

*Alberto Fuertes Puerta*

*José Soriano Guerrero*

PRONEUROTENSINA Y ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO  
ALCOHÓLICO

TRABAJO DE FIN DE GRADO

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

Grado en Medicina



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2023



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: GRAU DE MEDICINA

NOM DE L'ALUMNE: JOSÉ SORIANO GUERRERO

TÍTOL DEL TREBALL: PRONEUROSENSINA Y ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRAU NO ALCOHÓLICO

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
<p><u>Comentaris del tutor si s'escau</u> És un alumne amb molt interès i amb molta dedicació</p>	
MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)	
	10

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\*\*:

*Tane Aue*

Tanepona, a 17 de maig de 20 23



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: *ALBERTO FUERTES PUERTA*

TÍTOL DEL TREBALL: *PRO-NEUROTENSINA Y ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO-ALCOHÓLICO*

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	<i>10</i>
Ha mostrat iniciativa durant tot el procés d'elaboració del Treball	<i>10</i>
El procés d'elaboració del Treball ha estat continuat	<i>10</i>
Ha mostrat habilitat de cerca i gestió de la informació	<i>10</i>
Ha mostrat capacitat d'organització i planificació	<i>10</i>
Ha seguit la normativa pròpia del Centre en quan a la presentació escrita del treball	<i>10</i>
El treball és ordenat i redactat amb cura, expressant-se correctament amb la llengua escollida	<i>10</i>
Els resultats del treball són originals	<i>10</i>
El treball presentat supera les expectatives del tutor	<i>10</i>
<u>Comentaris del tutor si s'escau</u> <i>Es un alumne amb molt d'interès: molt treballador</i>	
<b>MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)</b>	<i>10</i>

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\*\*:

*M. Tere Arce*

*Tarazona*, a *17* de *maig* de 20 *23*

\*\*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**

Nos gustaría dedicar un espacio para dar las gracias a aquellas personas que han dedicado su tiempo y esfuerzo a ayudarnos en la realización de este Trabajo de fin de grado.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Maria Teresa Auguet Quintillà su dedicación, paciencia y diligencia. Ha sido nuestro modelo médico durante la carrera, y nuestro apoyo y guía durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Beatriz Villar Navas y al resto del equipo de investigación del Hospital Universitario Joan XXIII, por su inestimable ayuda tanto por hacernos accesible la información necesaria para elaborar este trabajo como por facilitarnos la comprensión de los resultados estadísticos.

No podemos olvidar a Carmen Aguilar Crespillo, miembro del equipo de investigación que ha auspiciado este trabajo, quien en todo momento ha estado pendiente de nosotros y de nuestro progreso, además de facilitarnos el acceso a datos y materiales cuando ha sido necesario.

Por último, agradecer a todas aquellas personas de nuestro alrededor que de manera directa o indirecta nos han apoyado.

Muchas gracias.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	1
1.2. Historia natural .....	1
1.3. Epidemiología.....	2
1.3.1. Prevalencia global .....	2
1.3.2. La EHGNA en nuestro medio.....	3
1.3.3. Morbimortalidad.....	3
1.3.4. EHGNA y DM2 .....	4
1.4. Patogenia .....	4
1.4.1. Acumulación grasa y obesidad.....	4
1.4.2. Inflamación .....	6
1.4.3. Estrés oxidativo y RI .....	7
1.4.4. La disfunción mitocondrial.....	7
1.4.5. Factores genéticos .....	8
1.4.6. Microbiota intestinal.....	9
1.5. Diagnóstico.....	9
1.5.1 Pruebas de screening.....	9
1.5.1.1. FIB-4 .....	9
1.5.1.2. NFS .....	10
1.5.1.3. Elastografía transitoria (Fibroscan®).....	10
1.5.2. Pruebas confirmatorias.....	10
1.5.2.1. Biopsia hepática .....	10
1.5.2.2. Pruebas de imagen .....	11
1.6. Tratamiento .....	12
1.6.1. Intervenciones no farmacológicas .....	12
1.6.2. Suplementos vitamínicos.....	13
1.6.3. Intervenciones farmacológicas .....	13
1.6.4. Tratamientos quirúrgicos para la obesidad .....	14
1.6.5. Nuevos tratamientos .....	14
1.6.6. Abordaje terapéutico del paciente de EHGNA .....	14
1.7. Proneurotensina .....	15
1.8. Proneurotensina y EHGNA.....	15
2. Hipótesis.....	15

3. Objetivos .....	16
4. Material y métodos.....	16
4.1 Participantes .....	16
4.2 Tamaño de la muestra .....	17
4.3 Patología hepática.....	17
4.4 Análisis bioquímicos.....	17
4.5 Expresión génica en el hígado.....	18
4.6 Análisis estadístico .....	18
5. Resultados.....	18
5.1 Características basales de los sujetos .....	18
5.2 Niveles circulantes de Pro-neurotensina en la cohorte estudiada .....	19
5.3 Expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo de los lípidos hepáticos.....	21
5.4 Correlaciones de los niveles de pro-NT con parámetros bioquímicos y clínicos y con la expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo de los lípidos en el hígado ....	22
6. Discusión .....	23
7. Conclusiones .....	25
8. Bibliografía .....	25

ANEXO

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Criterios empleados en el diagnóstico histológico de los distintos estadios de EHGNA en los índices NAS y SAF .....	11
<b>Tabla 2:</b> Características de las principales técnicas de imagen en el diagnóstico y estadificación de la EHGNA.....	12
<b>Tabla 3:</b> Variables de estudio antropométricas y bioquímicas clasificadas según el IMC y la clasificación histopatológica hepática .....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Progresión de la fibrosis en la EHNA.....	2
<b>Figura 2:</b> Prevalencia global de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) en 2018 .....	2
<b>Figura 3:</b> Lesiones histológicas en la EHGNA .....	11
<b>Figura 4:</b> Efecto dosis-respuesta de la dieta y pérdida de peso en las diferentes etapas de la EHGNA .....	12
<b>Figura 5:</b> (A) Niveles séricos de pro-NT en mujeres con Normopeso (NP) y mujeres con OM. (B) Niveles séricos de pro-NT en mujeres diabéticas con OM y mujeres no diabéticas con OM. (C) Niveles séricos de pro-NT en mujeres con OM e Hígado normal frente a EHGNA. (D) Niveles séricos de pro-NT en mujeres con OM con HN frente a SS frente a EHNA .....	20
<b>Figura 6:</b> Diferencia de la expresión en hígado de ARNm de SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR $\alpha$ , PPAR $\delta$ y PPAR $\gamma$ entre los grupos HN frente a EHGNA y entre los grupos HN, SS y EHNA.....	22
<b>Figura 7:</b> Correlación entre los niveles plasmáticos de pro-NT y LDLc. Pro-NT, pro-neurotensina.....	22

## Resumen

La enfermedad de Hígado Graso No-Alcohólico (EHGNA) es una patología con prevalencia global del 25%, resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales que producen acúmulo de grasa e inflamación hepática. Estudios recientes sugieren una relación entre la pro-neurotensina (pro-NT), un péptido intestinal secretado en respuesta a la ingesta de lípidos, y la EHGNA, pero los resultados son contradictorios y arrojan numerosos interrogantes en torno a su rol en la patogenia de la enfermedad. El presente estudio tiene por objeto analizar los niveles de pro-NT en una cohorte de mujeres con Obesidad Mórbida (OM) para investigar el rol de esta molécula en la EHGNA y su posible relación con el metabolismo lipídico. Se determinaron los niveles de pro-NT en 56 mujeres con OM y en 18 con normopeso (NP). Las pacientes con OM se clasificaron en función de si presentaban hígado normal (HN, n=20) y EHGNA (N=36). El grupo de EHGNA constó de 17 sujetos con esteatosis simple (ES) y 19 con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Se cuantificó la pro-NT plasmática mediante ELISA de quimioluminiscencia y se evaluaron los niveles hepáticos de mRNA de una serie de genes relacionados con el metabolismo lipídico mediante PCR cuantitativa. Los niveles de pro-NT demostraron ser significativamente mayores en OM con EHGNA que en OM sin EHGNA. Asimismo, los niveles de pro-NT fueron más elevados en pacientes con EHNA que en HN. La expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo lipídico se encontró alterada en EHGNA, en línea con la literatura científica. Además, aunque los niveles de pro-NT mostraron correlación con el colesterol LDL, no se encontró asociación con la expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo lipídico. Estos hallazgos sugieren que la pro-NT podría guardar relación con la progresión de la EHGNA.

