciona la obesidad mórbida con mayor fibrosis hepática grave y cirrosis (10).

1.2.3.1.1. “Lean” EHGNA

Aproximadamente el 5-8% de los pacientes con EHGNA son *lean*, es decir, no presentan obesidad. Se cree que estos pacientes tienen también una disregulación del metabolismo de la glucosa y del tejido adiposo puesto que presentan intolerancia a la glucosa (hasta un tercio se diagnostican de diabetes) y un mayor índice de adiposidad visceral así como un mayor riesgo de padecer hipertensión, síndrome metabólico y obesidad central (4).

Las similitudes de la EHGNA en pacientes lean y obesos indican que existe un espectro de anomalías metabólicas común y que posiblemente estas sean más graves en aquellos pacientes obesos. Se ha relacionado con el genotipo GG de PNPLA3 rs738409 y las bajas concentraciones séricas de adiponectina, que se da principalmente en población **asiática** (aproximadamente el 20% de la población) y áreas **rurales**, ya que las urbanas tienen una alimentación más parecida a la occidental (4).

Aunque los pacientes con lean EHGNA tienen una menor prevalencia de EHGNA, fibrosis hepática y anomalías metabólicas, los eventos clínicos y las tasas de fibrosis avanzadas son similares a los pacientes obesos con EHGNA (4).

1.2.3.2. Diabetes

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de EHGNA y de sus complicaciones (3) y se ha mostrado como el principal causante de fibrosis en el hígado y otros órganos (5).

En pacientes diabéticos, se ha encontrado una prevalencia global muy elevada tanto de EHGNA (57’80%) como de fibrosis avanzada (15’05%) (4). Paralelamente, el 47% de los pacientes con EHGNA tienen diabetes mellitus (1).

1.2.3.3. Otros factores de riesgo

Se ha relacionado también con otros aspectos como el IMC y desórdenes metabólicos como la dislipemia, disminución de la masa muscular (1), síndrome del ovario poliquístico, hipotiroidismo, hipopituitarismo y apnea del sueño (2).

También existen otros factores de riesgo no modificables como el sexo (es más frecuente en hombres), la edad (aumenta con la edad), y la etnia (relacionada con polimorfismos genéticos) y factores de riesgo genéticos (2,7).

Al contrario de los factores de riesgo, los factores protectores de la EHGNA no son muy conocidos (12). Se ignora si el consumo de alcohol moderado es protector o de riesgo (8).

1.2.4. Variación geográfica

Aunque la prevalencia de EHGNA está aumentando en todo el mundo, tanto la prevalencia de la enfermedad como sus factores genéticos y ambientales presentan una importante **variación geográfica** (4,7). Las tasas más altas se registran en el Oriente Medio (32%) y en América del Sur (31%), y la más baja en África (14%). Tenemos prevalencias del 27% en Asia, seguida de un 24% en América del Norte y un 23% en Europa (7). Por otro lado, el ratio de fibrosis avanzada y cirrosis es menor en Asia comparado con Europa y EEUU, donde se estima que un 10-15% de los pacientes tienen fibrosis avanzada (4). Asimismo, la mayor incidencia de EHGNA entre diabéticos la encontramos en Europa (66'19%), y la menor en África (13'20%) (4).

Sin embargo, **no disponemos de unos buenos datos** ya que varían según el método diagnóstico empleado (4). La ecografía puede pasar por alto formas leves de la EHGNA. No obstante, presenta una sensibilidad mayor que la hipertransaminesemia, pudiendo encontrar unos valores de transaminasas normales hasta en un 50-80% de los pacientes con EHGNA (4,7). Esto ocurre especialmente en la EHNA, en la que se requieren criterios histológicos para el diagnóstico (4). Para más información de las diferencias según áreas geográficas de EHGNA y ENHA, ver *anexo 1*.

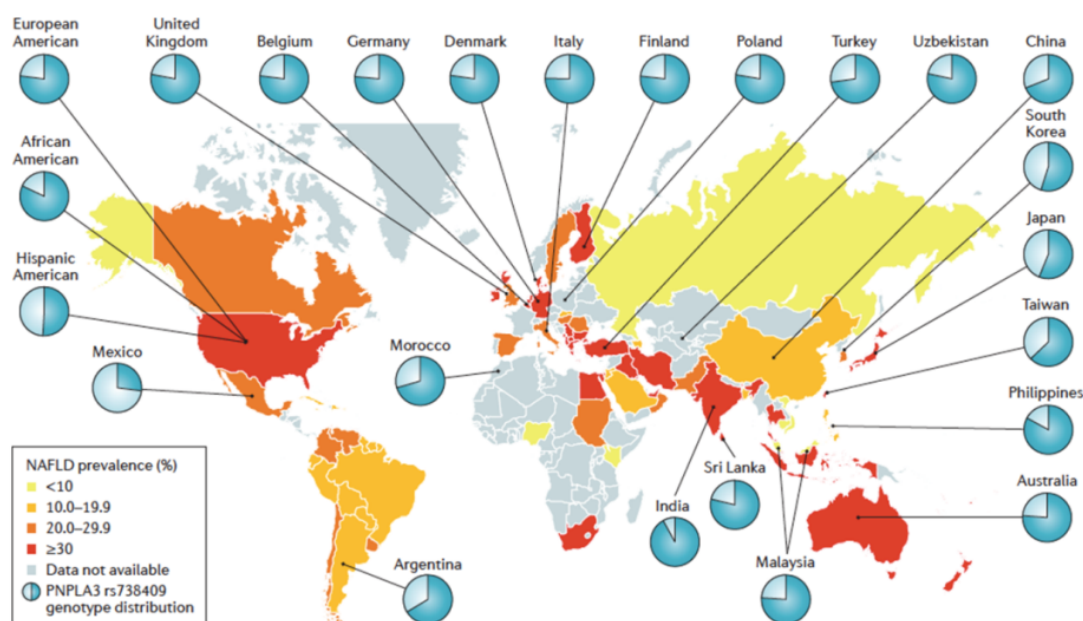


Figure 1 | Worldwide estimated prevalence of NAFLD and distribution of PNPLA3 genotypes. PNPLA3 is presented as minor allele frequency (light blue section of the pie chart).

Figura 1. Prevalencia mundial estimada de EHGNA y distribución del genotipo PNPLA3 (13).

1.2.5. Poblaciones específicas.

1.2.5.1. Mujeres

En general, la prevalencia de la EHGNA es mayor en los hombres que en las mujeres, pero en las mujeres está aumentando. Esta diferencia se ha atribuido principalmente al factor protector de los estrógenos. La prevalencia en los hombres tiende a mantenerse constante (25-27%) mientras que en las mujeres al principio es más baja (12'7%) y presenta un aumento con la edad tras la menopausia, por lo que la prevalencia se vuelve similar o incluso superior en mujeres. Esto va ligado a que la menopausia se asocia a un mayor riesgo de enfermedades metabólicas. Se ha sugerido que las mujeres pueden presentar formas más graves de la enfermedad y una mayor mortalidad por cirrosis (14).

1.2.5.2. Infancia

No es una patología limitada a los adultos, también tiene una prevalencia elevada en los niños y adolescentes (4), lo que se ha relacionado con cirrosis y cáncer hepático en la edad adulta (1). La prevalencia también está en aumento debido al incremento en la tasa de obesidad en esta franja de edad (7). El 38% de los niños obesos tienen evidencia de EHGNA (2). Además, la presentación en niños es diferente a la de los adultos. Existe una mayor prevalencia en niños que en niñas y en etnia hispana respecto la negra (4).

1.3. HISTORIA NATURAL

La historia natural de la EHGNA es mucho más **impredecible** en comparación con el resto de enfermedades hepáticas crónicas, como la hepatitis B o C, y su progresión depende de la combinación de factores genéticos, ambientales, y microbianos intrínsecos (10).

Por lo general, la EHGNA es una enfermedad **lentamente progresiva** a lo largo de los años, (10), que comienza con la esteatosis hepática, y a continuación, progresa a EHNA aproximadamente en el 15-20% de los pacientes, entre los cuales el 30-40% desarrollan fibrosis, y de éstos, el 15-20% evolucionan a cirrosis. Por último, los pacientes con cirrosis por EHGNA tienen riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma (14). De este modo, se puede correlacionar la evolución natural de la enfermedad con la edad media de aparición de las fases, siendo de 40-50 años en la EHNA, mientras que la cirrosis es más tardía, sobre los 50-60 años (2).

No obstante, el orden de aparición **no siempre es continuo**, ya que se puede pasar a una etapa avanzada sin pasar por fases intermedias y también regresar a estadios más iniciales. De este modo, la esteatosis puede progresar a EHNA, pero también directamente a fibrosis aunque sea en una baja proporción (4). Y de la misma forma, aunque el riesgo de progresión a cirrosis es mayor en los pacientes con EHNA, y el de carcinoma hepatocelular en los pacientes con cirrosis, éstos también pueden ocurrir en pacientes con estadios iniciales de fibrosis (1). Por consiguiente, observamos que la EHGNA no presenta una progresión lineal, sino que es una enfermedad que abarca un largo periodo de tiempo en el que los pacientes pueden experimentar progresiones y regresiones espontáneas entre los distintos estadios (4). Además, la evolución natural de la EHGNA se puede modificar, e incluso revertir, a través de cambios en la dieta y en el estilo de vida (10).

Dentro de la fibrosis, se distinguen cinco **estadios**. Fibrosis temprana (F0: ninguna fibrosis/F1: fibrosis mínima, perisinusoidal); F2, fibrosis significativa, perisinusoidal y periportal; F3, fibrosis avanzada, en puente; F4, cirrosis, con nódulos regenerativos. Se considera fibrosis avanzada el estadio F3 o superior (14).

Entre los pacientes con EHGNA que desarrollan fibrosis hepática progresiva, existen dos categorías: los progresadores lentos representan la gran mayoría de pacientes (alrededor de un 80%) que evolucionan de F0 a F1 o F2; y los progresadores rápidos (20%), que evolucionan directamente de F0 a F3 o F4 (cirrosis) (10).

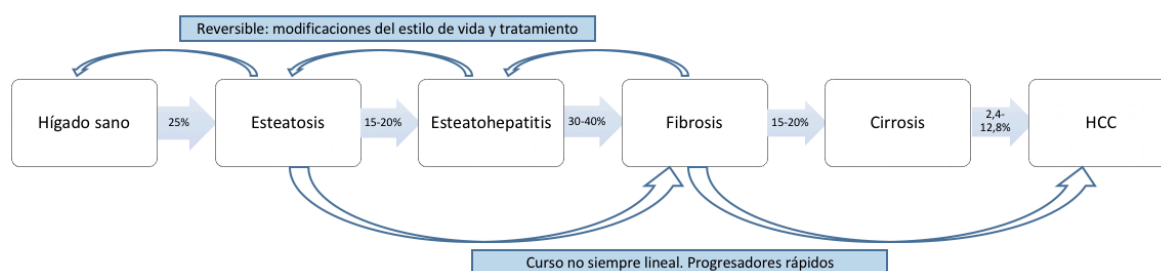


Figura 2. Historia natural de la EHGNA. (4,7)

1.3.1. Complicaciones extrahepáticas

Hay una gran cantidad de enfermedades vinculadas con la EHGNA, las llamadas manifestaciones extrahepáticas, muy relevantes puesto que están estrechamente relacionadas con la **morbimortalidad** (1) y el aumento del gasto económico (4). Como primera causa de mortalidad en la EHGNA encontramos la **cardiovascular**, seguida del **cáncer (no hepatocarcinoma)** y relegando la mortalidad hepática al tercer lugar (1). Sin embargo, se cree que esto es solo para pacientes en estadio incipiente, mientras que para pacientes con fibrosis avanzada y cirrosis, domina la mortalidad hepática (4).

Los pacientes con **fibrosis más avanzadas** tienen mayor riesgo tanto de complicaciones hepáticas como extrahepáticas, lo que está directamente relacionado con el estadio de fibrosis (5). Por esto, se ha reportado la fibrosis como el principal causante de mortalidad (2).

