

*Javier de la Guardia Fontes*

**LA EXPRESIÓN DE SFRP5 EN EL TEJIDO ADIPOSO DE MUJERES CON OBESIDAD  
MÓRBIDA Y ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

dirigido por la *Dra. M<sup>a</sup> Teresa Auguet Quintillà*

**Grado de Medicina**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
Tarragona

**2023**

**TREBALL DE FI DE GRAU. FMCS. FITXA D'AVALUACIÓ DEL TUTOR**


L'avaluació del treball pràctic tindrà en compte la nota referida pel tutor respecte a la memòria impresa i el seguiment del treball. El resultat de l'avaluació del tutor ha de ser favorable per tal que l'alumne pugui presentar i defensar el treball i representa el 25 % nota total del TFG.

**ENSENYAMENT:** MEDICINA

**NOM DE L'ALUMNE:** JAVIER DE LA GUARDIA FONTES

**TÍTOL DEL TREBALL:** LA EXPRESION DE SERPS EN EL TEJIDO ADIPOSO DE MUJERES CON OBESIDAD MORBIDA Y ENFERMEDAD DEL HIGADO GRASO NO ALCOHOLICO

SEGUIMENT I AVALUACIÓ DEL TREBALL PER PART DEL TUTOR DEL TREBALL PRÀCTIC (0-10)	
Ha mostrat capacitats d'anàlisi i síntesi i raonament al llarg del treball	10
Ha mostrat iniciativa durant tot el procés d'elaboració del Treball	10
El procés d'elaboració del Treball ha estat continuat	10
Ha mostrat habilitat de cerca i gestió de la informació	10
Ha mostrat capacitat d'organització i planificació	10
Ha seguit la normativa pròpia del Centre en quan a la presentació escrita del treball	10
El treball és ordenat i redactat amb cura, expressant-se correctament amb la llengua escollida	10
Els resultats del treball són originals	10
El treball presentat supera les expectatives del tutor	10
Comentaris del tutor si s'escau: És un alumne molt treballador i polifacultat. Ha estat un alumne intern brillant.	
<b>MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)</b>	<b>10</b>

**AVALUACIÓ:** FAVORABLE  NO FAVORABLE 
**AUTORITZA** a que el treball sigui públic i visible al repositori institucional de la URV\*?

SI  NO 

\* Desaconsellat en casos de treballs amb dades de pacients i amb treballs potencialment publicables

**NOM I SIGNATURA DEL TUTOR\*\*:**

Tampore, a 23 de maig de 2023

\*\*Lliurar una còpia al tutor i adjuntar una còpia amb la signatura original al Treball escrit. La suplantació de la signatura original està tipificada com a falta greu i serà objecte d'expedient.

**Agradecimientos:**

*Me gustaría agradecer toda la ayuda recibida en los últimos 2 años a Teresa, Laia y Carmen, habéis sido un gran apoyo en el desarrollo de este proyecto.*

*Además, quiero agradecer a las personas que abrazan árboles, a las personas que comen patatas bravas y a las que han vivido en la habitación 124 del dorm 2, a las personas que saltan conmigo a lagos congelados y aquellas que desayunan a las 8am en el hospa, a las personas que cada semana cogen más peso en crossfit, a las personas que se aseguran de que te sepas el apgar aunque les quite tiempo del genshin, a las personas que miran las estrellas desde el monte sobre un mar de nubes y a aquellas que son como lámparas, a las personas que la parten en el buffet del Barceló Maya y a las que están aprendiendo a tejer, a las personas cuya vecina pone el listening super fuerte a la hora de la siesta, a las personas que me acogen en su casa para ver sinchan y a las que con una sonrisa te arreglan el día, a las personas que rezan el rosario por mí y a las que me acompañaron en la batalla para entrar en Medicina, a las personas que me ayudan en todas mis mudanzas y a aquellas que me preparan verdura, a las personas que me cogen el teléfono en un momento de debilidad y a las que me han acompañado en este intenso camino ayudándome a superar las piedras y las caídas. Pero, lo más importante, a las personas que siempre han estado y a aquellas que han llegado y, pese a ver el tremendo panorama, se han quedado.*

*Molts de mercis! :)*

# ÍNDICE

**RESUMEN**

**ABREVIATURAS**

**INTRODUCCIÓN**

1. ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO. GENERALIDADES.
2. ESPECTRO HISTOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.
3. EPIDEMIOLOGÍA.
4. FISIOPATOLOGÍA.
5. FACTORES DE RIESGO.
6. CLÍNICA Y MANIFESTACIONES EXTRAHEPÁTICAS.
7. DIAGNÓSTICO.
8. TRATAMIENTO Y CONTROL DE OTRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS.
9. PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD.
10. PRONÓSTICO.
11. MOLÉCULA SFRP5.
12. SFRP5 Y LA EHGA.

**HIPÓTESIS**

**OBJETIVOS**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**ANEXOS**

**BIBLIOGRAFÍA**

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) consiste en la acumulación de grasa en el hígado en una proporción superior al 5% en ausencia de causas secundarias.

La proteína SFRP5 es una adipocitocina antiinflamatoria con papel antagonista en la vía no canónica de WNT. Dado el cruce de adipocinas entre el tejido adiposo y el hígado, el objetivo es evaluar el papel de la vía de señalización SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral (VAT) y subcutáneo (SAT), y su relación con la patogénesis de la EHGNA.

**METODOLOGÍA:** La cohorte estudiada está compuesta por 60 mujeres con obesidad mórbida (OM) subclasificadas según su histopatología hepática, y un grupo control de 15 mujeres con peso normal (PN). Las expresiones relativas de ARNm de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real en muestras SAT y VAT.

**RESULTADOS:** Primero, observamos una expresión aumentada de SFRP5 en VAT y menos expresión de WNT5A en SAT, ambas en OM y comparadas con PN. Luego, observamos una expresión elevada de SFRP5 en EHGNA comparando con pacientes con hígado normal (HN) en ambos tejidos. En SAT una mayor expresión de SFRP5 en esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) comparado con HN, y mayor expresión de WNT5A en esteatosis simple (ES) comparado con HN. Y en VAT, mayor expresión de SFRP5 en ES leve y EHNA en comparación con HN, y aumento significativo de la expresión de WNT5A en ES leve comparado con HN, ES moderado/grave y EHNA. No encontramos diferencias significativas en la expresión de PPAR $\gamma$  entre los grupos analizados.

**CONCLUSIONES:** Estos hechos, sumados a las evidencias previas del papel de SFRP5 y WNT5A en el hígado de pacientes con EHGNA, reafirmaron la evidencia de que la vía SFRP5-WNT5A parece tener un papel clave en los primeros pasos de la patogénesis de la EHGNA.

Palabras clave: SFRP5; EHGNA; inflamación; obesidad; hígado graso; vía no canónica de WNT.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the accumulation of fat in the liver in a proportion greater than 5% in the absence of secondary causes.

SFRP5 protein is an anti-inflammatory adipocytokine with an antagonistic role in the non-canonical WNT pathway. Given the adipokine cross-talk between adipose tissue and liver, we aim to evaluate the role of the SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  signalling pathway in visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissue, and its relationship to the pathogenesis of NAFLD.

**METHODOLOGY:** The studied cohort is composed of 60 morbidly obese (MO) women subclassified according to their liver histopathology, and a control group of 15 normal weight (NW) women. Relative mRNA expressions of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  were analysed by real-time quantitative PCR in SAT and VAT samples.

**RESULTS:** First, we observed increased expression of SFRP5 in VAT and decreased expression of WNT5A in SAT, both in MO and compared to NW. Next, we observed elevated SFRP5 expression in EGHNA compared to patients with normal liver (NL) in both tissues. In SAT, we observed higher SFRP5 expression in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) compared to NL, and higher WNT5A expression in simple steatosis (SS) compared to NL. And in VAT, we observed higher SFRP5 expression in mild SS and NASH compared to NL, and significantly increased WNT5A expression in mild SS compared to NL, moderate/severe SS and NASH. We found no significant differences in PPAR $\gamma$  expression between the groups analysed.

**CONCLUSIONS:** These facts, added to previous evidence of the role of SFRP5 and WNT5A in the liver of NASH patients, reaffirmed the evidence that the SFRP5-WNT5A pathway appears to play a key role in the early steps of NASH pathogenesis.

**Keywords:** SFRP5; NAFLD; inflammation; obesity; fatty liver; noncanonical WNT pathway.

## RESUM

**INTRODUCCIÓ:** La malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) consisteix en l'acumulació de greix en el fetge en una proporció superior al 5% en absència de causes secundàries.

La proteïna SFRP5 és una adipocitocina antiinflamatòria amb paper antagonista en la via no canònica de WNT. Donat l'encreuament de adipocinas entre el teixit adipós i el fetge, l'objectiu és avaluar el paper de la via de senyalització SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en teixit adipós visceral (VAT) i subcutani (SAT), i la seva relació amb la patogènesi de la MFGNA.

**METODOLOGIA:** La cohorte estudiada està composta per 60 dones amb obesitat mòrbida (OM) subclasificadas segons la seva histopatologia hepàtica, i un grup control de 15 dones amb pes normal (PN). Les expressions relatives de ARNm de SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  es van analitzar mitjançant PCR quantitativa en temps real en mostres SAT i VAT.

**RESULTATS:** Primer, observem una expressió augmentada de SFRP5 en VAT i menys expressió de WNT5A en SAT, totes dues en OM i comparades amb PN. Després, observem una expressió elevada de SFRP5 en MFGNA comparant amb pacients amb fetge normal (HN) en tots dos teixits. En SAT observem una major expressió de SFRP5 en esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA) comparat amb HN, i major expressió de WNT5A en esteatosis simple (ES) comparat amb HN. I en VAT, observem una major expressió de SFRP5 en ES lleu i EHNA en comparació amb HN, i un augment significatiu de l'expressió de WNT5A en ES lleu comparat amb NL, ES moderat/greu i EHNA. No trobem diferències significatives en l'expressió de PPAR $\gamma$  entre els grups analitzats.

**CONCLUSIONS:** Aquests fets, sumats a les evidències prèvies del paper de SFRP5 i WNT5A en el fetge de pacients amb MFGNA, van reafirmar l'evidència que la via SFRP5-WNT5A sembla tenir un paper clau en els primers passos de la patogènesi de la MFGNA.

**Paraules clau:** SFRP5; MFGNA; inflamació; obesitat; fetge gras; via no canònica de WNT.

## ABREVIATURAS

AB	Ácidos biliares
AGLs	Ácidos grasos libres
AGs	Ácidos grasos
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EHGNA	Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no Alcohólica
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ERC	Enfermedad renal crónica
ES	Esteatosis simple
GGT	Gamma-glutamilttransferasa
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GPx	Glutación peroxidasa
HDL-C	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
HN	Hígado normal
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INF	Interferón
LDL-C	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
NLRPs	Dominios de unión a nucleótidos
OM	Obesidad mórbida
PAD	Presión arterial diastólica
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	Presión arterial sistólica
PN	Peso normal
PPAR- $\gamma$	Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma
RI	Resistencia a la insulina
RM	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAT	Tejido adiposo subcutáneo
SFRP	Secreted frizzled-related protein
SGLT2	Sodium-glucose cotransport protein 2
SM	Síndrome metabólico
TGs	Triglicéridos
TLR	Receptor toll-like
TNF	Tumor necrosis factor
UPR	Respuesta de proteína desplegada
VAT	Tejido adiposo visceral
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

## INTRODUCCIÓN

### 1. ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO. GENERALIDADES.

La **Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA)** es una de las patologías hepáticas más comunes hoy en día, su prevalencia está aumentando a un rango del 1% por año, llegando a afectar a un 30% de la población global actualmente (1,2), y es la principal causa de enfermedad hepática crónica hoy en día (3). Esta patología se define como **el acúmulo de grasa en el hígado no causada por un consumo excesivo de alcohol** (4). Es una enfermedad **biológica y clínicamente heterogénea**, un término empleado para describir un **amplio espectro de condiciones** histológicas que están caracterizadas por este **acúmulo de grasa excesivo en el hígado** (5), y que van desde una simple esteatosis hasta fibrosis y cirrosis avanzadas, pudiendo desencadenar un hepatocarcinoma celular (CHC) (6). El mecanismo molecular responsable del desarrollo de esta patología permanece esquivo y, por lo tanto, el principal tratamiento empleado actualmente está basado en cambios en la dieta y medicación administrada para aliviar los síntomas o enfermedades asociadas como la diabetes (7). La detección y el tratamiento precoz de comorbilidades tienen un gran potencial para reducir la mortalidad relacionada con la afectación hepática y cardiovascular de EHGNA (4), aunque se conoce que actualmente el desarrollo no controlado de EHGNA es la 3ª causa de trasplante hepático a nivel mundial, pudiendo llegar a ser la principal causa en 2030 (8).

La patogenia de EHGNA es **multifactorial** estando relacionada con un aumento en la liberación de ácidos grasos libres y dislipemia, el desarrollo de inflamación y una exacerbación de la resistencia a la insulina (RI), entre otros (2,7).

Su diagnóstico se basa en la presencia de esteatosis, que se evalúa a partir de biomarcadores, pruebas de imagen o histología hepática, asociado con al menos uno de los siguientes criterios: un estatus de índice de masa corporal (IMC) de sobrepeso u obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) o síndrome metabólico (SM) (9).

Dicho esto, existe un subgrupo de pacientes con EHGNA que no presentan obesidad, el llamado grupo **“EHGNA magra”** que engloba a un espectro heterogéneo de enfermedades derivadas de diferentes etiologías, como un aumento de grasa visceral, aumento de ingesta de fructosa y grasas o variaciones genéticas. Una gran proporción de este subgrupo probablemente pertenece al fenotipo descrito como “metabolismo obeso, peso normal” (10,11). Los pacientes comprendidos en este subgrupo tienden a ser más jóvenes y tener menor prevalencia de síndrome metabólico por lo que se consideraba que es una afectación menos severa que la que sufren los pacientes con EHGNA y obesidad. Pero estudios recientes sugieren que este tipo de paciente presenta mayor mortalidad y más morbilidad, incluso teniendo una supervivencia media sin trasplante hepático menor a pacientes obesos con EHGNA (12).

Los **cambios en las condiciones socioeconómicas** alrededor del mundo han derivado en cambios ambientales que promueven la evolución de las principales enfermedades crónicas que afectan a la población general hoy en día. En este contexto, se ha observado un rápido e importante aumento en la prevalencia de la obesidad y la DM2, conductores de las principales causas de EHGNA (5). Además, la progresión de esta patología también se ve afectada por factores

genéticos y epigenéticos, sumados a la influencia de la variación de la microflora intestinal como comentaremos más adelante (7).

En cuanto al tratamiento, se ha observado que la reducción de más de un 5-10% del peso a través de medidas higiénico-dietéticas puede mejorar el grado de esteatohepatitis y fibrosis. La cirugía bariátrica, que es actualmente el método más efectivo para la reducción de peso en pacientes con obesidad severa, también puede mejorar la histología hepática y reducir las complicaciones hepáticas relacionadas con esteatohepatitis (4). No obstante, no existe en la actualidad ningún tratamiento específico aprobado para EHGNA, y se están llevando a cabo estudios con terapias cuyo principal objetivo es el tratamiento de las comorbilidades como la diabetes, el metabolismo lipídico en el hígado, la inflamación y la fibrosis (13).

## 2. ESPECTRO HISTOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.

El **hígado** es un órgano que lleva a cabo diferentes funciones, entre las que destacan el procesamiento de nutrientes absorbidos por el intestino, el control de los niveles sanguíneos de proteínas y glucosa, y almacenaje de carbohidratos y de grasa (14). Además, juega un importante papel en el sistema de defensa del organismo y en los mecanismos alérgicos e inmunes (15). La unidad celular del hígado son los **hepatocitos**, células que son capaces de metabolizar casi todos los nutrientes, forman el 80% de la masa hepática y están organizados en placas interconectadas formando lóbulos hexagonales alrededor de la vena central (16).

El **espectro de la enfermedad del hígado graso no alcohólico**, como podemos observar en el **Anexo 1**, comprende varios estadios histológicos:

- 1- En primer lugar, la **Esteatosis Simple (ES)**. Como ya hemos comentado previamente, se caracteriza por la acumulación de lípidos en los hepatocitos y niveles anormales de enzimas hepáticas. Este diagnóstico se da cuando al menos un 5% de las células hepáticas contienen un exceso de grasa. Es un estadio reversible, y su sintomatología es inespecífica e imperceptible hasta que el hígado presenta un agrandamiento significativo (7).
- 2- En segundo lugar, la **Esteatohepatitis no Alcohólica (EHNA)**. Se caracteriza por el acúmulo de grasa hepática junto con inflamación crónica e infiltración de neutrófilos (15). En este estadio, en ocasiones también reversible, se observa degeneración balonizante e inflamación más allá de la esteatosis hepatocitaria causada por el estrés oxidativo y la inflamación (17), incluso, se puede llegar a observar la presencia de cuerpos de Mallory-Denk (18). La principal diferencia con la esteatosis simple es la presencia de infiltrado inflamatorio (19), y está asociada con un aumento de la morbilidad y mortalidad, tanto hepática como no hepática (5). Alrededor del 20% de pacientes con ES desarrollan EHNA, y de este grupo, alrededor del 40% progresará a fibrosis hepática (13). Histológicamente está diagnosticada por la presencia de grasa hepática en conjunción con el daño celular hepático, presencia de inflamación lobulillar y/o portal, así como la degeneración balonizante ya comentada. En ocasiones, se puede acompañar de fibrosis (5,13), siendo la presencia de fibrosis el único factor histológico asociado con la mortalidad (18). La transición de la ES a EHNA es un paso crucial en el desarrollo de enfermedad hepática severa con mal pronóstico y con mayor riesgo de progresar a fibrosis y a enfermedad hepática terminal (19).

- 3- Por último, la **cirrosis hepática**. Es un estadio irreversible en el que la función hepática se ve comprometida debido al acúmulo de hepatocitos muertos (14) y la sustitución del parénquima hepático normal por lesiones fibrosas de gran extensión alrededor de nódulos hepáticos en regeneración (20). Tiene un alto riesgo de progresar a disfunción hepática y CHC (14). Además, existe la posibilidad de desarrollar CHC en ausencia de cirrosis (13).

Se tiene evidencia de que la progresión en EHGNA de esteatosis a EHNA y fibrosis no es lineal, presentando un patrón dinámico. Datos publicados en los últimos años sugieren que el riesgo de mortalidad asociado a EHGNA crece exponencialmente a medida que el estadio de fibrosis aumenta (10,11).

Alrededor del 40% de los pacientes con EHGNA progresan de EHNA a cirrosis hepática y a CHC, que es una de las principales causas de mortalidad de EHGNA. La cirrosis hepática no es un prerrequisito para padecer CHC, pero los pacientes con fibrosis y cirrosis avanzada presentan un mayor riesgo de sufrirla (21).

**Anexo 1: Espectro histológico de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.**

### 3. EPIDEMIOLOGÍA.

Se estima que la **prevalencia global** de EHGNA es de un **25-30%** (17), siendo la prevalencia basada en un metaanálisis de un 25.24%. Además, la prevalencia de EHNA se encuentra entre un 3-5% (21). EHGNA tiene un impacto que se observa principalmente en las comunidades marginadas socialmente debido al estigma y estrés social, su alta exposición a comida ultra procesada y los patrones sedentarios (4). Esta nueva epidemia de enfermedad hepática crónica crece en paralelo con el aumento a nivel global de obesidad (10). Los últimos estudios demuestran que la prevalencia de EHGNA está relacionada con la edad, la obesidad y la DM2, y varía en función de la etnia y región geográfica (13).

Conforme la población crece, mayor es la prevalencia de EHGNA y de fibrosis hepática relacionada con esta esta patología (12), se ha observado que EHGNA es una patología más común en gente de edad avanzada, y que los hombres tienden a demostrar mayor frecuencia y severidad que las mujeres. Pero, la EHNA en estadios avanzados de fibrosis es más frecuente en mujeres (6). Además, se ha observado que la incidencia de EHGNA tiende a aumentar en las mujeres postmenopáusicas (7), de entre las cuales aquellas que no están tomando un tratamiento hormonal sustitutivo tienden a tener una mayor prevalencia que aquellas que si lo toman. Consecuentemente, una mayor duración de déficit estrogénico se asocia con una mayor probabilidad de fibrosis entre la población de mujeres postmenopáusicas afectadas por EHGNA (22). La prevalencia de EHGNA es de 34% en individuos mayores de 70 años y de 22.4% en individuos entre 30 y 39 años (21).

La raza y etnicidad es también importante a la hora de considerar el riesgo de padecer EHGNA (12). Esta condición tiende a ser generalizada en países Occidentales y es más prevalente en poblaciones con ascendencia asiática, hispánica o nativo-americana (7). Los datos de mayor prevalencia se han observado en Sur América (31%), Oriente Medio (32%), y Asia (27%). Tan solo en los Estados Unidos la prevalencia asciende al 24%, mientras que en Europa se tienen datos de un 23%, quedando África en último lugar con un 14% (10). Se observado que la incidencia es mayor, como ya hemos comentado, en poblaciones con mayor prevalencia de obesidad y

diabetes (5), siendo esto un ejemplo de la posible implicación del tipo de dieta en el desarrollo y evolución de la patología y suponiendo esto que la obesidad y la diabetes son factores de riesgo para EHGNA (7). En el **Anexo 2** podemos observar una comparativa de los individuos con EHGNA en función de su país y de su estado de obesidad.

#### **Anexo 2: Proporción de individuos con EHGNA estratificados por país y estado de obesidad.**

Se han llevado a cabo estudios que confirman que la EHGNA es la enfermedad hepática crónica más común en los países occidentales (6). La **prevalencia de EHGNA está en constante aumento**, y del mismo modo, la de EHNA ha casi doblado sus datos en el mismo periodo de tiempo (10). Este aumento en la prevalencia ha supuesto un aumento remarcable en el número de casos de cirrosis, carcinoma hepatocelular, descompensación hepática y de la mortalidad relacionada con patología hepática (11).

Como hemos comentado, existe un subtipo de EHGNA que aparece en pacientes sin obesidad, los llamados “EHGNA magra”. En este subgrupo de pacientes, la prevalencia de EHNA es menos común que en aquellos pacientes que además de EHGNA presentan obesidad, siendo esta prevalencia de un 54.1% en comparación con el 71.2% de los pacientes obesos. Y, por lo tanto, el diagnóstico de fibrosis avanzada es menos común. (11). El CHC se ha convertido en la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, y es una de las principales y más importantes complicaciones EHGNA (12).

En cuanto a la población pediátrica, la EHGNA se está viendo alimentada por la pandemia de **obesidad infantil**. En las últimas décadas se ha observado un **aumento** de la prevalencia de **EHGNA pediátrica** de entre 3-10% hasta un 45%, prevalencia que varía en función de la edad, raza y era (11).