## Resum

La Malaltia de Fetge Gras No-Alcohòlic (MFGNA) és una patologia amb prevalença global del 25%, resultat d'una combinació de factors genètics i ambientals que produeixen acúmul de gras i inflamació hepàtica. Estudis recents suggereixen una relació entre la pro-neurotensina (pro-NT), un pèptid intestinal secretat en resposta a la ingesta de lípids, i la MFGNA, però els resultats són contradictoris i susciten nombrosos interrogants sobre el seu rol en la patogènia de la malaltia. Aquest estudi pretén analitzar els nivells de pro-NT en dones amb Obesitat Mòrbida (OM) per investigar el rol d'aquesta molècula a la MFGNA i la seva possible relació amb el metabolisme lipídic. Es van determinar els nivells de pro-NT en 56 dones amb OM i en 18 amb normopès (NP). Les pacients amb OM es van classificar en funció de si presentaven fetge normal (FN, n=20) i MFGNA (N=36). El grup de MFGNA va constar de 17 subjectes amb esteatosi simple (ES) i 19 amb esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA). Es va quantificar la pro-NT plasmàtica mitjançant ELISA de quimioluminescència i es van avaluar els nivells hepàtics de mRNA d'una sèrie de gens relacionats amb el metabolisme lipídic amb PCR quantitativa. Els nivells de pro-NT van demostrar ser significativament més elevats en OM amb MFGNA que en OM sense MFGNA. Així mateix, els nivells de pro-NT van resultar més elevats en pacients d'EHNA que a FN. L'expressió hepàtica dels principals gens relacionats amb el metabolisme lipídic es va trobar alterada a MFGNA, en línia amb la literatura científica. A més, encara que els nivells de pro-NT van mostrar correlació amb els nivells de colesterol LDL, no es va trobar associació amb l'expressió hepàtica dels principals gens relacionats amb el metabolisme lipídic. Aquestes troballes suggereixen que la pro-NT podria tenir relació amb la progressió de la MFGNA.

## Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a condition with a worldwide prevalence of 25% resulting from a combination of genetic and environmental factors causing fat accumulation and inflammation in the liver. Recent studies point to a link between pro-neurotensin (pro-NT), a gut-derived peptide stimulated by fat ingestion, and NAFLD, but published data are conflicting and there are many questions yet to be answered as to its role in the pathogenesis of the disease. This study sets out to analyse pro-NT levels in women with Morbid Obesity (MO) to look into the role of this molecule in NAFLD and its possible relationship with lipid metabolism. Plasma levels of pro-NT were determined in 56 female subjects with MO and 18 with normal weight (NW). MO patients were then classified based on liver histology into normal liver (NL, n=20) and NAFLD (n=36) groups. NAFLD group had 17 subjects with simple steatosis (SS) and 19 with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The chemiluminescence sandwich immunoassay was used to quantify pro-NT in plasma, and RT-qPCR to evaluate the hepatic mRNA levels of a number of lipid metabolism-related genes. Pro-NT levels proved to be significantly higher in MO with NAFLD than in MO without NAFLD. Similarly, pro-NT levels were higher in NASH patients than in NL. The hepatic expression of the main lipid metabolism-related genes was found to be altered in NAFLD, as previously reported. Furthermore, although pro-NT levels correlated with LDL, there was no association with the liver expression of the main lipid metabolism-related genes. These findings suggest that pro-NT could be related to NAFLD progression.

## **1. Introducción**

### **1.1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico**

La Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) es una entidad caracterizada por la presencia de histopatología hepática propia de pacientes consumidores habituales de grandes cantidades de alcohol en pacientes no consumidores [1].

Esta entidad aparece en el contexto de situaciones clínicas de disfunción metabólica, entre las que destacan la obesidad, la diabetes, el síndrome metabólico y la dislipemia [1].

La variedad de factores implicados en la enfermedad condiciona además diferentes subtipos de pacientes en función de aspectos genéticos, metagenómicos, metabolómicos e inflamatorios [1].

Histopatológicamente, en la EHGNA se distingue entre el hígado graso no alcohólico (HGNA) o esteatosis hepática simple (ES) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). El HGNA se define como la presencia de ES en el hígado, esto es, infiltración de >5% del tejido hepático por acúmulos de tejido lipídico en los que no existe evidencia de daño hepatocelular de tipo “degeneración balonzante”, mientras que en la EHNA la esteatosis hepática se acompaña de inflamación y daño tisular (degeneración balonzante), con o sin fibrosis [1]. En la EHNA se produce, por tanto, un proceso inflamatorio que acompaña la infiltración grasa y condiciona la aparición de degeneración balonzante en los hepatocitos, con células agrandadas y vacuoladas que con frecuencia contienen cuerpos de Mallory-Denk (inclusiones citoplasmáticas filamentosas eosinofílicas que a menudo se encuentran cerca del núcleo celular) [1].

Desde el punto de vista de las manifestaciones clínicas, la EHGNA es paucisintomática y entre sus síntomas destacan, principalmente, la astenia y el prurito. En menor medida, puede aparecer somnolencia diurna o dificultad para dormir, dolor abdominal, inactividad e incluso alteraciones del estado de ánimo. Por lo tanto, esta enfermedad produce un impacto en la calidad de vida del paciente que dependerá del estadio de la histología hepática [1].

### **1.2. Historia natural**

La EHGNA es una enfermedad dinámica, cuya historia natural es variable y se caracteriza por su capacidad de progresar y remitir dependiendo del estilo de vida del paciente, así como de factores ambientales.

En el contexto multifactorial adecuado, un hígado sano desarrollará ES, que puede progresar a EHNA. Estos estadios pueden ser reversibles, sobre todo la ES. Ambos son indistinguibles si no se realiza una biopsia hepática. En caso de progresar la enfermedad, el paciente con EHGNA puede pasar desde cualquiera de estos estadios a desarrollar una fibrosis progresiva, distinguiéndose cinco grados (F0-F4) que comprenden la ausencia de fibrosis (F0), el desarrollo de fibrosis en áreas hepáticas perisinusoidal o centrolobulillar (F1), la suma de fibrosis periportal a la fibrosis centrolobulillar (F2), que podrá progresar hacia la aparición de bandas de colágeno más evidentes y fibrosis “en puentes” (F3) y, finalmente, cirrosis (F4) [2], que precede a la cirrosis hepática (CD), siendo esta última una situación irreversible de afectación generalizada de la función hepática que puede incluso degenerar en hepatocarcinoma (HCC) [1].

[ver ANEXO]

**Figura 1:** Progresión de la fibrosis en la EHNA (adaptado de [3])

En la figura 1 se muestra la historia natural de la EHGNA junto con los resultados de un estudio sobre el tiempo medio de desarrollo de enfermedad hepática grave en pacientes con hígado graso. La media de seguimiento de los pacientes fue de 20 años (en un rango de 0-40 años), observándose que el tiempo medio hasta que los pacientes desarrollaban CD era de 33,4 años desde F0, de 34,1 años desde F1, de 22,7 años desde F2, 11,8 años desde F3 y de 5,7 años desde F4, todo ello independientemente de si partían de una ES o una EHNA, lo que sugiere que la presencia y grado de fibrosis es mejor predictor de enfermedad hepática grave que la presencia de ES o EHNA [4].

Como venimos señalando, diferentes estudios muestran que la historia natural de la enfermedad no es lineal y que en su evolución se producen también regresiones desde distintos estadios histológicos así como periodos de estabilidad [3]. Así, un estudio sobre 36 pacientes de EHGNA mostró que en aquellos con EHNA (10 del total), un 50% experimentó regresión histológica de su enfermedad durante el seguimiento. Asimismo, la fibrosis revirtió en un 25%, se mantuvo estable en el 33%, y en aquellos en que progresó se observó además que la prevalencia de diabetes era significativamente mayor que en el resto [5]. Otro estudio reveló que, tras 3 años, un 48% de los pacientes de EHNA con fibrosis incluidos en el estudio se mantenían estables y un 25% mostraban regresión [6]. Por último, un metanálisis de 11 estudios de cohortes concluyó de manera similar que un 22% de pacientes de EHGNA con fibrosis mostraban regresión de la misma y un 42% estabilidad [7].

En cuanto a las complicaciones asociadas a fases avanzadas de fibrosis (F3-F4), estas son principalmente hepáticas, metabólicas, cardiovasculares y neoplásicas, destacando la ascitis, la hemorragia por hipertensión portal y la encefalopatía hepática (debido a la progresión hacia la cirrosis descompensada), así como el hepatocarcinoma [1].