En cuanto a las complicaciones hepáticas, los pacientes con EHGNA, especialmente los cirróticos, pueden desarrollar **hepatocarcinoma** (incidencia aproximada del 2'4-12'8%) (4). El hepatocarcinoma está creciendo a un ritmo alarmante en gran parte debido al incremento en pacientes con EHGNA (2), de modo que actualmente es el quinto cáncer más prevalente a nivel mundial (1). Se calcula que la EHGNA es la séptima causa de cáncer y la tercera de cáncer causante de muerte a nivel mundial (4). Además, la EHGNA se asocia a una mayor incidencia de otro tipo de **cánceres (no hepatocarcinoma)**, principalmente de útero, estómago, páncreas y colon (1).

La EHGNA contribuye por sí misma a la morbimortalidad **cardiovascular**, aumentando notablemente a partir del estadio de fibrosis 2 y en particular con la cirrosis (10) independientemente del resto de factores de riesgo cardiovascular (7). A esto hay que añadir la presencia de dichos factores de riesgo cardiovascular, a los que muchas veces se asocian (1). Pese que se han demostrado múltiples mecanismos implicados, aún se desconoce con exactitud la fisiopatología y la influencia del tratamiento de la EHGNA en su curso (4).

Como hemos comentado, otras comorbilidades o complicaciones frecuentes son la **obesidad** y la **diabetes mellitus**. Se ha asociado el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina con la mortalidad hepática, cardiovascular y global (4), de modo que los diabéticos tienen una mortalidad de dos a tres veces superior cuando se asocia EHGNA (1).

En cuanto a la **insuficiencia renal crónica (IRC)**, su prevalencia y gravedad (estadio de IRC) aumenta con la EHGNA y con la severidad y el grado de fibrosis hepática. Se cree que los mecanismos implicados son la activación del sistema renina-angiotensina, la alteración del sistema antioxidante y la alteración de la lipogénesis (1).

1.4. PATOGENIA

La patogenia de la EHGNA es multifactorial y compleja, de modo que todavía no se conoce por completo. En la última década, se han desarrollado varias hipótesis entre las que destaca la **teoría de los "múltiple hits"** donde se ven implicados numerosos sucesos y órganos (8), en la que se incluyen interacciones complejas de factores hormonales, genéticos y nutricionales (2). Dicha teoría se basa en la existencia de diversas causas ("hits") cuya suma explicaría la aparición de la EHGNA (9) como por ejemplo modificaciones epigenéticas, ingesta dietética, hormonas secretadas por el tejido adiposo (leptina, adiponectina), interferencias entre diferentes órganos o tejidos... (6) Radica principalmente en la afectación de tres sistemas: daño **hepático**, inflamación del tejido **adiposo** (TA) y alteraciones a nivel **gastrointestinal** que incluyen la disbiosis (9). Estos tres sistemas se correlacionan íntimamente estableciendo interacciones bidireccionales y contribuyendo a la evolución de la inflamación y fibrosis en la EHGNA (9).

1.4.1. Mecanismos de daño hepático

1.4.1.1. Patogenia de EHGNA.

1.4.1.1.1. Esteatosis hepática

La esteatosis hepática se define como la acumulación de triglicéridos en el hígado. Definimos esteatosis simple (ES) como la presencia de esteatosis hepática <5% sin evidencia de lesión hepatocelular. En condiciones normales, en el hígado hay un equilibrio entre la ganancia de triglicéridos (captación desde la circulación sanguínea de ácidos grasos libres y lipogénesis de novo) y la pérdida (degradación de ácidos grasos mediante la beta-oxidación y la liberación a circulación dentro de las lipoproteínas VLDL). No obstante, el aumento de la ingesta de grasas conduce a un exceso de ácidos grasos libres y, por consiguiente, una alteración en estas vías con un aumento de la lipogénesis de novo y disminución de la excreción hepática de triglicéridos, almacenándose como gotas de lípidos en los hepatocitos (2,3,8).

La **β -oxidación** de los ácidos grasos en los hepatocitos se regula principalmente por el receptor nuclear activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR α). En la EHGNA se ha observado una disminución de este receptor (2,8).

Por otro lado, la hiperglucemia es un estímulo para la **lipogénesis de novo**, puesto que está regulada por la insulina a través de la activación del factor de transcripción de la proteína de unión al elemento regulador del colesterol (SREBP-1c), cuya activación aumenta la síntesis y captación de ácidos grasos, lípidos y colesterol conduciendo a la esteatosis hepática. Este mecanismo es un regulador de la homeostasis lipídica, glucídica y de la inflamación y puede explicar la relación de EHGNA con la resistencia a la insulina (2,8). Además, en la EHGNA aumentan la generación de moléculas lipídicas dañinas (lipotoxicidad) que incrementan aún más la resistencia a la insulina convirtiéndose en un bucle de retroalimentación en el que la lipogénesis estimula la resistencia a la insulina y ésta la lipogénesis (3).

También hay que tener en cuenta los **cambios estructurales** en las gotas de lípidos hepáticas, como en la proteína específica de grasa 27 (FSP27), relacionados con la esteatosis (8).

1.4.1.1.2. Lipotoxicidad hepática

El acúmulo de lípidos conduce a la lipotoxicidad hepática, referida al daño hepático causado por la alteración del metabolismo celular debido al acúmulo de ácidos grasos en el hígado (3).

El exceso de lípidos conduce a **estrés oxidativo** mediante la disfunción mitocondrial, la peroxidación anormal de lípidos (favorecen la fibrogénesis mediante la estimulación de las células estrelladas) y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que inducen la participación del sistema inmune con la liberación de citoquinas, la síntesis de receptores tipo Toll (TLR-4), y la activación de los macrófagos hepáticos inflamatorios (2,3).

1.4.1.2. Patogenia de EHNA.

1.4.1.2.1. Mecanismos de lesión e inflamación de los hepatocitos

La lesión hepatocelular en la EHGNA se da por múltiples vías como el estrés del retículo endoplásmico, la activación del inflamosoma y de las vías apoptóticas y lipotoxicidad hepática. Los triglicéridos almacenados en las gotas lipídicas no parecen ser tóxicos para los hepatocitos, pero sí sus precursores e intermediarios (como el palmitato, el diacilglicerol y la ceramida) y el aumento del colesterol libre (8).

Los hepatocitos dañados liberan varios mediadores pro-inflamatorios que incluyen patrones moleculares asociados al daño (DAMP) y patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP) (8). Estos interactúan con el denominado **inflamosoma**, un complejo citoplasmático multiproteico que induce la apoptosis celular (2) y la activación de células inmunes que liberan moléculas

hepatotóxicas. Por lo tanto, se amplifica la inflamación y muerte celular, favoreciendo el desarrollo de EHNA (8).

1.4.1.2.2. Mecanismo de la fibrogénesis

La muerte crónica de hepatocitos y su regeneración deficiente sumado a la estimulación del sistema inmune, promueven la activación de las células estrelladas hepáticas que actuarán generando fibras y matriz extracelular. Esto conlleva la formación de cicatrices y alteración de la arquitectura normal de los lóbulos hepáticos (8). La fibrosis en el espacio perisinusoidal es bastante específica de la EHNA (2).

1.4.1.2.3. Mecanismo de hepatocarcinogénesis

El hepatocarcinoma (HCC) se suele desarrollar en etapas avanzadas de fibrosis y especialmente cirrosis, lo que se explica por la secuencia de daño hepático habitual: inflamación, fibrosis y HCC. No obstante, también puede darse en estadios más iniciales de fibrosis. Esto podría ser explicado por la comorbilidad frecuente con **obesidad y diabetes**, que también se han reportado como factores de riesgo de HCC. Aunque todavía no se conoce del todo este mecanismo de carcinogénesis, se ha relacionado con la resistencia a la insulina, la liberación de productos finales de la glicosilación y alteraciones genéticas como PNPLA3, TERT y MBOAT (8).

1.4.2. Alteración del tejido adiposo

1.4.2.1. Relación con la obesidad

En la obesidad, principalmente la visceral, encontramos un **estado inflamatorio crónico de baja intensidad** local y sistémico que implica tanto la inmunidad innata (a través de la activación de los TLR de los adipocitos), como la adaptativa. También se observa liberación de múltiples citoquinas, con aumento de las proinflamatorias: TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6; y disminución de las antiinflamatorias: IL-37, quimiocinas (CCL2) y adipocinas. Asimismo, se da la infiltración del tejido adiposo por células inmunes (9). Por ejemplo, los macrófagos residentes del tejido adiposo se activan aumentando la producción de mediadores proinflamatorios que pueden alterar la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo (3). Se especula que el inicio de la inflamación se produce por la dieta y se mantiene por las células inmunes infiltrantes (9).

Este estado inflamatorio estimula la lipólisis con el consiguiente aumento de los ácidos grasos libres que llegan al hígado produciendo esteatosis. Pero aún más importante es la relación directa de la inflamación con el grado de **daño hepático de la EHGNA y la resistencia a la insulina** (y diabetes mellitus tipo 2). Es el llamado **eje tejido adiposo-hígado**, causante de inflamación y fibrosis hepática y relacionado con la progresión de EHGNA a EHNA (9).

Las **adipocinas** son hormonas secretadas por el tejido adiposo, siendo las más estudiadas la adiponectina y la leptina. Tanto en la obesidad como en la EHGNA se observan niveles bajos de adiponectina y altos de leptina. La adiponectina está relacionada con el metabolismo lipídico (oxidación e inhibición del acúmulo de ácidos grasos) y glucídico (sensibilidad a la insulina hepática) y su disminución promueve un estado crónico inflamatorio del hígado. Por otro lado, la leptina controla el equilibrio energético y el apetito, mientras que niveles elevados impulsan la activación de las células estrelladas hepáticas y por lo tanto fibrosis (3).

1.4.2.2. Relación con la diabetes mellitus

La **resistencia a la insulina** es el elemento clave que aparece tanto en la EHGNA como en la diabetes mellitus. Aunque es difícil determinar cuál es la causa y cuál la consecuencia, lo más seguro es que haya una relación bidireccional entre ambas (3).

La **obesidad** y la inflamación sistémica son causantes de la resistencia a la insulina. De forma inversa, la **resistencia a la insulina** se ha identificado como causante de inflamación hepática y del tejido adiposo. Hay una relación en ambos sentidos entre la inflamación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina, lo que contribuye a la evolución de la **EHGNA** (9). Por lo tanto, la resistencia a la insulina y la inflamación, forman un **círculo vicioso**, ya que se promueven entre sí y aceleran el desarrollo de la EHGNA hacia EHNA y fibrosis (2,3). Esto convierte a la diabetes mellitus en una potencial diana terapéutica para la EHGNA. Se ha demostrado que la disminución de la resistencia a la insulina provoca una mejoría de la EHGNA (5,9), y por otro lado, la resolución de la esteatosis hepática puede prevenir el inicio de la DM tipo 2 (3).

1.4.3. Alteración gastrointestinal

Existe una estrecha relación entre diversos factores gastrointestinales y el hígado, el denominado **eje intestino-hígado** (9). Se ha relacionado principalmente con la disbiosis intestinal; no obstante, también tiene importancia otros aspectos como el sistema inmune, la dieta y las hormonas intestinales. Todos ellos podrían tener un papel importante en el desarrollo de la EHGNA y otros trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes mellitus (9,10).

1.4.3.1. Microbiota intestinal. Disbiosis

En la última década se han identificado múltiples bacterias intestinales y sus metabolitos con una implicación tanto en el inicio como progresión de la EHGNA hacia la EHNA (6,9). Se postula que la microbiota intestinal tiene un efecto sistémico, más allá del intestino, pudiendo contribuir tanto a la salud como la enfermedad de múltiples enfermedades metabólicas (9).

Se ha observado en la EHNA un aumento de algunas **bacterias** como Proteobacteria, Enterobacteriaceae, Escherichia coli y Bacteroides mientras que disminuyen los Bacteroidetes y Prevotella (9). Por otro lado, se ha relacionado el microbioma con la aparición de la fibrosis y cirrosis, en concreto se observó un aumento de Proteobacteria, E.coli y Ruminococo y un descenso de Firmicutes (como Faecalibacterium prausnitzii) (6,9).