## **4. FISIOPATOLOGÍA.**

El conocimiento de la **fisiopatología** de EHGNA es un campo de estudio que continúa desarrollándose, dada la no completa comprensión de este (4). La EHGNA presenta una compleja variabilidad interindividual dependiente de muchos factores que podrían ser englobados en 3 grandes grupos: factores ambientales, SM y predisposición genética. Esta **variabilidad interindividual**, provocada por la diferente interacción entre estos grupos, es la que hace tan complejo el abordaje de esta patología (22).

#### **Anexo 3: Variabilidad interindividual de los factores conductores de EHGNA.**

Como ya hemos comentado, EHGNA está muy relacionada con la DM2, pero también se relaciona con el desarrollo de SM, hipertensión e hiperlipidemia (7,10). Además, se espera que la incidencia de EHGNA siga aumentando en paralelo con la incidencia de obesidad y DM2 (10), ya que en EHGNA se observa un estado perturbado del balance de energía sistémica, existiendo un superávit de sustrato, principalmente carbohidratos y ácidos grasos (18).

En la teoría del “**doble impacto**”, postulada por Day y James, se considera que EHGNA empieza con el desarrollo de esteatosis simple como “primer impacto” causado principalmente por el acúmulo de lípidos en el hígado provocando la apoptosis celular y un excesivo estrés oxidativo, que no es suficiente para inducir la fibrosis e inflamación. Pero, el progreso de la enfermedad produce un “segundo impacto”, en el que, debido a la sensibilización del hígado, se propicia el desarrollo de EHNA derivado de la infiltración de células inmunitarias que liberan mediadores proinflamatorios como las citoquinas necesarias para agravar el daño hepático (19). La teoría

del “**múltiple impacto**” propone que el desarrollo de esta enfermedad se produce por la sinergia de diversos factores que inducirían el estrés hepatocelular, la lesión y la muerte de los hepatocitos, que derivará en fibrogénesis e inestabilidad genómica que hace susceptibles a los pacientes de sufrir cirrosis y carcinoma hepatocelular (13). Dicho esto, la evolución de EHGNA hacia la fibrosis, cirrosis y desarrollo de CHC no es lineal y depende de múltiples factores (19). En el **Anexo 4** podemos ver un esquema de la patogénesis de EHGNA.

**Anexo 4: Esquema de la patogénesis y de la diafonía entre órganos que se produce en EHGNA y EHNA.**

Los principales **factores fisiopatológicos** que afectan a la progresión histológica de EHGNA son:

- 1- **Acúmulo de ácidos grasos libres (AGLs):** La dieta occidental, rica en productos de alto contenido en grasa y sacarosa, puede derivar en un aumento del acúmulo de AGLs y, en consecuencia, en el desarrollo de desórdenes hepáticos como EHGNA (7). Esta ingesta excesiva de ácidos grasos (AGs) y triglicéridos (TGs) a través de la dieta, unida a la lipogénesis *de novo*, produce un exceso de lípidos en el almacén graso, provocando la hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo visceral, causando un aumento en el influjo de AGLs al hígado (4). La formación de los TGs, una forma de almacenamiento relativamente inerte parece deberse a un mecanismo adaptativo para proteger el hígado de la toxicidad lipídica (18). El consecuente aumento de la grasa visceral fomenta la hipoxia y el estrés oxidativo del tejido adiposo, promoviendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, provocando además la disfunción mitocondrial en los hepatocitos (2,4). Los principales mecanismos de acúmulo de grasa hepática observados en la progresión de EHGNA son:
  - Exceso de aportación exógena de grasa y carbohidratos, a través de la ingesta por la dieta (7).
  - Elevada síntesis *de novo* de AGLs en los hepatocitos y  $\beta$ -oxidación de AGLs. La oxidación de los AGs está principalmente regulada por PPAR- $\gamma$  (receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma) que reduce los niveles intrahepáticos de grasa utilizando los lípidos como recurso energético. Diversos estudios muestran que la activación de PPAR- $\gamma$  está relacionada con un mayor intercambio lipídico, sugiriendo que un tratamiento farmacológico con PPAR- $\gamma$  mejora el medio metabólico y la esteatosis (7).
  - Retención de lípidos debido al daño de la apolipoproteína del hepatocito, con reducción de la secreción de los lípidos VLDL (lipoproteína de muy baja densidad)(7).

Además, debido a la disfunción provocada en el tejido adiposo de pacientes obesos y/o diabéticos, los niveles de adiponectina disminuyen, promoviendo el estado de RI. Esta reducción provoca la inhibición del proceso oxidativo de los AGLs, permitiendo su flujo hacia el hígado, y estimulando la glucogenólisis y la lipogénesis *de novo* (9). Este desequilibrio entre el consumo de lípidos y la lipogénesis, la oxidación y la secreción lipídica en el hígado es la principal característica de la patogenia de EHGNA (2).

- 2- **Inflamación:** La obesidad, que como ya hemos comentado, es una de las principales causas de EHGNA, se caracteriza por aumento de lípidos en el tejido adiposo y hepático (7). Bajo condiciones de control normales los adipocitos y las células inmunes juegan un papel sinérgico en la regulación del almacenaje y consumo energético en el tejido adiposo (23). Pero los niveles de AGLs elevados resultantes del excesivo acúmulo de grasa son responsables de la aparición de lipotoxicidad y disfunción del tejido adiposo. La consiguiente alteración en el metabolismo lipídico, así como la presencia de endotoxinas derivadas del intestino (secundario a disbiosis intestinal), contribuyen a la producción y liberación de **citocinas proinflamatorias** como tumor necrosis factor (TNF),

interleucina (IL)-1b, e IL-6. Estas citocinas inhiben la señalización de los receptores insulínicos y reducen la sensibilidad hepática de la insulina, causando la RI e induciendo la esteatosis y fibrosis hepáticas (7). Las citoquinas proinflamatorias son los componentes clave en la estimulación del proceso de acúmulo patológico de grasa en los hepatocitos, y en la esteatosis hepática (23). Estudios recientes evidencian que los desbalances inmunológicos en el hígado promueven el mantenimiento y la progresión de la inflamación de EHGNA (18).

En el hígado, el 10% de la masa celular está compuesta por las células de Kupffer, que son macrófagos caracterizados por el incremento de producción de citoquinas proinflamatorias. Estos macrófagos median la activación de las células T y la regulación de la apoptosis de los hepatocitos (7). Las células de Kupffer, que en el hígado sano se encuentran en los sinusoides hepáticos con la función de limpiar productos bacterianos y microbianos del intestino (18), aparecen como células proinflamatorias M1 y células antiinflamatorias M2 (7). Las primeras, estimuladas por las células Th1 y Th17 promueven la esteatosis hepática, fibrogénesis y la elevación del acúmulo de los lípidos hepáticos; mientras que las segundas, activadas por las células Th2 y las células T reguladoras, son macrófagos residentes en el hígado responsables de activar la apoptosis de M1 a través de la caspasa3 (7,23). El **balance M1/M2** es importante para regular la inflamación del hígado y el ratio M1/M2 está aumentado en la progresión de EHGNA (7). Además, existe evidencia de que la RI tiene influencia en la conversión del estado antiinflamatorio M2 al proinflamatorio M1, presumiblemente a través de un aumento de los niveles del interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (9).

**Anexo 5: Relación entre la inflamación del tejido adiposo causada por la obesidad y EHGNA.**

Otro factor que promueve el estado proinflamatorio y, por ende, participa en la progresión de EHNA, es el reclutamiento de monocitos derivados de la médula ósea. Factores derivados de las células de Kupffer facilitan el infiltrado de los monocitos en el hígado de manera sustancial, causando, junto con las células de Kupffer, un estado proinflamatorio que deriva en la progresión de la enfermedad (18).

- 3- **Estrés del retículo endoplasmático:** Los hepatocitos son células ricas en retículo endoplasmático (RE), orgánulo que juega un papel muy importante en la biosíntesis de proteínas y lípidos. Cualquier variación o perturbación en el funcionamiento normal de éste puede derivar en estrés del retículo endoplasmático (7). Este estrés producido en el RE juega un papel muy importante en la progresión de EHGNA ya que activa la vía de señalización UPR (respuesta de proteína desplegada), cuya principal función es recuperar la homeostasis del RE, por lo tanto, un estrés no resuelto causado por la lipotoxicidad a largo plazo promueve la apoptosis hepatocelular (13,23).
- 4- **Estrés oxidativo:** El estrés oxidativo surge cuando se produce un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la neutralización por parte de los antioxidantes. Los ROS se producen de manera fisiológica en bajas concentraciones por parte de los peroxisomas y las mitocondrias, y juegan un papel importante en las vías de señalización como factores de control de la transcripción y del ciclo celular (7). Pero la **capacidad de compensación de los ROS en EHGNA se ve afectada**, ya que la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), una de las enzimas antioxidantes más importante para mantener la homeostasis de ROS, y la de la catalasa, enzima encargada de catabolizar el peróxido de hidrógeno, están reducidas (13).

Además, en concentraciones elevadas, los ROS provocan daños en el ADN celular, alteraciones de la expresión genética, inestabilidad cromosómica y oxidación lipídica. Debido a esto, el estrés oxidativo es uno de los principales factores asociados a la obesidad y sus trastornos asociados, como la enfermedad cardiovascular, la DM2 o el síndrome metabólico (7). Y, por lo tanto, está directamente relacionado con el desarrollo y el progreso de EHGNA (19).

- 5- **Disfunción mitocondrial:** Las mitocondrias son el orgánulo en el que se lleva a cabo el almacenaje energético y el metabolismo de ácidos grasos en las células. Además, otra de sus funciones es mantener la homeostasis energética (7,13).

Como consecuencia de la disfunción del tejido adiposo ya comentada, y a raíz de la disminución de los niveles de adiponectina, se disminuye la oxidación de los AGLs, lo que conduce a su entrada en el hígado (9). En el contexto de EHGNA, el principal reto al que se enfrenta la mitocondria es el **manejo de una gran cantidad de ácidos grasos** fluyendo hacia el interior de los hepatocitos, ya que esta es la responsable de procesar los AGLs lipotóxicos, y tiene la capacidad para transformarlos en almacenes de triglicéridos (7), dando lugar a la formación de gotitas en los hepatocitos, o al empaquetado de las apolipoproteínas en lipoproteínas de muy baja densidad, las VLDLs (lipoproteína de muy baja densidad), y su envío al suero; o llevar a cabo un proceso de beta-oxidación, que en caso de ser excesivo dará lugar a la formación de ROS (9), puesto que en el contexto de RI, el ciclo del ácido tricarbóxico reduce la eficiencia respiratoria mitocondrial produciendo este exceso de ROS (13).

- 6- **Resistencia a la insulina:** es una respuesta metabólica defectuosa de la célula diana, como por ejemplo los hepatocitos, a la insulina, y se desarrolla a raíz de factores adquiridos como la obesidad (24). El hígado juega un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa, aportando glucosa al resto de órganos en el estado de ayuno a través de la glucogenólisis, proceso regulado por los niveles plasmáticos de insulina. En el estado postprandial, la insulina es enviada al hígado a través de la vena porta, donde provoca la inhibición de este proceso. Por ello, cuando se produce una disminución en la secreción de la insulina a causa de la DM2 suficiente como para que los niveles de insulina sean incapaces de superar la RI hepática, se produce la pérdida de inhibición de la glucogenólisis, con una sobreproducción hepática de glucosa (9). La RI sistémica reduce la capacidad de almacenaje energético y provoca la progresión del estado inflamatorio en el tejido adiposo (23).

Un enlace interesante entre RI y EHGNA es la presencia de ciertos genes, tales como ENPP1 121Gln y el polimorfismo 972 Arg del IRS-1, que disminuyen la actividad de la protein-quinasa B (AKT) de los receptores de insulina de los hepatocitos, derivando en la afectación de la señalización de la insulina en el hígado, y predisponiendo al daño hepático (9).

- 7- **Factores genéticos:** Estudios de asociación del genoma completo han demostrado la relación de polimorfismos de un solo nucleótido con EHGNA (2,8), siendo los genes que han demostrado mayor relación y, que además juegan un papel en el metabolismo lipídico, PNPLA3, MBOAT7, GCKR y TM6SF2 (9). En este contexto, los factores ambientales y mecanismos epigenéticos juegan un papel fundamental en el desarrollo de EHGNA (8). Además, se tiene evidencia de que los parientes de primer grado de pacientes con EHGNA presentan mayor riesgo para desarrollar la enfermedad (9).

Diversos autores postulan que la herencia de EHGNA podría estar relacionada con múltiples factores, como una herencia genética que podría afectar directamente al desarrollo de esteatosis y fibrosis, pero también a la herencia del microbioma intestinal heredado o a la influencia del estilo de vida compartido de los individuos estudiados y sus familiares afectados por la patología (8). Yun Huang et al. obtuvieron resultados que demostraban una asociación significativa entre las variantes PNPLA3, TM6SF2, GPAM y GCKR con un mayor contenido de grasa a nivel hepático y con distintos patrones de lípidos circulantes en pacientes adultos (25). En el **Anexo 6** podemos observar un pictograma en el que se muestra la localización cromosomal de los principales genes implicados en la patogenia de EHNA.

#### **Anexo 6: Alteraciones genéticas en EHNA.**

En cuanto a los polimorfismos comentados anteriormente, destacan:

- PNPLA3: Es el primer gen que demostró relación con EHGNA, codifica para la triacilglicerol lipasa, conocida como adiponutrina, cuya función se relaciona con el metabolismo de los triglicéridos en los adipocitos y hepatocitos (7,19). El polimorfismo que codifica para la variante I148M de la proteína PNPLA3, en la que se produce la sustitución de isoleucina por metionina, (19) es la **principal causante de la predisposición genética de EHGNA** en todas las poblaciones, y además es responsable de la variabilidad inter-étnica de la susceptibilidad a la enfermedad y está relacionada con el grado de severidad y progresión de la fibrosis, además de la aparición de carcinoma hepatocelular (2,11). Se ha visto que reduce la actividad lipolítica frente a los triglicéridos, por una pérdida de función a causa del acúmulo de I148M mutado en hepatocitos y células estrelladas con el consiguiente acúmulo maligno de triglicéridos (19). Esto lleva a una reducida lipólisis de las grasas y su exceso de producción en el hígado (7).
- TM6SF2: generalmente expresada en el hígado y el intestino delgado (19), esta variante provoca una reducción de la secreción de los lípidos VLDL y un aumento de la acumulación de grasa en las células hepáticas (2), y, por lo tanto, produciendo un acúmulo de triglicéridos en el hígado (19).
- MBOAT7: este gen también se ha visto identificado como un modificador del riesgo de progresión del daño hepático, estando asociado su polimorfismo rs641738 C>T con la severidad de la esteatosis hepática y la necroinflamación por EHGNA (2). Estudios recientes han relacionado esta mutación con un descenso de fosfatidilinositol que contiene ácido araquidónico sistémico e intrahepático que aumenta el riesgo de sufrir EHGNA, EHNA y progresión a enfermedad hepática terminal (19).

Dicho esto, existen estudios que muestran la discordancia en la progresión de EHGNA en gemelos idénticos que la relacionan con los ácidos ribonucleicos (ARN)s no codificantes, que son un grupo de moléculas de ARN sin la capacidad de codificación de proteínas involucradas en el remodelado de la cromatina y en la regulación transcripcional y postranscripcional de los genes. Dentro de estos ARN no codificantes, se ha observado una desregulación de los microARNs en EHGNA (8,10).

- 8- Disbiosis:** El 70% del suministro sanguíneo del hígado procede directamente del intestino a través de la vena porta, habiendo una estrecha relación bidireccional entre estos dos órganos, hecho que contribuye a una mayor exposición hepática a los productos tóxicos intestinales, como son las bacterias y sus derivados (13,23). Este estado de endotoxemia crea un ambiente inflamatorio a raíz de la producción de

citoquinas proinflamatorias, como el receptor toll-like hepático 4 (TLR4) y la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) plasmático, que desarrolla RI y promueve el acúmulo de lípidos en el hígado (9,21). Varios estudios han demostrado que la expresión del TLR4, especialmente en macrófagos, está aumentada en pacientes con EHNA (18). Además, se tiene evidencia de una relación bidireccional, dado que el hígado influencia a la composición y función de la microbiota intestinal, regulando la barrera a través de excreción de ácidos biliares y mediadores antiinflamatorios (13).

La **desregulación de la flora intestinal** juega un **papel muy importante en el desarrollo de EHGNA**, dado que, como hemos comentado, se ha observado que la microbiota intestinal tiene una estrecha relación con la permeabilidad del intestino y su desregulación juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad (2,23).

#### **Anexo 7: Eje hepático-intestinal en EHGNA/EHNA.**

Las **dietas occidentales**, que tienen en común un alto contenido en grasas y azúcares, representan el punto de partida del proceso patológico de la obesidad, DM2 y EHGNA. Además, también comparten alteraciones del microbioma intestinal, que tiende hacia el acúmulo de bacterias negativas, como *Proteobacteria*, y un descenso en la población de *Lactobacillus*. Se ha observado que en pacientes con EHGNA, el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* está disminuido, y que muestran una menor diversidad microbial. Esta alteración es un marcador de **disbiosis**, y está **correlacionado positivamente con la esteatosis** (9,13). Miele et al. observaron relación entre la severidad de la esteatosis hepática y la permeabilidad intestinal y el sobrecrecimiento de pequeñas bacterias intestinales, y en estudios llevados a cabo por Lichtman et al. y Bergheim et al. se observó que el uso de antibióticos mejora el daño hepático y la esteatosis en modelos con rodeadores (15).

Otro mecanismo incluye la participación de los inflamasomas, que constan de dominios de unión a nucleótidos (NLRPs) y de proteínas que contienen repeticiones ricas en leucinas, en la progresión de EHGNA. Concretamente la activación del inflamasoma NLRP3 (21), que se ha visto aumentada en modelos animales y humanos con EHNA (18), se desencadena por la producción de ROS mediada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (21), y se encuentra predominantemente expresado en hepatocitos dañados, células de Kupffer y en las células endoteliales sinusoidales del hígado (18). Un estudio demostró que la disbiosis de la microbiota intestinal mediada por los inflamasomas promovía la progresión de EHGNA (21).

Todos estos factores alterados conducen al desarrollo de trastornos metabólicos como la RI, la DM 2 y la obesidad, que son conductores patogénicos clave en el desarrollo y la progresión de EHGNA. La resistencia hepática y periférica a la insulina, provocada por el desajuste metabólico característico de la patología fisiología de EHGNA causa la liberación sistémica de citoquinas y hepatocinas proinflamatorias, que promueven el desarrollo de DM2 (5).

Los trastornos metabólicos que conducen al desarrollo de EHGNA, es decir, la hipertrigliceridemia, la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina, están asociadas las unas con las otras, pero cada una tiene un efecto distinto en EHGNA cuando las otras están dentro de la normalidad (6).

## 5. FACTORES DE RIESGO.

Son muchos los factores que juegan un papel importante en el desarrollo de EHGNA, factores modificables y no modificables, como el IMC, los niveles de insulina en plasma, el sexo masculino, el contexto genético o el bajo peso al nacer (10). Los factores que han mostrado una mayor asociación con el progreso de EHGNA son la edad avanzada, la presencia de obesidad visceral, la DM2 o la RI, y la etnia hispánica (12).

- 1- **OBESIDAD:** de acuerdo con los últimos datos aportados por la Asociación Mundial de la Salud (OMS), entre 1975 y 2016, la prevalencia de obesidad se ha casi triplicado, y alrededor de 2.8 millones de personas murieron por sobrepeso y obesidad cada año (23). Otro dato de especial relevancia es que más de 340 millones de niños y adolescentes entre 5 y 19 años presentaban sobrepeso u obesidad en 2016 (12). La OMS clasificó la obesidad en **clase I** (IMC 30.0-34.9 kg/m<sup>2</sup>), **clase II** (IMC 35.0-39.9 kg/m<sup>2</sup>), y **clase III** (IMC ≥40.0 kg/m<sup>2</sup>) (11).

La obesidad, que es una enfermedad **compleja y multifactorial**, con factores ambientales y socioeconómicos implicados en su etiología (26), aparece acompañada por el remodelado del tejido adiposo, que cambia el número y el tamaño de los adipocitos. Y debido a que el tamaño de los adipocitos afecta profundamente a su habilidad de almacenaje de lípidos, este aumento deriva en cambios funcionales y, finalmente, en disfunción celular, incluso muerte (23).

Esta patología aumenta el riesgo de sufrir EHGNA (12), entre los pacientes con esta enfermedad, un 75% sufre sobrepeso y entre un 90-95% son obesos (21). Además, estudios recientes han demostrado que el **grado de esteatosis se relacionado positivamente con el IMC** (2,7), y el riesgo de desarrollar EHGNA es mucho mayor en un contexto de obesidad, en comparación con individuos no obesos (27). Dicho esto, no todos los pacientes con obesidad desarrollan EHGNA (22).

La relación entre obesidad, SM y EHGNA es claramente evidenciable debido a que todas estas afectaciones derivan directamente de un **estilo de vida sedentario** y una **dieta rica en grasas e hidratos de carbono** (7). La obesidad está asociada con un estado inflamatorio crónico del tejido adiposo, y un mayor riesgo de sufrir DM2, dislipemia, enfermedades cardiovasculares, y ciertos tipos de malignidades (26).

El diagnóstico de EHGNA ayuda a la detección de otras complicaciones serias relacionadas con la obesidad, como son las enfermedades cardiovasculares (23).

- 2- **DIABETES MELLITUS TIPO 2:** la prevalencia de diabetes mellitus se estima en un 10.5% entre todos los adultos con 20-79 años, de los cuales un 90% tienen DM2 (9). En pacientes con DM2, la prevalencia global de EHGNA es de un 55%, y se ha relacionado con una progresión más rápida de la enfermedad a estados fibróticos y de cirrosis (13). Datos obtenidos de un metaanálisis, que incluyó aproximadamente a 300.000 individuos seguidos durante un periodo de 5 años, demuestran que los **pacientes con EHGNA tienen el doble de riesgo de padecer DM2** en comparación con aquellos que no sufren EHGNA, y se tiene evidencia de que la presencia de **DM2 aumenta el riesgo de desarrollar EHGNA, cirrosis y hepatocarcinoma** (9). El estudio de *Portillo-Sanchez et al.* obtuvo resultados que demostraban que los pacientes con EHGNA presentaban mayor RI en comparación con aquellos que no tenían EHGNA. Además, la esteatosis hepática

en pacientes con DM2 se asocia con una mayor dificultad en el control de la hiperglicemia, mayor RI y la necesidad de mayores dosis de insulina (27).