### 1.3. Epidemiología

La actual situación socioeconómica ha favorecido unas condiciones ambientales (i.e. sedentarismo, dietas hipercalóricas motivadas por la desigualdad social) propicias para la aparición de las principales enfermedades crónicas que hoy aquejan a la población mundial, entre las que destacan por su prevalencia la obesidad y la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2). Estas enfermedades son con frecuencia el principal factor etiológico en el desarrollo de la EHGNA. Esta última entidad se asocia con un aumento importante de la morbilidad y la mortalidad (tanto de causa hepática como no hepática), así como con el deterioro de la calidad de vida relacionada con la salud [3].

[ver ANEXO]

**Figura 2:** Prevalencia global de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) en 2018 (En: [8])

#### 1.3.1. Prevalencia global

Actualmente, del 25% al 30% de la población adulta mundial padece EHGNA [9]. La figura 2 presenta datos de prevalencia en torno al 30% en Asia, Suramérica y Oriente Medio, seguidos de EEUU y Europa con cifras en torno al 24% y África en último lugar con aproximadamente un 14%. En niños y adolescentes jóvenes la prevalencia global de la enfermedad es del 8 y el 10% respectivamente [9]. Además, es de esperar que la prevalencia de la enfermedad hepática relacionada con EHNA aumente en las próximas décadas si tenemos en cuenta la epidemia de obesidad infantil en que estamos inmersos y la influencia del índice de masa corporal (IMC) infantil en el riesgo de desarrollar cirrosis

en la edad adulta (hasta un 16% más riesgo por desviación estándar en niños de 7-13 años), máxime cuando hasta un cuarto de la población infantil con EHGNA ya presenta EHNA al diagnóstico [3].

Las tasas de prevalencia en sexo masculino por edad son del 16,1% en hombres de 30 a 40 años; del 22,3% de los 41 a 50 años; y del 27,6% en mayores de 60 años. En sexo femenino, la prevalencia de EHGNA fue del 12,5% en mujeres de 30 a 40 años; del 16,1% de los 41 a 50 años; y del 21,6% de los 51 a 60 años [10].

Se ha observado que la prevalencia de EHGNA aumenta con la edad y alcanza su pico máximo entre los 50 y 60 años (29,3%) en hombres y por encima de los 65 años (25,4%) en mujeres [10].

Durante la evaluación de la carga de la enfermedad según el género, los investigadores observaron que las mujeres de 50 años o más tenían un 17% más de probabilidades de desarrollar EHNA y un 56% más de probabilidades de desarrollar fibrosis avanzada en comparación con los hombres de edades similares [11].

### **1.3.2. La EHGNA en nuestro medio**

Según la Sociedad Española de Patología Digestiva la EHGNA presenta una elevada prevalencia en nuestro país (23-25%). Entre un 10-20% de pacientes presentan EHNA y hasta un 55% desarrollan cirrosis. Además, su incidencia y prevalencia está en aumento en relación con la mayor incidencia de otras enfermedades metabólicas con las que se encuentra patogénicamente asociada. Más del 90% de pacientes con EHGNA tienen al menos un componente de síndrome metabólico y aproximadamente una tercera parte tienen tres o más [12].

### **1.3.3. Morbimortalidad**

Los porcentajes de prevalencia se incrementan en poblaciones con altas tasas de obesidad y diabetes, aunque la entidad no es exclusiva de este tipo de pacientes y puede darse en personas no obesas (EHGNA magras). Este tipo de pacientes no obesos supone hasta el 40% de pacientes de EHGNA, si bien la mayoría presenta resistencia a la insulina y podría tener obesidad visceral [3].

Se estima que entre un 15 y un 20% de los pacientes con EHNA progresan hacia cirrosis, enfermedad hepática terminal e incluso muerte, y supone la segunda indicación más frecuente de trasplante hepático en los Estados Unidos después de la enfermedad hepática por alcohol (EHA). Además, de todos los tipos de cáncer a nivel mundial, el hepatocarcinoma es la segunda causa principal de años de vida perdidos [3].

En un estudio prospectivo realizado con 1773 pacientes de EHGNA durante un total de 4 años se demostró, en la línea de estudios previos, que la mortalidad por todas las causas, así como las complicaciones relacionadas con la patología, aumentan a medida que la fibrosis hepática avanza. También se observó que los pacientes con mayor grado de fibrosis presentaron mayor incidencia de Diabetes Mellitus tipo 2 y descensos de más del 40% en su tasa de filtrado glomerular, mientras que los eventos cardíacos y cánceres no hepáticos fueron similares en todas las etapas de fibrosis [13].

El estudio concluye que la mortalidad por todas las causas aumenta aproximadamente siete veces en los pacientes de EHGNA respecto a la población general. El síndrome metabólico se asoció a un incremento de la mortalidad, siendo la enfermedad cardiovascular la principal causa de muerte. Aun así, todavía se sigue estudiando qué componente de la enfermedad precede a cuál, es decir, si la EHGNA es un predictor independiente de mortalidad cardiovascular o un paso intermedio a lo largo del proceso [13].

### 1.3.4. EHGNA y DM2

La asociación entre EHGNA y DM2 es cada vez mayor en la práctica clínica, en especial en países occidentales, ya que ambas entidades tienen una elevada prevalencia individual y comparten los mismos factores de riesgo metabólicos. Como ya se ha comentado anteriormente, la prevalencia mundial de EHGNA es de en torno al 25% mientras que la prevalencia de DM2 se estima en un 10,5% de todos los adultos entre los 20-79 años. Entre los pacientes de EHGNA, sin embargo, la prevalencia de DM2 alcanza el 90% [14].

Un metanálisis publicado en 2019 que incluyó 80 estudios concluyó que la prevalencia global estimada de EHGNA en pacientes con DM2 era de 55,48%, registrándose las tasas más altas en Europa (68%) y Asia occidental (67%), y las más bajas en África (30%) [15].

Asimismo, otro metanálisis mostró que las personas con DM2 que además tenían EHGNA presentaron un riesgo dos veces mayor de desarrollo de enfermedad cardiovascular que aquellas sin EHGNA. También se observó un riesgo incrementado de EHNA, cirrosis o carcinoma hepatocelular en personas con DM2 [16].

### 1.4. Patogenia

Aunque los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad no son del todo conocidos, parece evidente su relación con la DM2 y el denominado Síndrome Metabólico (SM), un grupo de factores de riesgo cardiovascular que incluye obesidad abdominal, niveles de triglicéridos y colesterol LDL en sangre elevados, hipertensión arterial y glicemias en ayuno elevadas o insulinresistencia [17].

El común denominador en esta asociación es la resistencia a la insulina (RI), actor principal en la hipótesis clásica del doble impacto [18], que postula dos agresiones en el paso de la ES a la EHGNA. La primera agresión tiene que ver con la RI, que da lugar a la acumulación de ácidos grasos libres en las células hepáticas, mientras que la segunda agresión supone la aparición de inflamación a consecuencia de esta acumulación, lo que pone en marcha una serie de eventos citotóxicos que generan estrés oxidativo e incrementan la RI produciendo daño hepatocitario y fibrosis [17, 19].

Sin embargo, en la actualidad prevalece la teoría del múltiple impacto [20], que postula la implicación no solo de factores metabólicos e inflamatorios en el desarrollo de la lesión hepática, sino también de factores dietéticos, genéticos y microbiológicos. A continuación repasamos los principales mecanismos fisiopatogénicos implicados en la EHGNA.

#### 1.4.1. Acumulación grasa y obesidad

La acumulación de ácidos grasos en la EHGNA inducida por la RI parece venir potenciada por cuatro factores, la lipogénesis *de novo*, la beta-oxidación de los ácidos grasos, el descenso de VLDL y la ingesta de lípidos y carbohidratos:

- La lipogénesis *de novo* se encuentra aumentada en la EHGNA. Se trata de una de las funciones básicas del hígado y del adipocito, y consiste en la síntesis de ácidos grasos libres (AGL) a partir de sustratos como la glucosa y la sucrosa, que en última instancia se almacenan en forma de triacilgliceroles (TGL) mediante un proceso de esterificación mediado por la enzima Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Esta lipogénesis se encuentra a menudo incrementada también en individuos obesos y en pacientes de DM2, por lo que se relaciona con la RI [17].