También se ha descrito un posible rol de las **endotoxinas** hepáticas y circulantes y de cepas productoras de endotoxinas, como Enterobacter cloacae B29, Escherichia coli PY102 y Klebsiella pneumonia A7, que se encuentran aumentadas por su paso desde el intestino vía portal (9).

Paralelamente, se han encontrado múltiples **metabolitos** relacionados con la microbiota que pueden estar involucrados con el desarrollo de la EHGNA. Algunos ejemplos son el fenilacetato, propionato de imidazol, N, N, N-trimetil-5- ácido aminoaléxico (TMAVA) y 3- (4-hidroxifenil) lactato (9).

Por otro lado, la microbiota y sus metabolitos podrían tener potencial utilidad para el **diagnóstico no invasivo** de EHGNA mediante su uso como biomarcadores y en **el tratamiento**, mediante la modificación de la misma (6,9).

1.4.3.1.1. Alteración de la permeabilidad y sistema inmune intestinal

La disbiosis y los factores dietéticos como una dieta rica en grasas causan un estado inflamatorio intestinal de bajo grado subclínico que altera la **permeabilidad intestinal** y facilita la translocación de bacterias, componentes bacterianos (los llamados PAMP, por ejemplo los lipopolisacáridos, peptidoglicanos y flagelos bacterianos), metabolitos, DNA y células inmunes intestinales a la circulación portal, lo que en última instancia podrían interactuar con el hígado causando esteatosis hepática (9).

Un factor implicado es la mayor producción de etanol intestinal por las bacterias intestinales que actúa destruyendo las uniones ocluyentes (tight junction), aumentando la permeabilidad intestinal, y directamente como tóxico hepático (6).

El **sistema inmune** responde mediante el inflamosoma a los PAMPs (2,3) con su unión a los receptores de reconocimiento específicos del patógeno (por ejemplo, receptores tipo Toll en el hígado como TLR-4), lo que conduce a la secreción de citoquinas proinflamatorias que inducen inflamación y fibrosis del hígado (6). Por ejemplo, se ha relacionado el inflamosoma NLRP3 con la progresión de la EHGNA y la obesidad (3). Además, el sobrecrecimiento bacteriano provoca la activación de las células de Kupffer (9). Por otro lado, se ha relacionado los macrófagos proinflamatorios del colon con la sensibilidad a la insulina, la permeabilidad intestinal y la inflamación del tejido adiposo (el denominado **eje tejido adiposo-intestino**) (9).

1.4.3.1.2. Microbioma tisular y sistémico

Se cree que el microbioma tisular (en hígado y tejido adiposo) y circulante (en sangre) podrían ser expansiones de la disbiosis intestinal, constituyendo una firma genética específica de múltiples enfermedad como la EHGNA, obesidad, DM 2 o incluso cánceres sólidos (9).

1.4.3.2. Factores dietéticos

Los factores dietéticos actúan de forma directa en el metabolismo lipídico y glucídico y, de forma indirecta, en alteraciones funcionales del microbioma (disbiosis) (1,9).

Se han identificado múltiples alimentos con propiedades proinflamatorias o antiinflamatorias. Se ha demostrado que la dieta occidental (alto consumo de grasa, alcohol, sal, cereales refinados, fructosa y carnes rojas) es proinflamatoria mientras que la dieta isocalórica restringida o mediterránea es antiinflamatoria y además ha demostrado beneficios en cuanto el peso, transaminasas y resistencia a la insulina(9). Por lo tanto, una intervención dietética específica es una estrategia prometedora para el tratamiento de la EHGNA en el futuro (9).

1.4.3.3. Las hormonas intestinales

La nutrición y algunos factores hormonales (insulina y leptina) inducen la secreción de hormonas intestinales como la grelina, el péptido YY y el péptido similar al glucagón 1/2 (GLP-1/2) que son transportadas a la circulación sistémica para realizar su acción en los órganos diana, como el hígado y el tejido adiposo, regulando así el metabolismo de la glucosa, la resistencia a la insulina, y la inflamación metabólica relacionados con la EHGNA. Además, estas hormonas pueden verse afectadas por los metabolitos del microbioma intestinal. (6)

1.5. DIAGNÓSTICO

Diferenciaremos el proceso diagnóstico en dos partes: el diagnóstico de EHGNA y el diagnóstico de EHNA, es decir, la distinción entre los casos de esteatosis simple (ES) de aquellos con inflamación y fibrosis (EHNA).

Actualmente, existe una falta de protocolos y directrices que incluyan el screening y diagnóstico por pruebas de imagen y serológicas (3), lo que dificulta el seguimiento y el tratamiento ante cambios (8). Dada la elevada prevalencia e impacto en la morbilidad y mortalidad de la población, se necesitan establecer estrategias de diagnóstico y seguimiento que permitan estratificar correctamente a los pacientes (especialmente a aquellos con EHNA) teniendo en cuenta la disponibilidad y rentabilidad (coste –efectivo), más aún con la próxima introducción de nuevos tratamientos en un futuro cercano (1,5).

1.5.1. Diagnóstico de la EHGNA

La EHGNA causa diferentes manifestaciones clínicas según la progresión de la enfermedad. Generalmente, no presenta signos o síntomas significativos de forma que el paciente está **asintomático** pese a que la enfermedad puede seguir progresando. Además, cuando están presentes, las manifestaciones clínicas son muy **heterogéneas** incluyendo fatiga, hepatomegalia, dolor abdominal y signos de cirrosis en etapas avanzadas (2).

Por lo tanto, lo más frecuente es que se detecte por **alteraciones analíticas** de la función hepática (elevación persistente de transaminasas, sobretodo ALT y AST, especialmente si se asocian a más factores de riesgo metabólico) o como hallazgo causal de **estudios de imagen** realizados por otros motivos (presencia de grasa hepática en ecografía o TAC) que se consideran hallazgos incipientes de EHGNA (2,8) .

1.5.1.1. Anamnesis y exploración física

Se deberá explorar los factores de riesgo (dieta, peso y actividad física), comorbilidades asociadas (diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, obesidad y apnea del sueño) y antecedentes familiares de trastornos cardiovasculares, metabólicos y hepáticos. También es recomendable la medida de la tensión arterial, IMC, peso y circunferencia abdominal (2).

El **diagnóstico diferencial** se realiza con otras causas de hígado graso o patologías que imitan la esteatosis hepática, principalmente la hepatopatía alcohólica (definido como el consumo diario de más de 20g/d en mujeres y 30g/d en hombres) (1) lo que a veces puede resultar difícil debido a la variabilidad interindividual del impacto del etanol y la dificultad de estimar la cantidad exacta de ingesta (8).

1.5.1.2. Pruebas de laboratorio

Los valores de las transaminasas se han asociado a la EHNA y a la presencia de sus parámetros histológicos (inflamación, esteatosis) (12); sin embargo, **no se correlacionan adecuadamente** (2), especialmente con el grado de fibrosis (12). Los niveles bajos de transaminasas no excluyen la enfermedad puesto que en estadios de fibrosis avanzada o cirrosis, sus niveles disminuyen considerablemente (8). Además, tampoco sirven para evaluar la mejoría tras la instauración de tratamiento (12). Por todo ello, se han considerado como marcadores **deficientes** de la EHGNA (10) y no resultan muy útiles para el diagnóstico (2).

1.5.1.3. Pruebas de imagen

Las pruebas de imagen permiten controlar la progresión de la EHGNA y evaluar la respuesta terapéutica (8). La **ecografía** es la técnica más extendida por su simplicidad, accesibilidad, bajo coste y gran sensibilidad y especificidad para casos moderados y graves de esteatosis hepática. Sin embargo, su precisión disminuye en grados menores de esteatosis (2,10). Otras técnicas de imagen como la **tomografía computarizada (TC)** o la **resonancia magnética (RM)** pueden detectar niveles más bajos de esteatosis y fibrosis, especialmente la RM, pero no pueden ser usados rutinariamente para la evaluación de la ES (2).

1.5.2. Diagnóstico de EHNA

Una vez diagnosticado de EHGNA, el siguiente paso es evaluar la inflamación y fibrosis para diferenciar aquellos que presenten EHNA, lo que resulta importante ya que este grupo de pacientes tienen un **elevado riesgo de desarrollar complicaciones** y una mayor **mortalidad** (1).

El diagnóstico se basará en la detección de la **fibrosis**, principal determinante de pronóstico de la enfermedad (1), de complicaciones hepáticas y extrahepáticas (5) y de aumento de la morbilidad y mortalidad por todas las causas (12).

1.5.2.1. Histología. Biopsia Hepática

Históricamente el diagnóstico de la fibrosis se realizaba mediante la biopsia hepática, que continúa siendo la **prueba gold estándar** (3,10) ya que permite distinguir los diferentes estadios de fibrosis (1) e identificar fibrosis temprana (12). Sin embargo, actualmente en la mayoría de casos, se realiza el diagnóstico mediante **técnicas no invasivas** ya que la biopsia es una prueba cruenta, cara, propensa a errores de muestreo y con variabilidad inter y intraobservador (1,8,12). La indicación de biopsia ha quedado relegada a cuando el diagnóstico sea incierto o se dude entre múltiples patologías tras la realización de las pruebas rutinarias (2). Por otro lado, aún no tenemos marcadores histopatológicos capaces de predecir la progresión a cirrosis (2).

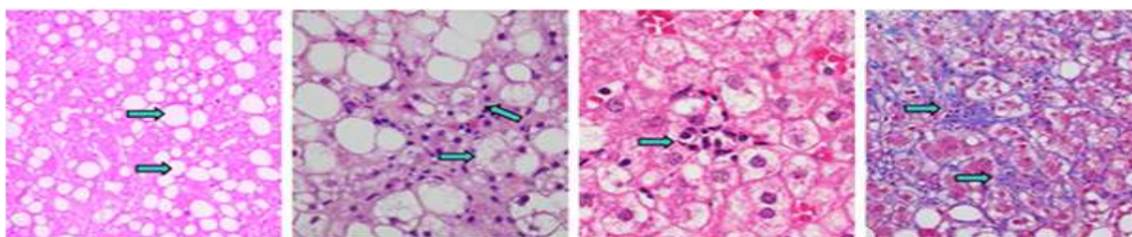


Figura 3. Biopsia hepática. Se marcan con flechas los aspectos típicos de esteatosis macrovesicular (grasa), abombamiento hepatocelular, inflamación (portal y lobulillar) y fibrosis (2).

1.5.2.2. Técnicas no invasivas

Disponemos de diversas herramientas no invasivas para el diagnóstico y estratificación del riesgo de fibrosis (1), basadas principalmente en análisis de sangre y pruebas de imagen (8). Resultan especialmente útiles para excluir **fibrosis avanzada**, mientras que su fiabilidad descende en la detección de fibrosis temprana, por lo que son de interés en aquellos pacientes con alto riesgo de EHNA (12). Las principales se resumen a continuación.

1.5.2.2.1. Biomarcadores. Sistemas de puntuación (scores)

Durante la última década se han desarrollado diversos biomarcadores y sistemas de puntuación (modelos predictivos), basados en la combinación de **datos clínicos** (factores de riesgo) y **datos de rutina de laboratorio** (parámetros de daño hepático) (1,8,12).

En un futuro podrían ser implementados en la práctica clínica como **primera herramienta de estadificación** (1) y **despistaje** en pacientes con EHNA, dada su capacidad para excluir EHNA con fibrosis avanzada (alto VPN pero bajo VPP), su bajo precio y facilidad de obtención. De esta forma, se podrían evitar biopsias hepáticas innecesarias (12). También se han mostrado útiles para el seguimiento (evaluar la progresión o mejoría) y evaluar el desarrollo de complicaciones a largo plazo y mortalidad (1,12).

Sin embargo, los datos actuales apuntan a que todos estos sistemas **no son efectivos para realizar un despistaje a nivel poblacional** (1) siendo necesario la realización de más estudios antes de poder utilizarlos en la práctica clínica (12). Además, tienen múltiples **limitaciones**: no existen biomarcadores capaces de detectar fibrosis temprana o aquellos con alto riesgo de progresión (8), no diferencian la esteatosis hepática de la EHNA (12) ni entre los diferentes estadios de EHNA (2) (aunque su rendimiento aumenta si se combinan varios) y no están validados para evaluar la respuesta al tratamiento (12).