La presencia de EHGNA está estrechamente asociada con un estado del tejido adiposo patológico, disfuncional y resistente a la insulina. Además, la lipotoxicidad juega un papel de gran importancia en la patogénesis de EHGNA en pacientes con DM2 (27).

- 3- SÍNDROME METABÓLICO:** la EHGNA es considerada actualmente la manifestación hepática del síndrome metabólico (28), que incluye obesidad central, hipertensión, hipertrigliceridemia, bajos niveles de c-HDL e hiperglicemia (6). La cantidad de grasa hepática es remarcablemente superior en pacientes con SM en comparación con la población general (21), incluso, se tiene evidencia de que la presencia de SM puede incrementar la progresión de la fibrosis, derivando en cirrosis, CHC y la muerte. Un estudio realizado con datos del US National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) observó que la presencia de al menos un componente de SM doblaba el riesgo de mortalidad (12). Además, se conoce que el principal factor de relación entre EHGNA y SM es la RI (7).

## 6. CLÍNICA Y MANIFESTACIONES EXTRAHEPÁTICAS.

La **presentación clínica** de EHGNA es muy variable (21). Hay muchos signos y síntomas tempranos que indican la aparición de esta patología, entre los que se encuentran la obesidad central, niveles elevados de triglicéridos en suero y valores de glucosa en ayunas alterados. Otros síntomas como anorexia, náuseas y vómitos, malestar, dolor de cabeza, e incluso dolor epigástrico y del cuadrante superior derecho del abdomen, ictericia leve y trombocitopenia indicarían un inicio de EHGNA (19).

La EHNA y la fibrosis típicamente avanzan de forma asintomática hasta que progresan a un estado final de enfermedad hepática en que la única solución curativa es el trasplante de hígado (19).

EHGNA es una **enfermedad multisistémica** con complicaciones extrahepáticas como la enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica (ERC), DM2, cánceres extrahepáticos como el cáncer de colon, cáncer de esófago, colangiocarcinoma, enfermedad del ovario poliquístico y enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (21). Este hecho puede ser a consecuencia de la propia enfermedad pero, además, supone un aumento en la severidad de ésta, ya que la mayoría de las manifestaciones empeoran el pronóstico por ser factores de riesgo de progresión de la fibrosis hepática (11). Un metaanálisis obtuvo resultados en los que un 51% de los pacientes de EHGNA eran obesos, el 23% tenía DM2, el 69% sufría de hiperlipidemia, el 39% tenía hipertensión y el 42% SM (12).

Se tiene evidencia de la fuerte asociación entre EHGNA y la enfermedad cardiovascular, estando asociada con hipertensión arterial, rigidez arterial, aterosclerosis, enfermedad de arteria coronaria, fibrilación atrial y esclerosis valvular aórtica (11), y siendo esta patología la principal causa de muerte entre los pacientes de EHGNA. Las principales complicaciones cardíacas de EHGNA son la hipertrofia ventricular, calcificación de las válvulas cardíacas y las arritmias, y dependen de la severidad de la enfermedad (21)

La asociación entre EHGNA y la ERC se debe parcialmente a sus morbilidades cardio metabólicas compartidas (11), como son la agresión a la estabilidad de la microbiota intestinal, el estado protrombótico, la activación plaquetar y un aumento en los niveles de ácido úrico (21). Se han observado porcentajes más elevados de afectación, y con más severidad, en pacientes con EHGNA de ERC. Y, además, se observó una afectación más agresiva de EHGNA en pacientes con estadios avanzados de daño renal (11). Los pacientes con EHGNA pueden presentar una reducción de la tasa de filtrado glomerular estimada (GFR) o albuminuria (21).

También se ha observado asociación entre EHGNA y trastornos hormonales severos, especialmente en mujeres, por ejemplo, la duración del déficit estrogénico postmenopáusico confiere mayor riesgo de fibrosis entre las mujeres afectas por EHGNA. También se ha observado una asociación directa entre el síndrome de ovario poliquístico y el desarrollo de EHGNA más severo, y mayor relación con estadios avanzados de fibrosis (11).

Las 3 causas más comunes de muerte en pacientes con EHGNA son las enfermedades cardiovasculares, seguidas de malignidades y muertes relacionadas con el hígado, (11) siendo la enfermedad cardiovascular la principal causa de muerte en EHGNA. Se ha estimado que un 5-10% de los pacientes de EHGNA muere por esta causa (12). La mortalidad relacionada con el cáncer es la segunda causa de muerte en pacientes con EHGNA, ya que esta patología hepática se ha visto relacionada con un aumento moderado del riesgo a largo plazo de cánceres extrahepáticos (especialmente gastrointestinales, de mama y ginecológicos) (11).

**Anexo 8: Principales manifestaciones extrahepáticas de EHGNA.**

## 7. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de EHGNA se basa en la detección de esteatosis hepática y la exclusión de otras enfermedades del hígado como el consumo patológico de alcohol y causas secundarias de hígado graso (4).

De acuerdo con la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) los criterios diagnósticos de EHGNA son: presentar una esteatosis del 5% en los hepatocitos, evidenciable por pruebas de imagen o histológicas, sin otra posible causa para la esteatosis, resistencia a la insulina y umbrales de consumo de alcohol para hombres y mujeres de <30g/día y <20g/día, respectivamente (21).

Los estadios precoces de EHGNA carecen de una sintomatología clara, por lo que la inflamación asociada a la obesidad es de gran utilidad para una identificación precoz y, por tanto, para el inicio del estudio para el diagnóstico de EHGNA con mayor antelación (23). Los pacientes asintomáticos son diagnosticados con tests de la funcionalidad hepática alterados o pruebas de imagen que muestran esteatosis, generalmente en contextos de exámenes rutinarios o de seguimiento (21). La identificación de individuos presintomáticos o pacientes de alto riesgo, a través de los signos y síntomas ya comentados, o biomarcadores de la enfermedad, es la mejor opción a la hora de aplicar un temprano abordaje y tratamiento de la enfermedad, pero actualmente existen limitaciones, como la baja sensibilidad y especificidad de los programas de screening de la población general, que impiden su implementación para EHGNA (19). En este sentido, las guías europeas proponen el screening para EHGNA utilizando pruebas de imagen basadas en ultrasonidos y/o tests hepáticos en individuos con alto riesgo como son aquellos pacientes con obesidad o SM (21).

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) se define como un acúmulo de triglicéridos en al menos >5% de los hepatocitos (5), confirmándose con la presencia de esteatosis, inflamación lobulillar y degeneración balonizante (17).

Actualmente, la prueba diagnóstica de elección para EHGNA es la **biopsia hepática** (19). A través de ésta se permite la interpretación de la muestra para valorar la presencia de elementos sugestivos de esta patología. Concretamente, para EHNA, estos elementos son:

- Esteatosis.
- Inflamación lobulillar y portal.
- Degeneración balonizante.
- Fibrosis.

El estadio de la fibrosis se valora desde el punto de vista histológico según los **estadios de Kleiner** (17). Debido a que la fibrosis tiene una importante correlación a nivel histológico con el pronóstico de EHGNA, en los pacientes que muestran scores de fibrosis anormales será necesario llevar a cabo tests no invasivos más específicos o, incluso biopsia hepática en aquellos pacientes con mal pronóstico (4).

No obstante, debido a las limitaciones de la biopsia hepática (causadas por su invasividad, coste, riesgos (5) y, el hecho de que una muestra del hígado no siempre representa el estado de todo el órgano, factor que supone un riesgo de infradiagnosticar la severidad de la enfermedad) (19), se está promoviendo el uso de pruebas menos invasivas, que puedan determinar y estudiar el grado de fibrosis hepática. Entre estas pruebas se encuentran las pruebas de biomarcadores sanguíneos simples como Fibrosis-4 (FIB-4), la puntuación del índice de proporción de aspartato aminotransferasa a plaquetas (APRI) o el NAFLD Fibrosis Score (NFS); y tests no invasivos que incorporan marcadores indirectos de fibrosis, como las aminotransferasas, acompañados de parámetros clínicos (5).

El **score FIB-4** se basa en patrones clínicos de fácil acceso, como es la edad, y en patrones biológicos, como el recuento de plaquetas y transaminasas (9). Se calcula con la siguiente operación matemática: edad (en años) x AST (aspartato aminotransferasa en U/L) / recuento plaquetario (en  $10^3/\mu\text{L}$ ) x  $\sqrt{\text{ALT}}$  (alanina aminotransferasa en U/L) ((29). En cuanto al resultado, se asume que un valor <1.45 supone un bajo riesgo de fibrosis hepática, un valor >3.25 indica un alto riesgo de fibrosis, y los valores intermedios darían un resultado indeterminado de la prueba (30). Sin embargo, Kasturiratne et al. observaron que, pese a que EHGNA es una de las principales causas de elevación de ALT en plasma, esta enfermedad puede desarrollarse con valores normales de ALT (5)

Además, la valoración de la rigidez hepática a través de la **elastografía** se ha incorporado como una prueba radiológica no invasiva (5). Se ha observado que, en ciertas condiciones de la enfermedad, la combinación de las técnicas de elastografía con los índices de EHGNA, compuestos por medidas simples de las características del paciente y parámetros bioquímicos y clínicos, aumentan la precisión diagnóstica en la evaluación de la fibrosis clínicamente significativa de EHGNA (19). La estratificación del riesgo de fibrosis avanzada en pacientes con diversos factores metabólicos de riesgo se lleva a cabo a través del score FIB-4 y la elastografía. De esta forma, a través del score FIB-4 se identifica a los pacientes que podrían beneficiarse de la elastografía para el cribado más preciso de la patología (9).

La **resonancia magnética** (RM) permite detectar y cuantificar la esteatosis hepática, los depósitos de hierro y la fibrosis hepática a través de la densidad protónica de la fracción grasa (17). El uso de técnicas avanzadas de RM, como el RM con fracción protónica de densidad grasa (MRI -PDF), se han desarrollado para detectar de una forma más específica la presencia de

esteatosis hepática, y para evaluar la grasa hepática en todo el hígado (19). Últimamente, se está empezando a emplear la **elastografía por resonancia magnética** (ERM) para un diagnóstico más preciso (17). Se piensa que esta modalidad diagnóstica es especialmente útil para determinar la rigidez hepática y dar una mayor precisión en el diagnóstico de fibrosis y cirrosis avanzadas (19).

Actualmente, además, se está estudiando la relación de EHGNA con la expresión de diversos **biomarcadores** (2), aunque normalmente los paneles de biomarcadores no pueden discernir entre la esteatosis leve y moderada, ni entre esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica. En este sentido, se intenta combinar el uso de biomarcadores con pruebas de imagen como la ultrasonografía o resonancia magnética (21). Por ejemplo, estudios recientes sugieren la relación de esta patología con un aumento de la expresión de la proteína circulante CK-18, que puede ser detectada en sangre (2). Incluso, pese a que no se conoce el mecanismo, se piensa que las características de la microbiota intestinal pueden ser utilizadas como marcadores diagnósticos o pronósticos. El uso de una colección de marcadores microbiales, desarrollados a partir de la secuenciación metagenómica, combinados con el IMC y la edad, pueden identificar de forma precisa pacientes con EHGNA que presenten estadios avanzados de fibrosis. Se están llevando a cabo múltiples estudios sobre el tema, como Caussy et al. que llevó a cabo un análisis metagenómico que concluyó que los pacientes que progresaron a un estadio de cirrosis presentaban una microbiota característica (21). Sin embargo, en la actualidad, todavía no disponemos de un algoritmo diagnóstico específico para discernir entre esteatosis simple y EHNA.

En cuanto a los **marcadores analíticos** de EHGNA, los marcadores bioquímicos que indican daño hepático o disfunción son AST, ALT, bilirrubina, el recuento plaquetar y los niveles de haptoglobina. Además, la expresión de ferritina está elevada en los pacientes con EHGNA y SM. También se pueden valorar comorbilidades de EHGNA analizando los valores relacionados con la diabetes o la inflamación. Dicho esto, la gran mayoría de marcadores bioquímicos no miden la fibrogénesis o fibrinólisis de forma directa (19).

## 8. TRATAMIENTO Y CONTROL DE ENFERMEDADES RELACIONADAS.

Pese a que actualmente no está aprobado ningún tratamiento específico por las agencias reguladoras para EHGNA, se sabe que la histología hepática presenta una mejora relacionada con las **modificaciones en el estilo de vida**, y tiene una importante relación con la cantidad de peso perdido, independientemente de la dieta empleada (4). Además, dada la gran evidencia de afectación extrahepática, a la hora de tratar pacientes con EHGNA es imprescindible llevar a cabo un estudio clínico completo para diagnosticar y tratar enfermedades extrahepáticas asociadas (11).

### - Medidas higiénico-dietéticas:

Se tiene una gran evidencia científica de que la **pérdida de peso** es la **principal diana terapéutica** de EHGNA (9). Se ha observado que la pérdida de un 3-5% del peso puede mejorar la esteatosis hepática, que la pérdida del 5-7% es necesaria para reducir la actividad inflamatoria, y que la pérdida de peso debe ser de al menos un 7-10% para que suponga una mejora tanto en el grado de esteatohepatitis como el de fibrosis (5,13). Se ha observado que, tras la pérdida de peso en pacientes con obesidad, los niveles circulantes de mediadores proinflamatorios, como son las citoquinas y quimiocinas, habían disminuido (23).

El consumo excesivo de alimentos ultra procesados y de carne roja y el sedentarismo se han visto relacionados con una mayor prevalencia de síndrome metabólico, marcadores de EHNA y fibrosis (2,4). Por ello, se ha establecido que el **ejercicio** es una importante forma de reducción de grasa hepática. Además, la **dieta mediterránea** ha sido recomendada para el tratamiento de EHNA por las guías europeas, ya que este patrón dietético, incluso más allá de la pérdida de peso, proporciona beneficios para la salud hepática y extrahepática (4). Esto es debido a que esta dieta contiene grandes cantidades de cereales integrales, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos omega-3 (13,21). Se tiene evidencia de que los ácidos grasos monoinsaturados aportados por el ácido palmitoleico y el ácido oleico pueden reducir la toxicidad lipídica en los hepatocitos, porque, pese a promover la formación de TGs, tienen un efecto citoprotector frente a los efectos nocivos de otros AGs, como el del ácido palmítico, en el tejido hepático (18). Ryan et al. describieron que, comparada con una dieta de control, la dieta mediterránea obtuvo una mayor reducción en la esteatosis hepática mejorando la RI (21). Pero, conseguir y mantener esta pérdida de peso es un desafío para los pacientes debido a los múltiples factores que influyen en una pérdida de peso sostenida (5).

Se ha demostrado que la actividad física, con una duración media de >150 minutos/semana, estaba asociada con un 44% menos de riesgo de desarrollo de EHNA, y que aquellos individuos que son físicamente activos más de 150 minutos/semana o que aumentaron su actividad física en al menos 60 minutos/semana durante un período de 3 meses, presentaron una mejora en las enzimas hepáticas, independientemente de la pérdida de peso (9).

Por todo ello, podemos afirmar que la modificación de los hábitos y del estilo de vida continúan siendo el **principal tratamiento de EHNA**. Esta modificación e implementación de nuevos hábitos debe ser individualizada para como opción terapéutica (2).

#### - **Tratamiento farmacológico:**

Se ha observado una mejoría clínica con las medidas higiénico-dietéticas, pero en estadios avanzados de la enfermedad, como un hígado con gran contenido fibrótico, es necesaria la implantación de medidas farmacológicas (13). Muchos tratamientos farmacológicos están siendo estudiados en ensayos clínicos y están mostrando resultados prometedores en el tratamiento y manejo de esta patología (5).

Podemos dividir estos tratamientos en función de cuál es la diana farmacológica:

- 1- Metabolismo de los lípidos y de la glucosa:** una posible diana terapéutica es abordar el metabolismo anormal de los ácidos grasos y la glucosa, y prevenir la acumulación de grasa hepática y la producción de un ambiente profibrótico (13).

Dentro del **metabolismo lipídico de novo**, que es la síntesis endógena de lípidos a partir de los nutrientes aportados por la dieta, se están estudiando fármacos como el ácido bempedoico, el orlistat o el firsocostat (cada uno en diferentes estadios clínicos o preclínicos de estudio). Estos fármacos actúan sobre diferentes enzimas y están obteniendo resultados prometedores como por ejemplo la reducción de TGs hepáticos y colesterol total, un buen control de la glicemia o la reducción de fibrosis hepática (13).

Las estatinas también juegan un papel muy importante, ya que restringen la síntesis de colesterol a través de la inhibición de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A). Aunque no se tiene total evidencia del efecto de las estatinas sobre la evolución de EHNA (13), sí que se ha observado que el uso de **estatinas** es recomendable para

reducir el riesgo cardiovascular, y está asociado con alrededor el 50% de reducción de la descompensación hepática y la mortalidad (4).

La **señalización PPAR** tiene tres isotipos ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , y  $\gamma$ ), que están involucrados en la homeostasis del metabolismo lipídico y de la glucosa (13), y juega un papel muy importante en la patogénesis de EHGNA (15). La expresión del gen PPAR $\alpha$  en el hígado de pacientes obesos se relacionó negativamente con la esteatosis, severidad de EHNA y la RI. Por otro lado, la expresión del mRNA de PPAR $\beta/\delta$  se vio reducida en las muestras de biopsias hepáticas de pacientes con esteatosis moderada o severa. También se ha visto que los agonistas de PPAR $\gamma$  redujeron la esteatosis hepática (13), la inflamación y la fibrosis (15) en pacientes con EHGNA, ya que la activación de PPAR $\gamma$  promueve la adipogénesis en el tejido adiposo para reducir la entrada de ácidos grasos al hígado (13). En resumen, la señalización de los isotipos de PPAR está relacionada con el metabolismo de los lípidos y la glucosa en diferentes órganos y contribuye a la respuesta antiinflamatoria de EHGNA. Por ello, actualmente, existen diversos fármacos que están siendo estudiados como posibles candidatos para la activación de PPAR, como son la pioglitazona, un agonista de PPAR $\gamma$  que mejora la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo de pacientes diabéticos; o elafibranor, un agonista dual de PPAR $\alpha/\delta$ , que tendría efectos protectores sobre la esteatosis, inflamación y fibrosis en muchos modelos animales de EHGNA (13)

Por otro lado, dado que EHGNA es una enfermedad hepática con una relación bidireccional muy importante con la obesidad y la DM2, los fármacos **antidiabéticos** juegan un papel crucial en el control de la enfermedad (13). Estos agentes son efectivos para revertir la RI y, en consecuencia, la disfunción del tejido hepático causada por la lipotoxicidad que ésta causa (4). Estos fármacos pueden ser conceptualizados en dos espectros de mecanismos de acción:

- Restauración de la biología normal del tejido adiposo, con la redistribución de la grasa desde el compartimento de grasa visceral y hepática, al compartimento de grasa subcutánea.
- Agentes de pérdida de grasa, donde la reducción del exceso de tejido adiposo también restablece la biología, la función y la respuesta a insulina del tejido adiposo (4).

Los tratamientos antidiabéticos, como por ejemplo los fármacos **agonistas de GLP-1** (glucagon-like peptide-1) o los **inhibidores de SGLT2** (sodium-glucose cotransport protein 2), están demostrando ser efectivos en la mejora de la esteatosis y la fibrosis de pacientes con EHGNA y DM2 (13). Además, la **metformina**, pese a ser un tratamiento sin impacto significativo en la lipotoxicidad (4), tiene un beneficio en el control de la RI, disminuyendo la glucogenólisis y estimulando la captación muscular de glucosa (9). Se ha observado que disminuye el grado de esteatosis en pacientes con EHNA y que previene los eventos hepáticos en pacientes con DM2 y EHNA avanzada (21). Sin embargo, no mejora de forma significativa ni la necroinflamación ni la fibrosis (4).

EHGNA puede estar asociado con una alteración en la homeostasis de los **ácidos biliares** (AB). Los ABs promueven la absorción intestinal de las sustancias lipídicas y mejoran la hidrólisis lipídica (13), previenen el sobrecrecimiento bacteriano intestinal y ejercen un fuerte efecto antimicrobiano en la homeostasis intestinal (15). Dicho esto, un exceso de acúmulo de ABs en los hepatocitos podría estar asociado con un aumento de la inflamación, del estrés oxidativo y el empeoramiento y la progresión de EHGNA. En este

contexto, se están llevando a cabo estudios del posible rol terapéutico de los BAs en el control de EHGNA (13).

- 2- **Prevención del estrés celular:** como ya hemos comentado, los trastornos crónicos del metabolismo lipídico que caracterizan a la progresión de EHGNA presentan una asociación clara con las alteraciones del balance oxidativo celular, y la pérdida de esta estabilidad provoca lipotoxicidad celular, peroxidación lipídica, estrés del retículo endoplasmático y disfunción mitocondrial (13). Para abordar este proceso, se emplea el tratamiento con **agentes antioxidantes**. Se tiene evidencia de que la vitamina E, que cuenta con los efectos antioxidantes del  $\alpha$ -tocoferol, inhibe la expresión de factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ) en el hígado de pacientes con EHGNA, reduciendo así la esteatosis, inflamación y fibrosis. A parte de la vitamina E, otros antioxidantes, como el carotenoide betacriptoxantina, la melatonina o la curcumina; están siendo estudiados como posibles terapias para EHGNA (13)
- 3- **Abordaje de la muerte celular hepática:** se ha observado la asociación directa de EHGNA con múltiples tipos de muerte celular, como por ejemplo la apoptosis, necroptosis o ferroptosis (13). Un estudio multiómico identificó la apoptosis hepatocítica como un evento de señalización precoz clave en la EHNA inducida por una dieta de alto contenido graso en modelos con animales (18).

En este contexto, se ha observado una reducción de la inflamación y de la apoptosis fibrótica empleando agentes **antiapoptóticos** como el emricasan, un inhibidor de la pancaspasa. Selonsertib, un inhibidor de ASK1 (apoptosis signal-regulated kinase 1), ha demostrado en modelos preclínicos que previene la apoptosis hepatocítica y puede revertir la fibrosis y la inflamación hepáticas (13). Para el abordaje de la necroptosis, se están llevando a cabo estudios de la inhibición de la quinasa de linaje mezclado (MLKL), el receptor de interacción de la proteína 3 (RIP3) o el receptor de interacción de la proteína 1 (RIP1), y todos mostraron una mejoría de EHNA en los modelos animales (13). También se ha observado relación de la patogenia de EHGNA con la hipoferritinemia, mostrando con una correlación positiva con el desarrollo de una fibrosis más avanzada con respecto a los pacientes con niveles normales de ferritina. Esto podría estar relacionado con la ferroptosis, un tipo de muerte celular programada hierro-dependiente caracterizada por la acumulación de ROS y peróxido. En este campo se están estudiando diversas vías metabólicas para frenar el avance de la fibrosis (13).