El mecanismo fisiológico de este incremento se fundamenta en los principales factores de transcripción implicados en la lipogénesis *de novo*: la proteína de unión al elemento regulador

del esteroil 1c (SREBP-1c), activado por insulina, y el factor de transcripción de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), activado por la glucosa [17].

Los pacientes de EHGNA, en los que existe un incremento del aflujo de insulina y glucosa al hígado, presentan consecuentemente una expresión elevada de SREBP-1c, que en modelos animales transgénicos con sobreexpresión de SREBP-1c se asocia con niveles incrementados de triglicéridos hepáticos y de insulina, parámetros, estos, altamente sugestivos de RI [17]. Por otra parte, la expresión del factor de transcripción de ChREBP aparece también elevada en las biopsias hepáticas de pacientes de EHNA en que la esteatosis superaba el 50%. Cabe señalar que la sobreexpresión de ChREBP se asocia con incremento de esteatosis hepática en modelos animales, pero no con RI o intolerancia a glucosa, independientemente de la dieta administrada (rica en grasas o estándar), y que en modelos animales donde se ha silenciado ChREBP se evidencia mejora de la esteatosis, pero en cambio se observa intolerancia a fructosa, glucosa y sucrosa [17].

Estos hallazgos son coherentes con estudios en modelos animales donde la sobreexpresión de la isoforma DGAT2 que media en la formación de TGL en la lipogénesis *de novo* y que es exclusiva del hepatocito favorece la esteatosis. En esa misma línea, los mismos estudios muestran que el silenciamiento de DGAT2 promueve la reversión de la acumulación grasa [21].

- La producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encuentra aumentada en ES y disminuida en EHNA [22]. En el hígado sano, una parte de los TGL que se producen mediante la lipogénesis *de novo* se unen a lipoproteína B gracias a la proteína transferidora de triglicéridos microsomales (MTTP) para formar VLDL, que se envían al torrente sanguíneo [21]. En presencia de RI, la producción de VLDL aumenta en un intento por mantener la homeostasis lipídica hepática [22]. No obstante, la sobreexpresión de SREBP-1c que se observa en la EHGNA inhibe la formación de MTTP, disminuyendo la síntesis de VLDL, por lo que se dificulta el envío del exceso de TGL al plasma, alterando la homeostasis lipídica y contribuyendo a la acumulación grasa en el hígado [21].
- La beta oxidación de los ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación) se encuentra disminuida en la EHGNA. La  $\beta$ -oxidación está regulada por el factor de transcripción del receptor de peroxisoma-proliferador activado gamma (PPAR $\gamma$ ), cuya activación en respuesta al ayuno reduce los niveles de ácidos grasos intrahepáticos mediante la utilización de los lípidos como fuente de energía [17, 19]. Su activación mediante agonistas se relaciona con niveles disminuidos de alanina aminotransferasa (ALT), lipoperóxidos hepáticos (LPO) y reducción de la EHNA en modelos animales con una dieta rica en grasas o deficiente en metionina y colina, que son dos formas de inducción de EHGNA en roedores. Además, la utilización de agonistas selectivos de la PPAR $\gamma$  ha demostrado reducir la RI, tanto genética como inducida por dietas ricas en grasas. El silenciamiento de PPAR $\gamma$ , en cambio, supone el desarrollo de EHNA más severa que el fenotipo salvaje en modelos animales con dietas deficientes en colina y metionina [17].
- Son numerosos los estudios que sugieren que las dietas ricas en grasas y carbohidratos sostenidas en el tiempo contribuyen a la fisiopatogenia de la EHGNA. Se sabe que los pacientes de EHGNA tienden a descuidar la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI n-3), que son antiinflamatorios y mejoran sensibilidad a la insulina, y favorecer la de AGPI n-6, que son proinflamatorios y promueven la ES. Además, abusan de los carbohidratos y de la fructosa, que, como se ha señalado ya, contribuyen a incrementar la lipogénesis *de novo* y a reducir la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos [17, 19].

### 1.4.2. Inflamación

El tejido adiposo (TA) es un órgano endocrino que participa en la homeostasis metabólica y que puede afectar a órganos como el hígado, corazón y músculo esquelético a través de la secreción aumentada de AGL así como de factores pro-inflamatorios, lo que lo sitúa como actor central en la patogénesis de la dislipemia, la RI y la EHGNA [19].

El TA potencia la expresión de adipocinas como las quimiocinas y las citocinas pro-inflamatorias. De hecho, los macrófagos presentes en el estroma vascular del TA parecen ser los principales secretores de interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en este tejido y aparecen incrementados en un 32% más en el tejido adiposo blanco (principal componente de la grasa visceral) que en el tejido adiposo pardo [19]. Tanto la IL-6 como el TNF- $\alpha$  interfieren con la función de los adipocitos inhibiendo las vías de señalización de los receptores de insulina y con ello incrementan la RI, además de promover la producción de adipocitos de fenotipo pro-inflamatorio, por lo que se considera que los macrófagos del tejido adiposo (ATM) contribuyen de manera crítica a la patogenia de la DM2 y el SM [23].

El reclutamiento incrementado de ATMs en el TA del individuo obeso parece estar relacionada con un incremento de la muerte celular no apoptótica de los adipocitos a consecuencia de los efectos deletéreos que tiene sobre ellos la hipertrofia consecuencia de la obesidad. Además, en modelos animales afectos de obesidad se ha observado un incremento de la expresión de la proteína atrayente de monocitos (MPC-1), que incrementa el reclutamiento de monocitos (precursores de los macrófagos) y causa RI. En la misma línea, el silenciamiento de MPC-1 o la deficiencia de su receptor, el receptor 2 de quimiocina CC (CCR2), han demostrado una disminución en la cantidad de ATM en modelos animales con dietas ricas en grasa y una mejora de sus parámetros metabólicos [23].

Dado que el CCR2 se expresa tanto en ATMs como en otras células sanguíneas mononucleares, la inflamación promovida por el TA podría transferirse a otros tejidos, hígado incluido, gracias a mediadores inflamatorios vertidos al torrente sanguíneo [19]. La acumulación grasa en el hígado o primer impacto se seguiría de infiltración de células inmunes y secreción de adipocinas, que conducirían a un incremento en el número de macrófagos hepáticos (células de Kupffer) y aumento de la RI, entrando en un círculo vicioso que contribuiría al incremento de la acumulación grasa y a una secreción creciente de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 en este tejido [17].

Cabe señalar que el 10% de células hepáticas son macrófagos, que son mediadores en la activación de las células T y regulan la apoptosis hepatocitaria [17]. Los macrófagos tipo 1 (M1) son un fenotipo proinflamatorio y los macrófagos tipo 2 (M2) son un fenotipo antiinflamatorio [23]. En hígado, los primeros están ligados a la esteatosis hepática, fibrogénesis y acumulación grasa mientras que los M2 son macrófagos residentes que activan la apoptosis de los M1 a través de la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 13 (IL-13) [17]. El incremento de IL-6 y TNF- $\alpha$  promueve la activación de los M2 residentes a M1 y la expresión incrementada de CCR2 aumenta el reclutamiento de monocitos, que se diferenciarán en M1. El balance M1/M2 estará por tanto aumentado en las mencionadas condiciones y conducirá a la progresión de la EHGNA [17]. Otros factores mediadores en la inflamación son los linfocitos CD4 circulantes, cuya presencia es mayor cuanto mayor es el IMC del individuo. Dentro de este subtipo linfocitario, están los linfocitos T colaboradores 1 y 17 (Th1 y Th17), que se hayan activados en el paciente obeso y promueven respuestas proinflamatorias en los M1 [19].

Todo el ambiente proinflamatorio descrito aumenta la permeabilidad intestinal y, en consecuencia, la translocación bacteriana. Dado que el hígado recibe el 70% del aporte sanguíneo a través de la vena porta, este está expuesto a productos tóxicos procedentes del intestino, como son las bacterias y sus

derivados, lo que contribuye al ambiente proinflamatorio hepático a través de la interacción entre los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y los receptores tipo toll 4 (TLR4) presentes en la membrana de células dendríticas, macrófagos y otras células inmunes, que activan las vías de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) y las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) promoviendo la activación de macrófagos y la infiltración de células inflamatorias [19].

Además, la fetuína-A (fetA), una proteína que se secreta en el hígado y que se encuentra en altas concentraciones en suero de pacientes obesos, tiene la capacidad de bloquear la translocación de la proteína transportadora de glucosa regulada por insulina tipo 4 (GLUT4), incrementando la IR y promoviendo la acumulación grasa, y forma un complejo terciario con los TLR4 que activa la señalización TLR4 promoviendo la inflamación [19].