A destacar están el NAFLD fibrosis score (**NFS**) y el índice de fibrosis 4 (**FIB-4**) que han demostrado ser coste efectivos y con una alta sensibilidad para el diagnóstico de la fibrosis avanzada, siendo NFS el que mejor puede predecir las complicaciones hepáticas y mortalidad (12), y el más coste efectivo (1). AST to platelet ratio index (**APRI**) ha demostrado ser efectivo en población diabética, en la que el NFS tiene una menor rentabilidad (5).

1.5.2.2.2. Los nuevos tests en sangre de fibrosis.

Recientemente se ha desarrollado nuevas pruebas, más específicas, basadas en el análisis de sangre de productos específicos de la síntesis y degradación de colágeno, es decir, medidas directas de la fibrosis (8). Estos tests se han mostrado superiores respecto los modelos predictivos (12). En un futuro, también podrían ser utilizados en el despistaje de pacientes con riesgo intermedio o alto de fibrosis severa (3); sin embargo, son pruebas caras, aún no disponibles en la práctica clínica y pendientes de validación en la EHGNA (1).

Los principales son FibroTest (FT), Fibrometer, el Enhanced Liver Fibrosis Test (ELF). **ELF** se ha mostrado como el de mayor sensibilidad aunque con limitada especificidad para la fibrosis avanzada (1) y el mejor predictor de las complicaciones y mortalidad (12). Para más información sobre los principales sistemas de puntuación y tests de fibrosis en estudio, consultar *anexo 2 y 3*.

1.5.2.2.3. Medición de la rigidez del hígado (elastografía).

En los últimos años se ha introducido en el diagnóstico de la fibrosis hepática la elastografía, un método de medición de la rigidez del hígado basado en el uso de ultrasonidos (a excepción de la elastografía por resonancia magnética). Tanto los nuevos tests en sangre como la elastografía, podrían constituir un segundo paso para la estadificación del riesgo en pacientes con positividad en el modelo predictivo.(5)

La elastografía presenta una peor transmisión en pacientes **obesos**, patología común en la EHGNA, por lo que existe un importante fallo de la prueba (1).

1.5.2.2.3.1. Elastografía de transición (ET)

Su nombre comercial es Fibroscan. Se trata de la técnica no invasiva más ampliamente generalizada en la práctica clínica. Se basa en la prueba M, con la emisión y recepción de ultrasonidos, cuyo resultado se expresa en kilopascales (kPa) (1). Se ha visto que tiene una adecuada exactitud en detectar fibrosis avanzada (F3-F4) (menor para fibrosis F2) y predecir la supervivencia en EHGNA (1).

En pacientes obesos, tenemos la prueba XL, con mayor rentabilidad. Otro posible problema es la esteatosis severa, que puede causar un falso positivo de la prueba. Para evitarlo, resulta útil estimar la cantidad de grasa hepática mediante el parámetro de atenuación controlada (CAP) que puede disminuir los falsos positivos por esteatosis (1,2,8).

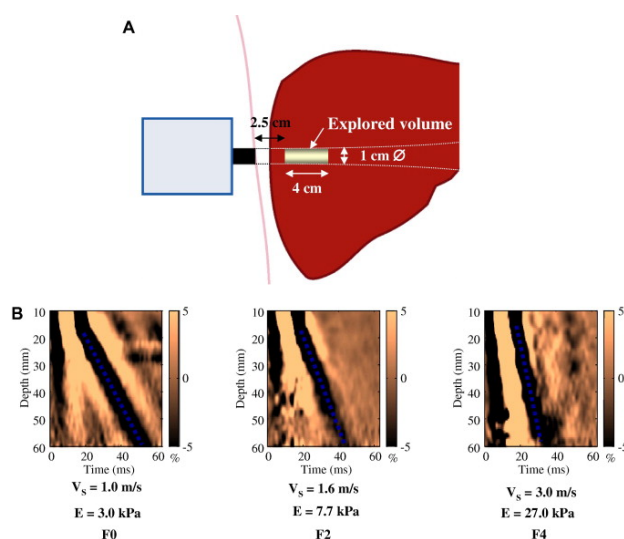


Figura 4. Técnica de la elastografía. A: Posición de la sonda de ultrasonidos y volumen explorado. B: Velocidad de propagación de la onda de corte según la gravedad de la fibrosis hepática (puntuación de Metavir). El módulo de elasticidad E expresado como $E = 3\rho V^2$, donde V es la velocidad de corte y ρ es la densidad de masa (constante para los tejidos): cuanto más rígido es el tejido, más rápido se propaga la onda de corte (15).

1.5.2.2.3.2. Otras técnicas de elastografía

Se están investigando nuevas técnicas de elastografía entre las que se incluye la elastografía de ondas de corte (SWE), la elastografía de ondas de corte puntual (pSWE) y la elastografía por resonancia magnética (ERM) (1). Todas estas técnicas también han demostrado su utilidad en la detección de fibrosis avanzada; sin embargo, los datos son limitados y aún no están disponibles para la práctica clínica por su alto coste (aunque menor que la biopsia) y baja accesibilidad (1).

Cabe destacar la utilidad de la ERM para pacientes **obesos**, en los que presenta un menor fallo de la prueba, además de ser la técnica que mejor ha demostrado cuantificar la fibrosis. Como examen adicional tenemos la fracción de grasa de densidad de protones (PDFF), para la cuantificación de la grasa hepática (el equivalente al CAP de la ET, siendo PDFF más exacto) (1). Las nuevas técnicas de imagen que incluyen el CAP, PDFF y la espectroscopia de resonancia magnética de protones (1H-MRS) son más precisas y cuantificables, y pueden convertirse en el *gold standard* para la detección de la EHNA en pacientes de alto riesgo (3,10).

1.5.2.2.4. Otras técnicas diagnósticas en investigación.

Actualmente se están investigando múltiples **biomarcadores** como nuevos marcadores de degradación del colágeno (12), los biomarcadores moleculares en sangre (microARN circulante, ARN libre, metilación del DNA y metilación de DNA libre (1,12) y el marcador de la activación de los macrófagos sCD163 (1)) y nuevas vías para detectar los biomarcadores como la espectrometría de masas (12). Además, se están probando nuevas **vías que combinen diversas modalidades**. Ejemplos son los modelos que combinen sistemas de puntuación y los nuevos tests en sangre (por ejemplo FIB-4 y ELF) (1) o la combinación con técnicas de imagen (por ejemplo la combinación FAST: elastografía, CAP y AST) (1,12).

También puede ser de utilidad la **firma metagenómica del microbioma intestinal** mediante la secuenciación del genoma de la microbiota para la identificación de fibrosis. Por otro lado tenemos las **pruebas genéticas** que han identificado polimorfismo de un solo nucleótido relacionados con la EHNA como PNPLA3 y TM6SF2 y la variante rs641738 de MBOAT7 (1,12).

1.5.3. Despistaje

Actualmente, únicamente se recomienda el **despistaje de hepatocarcinoma**, mediante ecografía cada 6 meses, cuando exista cirrosis. No está indicada en todos los pacientes con EHNA dada su baja prevalencia. Sin embargo, se está planteando realizar un despistaje también en pacientes con fibrosis avanzada, especialmente cuando se asocia a algún otro factor de riesgo (1).

Por otro lado, dada la estrecha relación de la EHNA con la diabetes, se recomienda un **despistaje de diabetes** a todos los pacientes (1). Identificar esta enfermedad es importante más aún cuando está relacionada con mayor daño hepático, el inicio y la progresión hacia la EHNA y el desarrollo del hepatocarcinoma (3).

1.6. TRATAMIENTO

No existen agentes farmacológicos específicos aprobados para EHNA, de modo que los objetivos principales de prevención y tratamiento se centran en actuar sobre sus factores de riesgo y comorbilidades (7) mediante un abordaje multidisciplinar (5).

1.6.1. Modificaciones del estilo de vida

Actualmente las únicas estrategias aprobadas efectivas disponibles son las modificaciones del estilo de vida (7,10). Estas deben prescribirse desde el diagnóstico puesto que son las fases iniciales de la EHNA y EHNA las que pueden ser reversibles (8), mejorando tanto la esteatosis

como la inflamación y el riesgo cardiovascular (2). Incluyen evitar el estilo de vida sedentario, aumentar las actividades diarias, el ejercicio físico regular y la alimentación saludable (8).

La **pérdida de peso** es la intervención más efectiva. Se recomienda una pérdida de al menos un 5-10% del peso, lo que ha demostrado disminuir la esteatosis, revertir la EHNA e incluso una regresión considerable de la fibrosis (3,10). No obstante, esto puede ser difícil de lograr y mantener. En los pacientes con obesidad mórbida, una opción válida es la cirugía bariátrica (2,8), que ha demostrado mejorar la supervivencia a largo plazo aunque se discute su seguridad y eficacia (7).

1.6.2. Tratamiento farmacológico

Como hemos comentado, no hay un tratamiento específico para la EHNGA. Además, la eficacia de un mismo fármaco puede variar ampliamente entre individuos (8). La combinación de tratamientos parece tener mayores beneficios que la monoterapia (3).

1.6.2.1. Tratamiento de las comorbilidades metabólicas

Una de las bases del tratamiento de la EHNGA es corregir los trastornos metabólicos acompañantes, como la diabetes y la dislipemia (8), por lo que resultan útiles los **antidiabéticos y las estatinas** (7).

1.6.2.1.1. Antidiabéticos

Se recomienda que tomen tratamiento hipoglucemiante los pacientes con **EHNGA y DM 2** (8), con tal de retrasar el inicio de las complicaciones propias de la diabetes así como reducir la esteatosis y fibrosis de la EHNGA (3). No obstante, no se recomienda en pacientes con EHNGA aislada por falta de resultados significativos a nivel histológico (2,3).

Se está investigando la utilización de metformina, pioglitazona, agonistas del receptor del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4i) e inhibidores del cotransportador 2 de sodio y glucosa (SGLT2i). Prácticamente todos los hipoglucemiantes han demostrado beneficios en la EHNGA. Aunque existan diferencias según el grupo de fármacos, en conjunto se ha observado mejoría en la pérdida de peso, disminución de las transaminasas, disminución de la esteatosis e incluso fibrosis y beneficio cardiovascular (3,5,8,10).

1.6.2.1.2. Hipolipemiantes

Los **ácidos grasos omega-3** mejoran la esteatosis hepática y controlan la dislipemia, por lo que se pueden utilizar para reducir el riesgo cardiovascular (2).

Las **estatinas** han demostrado frenar la progresión de la cirrosis, la hipertensión portal y el HCC, aunque presentan un leve riesgo de hepatotoxicidad (7). No obstante, no tienen efecto sobre la fibrosis hepática (2). Por consiguiente, solamente se recomiendan en los pacientes con **EHNGA y dislipemia** (8).

1.6.2.2. Antioxidantes y terapias citoprotectoras

Dado que la EHNGA es una condición inflamatoria en la que el estrés oxidativo y la formación de radicales libres contribuyen a su progresión, serán útiles las estrategias que **inhiban la señalización inflamatoria y reduzcan el estrés oxidativo** (2,8).

1.6.2.2.1. Antioxidantes

La **vitamina E** está mostrando resultados en la mejora de las transaminasas y la histopatología por lo que podría recomendarse su administración en forma de suplementos (2). Sin embargo, todavía no se conoce su seguridad a largo plazo y dosis altas (8).

La **pentoxifilina** es un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que también ha mostrado mejorar los parámetros histológicos y los niveles de aminotransferasas (2).

Los micronutrientes como la **colina** y los **polifenoles** actúan como antioxidantes, antiinflamatorios e inhibidores de SREBP1c, reduciendo los triglicéridos (3,10).

1.6.2.2.2. Ácidos biliares y sus vías de señalización

Otra potencial diana terapéutica son los ácidos biliares, cuya acumulación es perjudicial por su efecto pro-inflamatorio y cambios en la composición de la microbiota intestinal (6).