- 4- **Terapia antiinflamatoria:** como hemos comentado anteriormente, la inflamación juega un papel clave en la aparición, desarrollo y evolución de EHGNA. La apoptosis y la muerte celular, junto con la extensa liberación de mediadores inflamatorios, promueven la patogénesis de EHGNA. En este contexto se están estudiando diversas vías que podrían ser abordadas para frenar la progresión de la enfermedad como el tratamiento con antagonistas de los receptores de las quimiocinas, o con inmunomoduladores antiinflamatorios como la diacereína (13).
- 5- **Fibrosis:** la fibrosis hepática está causada principalmente por el depósito de colágeno tipo I en la matriz extracelular, que afecta a la correcta fisiología del hígado, y las células estrelladas son su principal fuente. Se están estudiando diversos posibles abordajes, como la reducción del número de células estrelladas promoviendo su apoptosis de forma farmacológica, empleando inhibidores del TGF- $\beta$ , o aplicando tratamientos que controlan o revierten directamente la fibrosis hepática, como galectin-3 o simtuzumab (13).

Por otro lado, el uso de **prebióticos** y **probióticos** para la flora intestinal ha demostrado una contribución positiva a la pérdida de peso. Diversos estudios con *Lactobacillus rhamnose* en EHGNA han puesto en evidencia que puede modular la flora intestinal, revertir la barrera intestinal, reducir la hepatitis, mejorar el metabolismo lipídico, y provocar un decrecimiento progresivo en el peso y la fibrosis hepática (23). Incluso el uso de probióticos podría estar relacionado con una reducción de la concentración de triglicéridos intrahepáticos (13). Loguercio et al. observó que la administración de probióticos reduce el daño hepático en pacientes con EHGNA, y Duseja et al. obtuvo resultados en los que se observaba una reducción significativa de la degeneración balonizante y fibrosis en las muestras de biopsia hepática de pacientes con EHGNA tratados con probióticos multicepa durante 1 año (15).

Además, se ha postulado que la suplementación con **vitamina D** podría ser beneficiosa teniendo un efecto antifibrótico. Se ha observado en estudios con modelos animales que la vitamina D mejora los mecanismos intracelulares de la acción de la insulina, facilitando la captación muscular de glucosa y promoviendo la expresión del transportador GLUT4 en los adipocitos. Adicionalmente, a nivel hepático, la vitamina D inhibe la proliferación de células estrelladas y la expresión de mediadores profibróticos (9).

No obstante, por el momento, **no disponemos de ningún tratamiento específico aprobado**. Por ello, dada la extrema complejidad de la patofisiología de EHGNA, el abordaje más efectivo es aquel que incluya diversos objetivos y dianas farmacológicas para mejorar la efectividad del tratamiento farmacológico (13). Se ha postulado que un tratamiento efectivo de EHGNA requiere ser dirigido con precisión, basado en el fenotipo del paciente y del contexto genético (22).

- **Abordaje quirúrgico:**

La **cirugía bariátrica** ha demostrado ser una posible solución a la obesidad mórbida pero también para la EHGNA. Recientes revisiones sistemáticas sobre esta intervención han documentado una completa resolución de EHGNA en pacientes obesos mórbidos intervenidos (4). Datos clínicos de pacientes con obesidad y esteatosis hepática muestran que tras 1 año de la intervención se produjo **mejoría en el SM y la esteatosis hepática** (9), dado que esta intervención mejora el metabolismo lipídico y las vías inflamatorias, que están asociadas con la patofisiología de EHGNA (21). Esta intervención quirúrgica supone una pérdida de peso de alrededor del 10%, hecho que, como ya hemos comentado, está asociado con la resolución de EHGNA y una mejora del estado de fibrosis hepática (4).

Por tanto, la cirugía bariátrica puede ser una alternativa viable para aquellos pacientes con obesidad mórbida, aunque **no debería ser la primera opción terapéutica ofrecida**, las medidas higiénico-dietéticas deben ser el primer paso (5). Incluso, la cirugía bariátrica debe ser considerada solo en aquellos individuos con obesidad mórbida candidatos a dicha intervención (12).

## 9. PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La compleja naturaleza fisiopatológica de EHGNA implica una gran dificultad a la hora de desarrollar estrategias de prevención de la propia enfermedad. Como hemos comentado anteriormente, las técnicas de screening no están completamente caracterizadas y determinadas. Dicho esto, es importante que se desarrollen **campañas de concienciación** sobre

la enfermedad y los alimentos y hábitos a los que se encuentra asociada, para frenar la progresión de esta patología en auge (21).

## 10. PRONÓSTICO.

La EHGNA está asociada con una alta mortalidad multicausal y cardiovascular. Existe evidencia de que alrededor de un 33% de los pacientes que sufren EHGNA murieron o se sometieron a trasplante hepático tras un seguimiento de 12 años. Además, la presencia de DM2 o un estado avanzado de fibrosis añade riesgo de muerte cardiovascular (9), siendo el riesgo de muerte de los pacientes con estadio F4 de 104.9 mientras que aquellos con estadio F0 presentan un ratio de 1.9 (12). La mortalidad específica hepática entre los pacientes con EHGNA se calcula en una cifra de 0.77 por 1000 personas-año, y entre los pacientes con EHNA de 11.77 personas-año (12).

## 11. MOLÉCULA SFRP5.

La molécula secreted frizzled-related protein (SFRP)5 pertenece a la familia SFRP (3), es una proteína secretada por los adipocitos (31), y contiene un dominio rico en cisteína homólogo al sitio de unión de la vía de señalización Wnt (3). Se trata de una **adipoquina antiinflamatoria** que antagoniza la vía de señalización Wnt5a (32). Se ha observado asociación entre SFRP5 e inflamación y RI en modelos animales con obesidad y DM2. Además, la expresión de SFRP5 está regulada a la baja en estos modelos animales (32), por lo que se ha identificado como una adipoquina con propiedades antiinflamatorias y de sensibilización a la insulina, siendo secretada por adipocitos sanos (26). SFRP5 neutraliza la activación no canónica de cinasas c-Jun N-terminal (JNK)1 en la vía Wnt5a en macrófagos y adipocitos, vía mecanismos paracrinos y autocrinos (31).

SFRP son un grupo de proteínas solubles con aproximadamente 300 aminoácidos consistiendo en un dominio N-terminal rico en cistina, que es altamente homólogo con el receptor de Wnt. Concretamente, SFRP5 se une a Wnt5a extracelularmente e inhibe su interacción con el receptor Frz, mitigando la acción inflamatoria causada por Wnt5a (26). Estudios recientes han descubierto que SFRP5 puede inhibir la unión de Wnt5A a su receptor, resultando en la inhibición de la vía Wnt que inhibe la activación de los macrófagos en la grasa, mucosa gástrica y otros tejidos (3). Además, se tiene evidencia de que Wnt5a puede inhibir la adipogénesis, mientras que SFRP5 la promueve y actúa como un marcador de adipocitos maduros (26). La expresión aumentada de Wnt5a a causa de la obesidad, sumada al descenso de la expresión de SFRP5 por este mismo motivo, parece conducir a un estado aumentado de señalización inflamatoria y de RI (33).

La **vía de señalización Wnt5a** actúa como una adipoquina **proinflamatoria** y está expresada en el tejido adiposo, en los macrófagos y en los monocitos CD14+ (26). La familia Wnt consta de glucopéptidos secretados que pueden actuar de una forma autocrina o paracrina, y está próximamente asociado con el proceso de proliferación y diferenciación celular (34). La señalización Wnt consta principalmente de dos vías: la canónica o  $\beta$ -catenina dependiente y la no canónica o  $\beta$ -catenina independiente. La vía de señalización canónica estabiliza la proteína citoplasmática  $\beta$ -catenina, derivando en una transcripción aumentada de determinados genes, e inhibe la transcripción del factor PPAR $\gamma$ , que es responsable de la diferenciación de las células progenitoras en adipocitos maduros. En consecuencia, la función de almacenamiento de los adipocitos maduros es limitada, y los lípidos son desviados al hígado y los músculos, causando

las complicaciones metabólicas de la obesidad. Por otro lado, la vía no canónica está principalmente relacionada con la RI y la inflamación endotelial (26).

En conclusión, se piensa que SFRP5 es una adipoquina que podría jugar un **papel protector** frente a la RI y DM2 relacionadas con la obesidad al unirse con Wnt5A y mejorar la sensibilidad a la insulina (26). **Anexo 9: Señalización Wnt5a y la molécula SFRP5 en el tejido adiposo.**

## 12. SFRP5 Y LA EHGNA.

Varias adipoquinas, entre las que se incluyen la leptina, la adiponectina, TNF-alfa y la resistina, presentan relación con la patología hepática. Considerando esta diafonía entre las adipoquinas y el hígado, se ha hipotetizado una relación entre SFRP5/Wnt5A y la enfermedad hepática (26). Se ha demostrado que SFRP5 se une y antagoniza a la señalización de Wnt5a, que Wnt5a se encuentra elevada con la obesidad, y que una señalización elevada de Wnt inhibe la expresión del mRNA de SFRP5 (35,36).

PPAR $\gamma$ , es un factor de transcripción del ligando activado que pertenece a una subfamilia de receptores nucleares implicados en la regulación del metabolismo, la homeostasis de la glucosa, la inflamación y el crecimiento celular (36). Se ha observado, en modelos animales con EHNA, que la activación de PPAR $\gamma$  regula la polarización de los macrófagos al subtipo M2, previniendo el desarrollo de EHNA (36).

Sin embargo, el papel de SFRP5 y su vía de señalización en la progresión de EHNA se ha estudiado escasamente. Recientemente, Bertran et al. han estudiado la expresión hepática y los niveles circulantes de SFRP5 en pacientes con EHGNA. Estos autores han descrito que los niveles circulantes de SFRP5 dependen de la dieta, y que el SFRP5 hepático parece tener un papel protector en las primeras etapas de EHGNA tratando de inhibir la vía Wnt no canónica. Sin embargo, en etapas avanzadas de la enfermedad, SFRP5 podría desregularse, mientras Wnt5A y JNK se activan promoviendo daño hepático (37). Otro estudio demostró que SFRP5 estaba altamente elevado en los hepatocitos, y que el nivel de expresión de SFRP5 en las células hepáticas en EHGNA estaba anormalmente disminuido con respecto a los pacientes con EHNA y sin patología, sugiriendo que la activación anormal de las células de Kupffer podría deberse a una secreción disminuida de SFRP5 en las células hepáticas. Se ha sugerido que PPAR $\gamma$  y SFRP5 pueden participar en la transformación de EHGNA a EHNA mediando la activación de las células de Kupffer (3).

La SFRP5 es una citocina antiinflamatoria producida y secretada por los adipocitos del tejido adiposo (38,39). Teniendo en cuenta la interrelación de las adipoquinas entre el tejido adiposo y el hígado (40), algunos autores han relacionado las funciones de SFRP5 con EHGNA (26,41). Esta adipoquina actúa inhibiendo la activación de la vía Wnt. Por un lado, la señalización de Wnt suprime la adipogénesis durante varias etapas de la diferenciación de los adipocitos (42). Por otro lado, en los adipocitos maduros, la vía Wnt desencadena resultados proinflamatorios, proliferativos (41,43) y lipogénicos (44). Estos estímulos en el tejido adiposo dan como resultado la liberación de factores proinflamatorios y AGs libres que podrían contribuir a la aparición y progresión de EHGNA (45). Se piensa que Wnt5a podría actuar como una importante molécula proinflamatoria en la inflamación de bajo grado en el tejido adiposo de humanos obesos (34).

Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual se produce esta posible interacción, y se han reportado resultados contradictorios con respecto a la función del SFRP5 en el tejido adiposo (46).

## HIPÓTESIS

Dado que se conoce que:

- SFRP5 es una adipoquina antiinflamatoria que antagoniza la vía de señalización Wnt5a y es secretada por los adipocitos,
- SFRP5 parece jugar un papel protector frente a la RI y DM2 relacionadas con la obesidad al unirse con Wnt5A,
- el desarrollo de EHGNA guarda relación con la liberación de adipoquinas del tejido adiposo,
- el SFRP5 hepático parece tener un papel protector en las primeras etapas de EHGNA tratando de inhibir la vía Wnt no canónica, y en etapas avanzadas de la enfermedad SFRP5 parece estar desregulado, mientras Wnt5A y JNK se activarían promoviendo daño hepático.

Hipotetizamos que:

**Los pacientes con EHGNA tienen una expresión de SFRP5 en tejido adiposo subcutáneo y visceral desregulada en relación con la expresión que presentan las personas con histología hepática normal.**

## OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar el papel de la vía SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en tejido adiposo subcutáneo y visceral y su vínculo con la patogénesis de EHGNA en una cohorte de mujeres con normo peso y obesidad mórbida.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Comparar la expresión génica de SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral y subcutáneo de personas con normo peso y obesidad mórbida.
2. Comparar la expresión génica de SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes obesos mórbidos con histología hepática normal versus EHGNA.
3. Comparar la expresión génica de SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes obesos mórbidos con hígado normal, esteatosis simple o esteatohepatitis no alcohólica.
4. Correlacionar los resultados de expresión génica de SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  en tejidos adiposos con parámetros del síndrome metabólico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. SUJETOS.

El Comité ético de investigación con medicamentos del Institut Investigació Sanitaria Pere Virgili (IISPV) aprobó este estudio (CEIm; 23c/2015). La cohorte estudiada está compuesta por **60 mujeres** caucásicas con obesidad mórbida (**OM**) ( $\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$ ), y el grupo control por **15 mujeres** caucásicas normo peso (**PN**) ( $\text{IMC} 19\text{-}25 \text{ kg/m}^2$ ); todas ellas firmaron el consentimiento informado. Las biopsias de hígado, tejido adiposo subcutáneo (SAT) y tejido adiposo visceral (VAT) de las pacientes con OM se obtuvieron durante la intervención de cirugía bariátrica programada, mientras que las biopsias de SAT y VAT del grupo de pacientes PN fueron obtenidas durante otras intervenciones quirúrgicas programadas (como por ejemplo colecistectomía electiva). Las biopsias hepáticas estaban indicadas solamente cuando el diagnóstico clínico era necesario. Las pacientes que se sometieron a cirugía bariátrica (sujetos con OM) siguieron una dieta muy baja en calorías las 3 semanas previas a la intervención, mientras que la cohorte NP no se sometió a ninguna dieta especial previa a la intervención quirúrgica.

Los criterios de **exclusión** en el estudio eran mujeres que: 1- tuvieran un consumo de alcohol superior a 10g/día u otras toxinas; 2- tuvieran enfermedad hepática aguda o crónica de otras etiologías, enfermedad inflamatoria, infecciosa o neoplásica; 3- tuvieran la menopausia o se encontrasen en tratamiento con anticonceptivos; y 4- que hubiesen tomado tratamiento antibiótico las 4 semanas previas a la intervención.

En este estudio se **incluyeron** solo a mujeres para evaluar una cohorte homogénea y de este modo evitar la interferencia de factores de confusión como el género, ya que existe evidencia de que los hombres y las mujeres difieren sustancialmente en cuanto a la composición corporal, desequilibrio energético y hormonas. Además, diversos estudios han mostrado diferencias específicas, según el género, en cuanto al metabolismo lipídico y de la glucosa (47,48) y en el perfil de las adipocinas (49).

### 2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA HEPÁTICA.

Las mujeres con OM, de las cuales se obtuvo biopsia hepática, se clasificaron por un patólogo experimentado de acuerdo con la clasificación histopatológica siguiendo los **criterios de Brunt**, descritos previamente (50,51), en pacientes con hígado normal (HN) ( $n=20$ ) o EHGNA ( $n=40$ ); además, la cohorte con EHGNA se subclasificó en esteatosis simple (ES) (esteatosis micro/macrovesicular sin inflamación o fibrosis,  $n=21$ ) o EHNA (grados de Brunt 1-2,  $n=19$ ). Se debe tener en cuenta que ninguna de las pacientes con EHNA en nuestra cohorte presentaba fibrosis.

### 3. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Este estudio está principalmente centrado en definir la especificidad del rol de SFRP5 en EHGNA. En este sentido, el tamaño de la muestra se calculó utilizando el enfoque **ARCSINUS**, con un riesgo de error  $\alpha$  de 0.05 y un riesgo de error  $\beta$  de 0.01 en un contraste bilateral. Por eso, un mínimo de 15 sujetos era necesario para el primer grupo (NP) y 45 en el segundo (OM) para detectar las diferencias entre ellos con significación estadística.

#### 4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Todas las participantes se sometieron a evaluaciones físicas, antropométricas y bioquímicas. Las analíticas de sangre fueron extraídas por un equipo de enfermería especializado a través del sistema BD Vacutainer<sup>®</sup>, tras el ayuno de la noche previa a la cirugía. Las muestras de sangre venosa se obtuvieron empleando tubos vacíos y recubiertos de ácido etilendiaminotetraacético, que fueron, respectivamente, separados en alícuotas de serum y plasma por centrifugación (3500 rpm, 4°C, 15 min) (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain). Los parámetros bioquímicos fueron analizados empleando un analizador convencional automatizado. La RI fue estimada empleando HOMA1-IR.

#### 5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Las biopsias de SAT, VAT y tejido hepático fueron recogidas en tubos con RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) durante la intervención quirúrgica, y fueron conservados a 4°C y, después, procesados y almacenados a -80°C. El mini kit RNAeasy (Qiagen, Barcelona, España) fue utilizado para extraer el ARN total de los tejidos SAT y VAT. La retro transcripción a cDNA se llevó a cabo con el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Madrid, España). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el TaqMan Assay prediseñado por Applied Biosystems para la detección de SFRP5 (Hs00169366\_m1), WNT5A (Hs00998537\_m1), PPAR $\gamma$  (Hs01115513\_m1) en muestras de tejido adiposo. La expresión de cada gen era primero normalizada con la expresión de la deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfatasa (GAPDH, Hs02786624\_g1), y después estandarizada con el grupo control. Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos utilizando el QuantStudio™ 7 Pro Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Madrid, España).

#### 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó para el análisis de los datos el pack estadístico SPSS/PC+ para Windows 8 (version 27.0; SPSS, Chicago, IL, USA). La prueba Kolmogorov-Smirnov fue empleada para conocer la distribución de las variables. Las variables se presentan como la mediana y el percentil 25-75 o la media y el error estándar de la media cuando se analizan expresiones relativas de genes. Los diferentes análisis comparativos entre grupos se llevaron a cabo utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La fuerza de asociación entre las variables se calculó utilizando la prueba de correlación  $\sigma$  de Spearman. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Las gráficas se crearon utilizando GraphPad Prism (version 7.04; San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS

### 1. Características básicas de los pacientes:

Las características antropométricas y bioquímicas de la cohorte estudiada se muestran en la Tabla 1 (**Anexo 10**). Las pacientes fueron primero clasificadas entre PN (n=15) y OM (n=60) de acuerdo con su índice de masa corporal (IMC). Los grupos eran comparables en términos de presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C). Después, el grupo de OM fue subclasificado de acuerdo con su histología hepática en HN (n=20), esteatosis simple (ES) (n=21) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (n=19), grupos que eran comparables en términos de peso, IMC, PAS, PAD, insulina, hemoglobina glicosiladas (HbA1c), triglicéridos (TG), colesterol, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), LDL-C, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).

El análisis de las medidas antropométricas y bioquímicas mostró que las participantes con PN presentaron menor peso, IMC, HbA1c y TG que las pacientes con OM; incluso, los valores de glucosa, insulina, el método de evaluación del modelo homeostático-resistencia a la insulina (HOMA1-IR), AST y ALT fueron menores que en los grupos de ES y EHNA; además, los niveles de gamma-glutamilttransferasa (GGT) se vieron disminuidos en relación con las mujeres con EHNA. Por otro lado, la cohorte PN presentó mayores niveles de HDL-C en comparación con el grupo de OM y mostró niveles superiores de colesterol con respecto a las pacientes con ES. En cuanto a las pacientes con OM, se ha observado que la cohorte de HN presentó niveles menores de fosfatasa alcalina (ALP) con respecto a las pacientes con ES, niveles disminuidos de GGT en comparación con el grupo de EHNA, y niveles más bajos de glucosa que en las pacientes con ES y EHNA. El grupo con ES presentó niveles superiores de ALP en comparación con la cohorte de EHNA.

### 2. Evaluación de la abundancia relativa de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$ en SAT y VAT:

En primer lugar, comparamos la expresión de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  entre SAT y VAT. Como se puede observar en la Figura 1 (**Anexo 11**), la expresión del mRNA de SFRP5 y de WNT5A en VAT eran notablemente superiores que en SAT, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión del mRNA de PPAR $\gamma$  cuando ambos tejidos fueron comparados. Se debe tener en cuenta que la expresión del mRNA de SFRP5 era detectable en el 85.5% de las muestras de SAT y el 97.2% de las muestras de VAT, WNT5A fue detectado en el 87.0% de las muestras de SAT y en el 100% de VAT, y PPAR $\gamma$  fue detectado en el 100% de las muestras de SAT y VAT.

### 3. Evaluación de la abundancia relativa de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$ en relación con el IMC:

Para poder evaluar el rol de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en SAT y VAT, hemos estudiado la expresión relativa de mRNA de estos genes, primero en una cohorte clasificada de acuerdo con el IMC en PN y OM.