### **1.4.3. Estrés oxidativo y RI**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se producen de forma fisiológica en concentraciones bajas tanto en la mitocondria como en los peroxisomas y participan en procesos de transcripción y en el ciclo celular. El estrés oxidativo es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de EROs y su neutralización con antioxidantes y está asociado con los mecanismos de formación de insulina [17].

El estrés oxidativo es un factor importante en la etiología de la RI. La GLUT4 es esencial en la absorción de glucosa en tejidos sensibles a la insulina como los adipocitos o el músculo esquelético. Cuando los niveles de glucosa en sangre se elevan, la expresión del transportador se eleva, lo que produce una regulación a la baja del mismo por feedback positivo, que a su vez hace aumentar la producción pancreática de insulina. Este círculo vicioso produce RI e incrementa de forma significativa su producción, lo que genera estrés oxidativo e inflamación [17]. Además, este incremento de la insulina en sangre activa el sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4 (NADPH oxidasa 4) y conduce a niveles aún más incrementados de EROs, lo que también activa el transporte endosomal de GLUT4 y su degradación, de forma que el transportador no puede cumplir su función. Una dieta rica en glucosa aumentará también la producción de trifosfato de adenosina (ATP) en la mitocondria, incrementando las EROs. Por último, el daño asociado al estrés oxidativo estimula la vía NF-κB y la JNK, que promueven la inflamación y con ello el desarrollo de EHGNA [17].

### **1.4.4. La disfunción mitocondrial**

Las mitocondrias son responsables de la homeostasis energética celular, incluidas la beta-oxidación, la cadena de transporte de electrones (CTE), y la producción de ATP y de EROs, por lo que tienen un papel prominente en todas aquellas enfermedades relacionadas con rutas metabólicas, como es el caso de la EHGNA. La disfunción mitocondrial produce deficiencias en la oxidación de los ácidos grasos, lo que eleva la producción de EROs y genera estrés oxidativo, estimulando la actividad de las vías de señalización con capacidad para producir necroinflamación en los hepatocitos y daño mitocondrial. Todo ello genera un círculo vicioso conducente a acumulación grasa, RI y EHGNA, especialmente en el contexto de una dieta rica en grasas [17].

Las sirtuinas constituyen una de las familias de proteínas implicadas en la disfunción mitocondrial. La sirtuina 1 (SIRT1) regula al alza las enzimas antioxidantes que modulan el estrés oxidativo, y la sirtuina 3 (SIRT3), que en modelos animales se encuentra reducida en hígados grasos, aumenta la oxidación de los ácidos grasos. Además, dado que la acción de las sirtuinas depende de nicotinamida adenina dinucleótida (NAD<sup>+</sup>), un derivado de la vitamina B3 cuya función es el intercambio de electrones y la producción de energía, su deficiencia puede contribuir a la aparición de disfunción mitocondrial [17].

Otros factores implicados en la función mitocondrial son el Slc25a1 y la carnitina. El Slc25a1 es un transportador de citrato asociado al metabolismo de los ácidos grasos libres cuya inhibición disminuye la esteatosis, protege contra la EH y reduce la inflamación en el tejido graso. La carnitina, transportador mitocondrial que transfiere los ácidos grasos de cadena larga del citoplasma a la matriz mitocondrial, inhibe el estrés oxidativo y aumenta la beta-oxidación reduciendo con ello la RI [17].

En cuanto al papel de la insulina en la disfunción mitocondrial, se sabe que ayuda a mantener un balance adecuado de NAD<sup>+</sup>/NADH en la mitocondria (la NADH es una forma reducida de la NAD<sup>+</sup> producida cuando esta acepta electrones de otras moléculas e interviene en la producción de energía), y que los radicales libres de origen mitocondrial modulan la sensibilidad a la insulina, mientras que el exceso de EROs interfieren en la señalización de la insulina e inducen RI [17].

Además, existen mutaciones en el ADN mitocondrial que pueden promover el SM y con ello la aparición de EHGNA. Así, el citocromo CYPE2E1, fuente de EROs, interviene en el metabolismo de los ácidos grasos, ya que sus niveles se encuentran incrementados en modelos animales y pacientes de EHGNA. Dado su papel, determinados polimorfismos del gen que regula su expresión se asocian con la aparición de EHGNA en pacientes obesos con DM2 [17].

Por último, ya hemos señalado que las EROs están implicadas en el estrés oxidativo y que, por tanto, la actividad antioxidante es importante para evitar la disfunción mitocondrial. En este sentido, la glutatión peroxidasa se encuentra disminuida en modelos animales de EHGNA, probablemente porque su uso incrementado conduce a su depleción y por deficiencias en su transporte a la matriz mitocondrial. Asimismo, el polimorfismo C47T del gen que codifica la superóxido dismutasa 2 (SOD2) no solo reduce su actividad y eleva las EROs sino que además incrementa la probabilidad de EHGNA y de fibrosis avanzada en paciente de EHGNA [17].

#### **1.4.5. Factores genéticos**

Algunos de los genes identificados por su posible asociación con la EHGNA son PNPLA3, TM6SF2, GCKR o HSD17B13. La función de la molécula PNPLA3 está relacionada con el metabolismo de los triglicéridos en el adipocito, y su variante I148M reduce la actividad lipolítica contra aquellos incrementando su producción en el hígado [17, 24, 14], además de estar asociada a un aumento de probabilidad de sufrir carcinoma hepatocelular [17]; el gen TM6SF2 está implicado en la síntesis de colesterol y su variante E162K aumenta la ES y la progresión de la fibrosis [17, 24, 14]; el GCKR interviene en la lipogénesis regulando el flujo de glucosa hacia el hepatocito [17]; y el HSD17B13 interviene en la modulación de los niveles de enzimas hepáticas en suero [17, 24]. Se especula con que los polimorfismos de estos y otros genes puedan tener un papel preponderante en el paso de la ES a EHNA.

Los daños producidos en el ADN mitocondrial por las EROs que genera la respiración celular precisan de un mecanismo de reparación complejo denominado reparación por escisión de bases o BER. El BER implica una serie de proteínas y pasos críticos, y cualquier error en cualquiera de estos elementos puede afectar a la eficiencia del proceso de reparación, generando estrés oxidativo, y RI. En este sentido, de todos los genes implicados en el BER, es el OGG1 el que parece tener mayor repercusión en la EHGNA, ya que su silenciamiento ha demostrado un mayor incremento de peso e hígado graso en modelos animales, principalmente debido a un predominio del metabolismo de los carbohidratos sobre la oxidación de los ácidos grasos [17]. No en vano, el polimorfismo c.1245C<G aumenta el riesgo de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y metabólicas como la DM2 y el SM [17].

#### **1.4.6. Microbiota intestinal**

Existen estudios recientes que relacionan la EHGNA con la microbiota intestinal, dada su asociación con la obesidad y la resistencia a la insulina. En la población obesa, el porcentaje de bacteroidetes, un filo implicado en diversas vías metabólicas, suele ser muy reducido. Además, la resistencia a la insulina de sujetos colonizados con microbiota procedente de personas delgadas se ve reducida, lo que parece estar relacionado con poblaciones incrementadas de bacterias productoras de butirato. El mismo butirato, administrado en modelos animales ha mostrado reducción de la RI y protección frente a EHGNA incluso en el contexto de dietas ricas en grasa [17].

Asimismo, se ha demostrado que en modelos animales colonizados con microbiota intestinal procedente de bebés de madres obesas, la inmunidad celular se ve comprometida, condicionando mayor permeabilidad intestinal y promoviendo la translocación bacteriana al hígado a través del eje hepato-intestinal [14]. Como ya se ha señalado anteriormente, los LPS y endotoxinas producidas por estas bacterias promueven el ambiente inflamatorio propio de la EHGNA favoreciendo la acumulación hepática de grasa y el daño hepatocitario [19].

#### **1.5. Diagnóstico**

El vínculo de la EHGNA, la EHNA y la fibrosis hepática avanzada con la DM2 y el SM es el punto de partida a la hora de plantear campañas de cribado dirigidas a la población de riesgo, pero existen pruebas confirmatorias que permiten aportar certeza diagnóstica sobre la presencia de enfermedad del hígado graso no alcohólico y grado de fibrosis histológica bien de forma directa a través de la biopsia o mediante pruebas de imagen. A continuación, repasamos los índices y pruebas más utilizadas en el diagnóstico de la EHGNA.