Los **agonistas FXR** reducen la síntesis de ácidos biliares. Los más utilizados son los ligandos FXR naturales (ácido ursodesoxicólico), las moléculas no esteroideas (WAY-362450, PX-102 y GW4064) y los derivados de los ácidos biliares (ácido obeticólico) (6). El ácido ursodesoxicólico también se ha mostrado con propiedades anti-inflamatorias y de reducción de las transaminasas, pero no se recomienda actualmente por la falta de resultados a nivel histológico (2). El ácido obeticólico es el potencial primer fármaco aprobado específicamente para la EHNA (7) puesto que ha demostrado beneficios en la sensibilidad insulina e inflamación y fibrosis hepática (6), aunque aumenta el riesgo cardiovascular (8).

Los **inhibidores de la absorción de ácidos biliares** (como el Colesevelam y la Colestidina) han mostrado beneficios en la mejora del control glucémico, la reducción de los niveles plasmáticos de LDL, la pérdida de peso y la reducción de la esteatosis hepática (6).

Los **inhibidores del transportador ASBT**, como el SC-435 o el Volixibat, atenúan la inflamación hepática y la fibrosis (6).

1.6.2.3. Microbiota y modulación del eje intestino-hígado

Actualmente están cobrando importancia los tratamientos dirigidos a la microbiota y a la modulación del eje intestino-hígado, como los probióticos, prebióticos y simbióticos (8). No obstante, todavía se requieren más estudios para poder generalizar su uso (6).

Los **antibióticos**, utilizados a corto plazo, reducen la cantidad de flora intestinal cuyos componentes microbianos y metabolitos están involucrados en la patogenia de la EHNA y pueden promover el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas. No obstante, a largo plazo presentan potenciales efectos adversos (6).

Los **probióticos** son preparados que contienen microorganismos viables. Han mostrado beneficios mediante la alteración de la composición de la flora microbiana. También pueden producir péptidos antimicrobianos, reducen la permeabilidad intestinal y previenen la translocación bacteriana (6).

Los **prebióticos** son preparados alimentarios no digeribles que contienen microorganismos no vivos para promover selectivamente la proliferación o la actividad de uno o varios microbios intestinales y los **simbióticos** son una combinación de prebióticos y probióticos. La suplementación con prebióticos reduce la lipogénesis *de novo* y la inflamación hepática (6) de manera que disminuye la esteatosis y la EHNA a nivel histológico (3).

Los **materiales adsorbentes** se unen a las toxinas y productos bacterianos del intestino deteniendo su absorción a la circulación sistémica y endotoxemia (6).

El **trasplante de microbiota fecal** permite reconstruir una microbiota gastrointestinal “sana”. Ha demostrado mejorar las uniones estrechas (tight junction) implicadas en la permeabilidad intestinal y atenuar la gravedad de la EHNA (6).

1.6.2.4. Nuevas y potenciales dianas terapéuticas

En los últimos años se están investigando múltiples nuevas moléculas para el tratamiento de la EHGNA con resultados prometedores (10) siguiendo la idea de la teoría de los “multiple hits” que contribuyen a su patogenia (3,10). Para consultar los nuevos fármacos en estudio para el tratamiento de la EHGNA ver *anexo 4*.

1.6.3. Trasplante de hígado

El trasplante de hígado es el único tratamiento disponible para la enfermedad hepática terminal por EHGNA (2,14). Resulta curativo y mejora la supervivencia de los pacientes (7).

En los pacientes con EHGNA existen con frecuencia ciertas características como la edad avanzada, la obesidad y múltiples comorbilidades, que hacen que el trasplante hepático tenga una mayor **mortalidad** respecto otras causas de trasplante (sobre todo en el postoperatorio inmediato, debido a la enfermedad cardiovascular y complicaciones infecciosas). Por el contrario, el **fallo del injerto** es menor, posiblemente por el riguroso proceso de selección en el que se excluye los pacientes con mayor riesgo cardiovascular (7).

La **EHGNA recurrente o de novo** después del trasplante es una complicación frecuente, situándose en torno a un 30-100% en forma de EHGNA y 20-40% en forma de EHNA. Sus causas son el aumento de la ingesta calórica post-trasplante y el uso de corticoides y otros inmunosupresores que contribuyen al desarrollo de alteraciones metabólicas (7).

2. RUNX1

2.1. Definición y funciones

El factor de transcripción 1 relacionado con Runt (RUNX1), también conocido como leucemia mieloide 1, es un factor de transcripción que puede actuar como **oncogén o gen supresor de tumores** dependiendo de su interacción con proteínas correguladoras específicas. Esta molécula se ha estudiado principalmente por su asociación a la leucemia mieloide aguda. A nivel hepático, se han relacionado niveles bajos de RUNX1 con el HCC, lo que indica su función supresora (16,17).

RUNX1 es un regulador fundamental de la **hematopoyesis y la angiogénesis** (formación de nuevos vasos sanguíneos) (18,19), siendo esta última un aspecto crucial de la inflamación y remodelación de un tejido dañado (20,21).

2.2. Relación de RUNX con la EHGNA

En las enfermedades hepáticas crónicas se producen cambios en la arquitectura vascular del hígado y estrés oxidativo, que se han relacionado con la progresión a fibrosis, cirrosis y HCC (21,22). Esto se apoya por la mayor cantidad de citoquinas proangiogénicas encontradas en los pacientes con EHNA (23,24). Sin embargo, los mecanismos precisos que regulan la angiogénesis, inflamación y fibrogenesis en la EHNA siguen sin estar claros.

El estrés oxidativo y la angiogénesis patológica impulsada por la inflamación juegan un papel importante en la progresión de la EHGNA (22). Ciertos genes asociados a la angiogénesis presentan una mayor expresión en la EHNA, como el receptor y activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), un gen involucrado en la captación y transporte de ácidos grasos (25); y RUNX1, que se ha visto implicado en el aumento del grado de inflamación y la gravedad de la

enfermedad (21). Por otro lado, se ha demostrado que RUNX1 es un regulador positivo de la vía TLR4 para la inducción de la respuesta inflamatoria (26). Es conocido el papel de los TLR, la disbiosis intestinal y la liberación de componentes bacterianos en la activación de la respuesta inflamatoria de las enfermedades hepáticas crónicas (27). La *figura 5* plantea la hipótesis del posible papel de RUNX1 en la patogénesis de EHGNA.

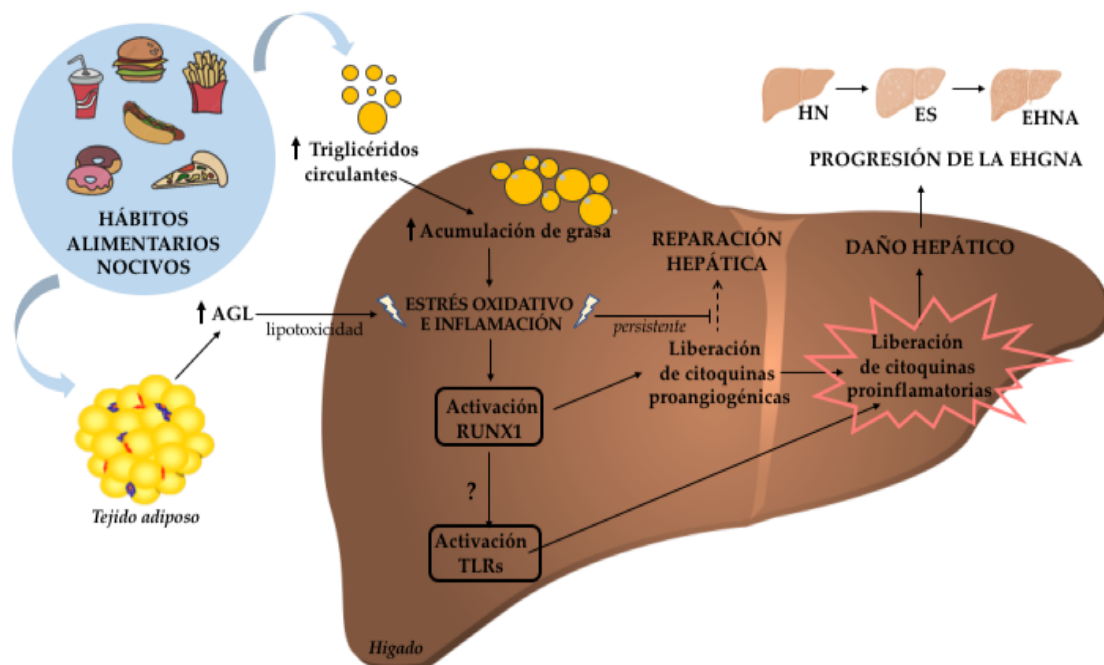


Figura 5. Papel de RUNX1 en la EHGNA mediado por la inflamación (grupo GEMMAIR). Los hábitos alimenticios nocivos conducen a niveles elevados de triglicéridos circulantes que se acumulan en el hígado provocando estrés oxidativo e inflamación. Estos dos procesos activan RUNX1 que a su vez activa la vía de la angiogénesis para intentar reparar la lesión. Un estado de inflamación persistente inhibe la remodelación tisular y promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias, lo que conduce al daño del tejido hepático y a la progresión de EHGNA a EHNA (18,21,22). Por otro lado, RUNX1 actúa como regulador positivo de la señalización de TLR4 para la inducción de la respuesta inflamatoria (26).

HIPÓTESIS

La vía de señalización del RUNX1 está involucrada en la patogenia de EHGNA.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Analizar la expresión hepática de RUNX1 mediante la abundancia relativa de ARNm de RUNX1 en mujeres con obesidad mórbida (OM) con diferentes estadios anatomopatológicos de EHGNA.

Objetivos secundarios:

- Estudiar la relación de la expresión hepática de RUNX1 con la expresión hepática de los principales genes del metabolismo lipídico y de los Toll Like Receptors (TLR).
- Estudiar la relación de la expresión hepática de RUNX1 con otros parámetros relacionados con la EHGNA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) CEIm; 23c/2015) y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. La población del estudio consistió en 69 mujeres caucásicas con OM (IMC>40 kg/m²). Se obtuvieron biopsias de hígado durante la cirugía bariátrica laparoscópica planificada a la que se sometieron. Todas las biopsias hepáticas se indicaron para diagnóstico clínico.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Mujeres con consumo de alcohol superior a 10g/ día.
- Pacientes con antecedente de enfermedades hepáticas, inflamatorias, infecciosas o neoplásicas agudas o crónicas.
- Mujeres menopáusicas o en tratamiento con anticonceptivos.
- Mujeres diabéticas en tratamiento con pioglitazona o insulina.
- Pacientes tratadas con antibióticos en las 4 semanas previas.

2. Tamaño de la muestra

Aceptando un riesgo α de 0,05 y un riesgo β inferior a 0,2 en un contraste de hipótesis bilateral, se necesitan 24 sujetos por grupo para detectar una diferencia $\geq 0,2$ unidades. Se asume que la desviación estándar común es 0,3.

3. Patología hepática

Para las muestras de hígado se usaron tinciones de hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson. Se puntuaron por hepatopatólogos experimentados utilizando los métodos descritos según Kleiner et al (28). Las mujeres con OM se clasificaron según su patología hepática en hígado normal (HN) (n = 28) y EHGNA (n = 41). Posteriormente, los pacientes con EHGNA fueron subclasificados en esteatosis simple (ES, esteatosis micro/ macrovesicular sin inflamación ni fibrosis, n = 24) y EHNA (grados de Brunt 1-2, n = 17). Ninguno de los pacientes de la cohorte de EHNA presentó fibrosis. En la *Figura 6*, se muestran imágenes de las características histológicas, la clasificación y la estadificación de la EHGNA en la cohorte de mujeres con OM.