El análisis del mRNA de SFRP5 de acuerdo con el IMC mostró diferencias no significativas entre los grupos PN y OM en SAT (Figura 2A), pero se encontró un aumento significativo de la expresión del mRNA de SFRP5 en las pacientes con OM en comparación con el grupo PN en SAT, como se puede ver representado en la gráfica en la Figura 2C, pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos de VAT (Figura 2D). En cuanto a la expresión del mRNA de PPAR $\gamma$ , no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (Figura 2 E, F). **Anexo 12.**

#### 4. Evaluación de la abundancia relativa de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$ en función de la presencia de EHGNA:

Para comprobar si había diferencias significativas en la expresión de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo (SAT y VAT) de acuerdo con la presencia de EHGNA, en primer lugar, clasificamos la cohorte de OM (la única con biopsia hepática diagnóstica) en HN y EHGNA. En cuanto a **SFRP5**, observamos una **mayor expresión relativa de mRNA en pacientes con EHGNA con respecto a HN en SAT (Figura 3A) y en VAT (Figura 3B)**. Por otro lado, no observamos diferencias entre las cohortes en SAT o VAT en el análisis de WNT5A (Figura 3 C, D) y PPAR $\gamma$  (Figura 3 E, F). **Anexo 13.**

#### 5. Evaluación de la abundancia relativa de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$ de acuerdo con la clasificación por grados de EHGNA:

Para lograr el principal objetivo del estudio, evaluamos la expresión de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en tejido adiposo (SAT y VAT) clasificando la cohorte en los diferentes grados de EHGNA. Centrándonos en **SAT**, nuestros resultados mostraron un **aumento de la expresión de mRNA de SFRP5 en EHNA comparado con HN** (Figura 4 A, B; esta última desglosando el estadio de SS en leve y moderado/grave (mod/sev)). Además, observamos que SFRP5 en SAT estaba aumentado en aquellas pacientes que presentaban ballooning ( $p=0.046$ ), una de las principales características de EHNA, en comparación con aquellas pacientes que carecían de esta característica. En cuanto a la expresión de **WNT5A** en SAT, encontramos una **mayor expresión en ES en comparación con el grupo HN** (Figura 4C); mientras que, cuando separamos el grupo ES en leve y mod/sev, no encontramos diferencias entre los diferentes grupos (Figura 4D). No obstante, no se observaron diferencias en la expresión de PPAR $\gamma$ , como se muestra en la Figura 4 E, F. **Anexo 14.**

Cuando analizamos la expresión génica en **VAT**, encontramos una **mayor expresión de SFRP5 en pacientes con ES y EHNA, con respecto a aquellas con HN** (Figura 5A); pero, cuando desglosamos el grupo ES, la expresión aumentada de SFRP5 se observó en el estadio leve de ES y EHNA en comparación con el grupo HN (Figura 5B). En referencia a la expresión de mRNA de **WNT5A**, cuando clasificamos a las pacientes en HN, ES y EHNA, no se observaron diferencias relevantes (Figura 5C); dicho esto, cuando se subdivide el grupo de ES, observamos un **aumento significativo de la expresión de este gen en el estadio leve de ES en comparación con el resto de los grupos**, como se puede observar en la Figura 5D. Con respecto a PPAR $\gamma$ , no observamos diferencias significativas, como podemos ver representado en la Figura 5 E, F. **Anexo 15.**

Puesto que observamos un **pico en la expresión de SFRP5 y WNT5A en el estadio leve de ES en las muestras de VAT**, decidimos estudiar la relación de estos genes centrándonos en los grados de esteatosis, independientemente de la presencia de inflamación o ballooning, en la cohorte analizada. Por lo tanto, encontramos una expresión significativamente mayor de SFRP5 en la

esteatosis leve comparada con aquellas pacientes sin esteatosis ( $p=0.001$ ) o grados mod/sev ( $p=0.032$ ); además, el grupo mod/sev presentaba una expresión aumentada en comparación con la cohorte que carecía de esteatosis ( $p=0.014$ ). En cuanto a la expresión de WNT5A, era mayor en el grupo de esteatosis leve que en el grupo de pacientes con esteatosis mod/sev ( $p=0.025$ ).

#### 6. Evaluación de la abundancia relativa de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$ de acuerdo con los parámetros de Síndrome Metabólico:

También quisimos evaluar la expresión del mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  basándonos en la presencia de síndrome metabólico (SM) y sus principales características de acuerdo con la clasificación de Alberti et al. (52). Así, encontramos una **expresión disminuida de WNT5A** en las muestras de VAT ( $p=0.034$ ) y de PPAR $\gamma$  en las muestras de SAT ( $p=0.035$ ) en pacientes que **presentaban SM**. En cuanto a la DM2, solo encontramos **niveles inferiores de la abundancia relativa de mRNA de WNT5A en las muestras de SAT** ( $p=0.030$ ) del grupo diabético. Además, observamos una **disminución en la expresión de PPAR $\gamma$  en las muestras de SAT** ( $p=0.020$ ) de pacientes que presentaban **dislipemia**. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre estos genes en relación con la hipertensión. Centrándonos en SFRP5, no encontramos asociaciones significativas con estos trastornos.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se ha hipotetizado que la vía de señalización de la proteína SFRP5, que parece presentar un rol protector y antiinflamatorio frente al desarrollo de trastornos metabólicos, puede estar implicada en la patogenia de la EHGNA a nivel del tejido adiposo. Es importante tener en cuenta que el tejido adiposo tiene otras múltiples funciones y no solo actúa como almacén de grasa, como por ejemplo la de órgano endocrino, función que lleva a cabo a través de la secreción de citoquinas. En este sentido, en el presente estudio nos centramos en la vía de señalización de SFRP5 y su posible implicación en la patogenia de la EHGNA a través del eje hígado-tejido adiposo en mujeres con diferentes grados de EHGNA asociada a la obesidad.

El objetivo era evaluar la expresión de ARNm de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en el SAT y en el VAT con relación a la **presencia de obesidad** primero y, posteriormente, con relación a la **presencia de EHGNA**, para así intentar alcanzar una mejor comprensión del papel de esta vía en la disfunción metabólica causada por la disfunción del tejido adiposo en pacientes con obesidad y EHGNA.

A la hora de analizar los resultados, en primer lugar, comparamos resultados de expresión **entre VAT y SAT**. Observamos una expresión de **ARNm de SFRP5 considerablemente elevada en el VAT, comparándolo con el SAT**, del grupo de sujetos estudiadas. Este resultado concuerda con estudios previos que proponen que la proteína SFRP5 es sintetizada y secretada principalmente en el VAT (44,53). En cuanto a la expresión de **ARNm de WNT5A**, observamos una **mayor abundancia en el VAT con respecto al SAT de toda la cohorte**, resultado que sigue la misma línea que otros previamente publicados (54,55). A este respecto, podemos postular que **SFRP5 y WNT5A parecen presentar papeles relevantes**, actuando a nivel del VAT, **en la patogénesis de EHGNA**, debido a la implicación directa de este tejido en la entrega de AGLs y adipoquinas al hígado a través de la circulación portal (56). Por el contrario, pese a la implicación de PPAR en

diversas funciones del tejido adiposo (57), sus niveles de expresión entre los tejidos fueron diferentes y carecían de significancia estadística.

Otro factor que analizamos era la abundancia de ARNm de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$ , y su relación con la **obesidad**. En este caso, encontramos **elevada la expresión de SFRP5 en el VAT del grupo con OM al compararla con el grupo control**. Los resultados obtenidos muestran coherencia con artículos publicados previamente, que postulaban un aumento de la expresión de SFRP5 en el tejido adiposo de modelos animales con obesidad, induciendo de este modo la adipogénesis (46,58–60). Al comparar nuestros resultados con otros estudios, observamos diferencias como que la expresión de SFRP5 en el tejido adiposo se veía reducida en respuesta a la disfunción metabólica severa causada por la obesidad (53). Este estudio publicado por Ouchi et al. se llevó a cabo en modelos animales, hecho que podría explicar estas controversias, dada la variabilidad en el modelo de estudio y los sujetos utilizados. También podrían explicarse por la dieta que fue seguida por nuestras pacientes con OM las tres semanas previas a la cirugía bariátrica, una dieta altamente baja en calorías, que no fue seguida por el grupo control con PN. Este régimen dietético tan estricto fue pautado con el objetivo de reducir el IMC inicial de las pacientes antes de la cirugía. Siguiendo esta línea, Tan et al. y Schulte et al. informaron de un aumento de los niveles séricos de SFRP5 en niños y adultos, respectivamente, que habían seguido una dieta de restricción calórica (34,61). Por ello, se propone esta adipocina como un **posible biomarcador de los efectos antiinflamatorios de cambios en los hábitos dietéticos** (34). Incluso, los resultados obtenidos por Bertrán et al., en un estudio previo de características similares, ya informaban de unos niveles circulantes de SFRP5 aumentados en pacientes con OM, pacientes que fueron sometidas a la misma dieta hipocalórica (37). Por el contrario, al evaluar los niveles de **WNT5A**, sólo hemos observado una **disminución significativa en el SAT de pacientes con OM al compararlas con el grupo control**. Son unos resultados difíciles de explicar dado que no se tiene constancia de estudios previos con diferencias significativas en cuanto a la expresión de WNT5A en el SAT entre sujetos con obesidad y sin obesidad. Tan solo se tiene evidencia de unos resultados publicados por Catalán et al. que mostraron reducción de la expresión de los niveles de ARNm de WNT5A en el SAT de pacientes con obesidad en comparación con sujetos delgados, pero estos resultados no fueron estadísticamente significativos (33). Además, también se ha postulado que la vía WNT5A está más activada en el VAT que en el SAT de pacientes que presentan obesidad (54,55), dato que concuerda con nuestros resultados iniciales sobre la expresión de WNT5A en el VAT al compararlo con la del SAT. En este caso, Catalán et al. observaron que la **pérdida de peso podría suponer una reducción de los niveles circulantes de WNT5A** (33), esto es algo importante para tener en cuenta, dado que las pacientes de nuestro estudio incluidas en la cohorte con OM llevaron a cabo una dieta muy hipocalórica semanas previas a la cirugía para inducir la pérdida de peso. Asimismo, se tiene evidencia de que una dieta alta en grasas estimula la hipertrofia y proliferación de los adipocitos en el SAT (62). A la hora de analizar la expresión de **PPAR $\gamma$**  en el tejido adiposo, al igual que en el estudio de Torres et al. (63), **no encontramos diferencias significativas** entre los grupos con OM y el grupo con PN. Aunque PPAR $\gamma$  se considere el regulador principal de la adipogénesis (57), por el momento no se tiene claro cuál es el mecanismo exacto que juega PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo al desarrollarse la obesidad en humanos.

Después quisimos evaluar la expresión en tejido adiposo de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en relación con la **presencia de la EHGNA**. En primer lugar, observamos una mayor expresión del ARNm de SFRP5 en el grupo con EHGNA al compararlo con las pacientes con HN tanto en el SAT como en el VAT. Para profundizar en estos hallazgos y obtener una mayor comprensión de estos resultados, dividimos a las pacientes con EHGNA en función del grado de enfermedad hepática. Al llevar a cabo esta división, observamos una **mayor expresión** de la citoquina **SFRP5** en las muestras del **SAT de las pacientes con EHGNA en comparación con las del grupo con HN**; y en el **VAT**, observamos un **aumento de la expresión de SFRP5 en aquellas pacientes en estadios leves**

**de ES y EHNA.** En la valoración de la expresión de **WNT5A**, **no vimos diferencias significativas** en cuanto a su expresión de ARNm entre el grupo con HN y el grupo con EHGNA. Pero, si vimos una **mayor expresión de esta proteína en el SAT de las pacientes con ES**, y un **pico de expresión de WNT5A en las pacientes con ES leve en las muestras del VAT**. Además, observamos una mayor expresión de esta proteína en las pacientes con ES en el SAT al compararlas con el grupo de HN, y un pico de expresión de WNT5A en las pacientes con ES leve en las muestras de VAT en comparación con aquellas pacientes que presentaban HN, ES moderada o severa, e incluso aquellas con EHNA. No tenemos constancia de ningún estudio que haya investigado la vía SFRP5/WNT5A en el tejido adiposo en relación con la EHGNA, y sus diferentes grados histológicos, en pacientes humanos. Como se puede observar, nuestros resultados sugieren que **las pacientes con EHGNA presentan una expresión aumentada de SFRP5 en el tejido adiposo, concretamente en pacientes con EHNA se observa en el SAT, y en el VAT de aquellas con ES leve o EHNA.** La literatura publicada sobre la SFRP5 la define como una adipoquina antiinflamatoria que es producida y secretada por el tejido adiposo (32,38,39,64), por ello planteamos la hipótesis de que el aumento en la abundancia del ARNm de SFRP5 a medida que avanza la EHGNA puede deberse a un **mecanismo protector llevado a cabo por esta molécula con el objetivo de proteger el tejido adiposo frente a la acumulación de lípidos, la inflamación y desequilibrio metabólico.** Además, Bertrán et al. en estudios previos sugirieron un papel protector de SFRP5 similar, en este caso en tejido hepático (37). Teniendo en cuenta esto, se propone que la expresión de SFRP5 en el tejido adiposo de los pacientes con EHGNA podría verse aumentada por la **estrecha relación entre el tejido hepático y el adiposo** (65). Incluso, en base a estudios previos que proponen que la obesidad podría inducir la expresión de SFRP5 en ratones y humanos (66), planteamos la hipótesis de que, en presencia de desequilibrio metabólico, EHGNA podría inducir el mismo efecto. Choudhary et al. observaron una correlación positiva entre el volumen del SAT y del tejido adiposo total, con el grado de esteatosis hepática y la gravedad de la enfermedad. Pero, en ese estudio, no se obtuvieron resultados que correlacionasen ninguno de los 2 volúmenes con las principales características de EHNA, la balonización, la fibrosis hepática o la inflamación lobulillar (67). Por otro lado, no hemos observado resultados que muestren diferencias significativas en la expresión de ARNm de PPAR $\gamma$ . Si nos centramos en el aumento de la expresión de WNT5A en el tejido adiposo, es posible que se de este aumento en las primeras etapas de la esteatosis, ya que en sujetos con OM, existe una sobreproliferación del tejido adiposo mediada por WNT5A (68). Además, esta excesiva proliferación provoca a una saturación de los depósitos de grasa del tejido adiposo que reducen su sensibilidad a la insulina (69,70). Al reducirse la sensibilidad a la insulina se crea una resistencia a la insulina que tiene afectación directa en el hígado y puede provocar el desarrollo de esteatosis hepática (71). Teniendo en cuenta los hallazgos de nuestro estudio, y en base a evidencias previas, sugerimos una posible **desregulación de las dos adipoquinas competidoras, SFRP5 y WNT5A, en el tejido adiposo de pacientes con EHGNA**, pacientes que además se encuentran en un probable contexto de disfunción metabólica asociada a la obesidad (72,73), teniendo en cuenta, además, el papel importante del eje tejido adiposo-hígado en la progresión de la enfermedad (74).

Tras evaluar la relación de la obesidad y EHGNA en la expresión de estas citoquinas, y en base a los datos obtenidos que indicaban una fuerte relación entre estas y la evolución de la disfunción metabólica, quisimos valorar la relación entre la expresión de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en tejido adiposo, **en relación con la presencia del síndrome metabólico y de las patologías implicadas, DM2, DL y HTA.** Al evaluar la abundancia de ARNm de SFRP5 en los tejidos adiposos en función de estas comorbilidades, no hemos encontrado variaciones significativas en nuestro análisis. Por otro lado, encontramos una **menor expresión de WNT5A en el SAT de las pacientes diabéticas y una menor expresión de WNT5A en el VAT de pacientes con SM.** Aunque WNT5A tiene función lipogénica, algunos autores han descrito que la inhibición de su vía en el páncreas puede provocar diabetes (69), dato que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio. En

cambio, se tiene evidencia de que la señalización no canónica de WNT5A presenta un papel fundamental en la inflamación del VAT inducida por la obesidad y la disfunción metabólica, hecho que puede promover la aparición de la resistencia a la insulina en condiciones de sobrealimentación (33,55,75). Esta diferencia en cuanto a los resultados puede ser a causa de la dieta hipocalórica seguida por las pacientes con OM de nuestro estudio antes de la cirugía, por ello, pensamos que debería ser estudiado más adelante en sujetos expuestos a otras condiciones. En cuanto a la expresión de **PPAR $\gamma$** , nosotros observamos que los niveles de ARNm de PPAR $\gamma$  eran **menores en el SAT de las pacientes con SM y de aquéllas con DM2** al compararlo con las del grupo control. Esto puede ser explicado por el hecho de que PPAR $\gamma$  es una proteína sensibilizante a la insulina implicada en la inhibición de la lipogénesis (76,77). En resumen, las diferencias significativas que hemos encontrado al llevar a cabo el análisis en este estudio se encontraban principalmente en el SAT, hecho que puede ser explicado debido a que este depósito de grasa actúa como protector para los demás tejidos frente a la lipotoxicidad, cumpliendo la función de "tampón" frente a una elevada ingesta de lípidos a través de la dieta.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio, podríamos hipotetizar que tanto la SFRP5 y la WNT5A en el tejido adiposo podrían actuar como posibles dianas terapéuticas para prevenir la lipogénesis, la inflamación y el daño hepático (43), ya que parece que su síntesis aumenta cuando comienza la EHGNA en sujetos obesos (34,61).

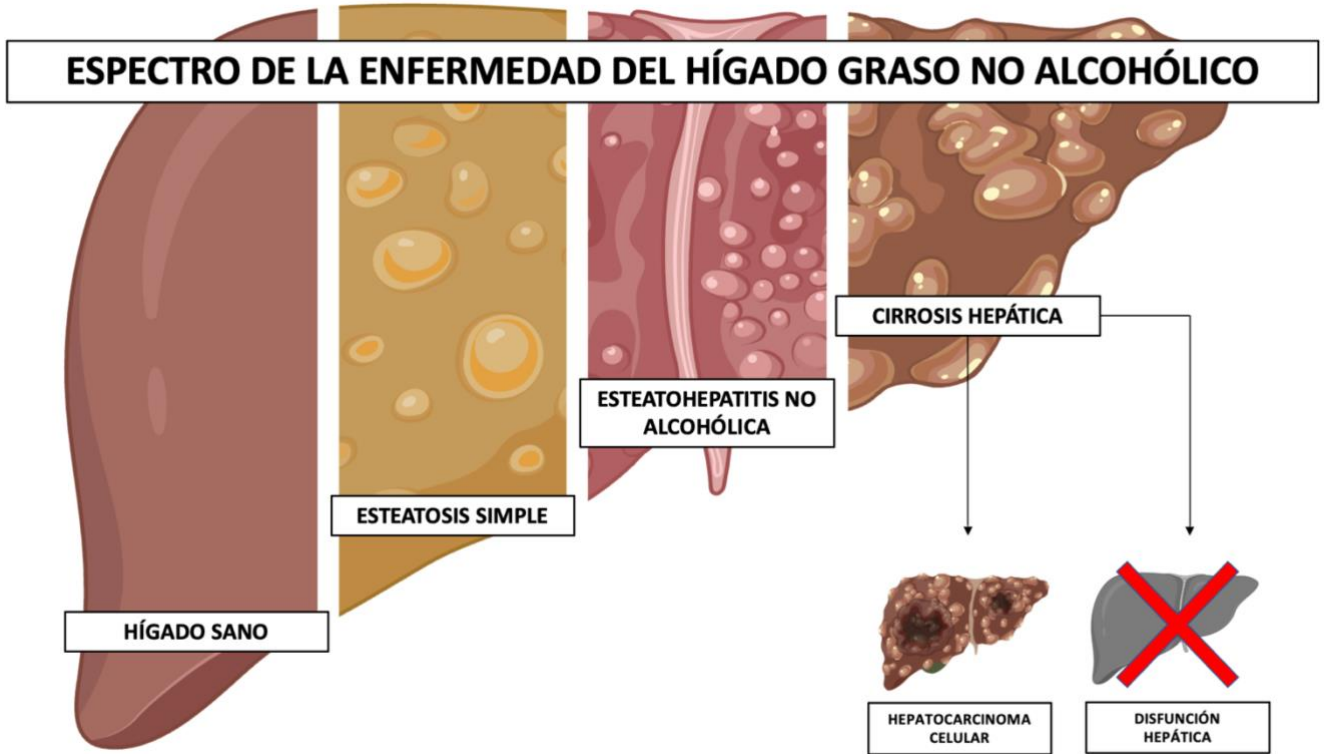
En este estudio, la cohorte de mujeres permitió obtener la relación de la abundancia de la expresión de mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR en el SAT y el VAT, con la obesidad y la EHGNA. Pero estos resultados no pueden extrapolarse a otros grupos de obesidad, o a hombres. Además, no tenemos la posibilidad de explicar si esta asociación subyace a una relación causal o si se trata simplemente de un epifenómeno en el contexto de estos complejos mecanismos patogénicos. Por lo tanto, otros estudios deben ser llevados a cabo para validar estos resultados.

## CONCLUSIONES

Para concluir, en este estudio observamos una expresión elevada del ARNm de SFRP5 en tejido adiposo en pacientes con EHGNA relacionada con obesidad. Los resultados que obtuvimos sugieren que el **aumento en la expresión de SFRP5 en el VAT puede estar inducida por la obesidad**. Además, en el SAT y en el VAT se relaciona con EHGNA y tiene un **potencial rol protector frente a la desregulación metabólica**. Por otro lado, pensamos que el aumento en la expresión de WNT5A en el SAT y VAT de las pacientes con ES puede promover el daño hepático. Por lo tanto, hipotetizamos que **la vía SFRP5/WNT5A en el tejido adiposo podría jugar un papel fundamental en la patogénesis de la EHGNA relacionada con la obesidad a través del eje tejido adiposo-hepático**. Dicho esto, es necesario seguir investigando en este campo para obtener resultados que permitan determinar el mecanismo molecular específico por el que tanto SFRP5 y WNT5A en tejido adiposo presentan relación con la patogénesis de EHGNA.