##### **1.5.1. Pruebas de screening**

La Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) sugiere realizar screening basados en niveles de enzimas hepáticas en sangre o ecografía en todo paciente con obesidad o síndrome metabólico, especialmente en aquellos pacientes con DM2 [14]

No obstante, las muchas incertidumbres sobre la historia natural y tratamiento de estas entidades han llevado a la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD) a adoptar un enfoque más restrictivo en cuanto a la realización de pruebas dirigidas a la población de riesgo, por lo que propone screening más enfocados en casos de alta sospecha de desarrollo de EHGNA o EHNA mediante la utilización de índices no invasivos basados en biomarcadores como el Fibrosis-4 score (FIB-4), el Non-Alcoholic Fatty Liver Disease fibrosis score (NFS) o la elastografía hepática a la hora de estratificar el riesgo de fibrosis [14]. La utilidad diagnóstica de estas pruebas se basa en su elevado valor predictivo negativo para descartar la presencia de fibrosis, si bien su capacidad de predecir fibrosis avanzada es pobre [1].

##### **1.5.1.1. FIB-4**

El FIB-4 se vale de cuatro criterios, edad, plaquetas, transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) y transaminasa glutámico pirúvica (GPT), para calcular un índice que nos sitúa en un rango de fibrosis definido por los siguientes estadios:

- F0 = no fibrosis
- F1 = fibrosis portal sin septos
- F2 = fibrosis portal con pocos septos
- F3 = numerosos septos sin cirrosis

F4 = cirrosis

Las cifras de referencia para EHNA predicen una fibrosis de entre F0-F1 si FIB4<1,30 y una fibrosis entre F3-F4 si FIB4>2,97. El FIB-4 presenta, según sus creadores, una excelente correlación con la elastografía en la predicción de la fibrosis histológica con independencia de la presencia de DM2 [25] pero en la práctica, se utiliza un punto de corte de 1,30 para identificar pacientes con riesgo intermedio-alto de fibrosis, que serían candidatos a realización de elastografía transitoria, mientras que a aquellos por debajo de 1,30 se les recomendarían medidas higiénico-dietéticas [1, 14].

#### 1.5.1.2. NFS

El NFS es el más utilizado y se basa en la edad, el IMC, la hiperglucemia en ayunas, el cociente GOT/GPT, plaquetas y albúmina para predecir la presencia de fibrosis avanzada en pacientes con EHGNA, especialmente en los no diabéticos. Un índice NFS < -1.455 supondría una fibrosis entre F0-F2, un NFS > 0,675 nos situaría en una fibrosis entre F3-F4 y cualquier valor intermedio supondría un resultado indeterminado [26].

#### 1.5.1.3. Elastografía transitoria (Fibroscan®)

La elastografía es un enfoque basado en el grado de rigidez del hígado como marcador de fibrosis. Esta técnica mide mediante ultrasonidos la velocidad de propagación de una onda mecánica por el hígado expresada en kilopascales. Valores por debajo de los 8 kilopascales se consideran de bajo riesgo en el desarrollo de fibrosis mientras que valores superiores se considerarían de alto riesgo (estadios F3-F4), y requerirían de prueba confirmatoria [1]. La elastografía es una buena técnica en la detección de fibrosis avanzada y cirrosis, pero su rendimiento es inferior para fibrosis moderada y, en caso de obesidad o ascitis, la distancia entre la sonda y el hígado puede limitar la precisión de las mediciones. La elastografía con Parametro de Atenuación Controlada (PAC) es una nueva aplicación de la elastografía que aumenta la capacidad de detección de esteatosis leves, pero está sujeta a las mismas limitaciones de la elastografía convencional [27].

Dado que la evidencia científica señala que el cribado y la estratificación del riesgo son coste-efectivos para los pacientes de DM2, asociaciones como la Asociación Americana de Gastroenterología (AGA) proponen realizar screening y estratificación del riesgo de fibrosis con elastografía en pacientes de DM2, incluidos aquellos que no sufren de obesidad. La Asociación Americana para la Diabetes (ADA) va más allá y recomienda realizar screening de EHNA y fibrosis hepática en todo paciente con DM2, o bien con prediabetes y enzimas hepáticas elevadas, o bien en pacientes con hígado graso evidenciado mediante ecografía [14].

### 1.5.2. Pruebas confirmatorias

Teniendo en cuenta el coste de la biopsia, la variabilidad de las muestras, su mortalidad (aunque escasa), y sus comorbilidades, la tendencia en el diagnóstico es recurrir a métodos con alto índice predictivo negativo (como son los índices no invasivos) a la hora de detectar riesgo de fibrosis, y utilizar pruebas de imagen para confirmar el diagnóstico. La biopsia hepática se reservaría para casos en los que el resto de pruebas no fueran concluyentes [1].

#### 1.5.2.1. Biopsia hepática

La biopsia hepática es el *gold standard* en el diagnóstico de la EHGNA y las guías americanas la recomiendan en aquellos pacientes con alto riesgo de desarrollar EHNA y/o fibrosis hepática, es decir, aquellos con SM o DM2, especialmente cuando coexiste con hepatopatía crónica [14].

Como señalamos en la sección 1 de este trabajo, la ES y la EHNA se definen de manera histológica. La ES supone la presencia de infiltrado graso hepático de más del 5% que no se acompaña de lesión hepatocitaria de tipo degeneración balonizante. La EHNA se define como la presencia de esteatosis hepática de más del 5% acompañada de daño hepatocitario (degeneración balonizante) e inflamación lobular, con o sin fibrosis, y constituye el siguiente escalón en la progresión de la EHGNA. La figura 3 muestra los distintos estadios en la evolución histológica de la EHGNA, desde la ES y la EHNA, que pueden alternarse en función de los hábitos del paciente, hasta la aparición de fibrosis o la degeneración a cirrosis, que se consideran estadios más establecidos, si bien en la introducción de este trabajo ya hemos aportado evidencia en cuanto a la reversibilidad de la fibrosis, especialmente cuando esta no es avanzada (grados F1-F2).

[ver ANEXO]

**Figura 3:** Lesiones histológicas en la EHGNA (En: [27])

En la valoración del grado de fibrosis histológica mediante biopsia destacan el NAFLD Activity Score (NAS) y el SAF-score (esteatosis, actividad, fibrosis), donde la actividad es la suma de la inflamación lobular y la degeneración balonizante. La tabla 1 muestra los criterios de diagnóstico histológico utilizados en ambos índices.

	ES	EHNA	Cirrosis
Esteatosis hepática	≥ 5%	≥ 5%	actual o previa
Inflamación portal y lobular	±	Sí	Sí
Degeneración balonizante	No	Sí	Sí
Fibrosis	No	F0-F3	F4

**Tabla 1:** Criterios empleados en el diagnóstico histológico de los distintos estadios de EHGNA en los índices NAS y SAF (elaboración propia)

La puntuación NAS valora la esteatosis del 0 a 3, la inflamación lobular del 0 a 3 y la degeneración balonizante del 0 al 2 de forma que un NAS>4 define presencia de esteatohepatitis. El SAF valora la esteatosis del 0 al 3, la actividad del 0 al 8 y la fibrosis del 0 al 4 y requiere una valoración de al menos 1 punto en todos los componentes para hablar de esteatohepatitis [1].

### 1.5.2.2. Pruebas de imagen

Las pruebas de imagen incluyen la ecografía, la tomografía axial computerizada (TAC) y la resonancia magnética (RM) para detectar ES. En cambio, para el estudio de fibrosis, se puede utilizar la elastografía por resonancia magnética (ERM), basada en los mismos principios que la elastografía, para determinar el estadio de fibrosis [1].