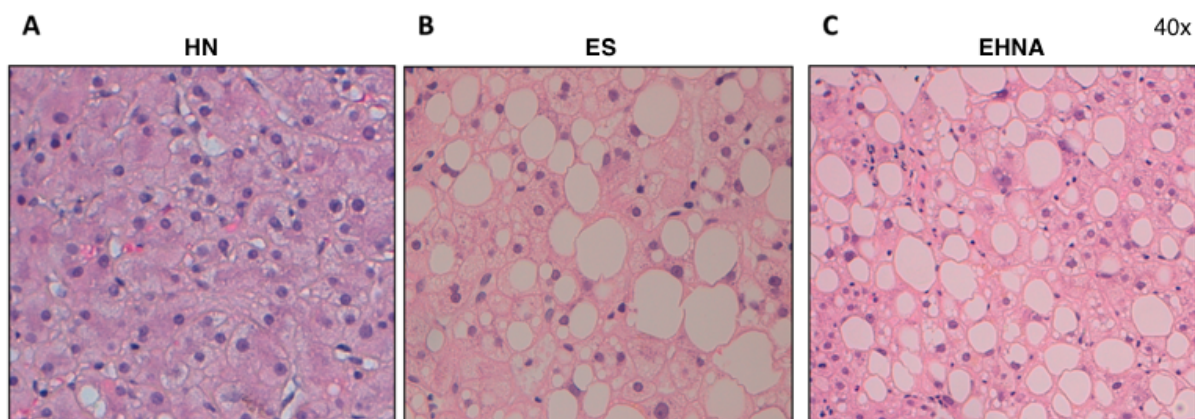


Figura 6. Imágenes histológicas de biopsias de hígado de mujeres con OM teñidas con eosina-hematoxilina, que corresponden a (A) HN, (B) ES, y (C) EHNA.

4. Análisis bioquímicos

Todos los sujetos incluidos fueron sometidos a evaluaciones físicas, antropométricas y bioquímicas. La extracción de sangre fue realizada por enfermeras especializadas a través del sistema BD Vacutainer[®], previo a la cirugía bariátrica posteriormente a la realización de un ayuno nocturno. Para las muestras de sangre venosa se utilizaron tubos de ácido etilendiaminotetraacético y se separó en alícuotas de plasma y suero por centrifugación (3.500 rpm, 4 °C, 15 min). Los parámetros bioquímicos se analizaron utilizando un analizador automático convencional. La resistencia a la insulina se estimó utilizando HOMA1-IR.

5. Expresión genética en hígado

Las muestras de hígado obtenidas durante la cirugía bariátrica se conservaron en RNAlater (Qiagen, Hilden, Alemania) a 4°C y luego se procesaron y almacenaron a -80°C. Se extrajo el ARN total utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Barcelona, España). La transcripción inversa a cDNA se realizó con el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Madrid, España). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el ensayo TaqMan prediseñado por Applied Biosystems para la detección de RUNX1 (Hs01021970_m1), TLR2 (Hs02621280_s1), TLR4 (Hs00152939_m1), TLR5 (Hs05021301_s13_s01), TLR5 (Hs05021301_s1_sB001), TLR9 (Hs00173195_m1), FAS (Hs00188012_m1), FXR (Hs01026590_m1), PPAR γ (Hs00947538_m1), PPAR γ (Hs01115513_m1).

La expresión de cada gen se calculó en relación con la expresión de ARN 18S (Fn04646250_s1) para los genes hepáticos y luego se normalizó usando el grupo de HN como referencia. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos utilizando el sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE. UU.).

6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS/PC + para Windows (versión 23.0; SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de variables. Las variables continuas se expresaron como la media y DE mientras que las no continuas como mediana y rango intercuartil. Los diferentes análisis comparativos se realizaron mediante las pruebas no paramétricas de la U de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis, según la presencia de dos o más grupos. La fuerza de la asociación entre variables se calculó mediante el método de Spearman. Se consideraron los valores de $p < 0,05$ como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Características basales de los sujetos

Las características clínicas y bioquímicas de la población estudiada se muestran en la *tabla 1*. En primer lugar clasificamos a las mujeres con OM según la histología hepática, en HN (grupo control, $n = 28$) y EHGA ($n = 41$). Los parámetros en que los dos grupos fueron comparables incluyen peso, índice de masa corporal (IMC), insulina, modelo homeostático 1 para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA1-IR), hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), gamma-glutamyl transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), interleucina (IL) 1 β , IL-6, IL-10, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), adiponectina y resistina. Sin embargo, se hallaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la glucosa en ayunas

(p = 0,026), fosfatasa alcalina (FA, p = 0,009) e IL-8 (p = 0,001) que fueron más elevados en el grupo EHGNA respecto al grupo HN.

En segundo lugar, se subclasificó a los pacientes del grupo EHGNA en esteatosis simple (ES, n = 24) y EHNA (n = 17) (*tabla 1*). Se encontraron niveles significativamente más altos de glucosa en ayunas (p = 0.021) y ALT (p = 0.042) en ES que en HN. Los niveles de FA fueron más elevados en el grupo ES respecto al grupo de HN (p = 0.001) y al de EHNA (p = 0,008). Los niveles de IL-8 fueron más altos en EHNA que en ES (p = 0,037), y en HN (p = 0,001).

Tabla 1. Variables antropométricas y bioquímicas de la cohorte de mujeres con OM clasificadas según las características histopatológicas hepáticas.

Variables	HN (N=28)	EHGNA (N=41)	ES (N=24)	EHNA (N=17)
Peso (kg)	116.50(107.25-130.50)	112.40(106.00-128.00)	113.20(108.33-128.00)	112.00(104.65-125.00)
IMC (kg/m ²)	43.30(40.94-46.47)	44.46(40.84-46.60)	44.35(40.82-46.83)	44.46(40.76-46.03)
Glucosa (mg/dL)	85.50(76.25-93.00)	93.00(84.00-105.00)*	93.50(85.75-107.00)#	91.00(82.50-101.20)
Insulina (mUI/L)	9.43(5.59-16.21)	9.63(5.88-14.52)	11.27(7.81-14.51)	6.57(5.09-23.04)
HOMA1-IR	2.07(1.06-3.35)	2.14(1.27-3.97)	2.70(1.59-4.77)	1.57(1.05-4.12)
HbA1c (%)	5.40(5.30-5.70)	5.60(5.20-6.05)	5.60(5.25-6.03)	5.50(5.20-6.10)
Colesterol (mg/dL)	171.88±36.20	179.07±38.80	174.42±35.41	185.28±43.39
HDL (mg/dL)	40.84±9.89	41.04±10.95	42.56±12.38	38.89±8.47
LDL (mg/dL)	108.16±27.94	104.48±30.86	104.39±31.21	104.62±31.58
Triglicéridos (mg/dL)	106.00(89.00-136.00)	132.00(91.00-189.00)	129.50(85.75- 175.50)	140.00(106.00-247.00)
AST (UI/L)	20.50(15.75-36.25)	23.50(17.00-41.75)	23.00(17.00-35.00)	24.00(17.00-43.00)
ALT (UI/L)	22.00(16.00-27.00)	31.00(21.00-37.00)	31.00(23.00-35.75)#	30.00(15.50-40.00)
GGT (UI/L)	18.00(16.00-27.00)	22.00(16.00-27.00)	21.00(16.25-30.50)	25.00(15.00-27.00)
FA (UI/L)	60.42±13.09	70.67±13.01*	75.80±11.66#	62.77±11.16&
LDH (UI/L)	378.65±54.30	421.00±82.47	428.08±79.38	411.80±89.76
PAS mmHg	119.00±18.26	117.29±13.86	120.09±13.41	113.44±13.96
PAD mmHg	63.00(57.75-75.75)	62.00(59.00-71.25)	62.00(59.00-72.50)	65.50(56.75-70.75)
IL-1β (pg/mL)	4.14±2.07	5.10±2.93	4.91±2.15	5.38±3.84
IL-6 (pg/mL)	4.24±2.51	3.65±1.83	3.40±1.54	4.01±2.20
IL-8 (pg/mL)	2.84(2.30-3.48)-	3.61(2.82-4.54)*	3.47(2.56-4.09)	4.18(3.12-5.29)&
TNF-α (pg/mL)	10.07(7.92-11.71)	10.44(7.50-12.26)	9.73(7.36-11.23)	11.31(7.80-12.57)
IL-10 (pg/mL)	3.99(1.44-7.30)	2.92(1.49-5.95)	2.79(1.78-9.96)	2.93(1.16-5.87)
Adiponectina (ng/mL)	14209.54±6519.51	12187.96±6707.07	13263.39±7238.02	10709.23±5795.64
Resistina (ng/mL)	26.16(19.72-34.94)	26.27(19.03-32.84)	26.27(20.95-32.84)	27.10(18.56-43.83)

Los datos se expresan como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico) dependiendo de la distribución de las variables. *Diferencias significativas entre el grupo HN y el grupo EHGNA (p <0.05). #Diferencias significativas entre el grupo HN y el grupo ES (p <0.05). &Diferencias significativas entre el grupo ES y el grupo EHNA (p <0,05). -Diferencias significativas entre el grupo HN y el grupo EHNA (p <0.05).

2. Evaluación de la abundancia relativa de ARNm de RUNX1 en el hígado según la histología hepática

Como objetivo principal de este estudio, se evaluó la abundancia relativa de ARNm de RUNX1 hepático en una cohorte de mujeres que presentaban OM con o sin EHGNA. No se obtuvieron diferencias significativas en la expresión hepática de RUNX1 entre pacientes con EHGNA y aquellos con HN (*Figura 7A*). Sin embargo, cuando analizamos la expresión hepática de RUNX1 según los diferentes grados histológicos de EHGNA, se encontró que la expresión de RUNX1 hepático fue significativamente mayor en pacientes con ES que en aquellos con HN o EHNA. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con HN y EHNA (*Figura 7B*).

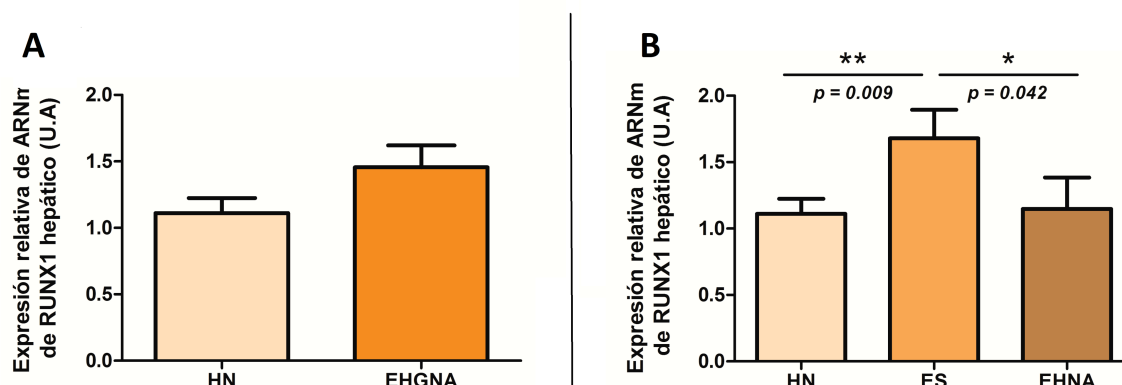


Figura 7. Abundancia relativa diferencial de ARNm de RUNX1 en el hígado entre (A) mujeres con OM con histología HN y mujeres con OM con EHGNA; (B) mujeres con OM con histología HN, mujeres con OM con ES y mujeres con OM con EHNA.

U.A., unidades arbitrarias; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; HN, hígado normal; ES, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; RUNX1, factor de transcripción 1 relacionado con runt. $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo (* significa $p < 0.05$; ** significa $p < 0.01$).

3. Evaluación de la abundancia relativa de ARNm de algunos genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático y TLRs según la histología hepática

Dado que se ha relacionado previamente la expresión de los genes del metabolismo lipídico con la expresión de genes implicados en la angiogénesis en el tejido adiposo (29), como objetivo secundario se ha estudiado la posible relación de la expresión de RUNX1 con la expresión hepática de los principales **genes del metabolismo lipídico hepático** como proteína de unión del elemento regulador de esteroles-1c (SREBP1c), ácido graso sintasa (FAS), receptor X hepático (LXR α), receptor X farnesoide (FXR), PPAR α y PPAR γ . Asimismo, dada la implicación de los TLR en la patogenia de la EHGNA (27), hemos estudiado la relación de la expresión de RUNX1 con la expresión hepática de TLR (TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9).