## ANEXOS

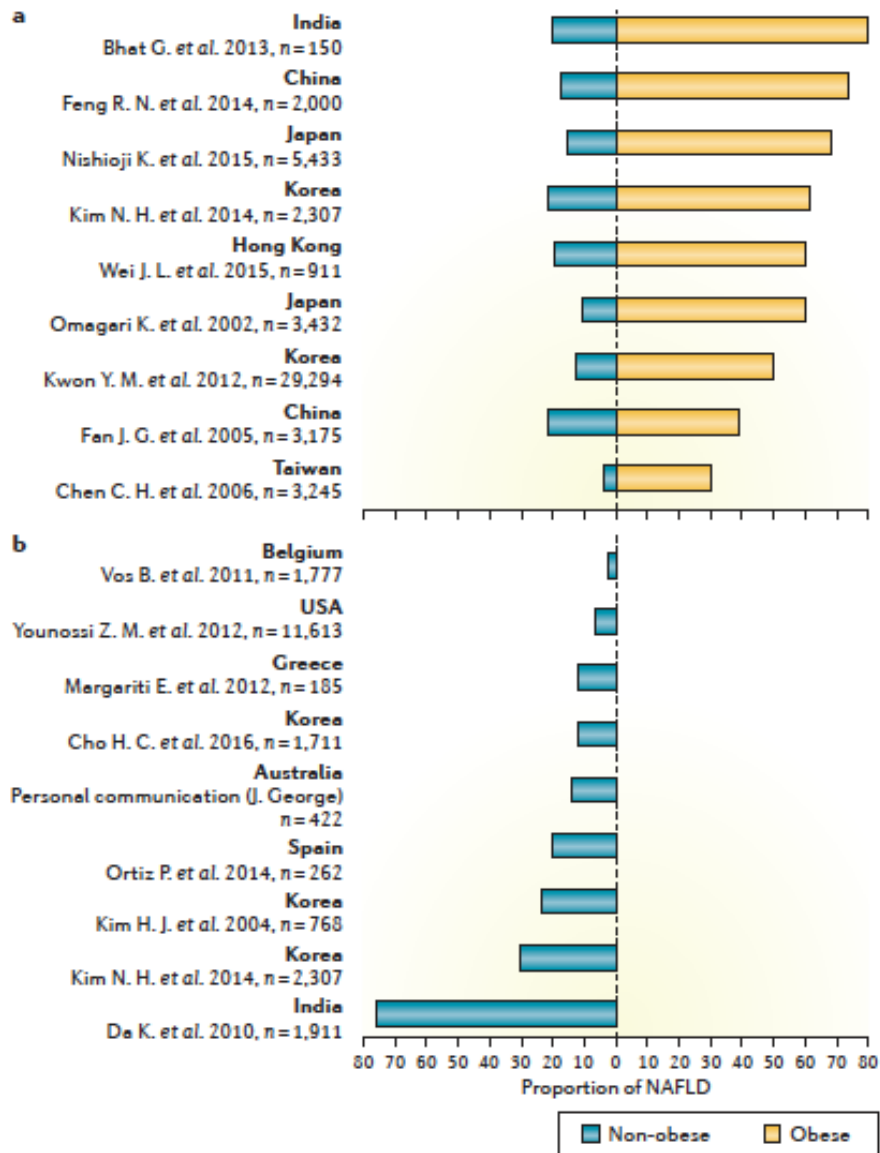
### ANEXO 1:



**Figura 1: Espectro histológico de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.**

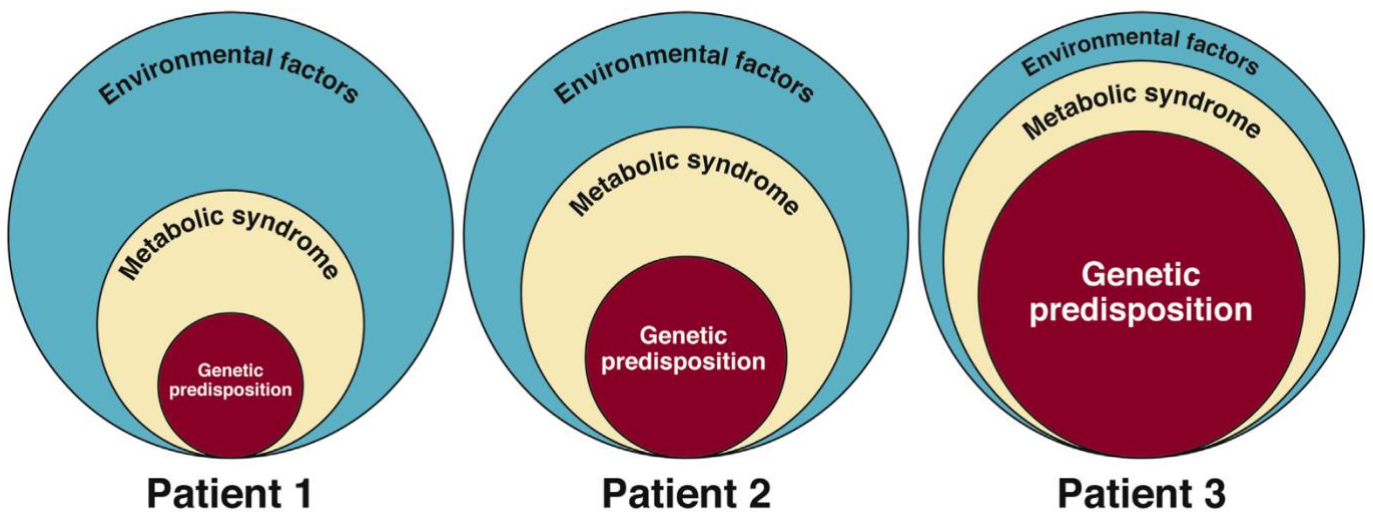
En primer lugar, cabe recalcar que el hígado sano no pertenece como tal al espectro histológico de la EHGNA, pero aparece en la imagen para que se pueda apreciar de forma gráfica el cambio del aspecto macroscópico del hígado conforme avanza la enfermedad. Por lo tanto, el primer estadio de la enfermedad es la esteatosis simple, caracterizada por el excesivo acúmulo de lípidos en los hepatocitos. A continuación, es posible que la enfermedad continúe su desarrollo provocándose, de manera reversible, una inflamación crónica e infiltración por neutrófilos, que, sumada al acúmulo de lípidos, caracterizará al estadio de esteatohepatitis no alcohólica. Por último, tenemos la cirrosis hepática, único estadio irreversible, observamos un acúmulo de hepatocitos muertos y la aparición de lesiones fibrosas. Este estadio tiene una alta probabilidad de evolución a disfunción hepática y hepatocarcinoma celular.

**ANEXO 2:**



**Figura 2: Proporción de individuos con EHGNA estratificados por país y estado de obesidad.** En **a** vemos la proporción de individuos con EHGNA en función de si son delgados u obesos. En **b** vemos la proporción de EHGNA en individuos delgados. (10)  
 Link imagen: <https://slideplayer.com/slide/14860109/>

**ANEXO 3:**

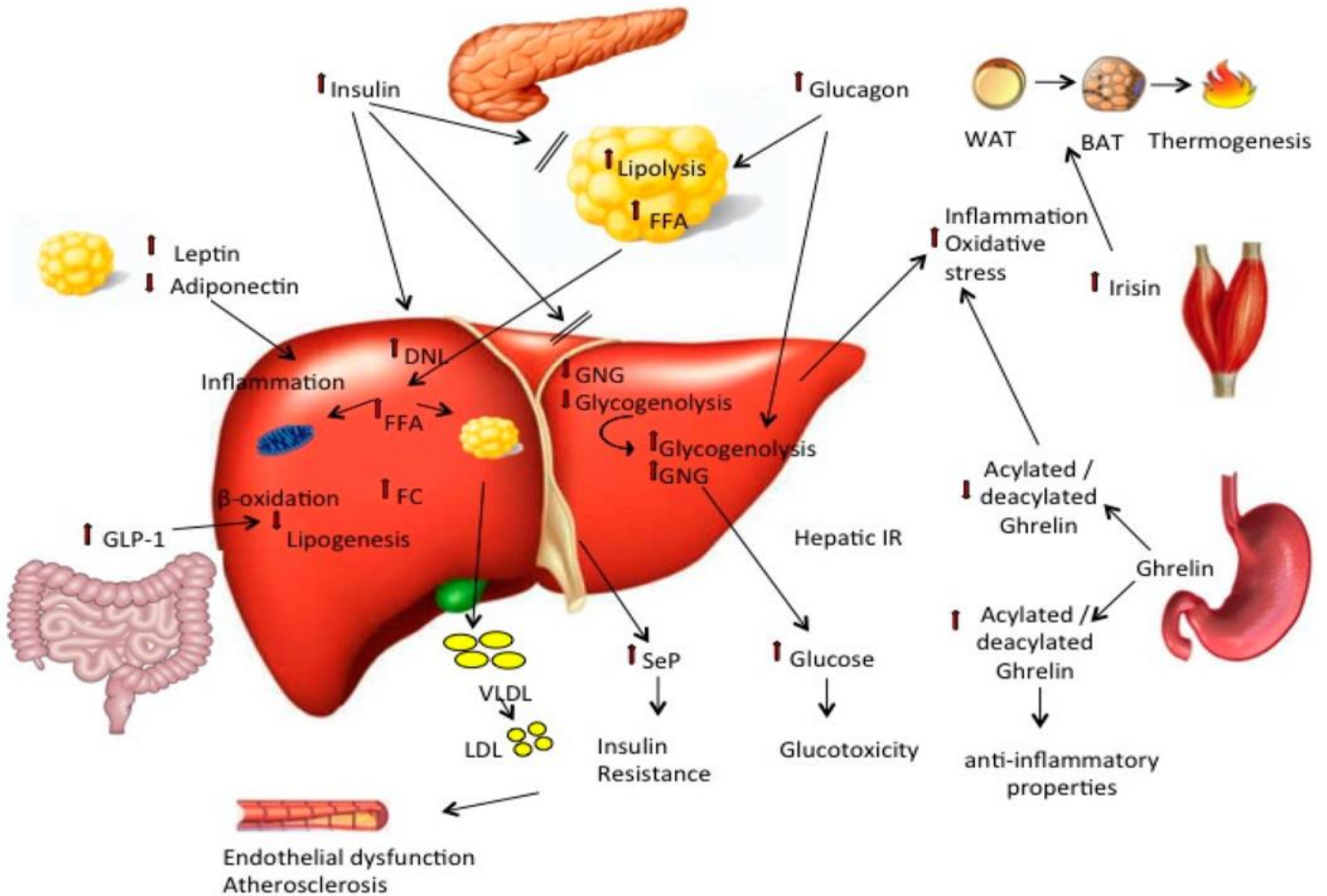


**Figura 3: Variabilidad interindividual de los factores conductores de EHGA.**

El fenotipo de EHGA es muy complejo y está dirigido por la dinámica interacción entre la predisposición genética, los factores ambientales y el síndrome metabólico. En esta imagen se muestran 3 pacientes tipo: el paciente 1 presenta una patología dirigida principalmente por la influencia de los factores ambientales, y menor influencia de la predisposición genética, en el paciente 2 el principal conductor de la enfermedad es el síndrome metabólico, mientras que en el paciente 3 el principal conductor es la predisposición genética, dejando en segundo plano a los otros dos factores. La identificación del principal conductor de la enfermedad podría ayudar a obtener un abordaje terapéutico personalizado. (22)

Link imagen: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508520301712>

**ANEXO 4:**

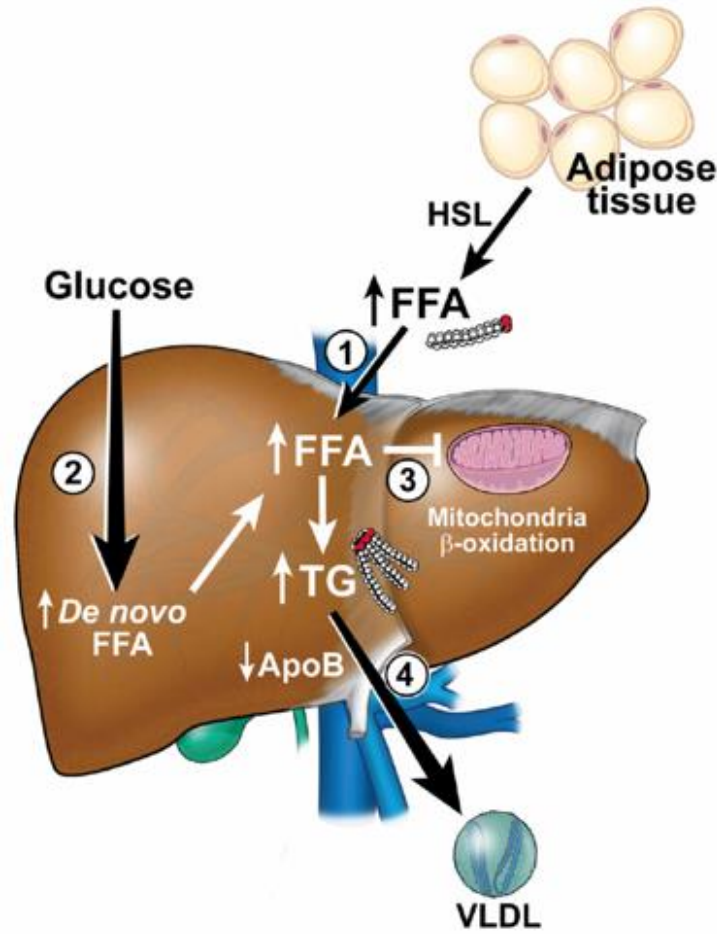


**Figura 4: Esquema de la patogénesis y de la diafonía entre órganos que se produce en EHNA y EHNA.**

La síntesis y el consumo aumentados de lípidos en el hígado excede la oxidación y excreción lipídica, causando la acumulación de lípidos y la lipotoxicidad, respuesta inflamatoria, muerte celular y fibrosis. Además del hígado, los órganos insulino-sensitivos, como el tejido adiposo o muscular, producen adipoquinas y mioquinas, que promueven la inflamación y el estrés oxidativo en el hígado. La microbiota intestinal regula la respuesta inflamatoria y la acumulación hepática de lípidos a través del metabolismo de los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), ácidos biliares, etc. La respuesta inmune innata relacionada con EHNA/EHNA incluye la activación de las células de Kupffer residentes y el reclutamiento de leucocitos al hígado. La inmunidad adaptativa mediada por linfocitos es un factor adicional a la hora de promover la inflamación hepática. (13)

Link imagen: [https://www.mdpi.com/ijms/ijms-17-02082/article\\_deploy/html/images/ijms-17-02082-g001.png](https://www.mdpi.com/ijms/ijms-17-02082/article_deploy/html/images/ijms-17-02082-g001.png)

ANEXO 5:

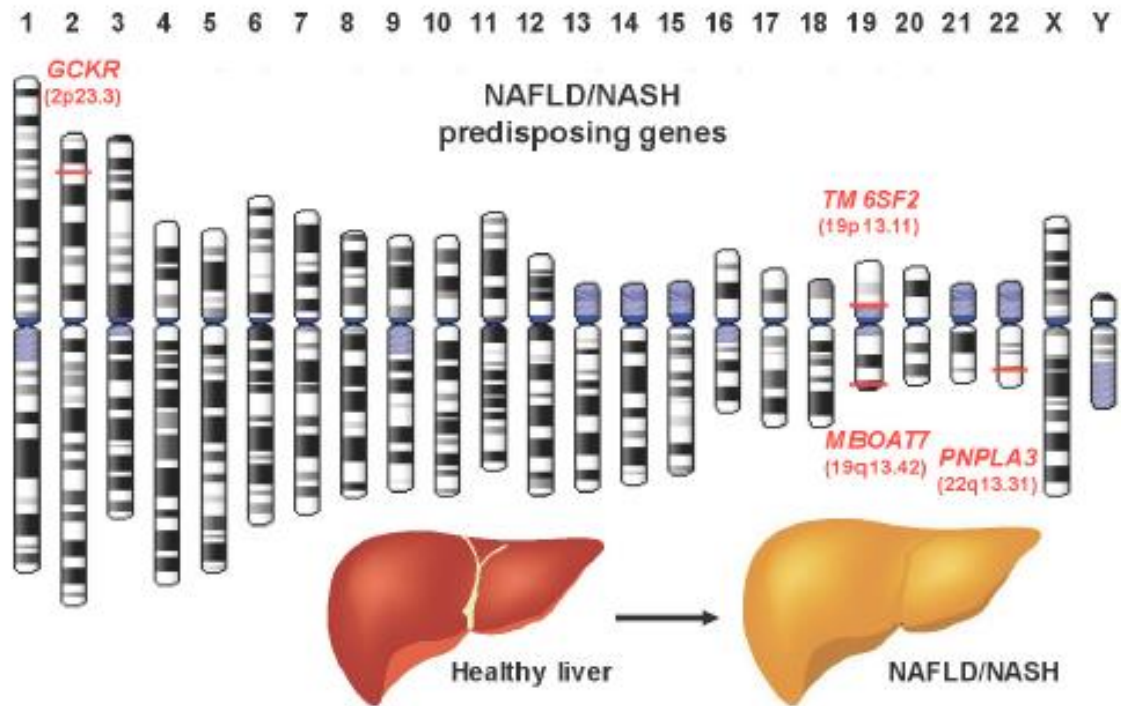


**Figura 5: Relación entre la inflamación del tejido adiposo causada por la obesidad y EHGNA.**

En esta imagen se puede observar como la obesidad provoca cambios en la composición de las células inmunes del tejido adiposo, de esta forma alterando el consumo y almacenaje de la energía. La obesidad desencadena la inflamación del tejido adiposo, y la muerte de los adipocitos, hecho que agrava aún más la obesidad. La inflamación del tejido adiposo resulta en la secreción de factores proinflamatorios, las adipocinas, que aumentan la generación de AGLs y la infiltración de macrófagos M1 en el hígado, además de resistencia a la insulina. En conjunto influyen a la progresión de EHGNA, llevando a la aparición de esteatosis, inflamación y fibrosis hepática, cirrosis, e incluso un elevado riesgo de carcinoma hepatocelular. La RI debida a la cirrosis puede exacerbar el estado inflamatorio del tejido adiposo reduciendo su capacidad de almacenaje energético. (23)

Link imagen: <https://www.researchgate.net/profile/Naim-Alkhouri/publication/26735120/figure/fig1/AS:310037374357504@1450930078120/Potential-Mechanisms-of-Hepatic-Steatosis-in-NAFLD.png>

ANEXO 6:

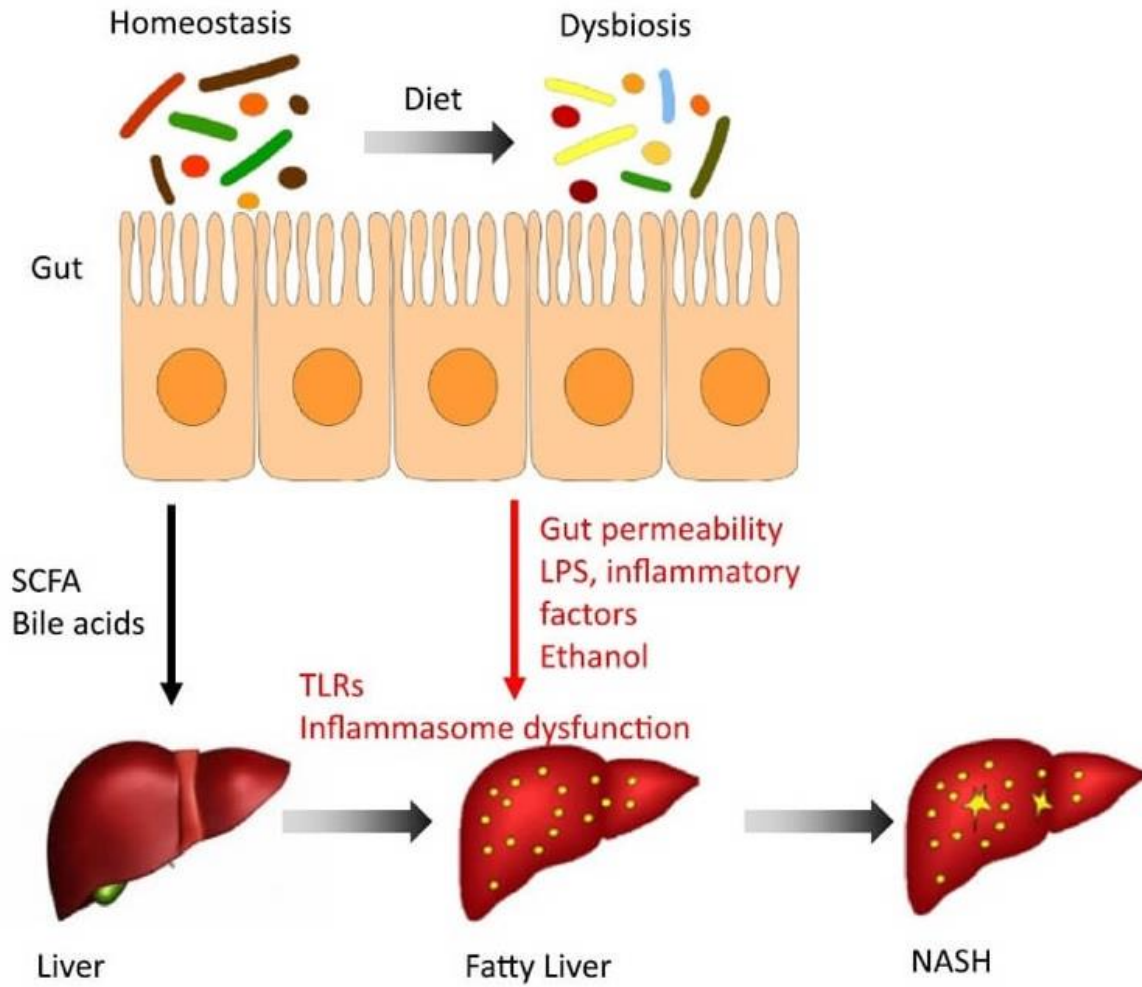


**Figura 6: Alteraciones genéticas en EHNA.**

Las alteraciones/modificaciones genéticas asociadas con EHNA afectan a los genes GCKR, TM6SF2, PNPLA3 y MBOAT7. En esta imagen podemos observar la localización cromosomal de dichos genes. (19)

Link imagen: [https://www.researchgate.net/figure/Gene-alterations-in-NASH-Gene-alterations-modifications-associated-with-the-pathogenesis\\_fig1\\_335040313](https://www.researchgate.net/figure/Gene-alterations-in-NASH-Gene-alterations-modifications-associated-with-the-pathogenesis_fig1_335040313)

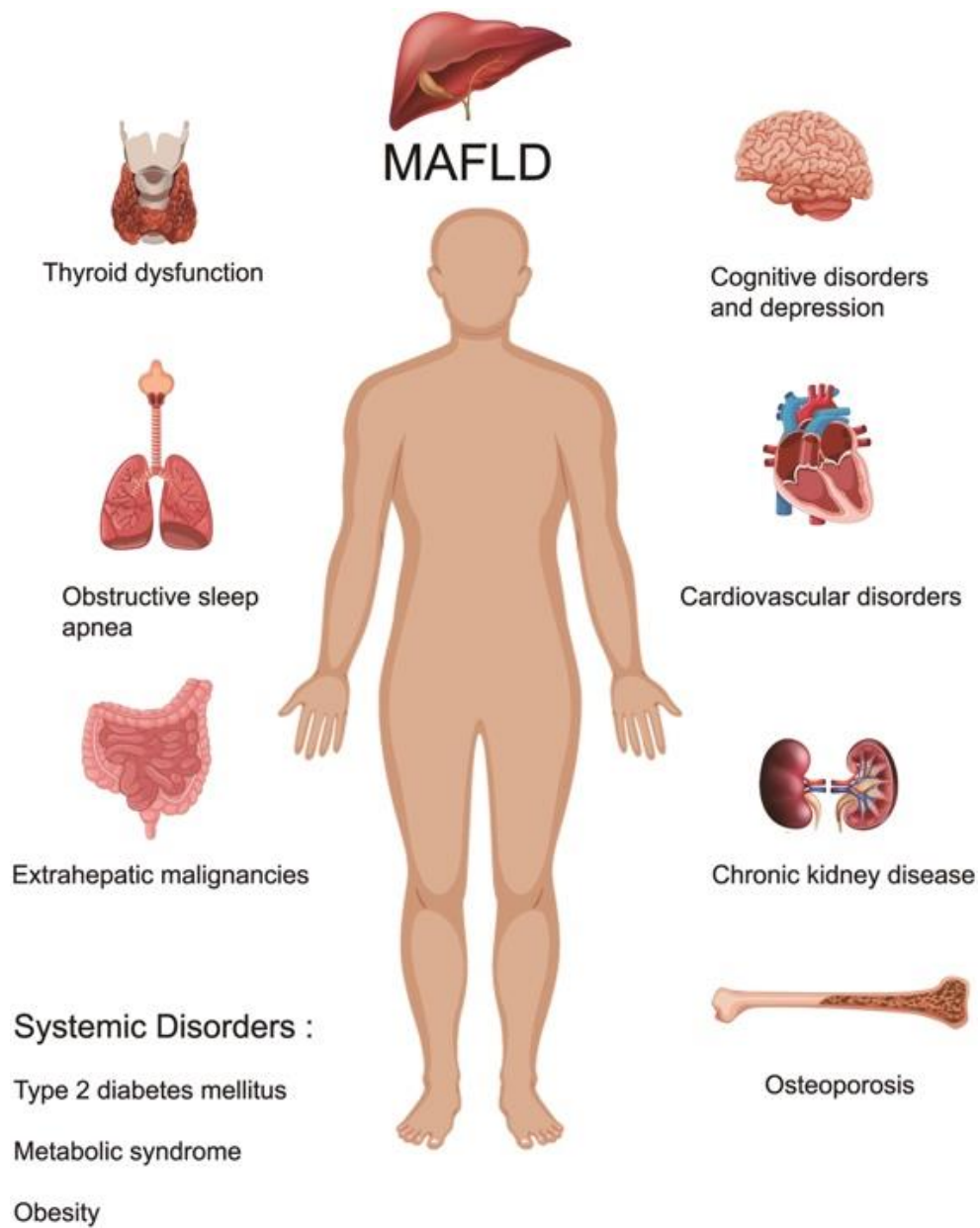
**ANEXO 7:**



**Figura 7: Eje hepático-intestinal en EHGNA/EHNA.** Una dieta insalubre, como aquellas ricas en grasas y azúcares, induce cambios en el microbioma intestinal. Esto provoca alteraciones en metabolitos, como un descenso en AG monoinsaturados y un aumento en lipopolisacáridos, etanol, etc. La barrera intestinal dañada permite una translocación aumentada y más fácil de estas sustancias dañinas para el hígado, acelerando la progresión de EHGNA/EHNA. (13)