La tabla 2 resume las principales características de las distintas técnicas de imagen:

	S/E	Ventajas	Inconvenientes	
Ecografía	79,7%/86,2%	-No radiación -Bajo coste -Alta disponibilidad	-Variabilidad interobservador -No detecta ES por debajo del 20% -Bajo rendimiento en obesidad mórbida y fibrosis avanzada	ESTEATOSIS SIMPLE
TAC	82%/100%* *con niveles de esteatosis >30%	-Buena disponibilidad -Detecta ES moderada-severa	-Radiación -No detecta niveles bajos de ES	
RM	76-90%/87-91%	-No radiación -Precisión en la cuantificación de grasa intrahepática -Alta capacidad diagnóstica en fases leves	-Baja disponibilidad -Coste elevado -Menor precisión en presencia de fibrosis	
ERM	90%/93%* *para ES 100%/92%* *para fibrosis avanzada	-No radiación -Discrimina esteatosis y grados de fibrosis	-Baja disponibilidad -Coste elevado	FIBROSIS

**Tabla 2:** Características de las principales técnicas de imagen en el diagnóstico y estadificación de la EHGNA ([27](#), [28](#), [29](#))

## 1.6. Tratamiento

Actualmente, no existe una terapia definitiva establecida para EHGNA, debido a la complejidad de los mecanismos patogénicos involucrados, la corta duración de los ensayos disponibles y la probable necesidad de una combinación de tratamientos. Las agencias reguladoras todavía no han aprobado un tratamiento específico para EHGNA.

### 1.6.1. Intervenciones no farmacológicas

La literatura muestra que la pérdida de peso es el principal objetivo terapéutico en EHGNA. Un ensayo prospectivo de 12 meses de duración (ver figura 4) que se basó en biopsias hepáticas pareadas mostró que una reducción del 3-5% del peso corporal mejora la esteatosis hepática, mientras que una pérdida de peso del 7 al 10% ya puede conducir a tasas significativas de resolución de la esteatohepatitis debido a la mejora de la inflamación hepática. En la misma línea de relación dosis-respuesta, reducciones por encima del 10% del peso corporal se asocian a regresión de la fibrosis ([30](#)).

[ver ANEXO]

**Figura 4:** Efecto dosis-respuesta de la dieta y pérdida de peso en las diferentes etapas de la EHGNA (En: [30](#) nuestra traducción)

Además, el ejercicio físico en pacientes afectados de EHGNA ha demostrado reducir la esteatosis hepática incluso en ausencia de pérdidas significativas de peso, probablemente debido a una disminución de las enzimas lipogénicas acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintasa, como se ha observado en modelos animales ([31](#)). La evidencia científica señala también que la intensidad del ejercicio no supone diferencias significativas en la reducción de la esteatosis hepática, mientras que una duración de éste superior a 150 minutos a la semana se asoció a un riesgo 44% menor de desarrollar EHGNA. Todos estos resultados se explican porque los pacientes que realizan actividad física durante más de 150 minutos a la semana presentan una mejora en las enzimas hepáticas

independientemente de la pérdida de peso, además de numerosos beneficios sobre los principales factores de riesgo asociados, como la DM2 y la adiposidad central. Todo ello pone de manifiesto que el sobrepeso y la obesidad son los principales factores de riesgo para el desarrollo de EHGNA, por lo que las dietas restringidas en calorías se presentan como posible estrategia no farmacológica para el tratamiento de la EHGNA. Diversos estudios sugieren que una reducción de 500-1000 kcal/día conduce a descensos en el volumen de los adipocitos y en la inflamación desde las primeras 48 horas junto a una supresión de la glucosa endógena. Cada vez es más frecuente encontrar pruebas que respalden los beneficios de la dieta mediterránea (verduras, legumbres, frutas, cereales integrales, frutos secos, pescados y mariscos) por sus numerosos componentes antiinflamatorios y antioxidantes [14].

### **1.6.2. Suplementos vitamínicos**

Como se desprende de estudios con modelos animales, la vitamina D potencia los mecanismos intracelulares de acción de la insulina mediados por el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) y los receptores de vitamina D, facilitando así la captación de glucosa en el músculo y promoviendo la expresión del transportador de glucosa dependiente de insulina 4 en los adipocitos. Aunque la literatura confirma la asociación entre niveles reducidos de 25-OH-Vitamina D y la presencia de EHGNA, no existen datos derivados de estudios con grandes poblaciones, por lo que no se acepta como tratamiento a día de hoy [14].

### **1.6.3. Intervenciones farmacológicas**

Dado el efecto perjudicial de la RI sobre el tejido hepático y adiposo, las terapias farmacológicas dirigidas a resolverla son una opción para los pacientes que asocian EHGNA y DM2. Además, es de esperar que la pérdida de peso que inducen algunos medicamentos para la diabetes motive mejoras en la progresión de la EHGNA. Por tanto, los antidiabéticos orales son una opción terapéutica para EHGNA en pacientes diabéticos.

El principal fármaco en el tratamiento de primera línea de los pacientes con DM2 es la metformina, ya que sus beneficios sobre la RI (e.g. disminución de la tasa de gluconeogénesis y estimulación de la captación muscular de glucosa) la convirtieron en un tratamiento potencial también para la EHGNA. Una revisión sistemática que incluyó a pacientes con EHGNA demostró que la metformina mejora el panel bioquímico al reducir las enzimas hepáticas y disminuir la RI y el IMC. En combinación con un estilo de vida saludable, además, la metformina promueve una pérdida de peso media del 6% en pacientes con EHGNA y DM2, aunque no motiva una mejora histológica de la EHGNA [32].

Las tiazolidinedionas aumentan la sensibilidad a la insulina y son una posible opción terapéutica para la EHGNA. Entre ellas, la pioglitazona actúa como agonista de los receptores gamma, que son activados por proliferadores de peroxisomas y abundan en los adipocitos, aunque no son comunes en el músculo. La activación de estos receptores nucleares estimula la adipogénesis, redistribuyendo todo el tejido adiposo del cuerpo desde los depósitos de grasa visceral a la subcutánea, lo cual es importante, ya que la grasa visceral se asocia a peor grado de EHGNA y a enfermedad cardiovascular. La pioglitazona mejora también la transcripción de genes de enzimas clave en la lipogénesis y mejora la acción supresora de la insulina sobre la lipólisis. En pacientes con EHGNA y DM2, aumenta la concentración plasmática de adiponectina, conduciendo a una disminución de triglicéridos hepáticos y una mejora en el control glucémico. Además, este fármaco sí demuestra una mejoría de la fibrosis avanzada hepática. A pesar de todo, su uso está limitado debido a sus efectos secundarios, como son el aumento de peso, edema de extremidades inferiores y alto riesgo de fractura ósea [14].

Otra opción son los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1). La GLP-1 es una hormona incretina secretada por el intestino que estimula la producción y liberación de insulina, inhibe la secreción de glucagón, retrasa el vaciamiento gástrico y reduce el apetito, motivando una restricción en la ingesta de alimentos. Su vida media es corta debido al efecto de la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), que produce la lisis de la molécula GLP-1. Por lo tanto, dado su efecto hipoglucemiante y cardioprotector, los agonistas de GLP-1 pueden ser agentes terapéuticos de primera línea en pacientes afectados de DM2 y enfermedad cardiovascular aterosclerótica establecida. Así, los datos clínicos de un estudio fase IIb sobre la liraglutida han demostrado el beneficio de ésta frente a placebo en la resolución de la EHNA sin empeoramiento de la fibrosis. Además, el 83% de los pacientes tratados con liraglutida durante 48 semanas mejoraron la esteatosis hepática frente a placebo debido a la reducción de la lipogénesis hepática *de novo*. Otro análogo de la GLP-1 que utilizar frente a la EHGNA es la semaglutida, que demostró resolución de la enfermedad en el 59% de los pacientes tratados con 0,4 mg por semana frente al 17% en placebo. En todos los casos expuestos, la mejora en EHGNA puede atribuirse tanto al efecto de los análogos de GLP-1 como a la pérdida de peso concomitante [33].

Los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT 2) promueven la excreción urinaria de glucosa al inhibir su reabsorción tubular proximal renal. Los pacientes con EHGNA y DM2 tratados con canaglifozina, dapaglifozina o empaglifozina mostraron una disminución de la HBA1c y un descenso en el acúmulo de triglicéridos hepáticos, así como en algunas enzimas hepáticas [14].

La tirzepatida es uno de los tratamientos más recientes y condiciona una reducción significativa de los niveles de biomarcadores relacionados con NAS, (e.g. k-18, Pro C-13) en los pacientes tratados, a pesar de encontrarse aún en estudio en diferentes ensayos clínicos [14].

#### **1.6.4. Tratamientos quirúrgicos para la obesidad**

En caso de no existir mejoría hepática en pacientes con obesidad severa y/o DM2 y EHGNA tras adopción de medidas higiénico-dietéticas y tratamiento farmacológico, se puede recurrir a procedimientos quirúrgicos para el control de la obesidad severa.