Como resultado, se observó una mayor abundancia relativa de ARNm hepático de **FAS, TLR2 y TLR4** en pacientes con EHGNA respecto a aquellos sin EHGNA (*Figura 8 A, C y E*). A continuación, al subclasificar a los pacientes según el grado histológico, se hallaron niveles más altos de ARNm hepático de FAS en mujeres con ES respecto HN; y también, niveles más altos en EHNA que en HN (*Figura 8B*). Por otro lado, se observó una mayor abundancia relativa de ARNm de TLR2 hepático en EHNA respecto a HN (*Figura 8D*). No obstante, las diferencias obtenidas no fueron significativas en cuanto a la expresión hepática de TLR4 entre los diferentes grados histológicos (*Figura 8F*).

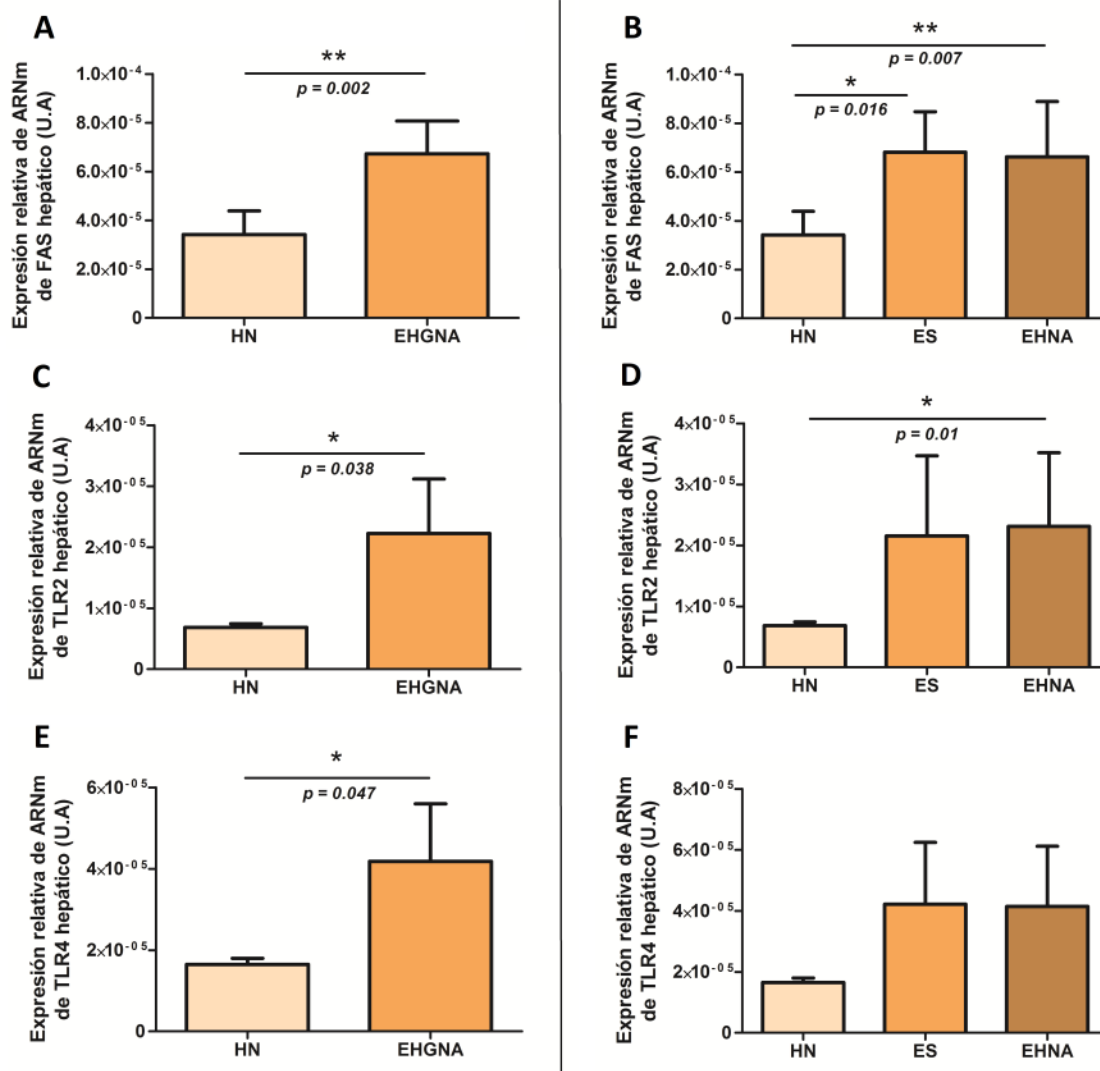


Figura 8. Niveles diferenciales de expresión relativa de ARNm de **FAS** en el hígado en mujeres con OM entre (A) histología HN y EHGNA; (B) histología HN, ES y EHNA. Niveles diferenciales de expresión relativa de ARNm de **TLR2** en el hígado en mujeres con OM entre (C) histología HN y EHGNA; (D) histología HN, ES y EHNA. Niveles diferenciales de expresión relativa de ARNm de **TLR4** en el hígado en mujeres con OM entre (E) histología HN y EHGNA; (F) histología HN, ES y EHNA.

4. Correlaciones de la expresión hepática relativa de RUNX1 con diferentes parámetros relacionados con la EHGNA

Con el objetivo de profundizar en el papel de RUNX1 en la EHGNA, se analizó las relaciones recíprocas de la expresión relativa de RUNX1 hepático con diferentes parámetros relacionados con la EHGNA, como peso, IMC, glucosa, insulina, transaminasas hepáticas, diferentes adipocitocinas, algunos genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (SREBP1c, FAS, LXR α , FXR, PPAR α y PPAR γ) y Toll Like receptors (TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9). Por un lado, se observó una correlación positiva con la expresión de **FAS hepática** ($\rho = 0,307$; $p = 0,036$); mientras que por otro lado, se vio una correlación negativa con los niveles de **resistina circulante** ($\rho = -0,375$; $p = 0,009$). No se hallaron otras correlaciones significativas con ningún otro de los parámetros mencionados.

DISCUSIÓN

La novedad del presente estudio radica en el hecho de que se analiza, en una cohorte de **mujeres con OM y EHGNA**, la abundancia de ARNm hepático de RUNX1, una molécula relacionada con la angiogénesis y escasamente estudiada en esta enfermedad.

Aunque existe alguna evidencia que sugiere el potencial papel de la vía de señalización RUNX1 en la **EHGNA**, se desconoce su participación en la patogénesis de la enfermedad. Por lo tanto, en este estudio se quiso profundizar en el conocimiento sobre la implicación de RUNX1 en la esteatosis hepática y la inflamación relacionada. Cabe destacar que la expresión hepática de RUNX1 en pacientes con ES fue superior a la de los pacientes con HN o aquellos con EHNA. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a expresión de RUNX1 al comparar los grupos de HN frente a EHGNA. Esto posiblemente esté relacionado con que RUNX1 únicamente aumenta en la ES, mientras que no lo hace en HN y EHNA.

Estos resultados sugieren que la expresión hepática de RUNX1 aumenta en los primeros estadios de EHGNA, mientras que en etapas avanzadas de la enfermedad, como EHNA, los niveles de ARNm de RUNX1 disminuyen, lo que se podría explicar por la inhibición de la vía de señalización causada por la inflamación persistente que caracteriza la EHNA.

Los resultados obtenidos en pacientes con **ES**, concuerdan con los reportados por Kaur et al. (21) que sugiere un papel proangiogénico de RUNX1 para reparar el daño hepático, junto con otros genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En esta publicación sitúan a RUNX1 como un factor de transcripción con un papel importante en la homeostasis tisular y la angiogénesis (21). Durante la esteatosis, los hepatocitos se dañan, lo que conduce a una desregulación del flujo sanguíneo microvascular y a lipotoxicidad por estrés oxidativo. Como consecuencia, se induce la liberación de citocinas, promoviendo un estado proinflamatorio. La inflamación inicial desencadena la angiogénesis a través de diferentes vías, una de las cuales es la activación de RUNX1 (23).

El papel de RUNX1 en **EHNA** aún no es del todo conocido, existiendo puntos de vista opuestos. Por un lado, Kaur et al. informaron que la expresión de RUNX1 se correlacionaba significativamente con la inflamación, la fibrosis y la actividad de la EHNA (21). En cambio, esto no se demostró en nuestro estudio. Este hecho podría explicarse por las diferencias entre ambas cohortes. En el estudio de Kaur et.al la cohorte incluyó pacientes de ambos sexos que eran mayores y solo con sobrepeso; mientras que nuestra cohorte, incluyó mujeres más jóvenes y con obesidad severa. Por otro lado, Liu et al. describió niveles bajos de RUNX1 en hepatocarcinoma. En este sentido, atribuyeron al RUNX1 hepático un papel como gen supresor de tumores inhibiendo la angiogénesis tisular (16). En nuestro estudio, se aportan nuevas evidencias sobre el papel de RUNX1 en la EHNA. Los resultados revelan que nuestra cohorte de pacientes con EHNA tiene unos niveles reducidos de ARNm de RUNX1 hepático en relación a los de ES. Para explicar este hecho, planteamos la hipótesis de que en etapas avanzadas de la enfermedad, el tejido deja de intentar repararse. Sin embargo, se requieren aún más estudios para aclarar el papel real de RUNX1 en EHNA.

Otro objetivo del estudio era determinar la posible relación de RUNX1 con los principales genes del **metabolismo lipídico** hepático, puesto que en el tejido adiposo ya se ha encontrado una asociación entre los genes proangiogénicos y la expresión de los genes del metabolismo lipídico (29). En nuestro estudio, se encontró una sobreexpresión de FAS hepática, una enzima lipogénica importante, en sujetos con EHGNA en comparación con aquellos con HN. Al subclasificar de acuerdo al grado histológico, encontramos una abundancia de ARNm hepático significativamente mayor de FAS en pacientes con ES y EHNA en comparación con sujetos con HN, sin evidenciar

diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con ES y EHNA. Por otro lado, se encontró una correlación positiva de RUNX1 con FAS hepática y una correlación negativa con la resistina, una adipocina asociada a la obesidad y la inflamación. La sobreexpresión de FAS en pacientes con EHNA ya se había encontrado previamente (30). Por lo tanto, en este estudio se describe la relación entre la expresión hepática de RUNX1 y la expresión de FAS hepática en pacientes con EHNA, que no había sido descrita previamente, lo que apoya la superposición de la vía de señalización de RUNX1 con el metabolismo de los lípidos hepáticos en estos pacientes.

Existen evidencias de la implicación de los **TLR** en la patogenia de la EHNA, lo que se ha asociado a la disbiosis intestinal que ocurre en estos pacientes (31,32). La disbiosis intestinal, inducida en gran parte por la dieta, da lugar a la liberación de componentes derivados de bacterias, como las endotoxinas, que circulan a través del sistema enterohepático y activan los TLR hepáticos a través de las células de Kupffer. Esto conlleva una respuesta inflamatoria que induce la acumulación de lípidos en los hepatocitos, promoviendo la fibrosis hepática (31). Es conocido que RUNX1 es un regulador positivo de la vía TLR4 (26). Por este motivo, en nuestro estudio se analizó la expresión hepática de TLR que resultó tener un comportamiento similar a la expresión hepática de RUNX1. En concreto, se encontró que la expresión de TLR2 y TLR4 hepáticos estaba incrementada en EHNA, y al subclasificar según el grado histopatológico se obtuvo mayor expresión de TLR2 en ES y EHNA, de acuerdo a lo que se encontró en otros estudios (32,33), aunque las diferencias encontradas para TLR4 no se hallaron estadísticamente significativas. Sin embargo, no pudimos demostrar correlación de la expresión hepática de RUNX1 con la expresión de los diferentes TLR.

En resumen, se ha estudiado la expresión hepática de RUNX1, un conocido factor de transcripción con actividad proangiogénica relacionado con la patogenia de la EHNA, así como de genes implicados en el metabolismo lipídico como FAS y de los TLR.