Link imagen: [https://images.vital.ly/editor/tr:w-800,c-at\\_max,dpr-2,q-100/hub/19-08/Gut-liver%20axis/GLA%20Essentials%20Fig%203.jpg](https://images.vital.ly/editor/tr:w-800,c-at_max,dpr-2,q-100/hub/19-08/Gut-liver%20axis/GLA%20Essentials%20Fig%203.jpg)

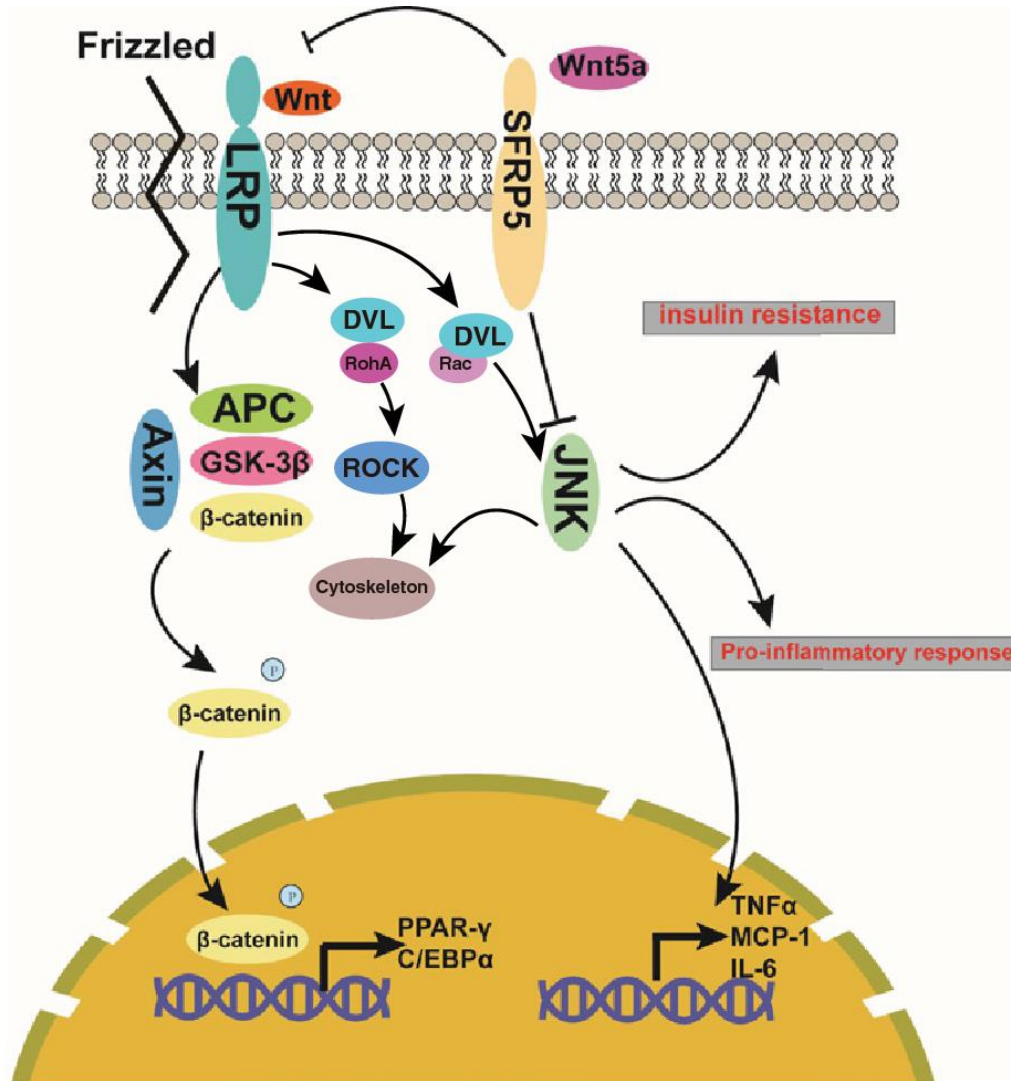
ANEXO 8:



**Figura 8: Principales manifestaciones extrahepáticas de EHGNA.** En esta imagen podemos observar los principales aparatos y sistemas que se pueden ver afectados en pacientes con EHGNA. (11)

Link imagen: <https://www.xiahepublishing.com/2310-8819/JCTH-2021-00178>

ANEXO 9:



**Figura 9: Señalización Wnt5a y la molécula SFRP5 en el tejido adiposo.** SFRP5 es secretada por los adipocitos y secuestra Wnt5a, previniendo la activación de la vía no canónica de Wnt. En estado de obesidad, los adipocitos se hacen más grandes y secretan más Wnt5a y menos SFRP5. Los macrófagos presentes en el tejido adiposo también responden a Wnt5a y producen citoquinas proinflamatorias. Estos hechos resultan en la RI. (78)

Link imagen: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Wnt-antagonist-and-secreted-frizzled-related-5%3A-Liu-Chen/f8ca47c056752726d3c2262440a555500f1ee7cc>

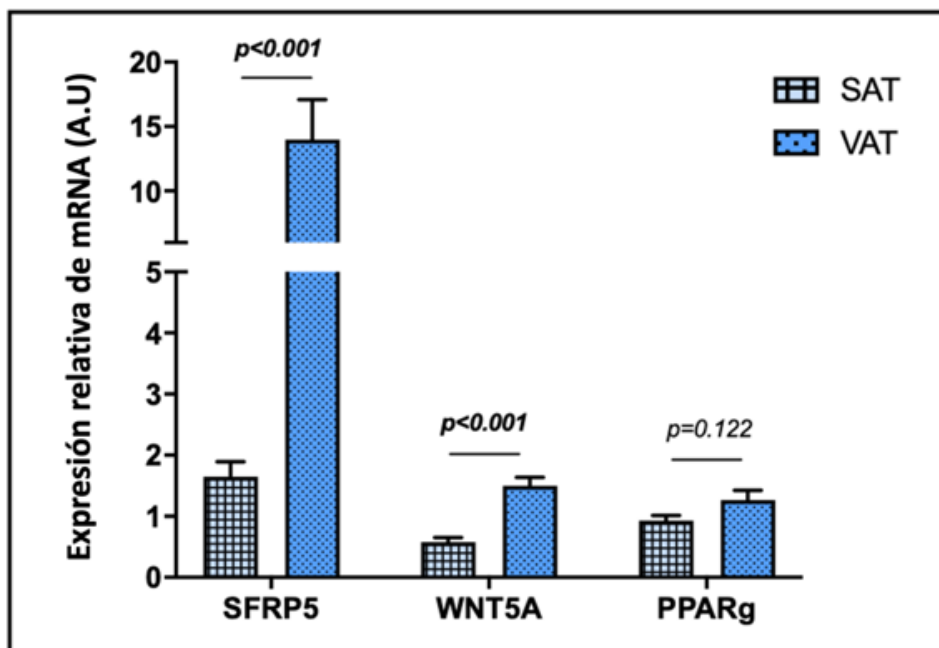
**ANEXO 10:**

**Tabla 1. Variables antropométricas y bioquímicas de las mujeres en la cohorte estudiada.**

Variables	PN (n = 15)	HN (n = 20)	OM (n = 60)	EHNA (n = 19)
			ES (n = 21)	
Peso (kg)	57 (52–62)	119 (108–134) *	115 (111–129) *	110 (104–121) *
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22.47 (21.59–24.19)	43.62 (41.56–48.83) *	44.94 (42.07–46.85) *	44.54 (40.95–47.29) *
PAS (mmHg)	117 (110–125)	120 (100–132)	116 (108–127)	117 (105–132)
PAD (mmHg)	70 (66–75)	63 (58–71)	62 (59–73)	68 (60–78)
HOMA1-IR	1.30 (0.85–2.17)	2.07 (1.22–3.45)	2.44 (1.27–3.05) *	1.90 (1.45–6.16) *
Glucosa (mg/dL)	83.50 (64.75–94.25)	85.50 (77.50–92.75)	93.00 (88.00–106.00) * <sup>§</sup>	99.00 (82.25–109.75) * <sup>§</sup>
Insulina (mUI/L)	7.00 (4.90–9.62)	9.70 (5.59–16.21)	9.80 (6.94–14.10) *	9.54 (5.68–26.02) *
HbA1c (%)	5.10 (4.70–5.40)	5.60 (5.30–5.75) *	5.55 (5.30–5.85) *	5.80 (5.28–6.43) *
TG (mg/dL)	86.00 (57.25–110.25)	106.00 (93.00–136.00) *	117.50 (84.00–165.50) *	130.50 (99.25–187.50) *
Colesterol (mg/dL)	183.25 (163.53–209.50)	170.00 (150.15–214.50)	165.70 (132.75–189.50) *	162.00 (150.50–213.25)
HDL-C (mg/dL)	62.40 (48.45–73.00)	40.20 (31.50–48.50) *	43.50 (33.25–46.75) *	38.00 (34.50–44.00) *
LDL-C (mg/dL)	112.20 (89.90–130.00)	108.80 (95.20–141.80)	103.10 (70.20–124.85)	93.40 (79.30–126.83)
AST (UI/L)	20.00 (16.00–26.00)	19.50 (15.00–36.25)	21.00 (17.00–31.00) *	30.00 (18.00–43.50) *
ALT (UI/L)	17.00 (12.50–25.00)	21.00 (16.00–37.00)	29.50 (22.00–35.00) *	33.50 (18.75–41.00) *
GGT (UI/L)	14.00 (10.00–31.00)	17.00 (13.00–23.00)	21.00 (16.25–32.75)	26.00 (19.75–34.00) * <sup>§</sup>
ALP (UI/L)	65.00 (51.50–88.00)	57.50 (47.75–71.75)	73.50 (62.00–86.00) <sup>§</sup>	61.00 (53.25–74.50) <sup>a</sup>

PN, peso normal; OM, obesidad mórbida; HN, hígado normal; ES, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; HOMA1-IR, método de evaluación del modelo homeostático-resistencia a la insulina; HbA1c, hemoglobina glicosilada; TG, triglicéridos; HDL-C, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-C, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; ALP, fosfatasa alcalina. Los datos se expresan como la mediana (rango intercuartílico). La prueba Mann-Whitney se empleó para encontrar diferencias significativas frente al grupo PN (\*), diferencias significativas frente al grupo HN (<sup>§</sup>), y diferencias significativas frente al grupo ES (<sup>a</sup>). p < 0.05 se consideraba estadísticamente significativo.

## ANEXO 11:



**Figura 1.** Diferencia de la abundancia relativa del mRNA de SFRP5, WNT5A y PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral y subcutáneo de la cohorte entera sin subclasificar. Los datos fueron normalizados por el grupo PN y expresados como error estándar de la media (SEM). SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, miembro de la familia WNT 5a; PPAR $\gamma$ , receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma; A.U unidades arbitrarias.  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

ANEXO 12:

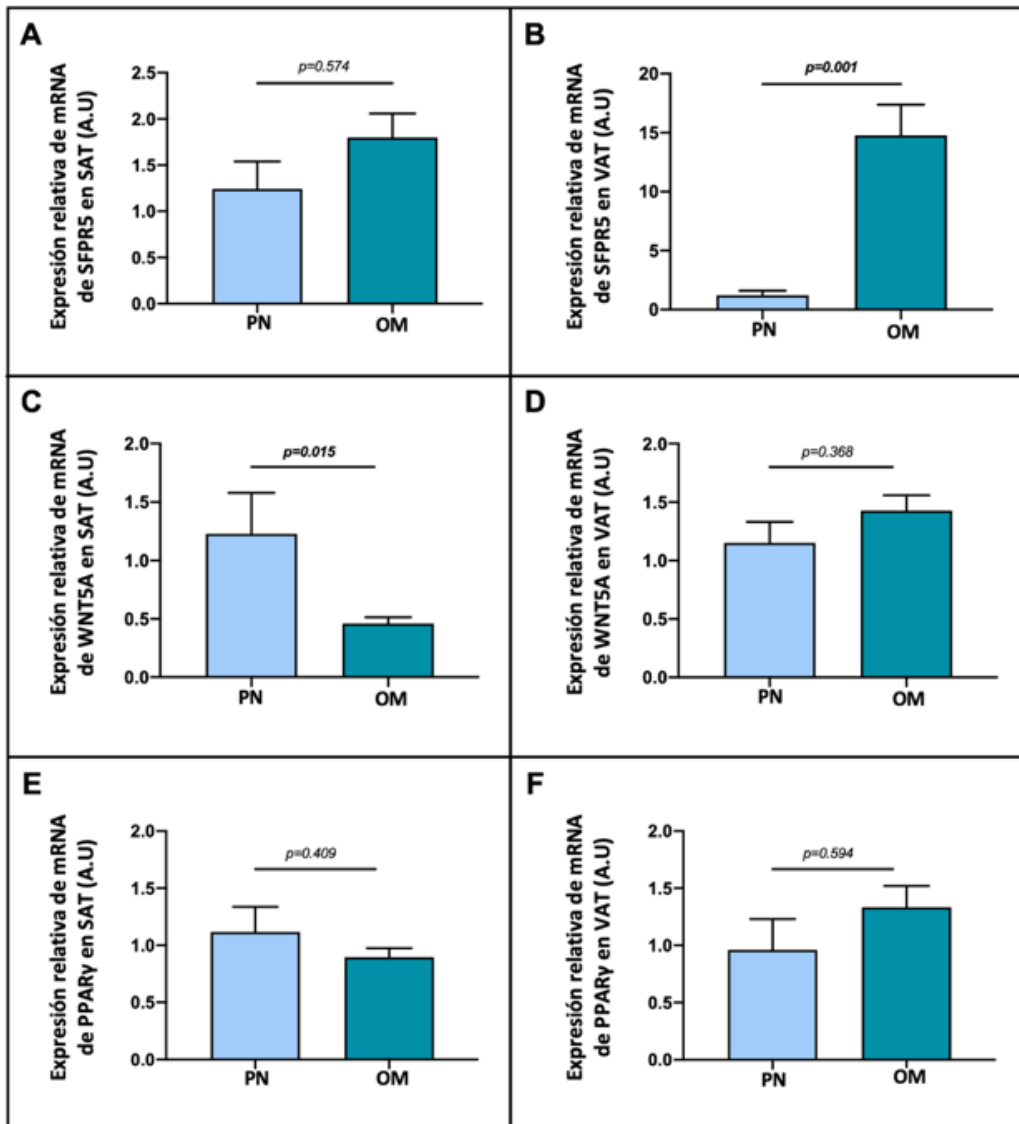


Figura 2. Diferencia de la abundancia relativa del mRNA de (A) SFRP5, (C) WNT5A y (E) PPAR $\gamma$  en tejido adiposo subcutáneo, y (B) SFRP5, (D) WNT5A y (F) PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral de mujeres clasificadas en función de sus IMC en PN y OM. Los datos fueron normalizados por el grupo PN y expresados como error estándar de la media (SEM). SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, miembro de la familia WNT 5a; PPAR $\gamma$ , receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma; PN, peso normal; OM, obesidad mórbida; A.U unidades arbitrarias.  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

ANEXO 13:

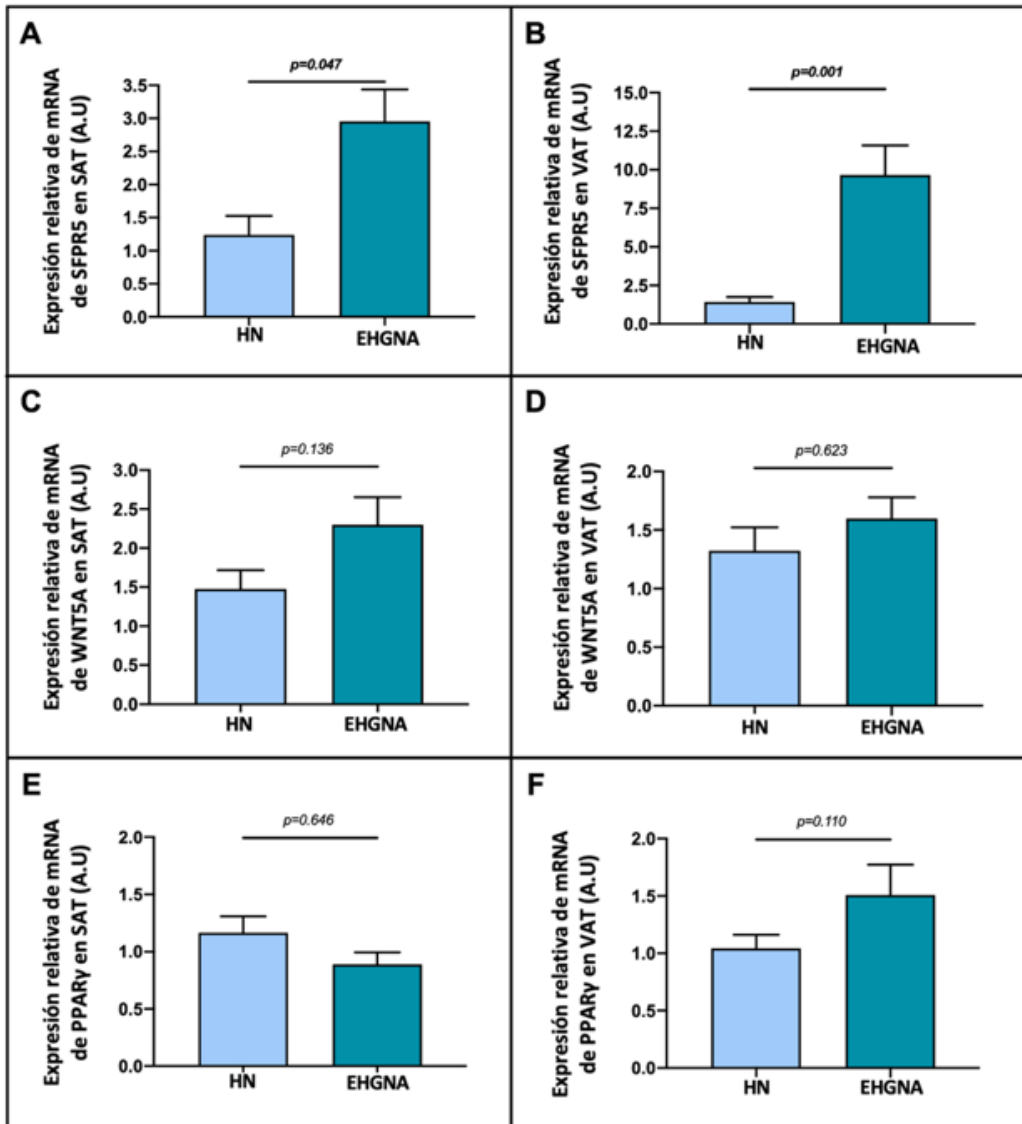


Figura 3. Diferencia de la abundancia relativa del mRNA de (A) SFRP5, (C) WNT5A y (E) PPAR $\gamma$  en tejido adiposo subcutáneo, y (B) SFRP5, (D) WNT5A y (F) PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral de mujeres con OM clasificadas dependiendo de la presencia de EHGNA en HN o EHGNA. Los datos fueron normalizados por el grupo HN y expresados como error estándar de la media (SEM). SAT, tejido adiposo subcutáneo; VAT, tejido adiposo visceral; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, miembro de la familia WNT 5a; PPAR $\gamma$ , receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma; PN, peso normal; OM, obesidad mórbida; A.U unidades arbitrarias.  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

ANEXO 14:

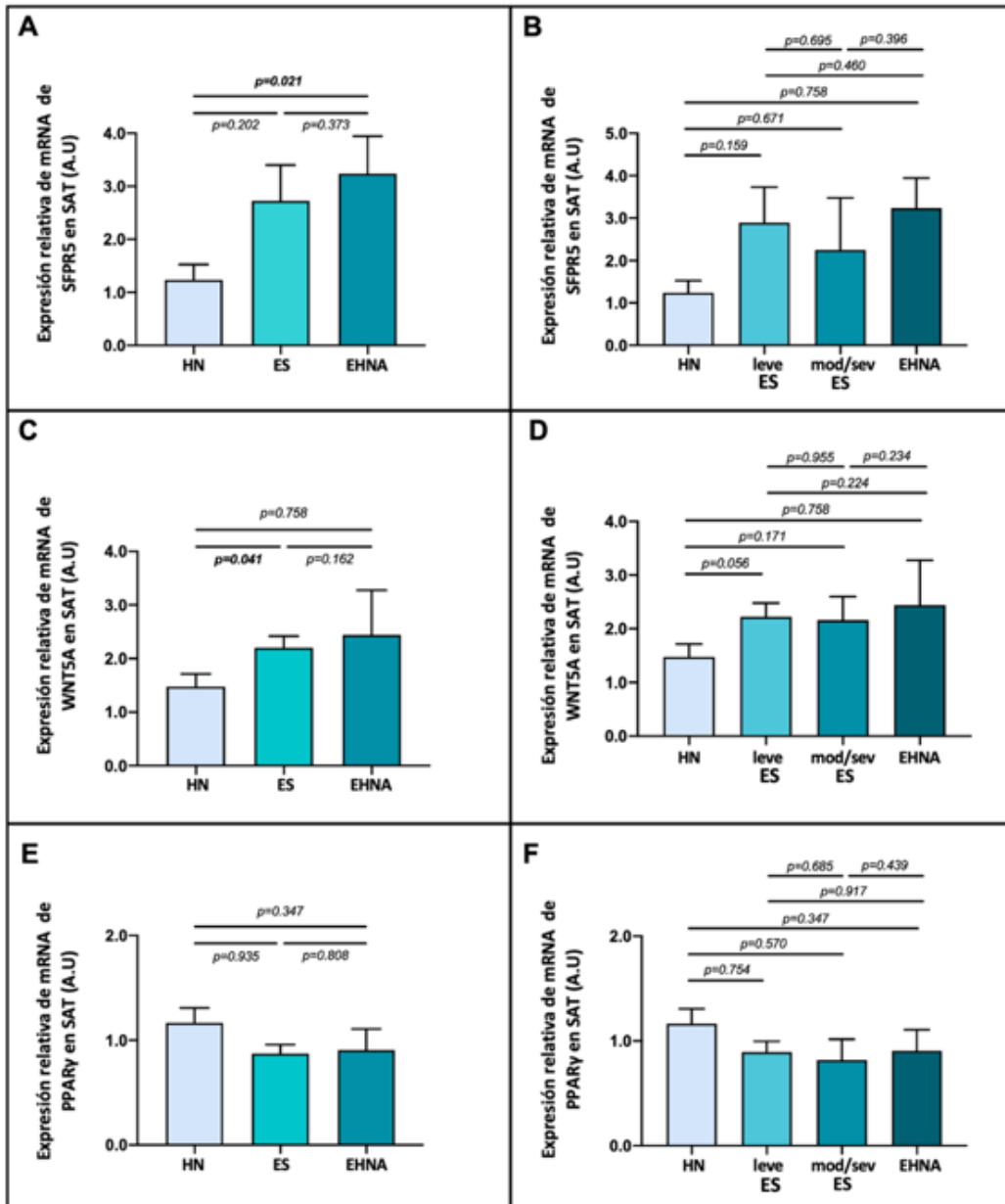


Figura 4. Diferencia de la abundancia relativa del mRNA de (A) SFRP5, (C) WNT5A y (E) PPAR $\gamma$  en tejido adiposo subcutáneo de mujeres con OM clasificadas en función de su histología hepática en HN, ES y EHNA; y también, la diferencia de la abundancia relativa del mRNA de (B) SFRP5, (D) WNT5A y (F) PPAR $\gamma$  clasificado en HN, ES leve, ES mod/sev, y EHNA dependiendo de los grupos histopatológicos. Los datos fueron normalizados por el grupo HN y expresados como error estándar de la media (SEM). SAT, tejido adiposo subcutáneo; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, miembro de la familia WNT 5a; PPAR $\gamma$ , receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma; OM, obesidad mórbida; ES, esteatosis simple; mod/sev ES, esteatosis moderada y severa; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; A.U unidades arbitrarias.  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

ANEXO 15:

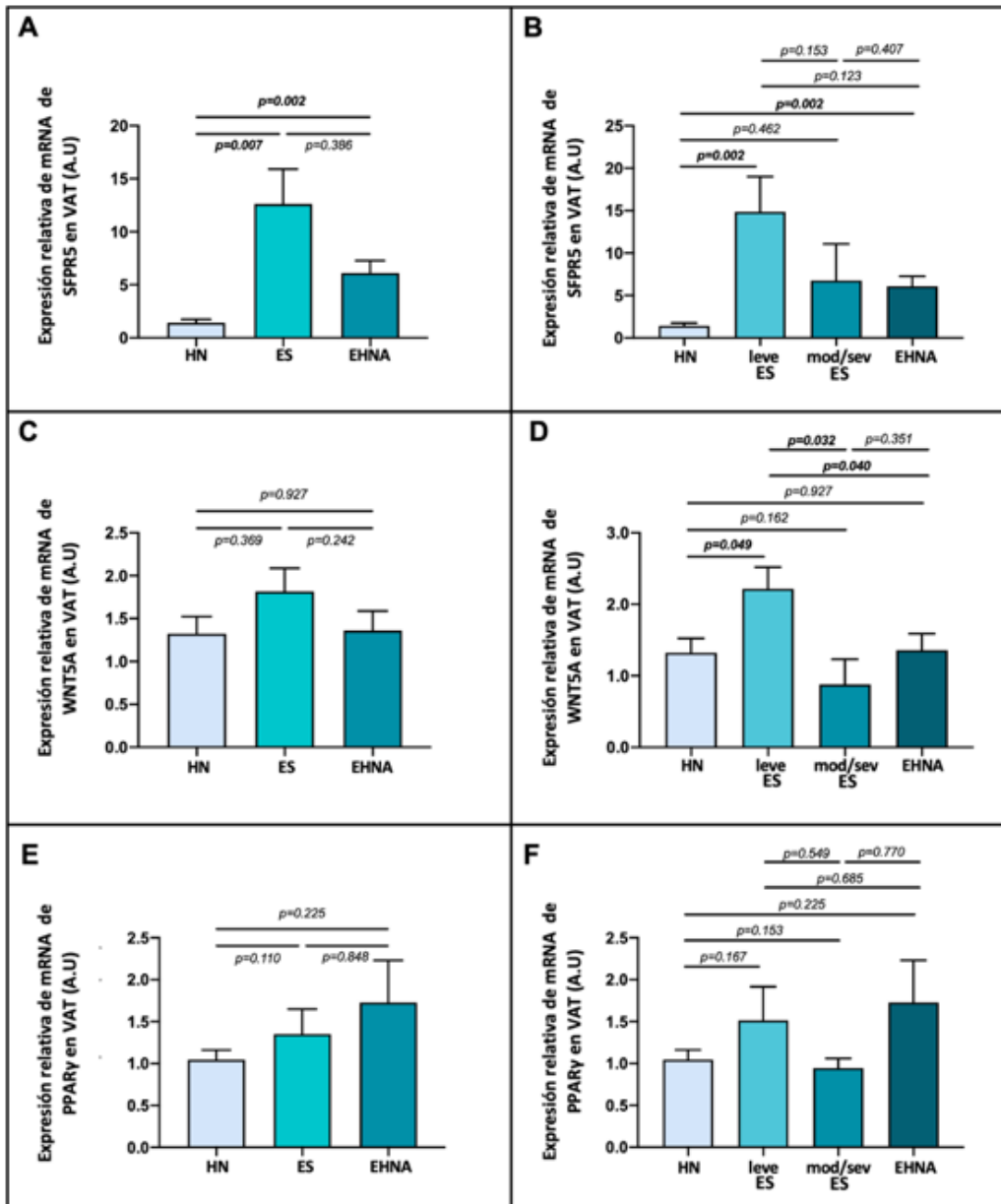


Figura 5. Diferencia de la abundancia relativa del mRNA de (A) SFRP5, (C) WNT5A y (E) PPAR $\gamma$  en tejido adiposo visceral de mujeres con OM clasificadas en función de su histología hepática en HN, ES y EHNA; y también, la diferencia de la abundancia relativa del mRNA de (B) SFRP5, (D) WNT5A y (F) PPAR $\gamma$  clasificado en HN, ES leve, ES mod/sev, y EHNA dependiendo de los grupos histopatológicos. Los datos fueron normalizados por el grupo HN y expresados como error estándar de la media (SEM). VAT, tejido adiposo visceral; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, miembro de la familia WNT 5a; PPAR $\gamma$ , receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma; OM, obesidad mórbida; ES, esteatosis simple; mod/sev ES, esteatosis moderada y severa; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; A.U unidades arbitrarias. p<0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Machado MV, Cortez-Pinto H. NAFLD, MAFLD and obesity: brothers in arms? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023 Feb 5;20(2):67–8.
2. Notarnicola M, Osella AR, Caruso MG, Pesole PL, Lippolis A, Tutino V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Focus on new biomarkers and lifestyle interventions. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
3. Wang H, Li F, Feng J, Wang J, Liu X. The effects of S-nitrosylation-induced PPAR $\gamma$ /SFRP5 pathway inhibition on the conversion of non-alcoholic fatty liver to non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Transl Med*. 2021 Apr;9(8):684–684.
4. Wong VWS, Zelber-Sagi S, Cusi K, Carrieri P, Wright E, Crespo J, et al. Management of NAFLD in primary care settings. Vol. 42, *Liver International*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 2377–89.
5. Younossi Z, Henry L. Non-alcoholic Steatohepatitis: Global Impact and Clinical Consequences Key Points. Available from: <https://doi.org/10.33590/emjhepatol/22-00150>.
6. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver International*. 2006 Sep;26(7):856–63.
7. Ziolkowska S, Binienda A, Jablkowski M, Szemraj J, Czarny P. The interplay between insulin resistance, inflammation, oxidative stress, base excision repair and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
8. Wajsbrot NB, Leite NC, Salles GF, Villela-Nogueira CA. Non-alcoholic fatty liver disease and the impact of genetic, epigenetic and environmental factors in the offspring. Vol. 28, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc; 2022. p. 2890–9.
9. Diaconu CT, Guja C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Its Complex Relation with Type 2 Diabetes Mellitus—From Prevalence to Diagnostic Approach and Treatment Strategies. Vol. 11, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2022.
10. 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. Vol. 15, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 11–20.
11. Yip TCF, Vilar-Gomez E, Petta S, Yilmaz Y, Wong GLH, Adams LA, et al. Geographical similarity and differences in the burden and genetic predisposition of NAFLD. *Hepatology*. John Wiley and Sons Inc; 2022.
12. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. Vol. 70, *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 531–44.
13. Xu X, Poulsen KL, Wu L, Liu S, Miyata T, Song Q, et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH). Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2022.
14. Lazarus J V. Enfermedad del hígado graso no alcohólico: una epidemia global silenciosa. In: Calleja JL, Turnes J, editors. *Enfermedad del hígado graso no*

- alcohólico: un estudio integral. Madrid, España: Asociación Española para el Estudio del Hígado. Fundación Gaspar Casal; 2021. p. 15–43.
15. Kobayashi T, Iwaki M, Nakajima A, Nogami A, Yoneda M. Current Research on the Pathogenesis of NAFLD/NASH and the Gut–Liver Axis: Gut Microbiota, Dysbiosis, and Leaky-Gut Syndrome. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
  16. Mitten EK, Baffy G. Mechanotransduction in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. Vol. 77, *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V.; 2022. p. 1642–56.
  17. Romero-Gómez M. Non-alcoholic steatohepatitis. Vol. 159, *Medicina Clinica*. Ediciones Doyma, S.L.; 2022. p. 388–95.
  18. Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. Vol. 4, *Hepatology Communications*. John Wiley and Sons Inc; 2020. p. 478–92.
  19. Drescher HK, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Current status in testing for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
  20. Guilera Sardá M. Medicina integral : Medicina preventiva y asistencia en atención primaria de salud. [Internet]. Vol. 35, *Medicina Integral*. IDEPSA; 1980 [cited 2023 May 11]. 450–454 p. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-cirrosis-hepatica-compensada-11323>
  21. Zaman CF, Sultana J, Dey P, Dutta J, Mustarin S, Tamanna N, et al. A Multidisciplinary Approach and Current Perspective of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Cureus*. 2022 May;
  22. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May 1;158(7):1999-2014.e1.
  23. Luo Y, Lin H. Inflammation initiates a vicious cycle between obesity and nonalcoholic fatty liver disease. Vol. 9, *Immunity, Inflammation and Disease*. Wiley-Blackwell; 2021. p. 59–73.
  24. Shen K, Singh AD, Esfeh JM, Wakim-Fleming J. Therapies for non-alcoholic fatty liver disease: A 2022 update. *World J Hepatol*. 2022 Sep 27;14(9):1718–29.
  25. Huang Y, Stinson S, Juel HB, Lund M, Holm LA, Fonvig CE, et al. An adult-based genetic risk score for hepatic fat associates with liver and lipid traits in Danish children and adolescents. *J Hepatol*. 2022 Jul;77:S450.
  26. Koutaki D, Michos A, Bacopoulou F, Charmandari E. The Emerging Role of Sfrp5 and Wnt5a in the Pathogenesis of Obesity: Implications for a Healthy Diet and Lifestyle. *Nutrients* [Internet]. 2021;13(7). Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/7/2459>
  27. Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, et al. High prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus and normal plasma aminotransferase levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015 Jun 1;100(6):2231–8.
  28. Kasturiratne A, Weerasinghe S, Dassanayake AS, Rajindrajith S, de Silva AP, Kato N, et al. Influence of non-alcoholic fatty liver disease on the development of diabetes mellitus. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2013;28(1):142–7.

29. Tapper EB, Lok ASF. Use of Liver Imaging and Biopsy in Clinical Practice. *New England Journal of Medicine*. 2017 May;377(8):756–68.
30. Younossi ZM, Pham H, Felix S, Stepanova M, Jeffers T, Younossi E, et al. Identification of High-Risk Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Using Noninvasive Tests From Primary Care and Endocrinology Real-World Practices. *Clin Transl Gastroenterol*. 2021 Apr;12(4):e00340.
31. Ren Y, Zhao H, Yin C, Lan X, Wu L, Du X, et al. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. Vol. 13, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
32. Li Y, Tian M, Yang M, Yang G, Chen J, Wang H, et al. Central Sfrp5 regulates hepatic glucose flux and VLDL-triglyceride secretion. *Metabolism*. 2020 Feb 1;103.
33. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Pérez-Hernández AI, Gurbindo J, Ramírez B, et al. Activation of noncanonical wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99(8).
34. Schulte DM, Müller N, Neumann K, Oberhäuser F, Faust M, Güdelhöfer H, et al. Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sfrp5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects. *PLoS One*. 2012 Feb 23;7(2).
35. Hu W, Li N, Yang M, Luo X, Ran W, Liu D, et al. Circulating Sfrp5 is a signature of obesity-related metabolic disorders and is regulated by glucose and liraglutide in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013 May;98(1):290–8.
36. ZHANG X, DENG F, ZHANG Y, ZHANG X, CHEN J, JIANG Y. Ppar $\gamma$  attenuates hepatic inflammation and oxidative stress of non-alcoholic steatohepatitis via modulating the mir-21-5p/sfrp5 pathway. *Mol Med Rep*. 2021 Nov 1;24(5).
37. Bertran L, Portillo-Carrasquer M, Aguilar C, Porras JA, Riesco D, Martínez S, et al. Deregulation of secreted frizzled-related protein 5 in nonalcoholic fatty liver disease associated with obesity. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 1;22(13).
38. Chen L, Zhao X, Liang G, Sun J, Lin Z, Hu R, et al. Recombinant SFRP5 protein significantly alleviated intrahepatic inflammation of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutr Metab (Lond)*. 2017 Aug 15;14(1).
39. Zhao A, Jiang F, Yang G, Liu H, Li L. Sfrp5 interacts with Slurp1 to regulate the accumulation of triglycerides in hepatocyte steatosis model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Apr 30;512(2):256–62.
40. Azzu V, Vacca M, Virtue S, Allison M, Vidal-Puig A. Adipose Tissue-Liver Cross Talk in the Control of Whole-Body Metabolism: Implications in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1899–912.
41. Chatani N, Kamada Y, Kizu T, Ogura S, Furuta K, Egawa M, et al. Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Liver International*. 2015 May;35(8):2017–26.
42. de Winter TJJ, Nusse R. Running Against the Wnt: How Wnt/ $\beta$ -Catenin Suppresses Adipogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 9;9.
43. Liu L Bin, Chen XD, Zhou XY, Zhu Q. The Wnt antagonist and secreted frizzled-related protein 5: Implications on lipid metabolism, inflammation, and type 2 diabetes mellitus. Vol. 38, *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2018.
44. Bagchi DP, Nishii A, Li Z, DelProposto JB, Corsa CA, Mori H, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates adipose tissue lipogenesis and adipocyte-specific loss is

- rigorously defended by neighboring stromal-vascular cells. *Mol Metab.* 2020 Dec;42:101078.
45. Wang X, Rao H, Liu F, Wei L, Li H, Wu C. Recent Advances in Adipose Tissue Dysfunction and Its Role in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells.* 2021 Nov 25;10(12):3300.
  46. Mori H, Prestwich TC, Reid MA, Longo KA, Gerin I, Cawthorn WP, et al. Secreted frizzled-related protein 5 suppresses adipocyte mitochondrial metabolism through WNT inhibition. *Journal of Clinical Investigation.* 2012 Jul 2;122(7):2405–16.
  47. Bhagwandin C, Ashbeck EL, Whalen M, Bandola-Simon J, Roche PA, Szajman A, et al. The E3 ubiquitin ligase MARCH1 regulates glucose-tolerance and lipid storage in a sex-specific manner. *PLoS One.* 2018 Oct 24;13(10):e0204898.
  48. Rauschert S, Uhl O, Koletzko B, Mori TA, Beilin LJ, Oddy WH, et al. Sex differences in the association of phospholipids with components of the metabolic syndrome in young adults. *Biol Sex Differ.* 2017 Dec 28;8(1):10.
  49. Strack C, Behrens G, Sag S, Mohr M, Zeller J, Lahmann C, et al. Gender differences in cardiometabolic health and disease in a cross-sectional observational obesity study. *Biol Sex Differ.* 2022 Dec 4;13(1):8.
  50. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1313–21.
  51. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging The Histological Lesions. *American Journal of Gastroenterology.* 1999 Sep;94(9):2467–74.
  52. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation.* 2009 Oct 20;120(16):1640–5.
  53. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, et al. Sfrp5 Is an Anti-Inflammatory Adipokine That Modulates Metabolic Dysfunction in Obesity. *Science (1979).* 2010 Jul 23;329(5990):454–7.
  54. Zuriaga MA, Fuster JJ, Farb MG, MacLauchlan S, Bretón-Romero R, Karki S, et al. Activation of non-canonical WNT signaling in human visceral adipose tissue contributes to local and systemic inflammation. *Sci Rep.* 2017 Dec 11;7(1):17326.
  55. Fuster JJ, Zuriaga MA, Ngo DTM, Farb MG, Aprahamian T, Yamaguchi TP, et al. Noncanonical Wnt Signaling Promotes Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysfunction Independent of Adipose Tissue Expansion. *Diabetes.* 2015 Apr 1;64(4):1235–48.
  56. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews.* 2010 Jan;11(1):11–8.
  57. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013 May 7;19(5):557–66.
  58. Koza RA, Nikonova L, Hogan J, Rim JS, Mendoza T, Faulk C, et al. Changes in Gene Expression Foreshadow Diet-Induced Obesity in Genetically Identical Mice. *PLoS Genet.* 2006 May 26;2(5):e81.
  59. Okada Y, Sakaue H, Nagare T, Kasuga M. Diet-induced up-regulation of gene expression in adipocytes without changes in DNA methylation. *Kobe J Med Sci.* 2009 Mar 10;54(5):E241-9.

60. Lagathu C, Christodoulides C, Virtue S, Cawthorn WP, Franzin C, Kimber WA, et al. *Dact1*, a Nutritionally Regulated Preadipocyte Gene, Controls Adipogenesis by Coordinating the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Network. *Diabetes*. 2009 Mar 1;58(3):609–19.
61. Tan X, Wang X, Chu H, Liu H, Yi X, Xiao Y. SFRP5 correlates with obesity and metabolic syndrome and increases after weight loss in children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Sep;81(3):363–9.
62. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013 Oct 1;19(10):1338–44.
63. Torres JL, Usategui-Martín R, Hernández-Cosido L, Bernardo E, Manzanedo-Bueno L, Hernández-García I, et al. PPAR- $\gamma$  Gene Expression in Human Adipose Tissue Is Associated with Weight Loss After Sleeve Gastrectomy. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2022 Feb 8;26(2):286–97.
64. Xu Q, Wang H, Li Y, Wang J, Lai Y, Gao L, et al. Plasma Sfrp5 levels correlate with determinants of the metabolic syndrome in Chinese adults. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017 Sep;33(6):e2896.
65. Osorio-Conles Ó, Vega-Beyhart A, Ibarzabal A, Balibrea JM, Graupera I, Rimola J, et al. A Distinctive NAFLD Signature in Adipose Tissue from Women with Severe Obesity. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 29;22(19):10541.
66. Wang R, Hong J, Liu R, Chen M, Xu M, Gu W, et al. SFRP5 acts as a mature adipocyte marker but not as a regulator in adipogenesis. *J Mol Endocrinol*. 2014 Dec;53(3):405–15.
67. Choudhary NS, Duseja A, Kalra N, Das A, Dhiman RK, Chawla YK. Correlation of adipose tissue with liver histology in Asian Indian patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*. 2012;11(4):478–86.
68. Chen N, Wang J. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Obesity. *Front Physiol*. 2018 Jul 17;9.
69. Das B, Das M, Kalita A, Baro MR. The role of Wnt pathway in obesity induced inflammation and diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord*. 2021 Dec 3;20(2):1871–82.
70. Tang Q, Chen C, Zhang Y, Dai M, Jiang Y, Wang H, et al. Wnt5a regulates the cell proliferation and adipogenesis via MAPK-independent pathway in early stage of obesity. *Cell Biol Int*. 2018 Jan;42(1):63–74.
71. Garg A, Misra A. Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Adipose Tissue Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul 1;87(7):3019–22.
72. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Aug 7;5(8):442–7.
73. Gustafson B, Smith U. Activation of Canonical Wingless-type MMTV Integration Site Family (Wnt) Signaling in Mature Adipocytes Increases  $\beta$ -Catenin Levels and Leads to Cell Dedifferentiation and Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Apr;285(18):14031–41.
74. Ye D wei, Rong X lu, Xu A min, Guo J. Liver-adipose tissue crosstalk: A key player in the pathogenesis of glucolipid metabolic disease. *Chin J Integr Med*. 2017 Jun 10;23(6):410–4.

75. Prats-Puig A, Soriano-Rodríguez P, Carreras-Badosa G, Riera-Pérez E, Ros-Miquel M, Gomila-Borja A, et al. Balanced duo of anti-inflammatory SFRP5 and proinflammatory WNT5A in children. *Pediatr Res*. 2014 Jun 6;75(6):793–7.
76. Sharma AM, Staels B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Feb 1;92(2):386–95.
77. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009 Jan;20(1):16–24.
78. Meneses AM, Wielockx B. PHD2: from hypoxia regulation to disease progression. *Hypoxia (Auckl)*. 2016;4:53–67.