Se ha encontrado un aumento de la expresión hepática de RUNX1 en la EHNA y más concretamente en presencia de ES, mientras que la expresión en EHNA no difirió de la de HN. También se encontró un aumento de FAS en la EHNA, tanto en las mujeres con ES como en EHNA. Asimismo, se encontró un aumento significativo de los TLR en la EHNA y más concretamente de TLR2 en la EHNA. Parece que, en la obesidad extrema, la vía proangiogénica se inhibe en etapas avanzadas de la EHNA, quizás como un mecanismo protector. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual se desregula RUNX1 en las últimas etapas de la EHNA sigue siendo desconocido.

LIMITACIONES

Este estudio, realizado en una cohorte de mujeres con OM, ha permitido establecer algunas relaciones entre RUNX1 y EHNA sin la interferencia de factores de confusión como el sexo o la edad. Sin embargo, estos resultados no se pueden extrapolar a otros grupos con obesidad leve o moderada, sobrepeso o peso normal. Sería útil realizar más estudios que incluyeran dichas cohortes para validar los hallazgos obtenidos en este estudio.

CONCLUSIONES

La expresión hepática de RUNX1 parece estar involucrada en los primeros estadios de la EHNA ejerciendo una función proangiogénica para reparar el daño hepático. No obstante, parece que en estadios avanzados como la EHNA, esta expresión está regulada a la baja. Estos hechos sugieren que RUNX1 podría tener un papel protector en la progresión de EHNA en pacientes con obesidad mórbida.

BIBLIOGRAFIA

1. Schulz M, Tacke F. Identifying High-Risk NASH Patients : What We Know so Far. *Hepatic Med.* 2020;12(125–138):14.
2. Kathale S V., Vyas J. Review on Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis, Management and Treatment. *Am J PharmTech Res.* 2020;10(1):191–210.
3. Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, Ciocoiu M, Lacatusu CM, Maranduca MA, et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Diabetes Res.* 2020;2020:16.
4. 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;69(6):2672–82.
5. Rodriguez-Araujo G. Nonalcoholic fatty liver disease: Implications for endocrinologists and cardiologists. *Cardiovasc Endocrinol Metab.* 2020;96–100.
6. Hu H, Lin A, Kong M, Yao X, Yin M, Xia H, et al. Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives. *J Gastroenterol.* 2020;55(2):142–58.
7. Gadiparthi C, Spatz M, Greenberg S, Iqbal U, Kanna S, Satapathy SK, et al. Nafld epidemiology, emerging pharmacotherapy, liver transplantation implications and the trends in the United States. *J Clin Transl Hepatol.* 2020;8(2):215–21.
8. Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, Nagaya T, Komatsu M, Tanaka E. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World J Gastroenterol.* 2019;25(2):163–77.
9. Tilg H, Adolph TE, Moschen AR. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology.* 2021;73(2):833–42.
10. Bica C, Sandu C, Suceveanu A, Sarbu E, Stoica R, Gherghiceanu F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: A major challenge in type 2 diabetes mellitus (Review). *Exp Ther Med.* 2020;2387–91.
11. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology.* 2020;158(7):1851–64.
12. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol.* 2018;68(2):305–15.
13. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11–20.
14. DiStefano JK. NAFLD and NASH in postmenopausal women: Implications for diagnosis and treatment. *Endocrinology.* 2020;161(10):1–12.
15. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48(5):835–47.
16. Liu C, Xu D, Xue B, Liu B, Li J, Huang J. Upregulation of RUNX1 Suppresses Proliferation and Migration through Repressing VEGFA Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(2):1301–11.
17. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-).* 2015;347(6220):1–10.
18. North TE, De Bruijn MFTR, Stacy T, Talebian L, Lind E, Robin C, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity.* 2002;16(5):661–72.
19. Iwatsuki K, Tanaka K, Kaneko T, Kazama R, Okamoto S, Nakayama Y, et al. Runx1 promotes

- angiogenesis by downregulation of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Oncogene*. 2005;24(7):1129–37.
20. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 2009;50(3):604–20.
 21. Kaur S, Rawal P, Siddiqui H, Rohilla S, Sharma S, Tripathi DM, et al. Increased Expression of RUNX1 in Liver Correlates with NASH Activity Score in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Cells*. 2019;8(10).
 22. Kitade M, Yoshiji H, Kojima H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kaji K, et al. Neovascularization and oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Med Rep*. 2008;1(4):543–8.
 23. Coulon S, Francque S, Colle I, Verrijken A, Blomme B, Heindryckx F, et al. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*. 2012;59(2):442–9.
 24. Coulon S, Legry V, Heindryckx F, Van Steenkiste C, Casteleyn C, Olievier K, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis in two rodent models. *Hepatology*. 2013;57(5):1793–805.
 25. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: Potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821(5):809–18.
 26. Luo MC, Zhou SY, Feng DY, Xiao J, Li WY, Xu C Di, et al. Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) binds to p50 in macrophages and enhances TLR4-triggered inflammation and septic shock. *J Biol Chem*. 2016;291(42):22011–20.
 27. Kiziltas S. Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases. *World J Hepatol*. 2016;8(32):1354–69.
 28. 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;41(6):1313–21.
 29. Rodríguez-Acebes S, Palacios N, Botella-Carretero JJ, Olea N, Crespo L, Peromingo R, et al. Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: Distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes. *BMC Med Genomics*. 2010;3:1–15.
 30. Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martinez S, Porras JA, Aragonès G, et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22173–87.
 31. 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;139(1):323-334.e7.
 32. Vijay-kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science (80-)*. 2010;328:228–31.
 33. Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, et al. Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPAR γ in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258(2):431–5.

ANEXOS

ANEXO 1: Variación geográfica de EHNA y EHNA (4)

Localización geográfica	Prevalencia estimada		Observaciones
	EHGNA	EHNA	
Global	28,01 por 1000 personas-año a 52,34 por 1000 personas-año	1,5%-6,45% (1,7).	Disponemos de pocos datos, especialmente de EHNA
América	Norte América: 24% Sud América: 32%	1'5- 6'45%,	Bastante variabilidad entre los países dependiendo de la prevalencia de obesidad. Mayor riesgo de la población Hispana respecto los Nativos Americanos (relacionado con el gen del dominio de la fosfolipasa similar a la patatina PNPLA3) No se disponen buenos datos de prevalencia de EHNA.
Europa	20-30% (España 25'8%)	3%	Tanto en Europa como en EEUU, se están investigando biomarcadores solos o en combinación para detectar y monitorizar la EHNA.
Asia	15-40%	2-3%.	Varía significativamente debido a que es un continente con una gran heterogeneidad genética, de estilo de vida y de estatus económico, por lo que conviene estudiar mejor las diferencias entre cada país Mayor prevalencia de "lean EHGNA"
Medio Oriente y Turquía	31'79%	Desconocida	Hay una falta de datos importantes. Se sugiere un aumento de la incidencia relacionado con la epidemia creciente de obesidad y DM2 en la población urbana.
África	13,48%,	Desconocida	También varía ampliamente según la región, aunque se dispone de pocos datos. Un aspecto a resaltar es que podría agravar el curso de las hepatitis víricas, muy prevalentes en África.
Australia y países del pacífico	40% Australia (15% infantil) 13% Nueva Zelanda	Desconocida	Australia es una de las poblaciones con más sobrepeso y obesidad (63,4% de los adultos australianos) por lo que tiene una gran prevalencia de la enfermedad. En la resta del territorio de Oceanía y el Pacífico hay una ausencia de datos. Sin embargo, basándose en la prevalencia de DM2 y obesidad, habría una gran prevalencia de EHGNA.

ANEXO 2: Sistemas de puntuación (scores) /modelos predictivos (1,8,12)

Modelos predictivos	Variables	Fórmula
NAFLD Fibrosis Score (NFS)	edad, índice de masa corporal (IMC), presencia de glucosa en ayunas alterada o diabetes, AST (U / L), ALT (U / L), recuento de plaquetas, albúmina (g / dL)	$\text{NFS} = -1,675 + (0,037 \times \text{Edad [años]}) + (0,094 \times \text{IMC [kg / m}^2\text{]}) + (1,13 \times \text{alteración de la glucosa en ayunas / Diabetes [sí = 1; no = 0]}) + (0,99 \times \text{AST / ALT}) - (0,013 \times \text{Plaquetas [109 / L]}) - (0,66 \times \text{Albúmina [g / dL]})$
Fibrosis-4 Index (FIB-4)	edad, AST (U / L), recuento de plaquetas, ALT (U / L)	$\text{FIB-4} = [\text{edad (años)} \times \text{AST (U / L)}] / [\text{plaquetas (109 / L)} \times (\text{ALT (U / L)})^{1/2}]$
Hepatic Steatosis Index (HSI)	índice de masa corporal (o altura y peso), AST (U / L), ALT, diagnóstico de diabetes	$\text{HSI} = 8 \times (\text{ALT / AST}) + \text{IMC (+2 si diabetes tipo 2 sí, +2 si es mujer)}$
Aspartate Aminotransferase-Platelet Ratio Index (APRI)	AST (U / L), recuento de plaquetas	$\text{APRI} = \text{AST (U / L)} / \text{LSN} \times 100 / \text{plaquetas (109 / L)}$
BARD Score (BARD)	índice de masa corporal (IMC), aspartato relación aminotransferasa (AST) / alanina aminotransferasa (ALT), diabetes tipo 2	$\text{BARD} = \text{IMC (> 30 = 2; <30 = 0)} + \text{relación AST / ALT (> 0.8 = 2; <0.8 = 0)} + \text{diabetes tipo 2 (1 si es así; 0 si no)}$

ANEXO 3: Tests de fibrosis (1,8,12)

Tests de fibrosis	Variables	Fórmula
Fibrotest (FT)	α 2-macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, bilirrubina total, GGT	$F = 4,467 \times \log(A2M) - 1,357 \times \log(HAPT) + 1,017 \times \log(GGT) + 0,0281 \times \text{edad} + 1,737 \times \log(BbT) - 1,184 + (Apo A1) + 0,301 \times \text{sexo}(\text{mujer}=0; \text{hombre}=1) - 5,540.$
Fibrometer	Recuento de plaquetas, índice de protrombina, AST, α 2-macroglobulina, hialuronato, urea, edad	Fórmula patentada
Enhanced Liver Fibrosis Test (ELF)	Ácido hialurónico, inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1 de la matriz, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III	$2,494 + \ln(\text{ácido hialurónico}) + \ln(P\text{-III-P}) + \ln(TIMP-1)$
Hepascore	Edad, sexo, α 2-macroglobulina, ácido hialurónico, bilirrubina.	$Y = \exp[-4,185818 - (0,0249 \times \text{Edad}) + (0,7464 \times \text{sexo}) + (1,0039 \times \alpha 2\text{-macroglobulina}) + (0,0302 \times \text{ácido hialurónico}) + (0,0691 \times \text{bilirrubina}) - (0,0012 \times GGT)]$ $\text{Hepascore} = Y / (1 + Y)$
CA index-fibrosis	4C7S: colágeno tipo 4 7S, AST	$1,5 \times 4C7S + 0,0264 \times AST$

ANEXO 4: Nuevos fármacos en estudio para el tratamiento de EHGNA.

Fármaco	Mecanismo acción	Efectos
Saroglitazar o Elafibanor.	Agonistas duales PPAR α / γ	Atenúa la esteatosis e inflamación hepática y fibrosis y mejoran la histopatología (3,10).
Selonsertib (GS-4997)	Inhibidor de la cinasa 1 (ASK1)	Mejora de la actividad de la EHNA y la fibrosis (8).
17 β -estradiol (E2)	Inhibidor de la vía de activación JNK	De interés por el aumento de EHGNA en mujeres postmenopáusicas. Mejora la resistencia a la insulina y disminuye la acumulación de ácidos grasos (3,10).
Firsocostat (GS-0976)	Inhibidor de la acetilcoarboxilasa del CoA	Reduce los niveles de triglicéridos intrahepáticos, los marcadores de lesión hepática y la esteatosis en pacientes con EHNA. Es probable que se apruebe pronto por la FDA (3,10).
Cenicriviroc	Inhibición del CCR2 o del ligando CCL2-IR	Atenúa la fibrosis hepática (3,8,10).
MGL-319	Agonista del receptor beta de la hormona tiroidea hepática (THR- β)	Reduce la grasa hepática y mejora la función hepática (efectos dosis-dependientes) (3,10).