Datos clínicos de pacientes con obesidad y esteatosis hepática sugieren que, un año después de la cirugía bariátrica, el síndrome metabólico y la esteatosis hepática mejoraron, probablemente debido a la importante pérdida de peso asociada [34].

Con respecto al tipo de cirugía, los datos clínicos demostraron que el NAS disminuyó sustancialmente al año y a los 5 años tras la cirugía especialmente en aquellos pacientes sometidos a un bypass gástrico (en Y de Roux) en comparación con la colocación de banda gástrica ajustable [14].

#### **1.6.5. Nuevos tratamientos**

Los agonistas de FXR (ácido obeticólico) se encuentran en la vanguardia del desarrollo de fármacos para la EHGNA. Los FXR son receptores de ácidos biliares en el intestino delgado y el hígado. Cuando se estimulan, provocan una reducción en la síntesis de ácidos biliares y otros cambios metabólicos en el hígado. En los ensayos clínicos se observó que con 25 mg diarios se logra una mejoría de la fibrosis sin empeoramiento de la EHGNA en comparación con el grupo placebo [30].

#### **1.6.6. Abordaje terapéutico del paciente de EHGNA**

La mejora de las condiciones dietéticas, así como la realización de ejercicio físico tienen un efecto muy positivo en la progresión de la esteatosis hepática, ya que se combinan factores como la restricción

de la ingesta de lípidos y azúcares, el aumento en el aporte de antioxidantes y ácidos grasos beneficiosos y el efecto antiinflamatorio sistémico de la pérdida de peso.

Cuando las medidas higiénico-dietéticas no son suficientes, o en caso de padecer SM o DM2, se puede tratar al paciente principalmente con antidiabéticos orales que hayan demostrado reducir la acumulación de grasa hepática, así como su grado de fibrosis. Adicionalmente se está trabajando con otras dianas moleculares más específicas para lograr una mayor efectividad en el futuro.

Como última opción, en pacientes obesos mórbidos (IMC>40 kg/m<sup>2</sup>) o severos (IMC>35 kg/m<sup>2</sup>) con DM2 y EHGNA existe la opción de la cirugía bariátrica o metabólica, que ha demostrado una mejora de la EHGNA, principalmente asociada a la pérdida de peso motivada por la intervención.

### **1.7. Proneurotensina**

La neurotensina (NT) es un péptido de 13 aminoácidos con expresión tanto en el sistema nervioso como en el tracto gastrointestinal (35, 36). Su secreción digestiva se activa por la ingesta de ácidos grasos principalmente (37), y su función es la de estimular la secreción de jugos biliares y pancreáticos e inhibir la producción de ácido clorhídrico (38, 39). Además, tiene efecto neuromodulador negativo sobre el apetito (40). Sus niveles tienden a ser bajos en sujetos con obesidad mórbida (OM) cuando se comparan con pacientes con normopeso (41), mientras que se elevan tras cirugía bariátrica (41, 42, 43). En modelos animales, la deficiencia de NT conlleva una reducción de la absorción intestinal de lípidos y protege de la obesidad, la ES y la RI asociadas a dietas de alto contenido graso [44].

La proneurotensina (pro-NT) es el precursor de la NT, y se encuentra elevada en pacientes con obesidad y resistencia a la insulina [44], además de asociarse con el desarrollo de diabetes, enfermedad cardiovascular, cáncer de mama y muerte en sujetos no obesos [45]. Los niveles de pro-NT se incrementan tras cirugía de by-pass gástrico [46].

Parece, por tanto, que la obesidad y la RI, que son patologías directamente relacionadas con la fisiopatología de la EHGNA, guardan relación con los niveles de NT y pro-NT.

### **1.8. Proneurotensina y EHGNA**

Los dos frentes desde los que podemos relacionar la EHGNA y la NT son: su rol en la absorción grasa en el intestino delgado, que irá a favor de su infiltración y acumulación en el tejido hepático; y su papel en el desarrollo de RI y DM2, que son enfermedades ligadas a la patogenia de la EHGNA. Probablemente, la respuesta se encuentre en una combinación de ambos.

El interés de la pro-NT en el contexto de nuestro estudio radica en su estabilidad como molécula frente a la NT, que debería permitirnos determinar de manera precisa la relación entre la secreción de esta hormona y la EHGNA.

## **2. Hipótesis**

Dado que la literatura científica ha demostrado que:

- Los niveles de NT se han relacionado con la presencia de obesidad y síndrome metabólico, así como de EHGNA,
- La NT es un péptido inestable,
- Existe asociación entre los niveles de pro-NT en sangre y la obesidad, así como con el riesgo de desarrollar diabetes en individuos con normopeso, por lo que podría existir relación entre la pro-NT y la EHGNA, pues el mecanismo fisiopatogénico de esta entidad está íntimamente ligado a la RI propia

de pacientes con síndrome metabólico y DM2. Estos pacientes son una población de riesgo para sufrir esta hepatopatía crónica,

- La neurotensina un péptido intestinal liberado después de la ingestión de grasas que facilita la absorción de lípidos y el metabolismo lipídico hepático, que participa en la patogenia de EHGNA.

En ese sentido, hipotetizamos que los niveles de pro-NT en pacientes de EHGNA están alterados con respecto a individuos que no presentan la enfermedad. Además, pueden existir diferencias entre los niveles circulantes de pro-NT de pacientes con ES o con EHNA. Los niveles de pro-NT se relacionan con el metabolismo lipídico.

### **3. Objetivos**

Objetivo principal:

- Analizar los niveles de pro-NT en plasma en mujeres con EHGNA y OM.

Objetivos secundarios:

- Evaluar si los niveles circulantes de pro-NT son diferentes entre pacientes con OM o sujetos con peso normal.
- Evaluar si los niveles circulantes de pro-NT son diferentes entre pacientes con OM y diabetes mellitus tipo 2 o pacientes con OM sin diabetes.
- Evaluar si los niveles circulantes de pro-NT son diferentes entre pacientes con OM y EHGNA o pacientes OM con hígado normal.
- Evaluar si los niveles circulantes de pro-NT podrían ser biomarcadores diagnósticos de EHNA.
- Analizar la expresión génica hepática de los principales genes del metabolismo lipídico hepático.
- Analizar la posible relación entre la expresión de ARNm hepático de los principales genes relacionados con el metabolismo lipídico y los niveles de pro-NT.

### **4. Material y métodos**

#### **4.1. Participantes**

El estudio fue aprobado por el Comitè ètic d'investigació amb medicaments de l'Institut d'investigació Sanitària Pere Virgili (23c/2015) y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

La población de estudio incluyó 74 mujeres caucásicas: 18 controles con Normopeso (IMC<25 kg/m<sup>2</sup>) y 56 mujeres con OM (IMC>40 kg/m<sup>2</sup>). El estudio solo incluyó mujeres para evitar diferentes sesgos y factores de confusión, como el género. Las muestras del estudio se obtuvieron mediante biopsia hepática practicada en el curso de cirugía bariátrica laparoscópica planificada en el grupo de mujeres con OM (todas las biopsias se indicaron con fines diagnósticos).

El diagnóstico de EHGNA se realizó en pacientes con patología hepática e ingesta de etanol inferior a 10 g al día. Por otra parte, los criterios de exclusión para pacientes con OM fueron:

1. Uso recurrente de fármacos que puedan causar esteatosis hepática.
2. Uso recurrente de fármacos hipolipemiantes, incluidos los agonistas de peroxisomas PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ .
3. Pacientes diabéticos que reciban insulina o tomen fármacos que influyan en los niveles de insulina endógena.
4. Pacientes menopáusicas y posmenopáusicas, o pacientes en tratamiento anticonceptivo.

5. Pacientes con enfermedad aguda o evidencia actual de enfermedades inflamatorias, infecciones agudas o crónicas y/o enfermedades malignas en etapa terminal.

En la cohorte de sujetos con OM, 16 mujeres tenían Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (diagnosticada según criterios de las guías de la *American Diabetes Association*), de las que el 88% recibía tratamiento antidiabético (no insulina). En cuanto a la cohorte de las mujeres con EHGNA, 14 de ellas tenían DM2. Otras 15 mujeres del total de la cohorte presentaban dislipemia, de las que el 60% recibía tratamiento hipolipemiante. Por último, 27 mujeres del total de la cohorte presentaba Hipertensión Arterial (HTA), y de estas el 78% recibía tratamiento antihipertensivo.

#### 4.2. Tamaño de la muestra

Asumiendo un riesgo de  $\alpha$  de 0,05 y un riesgo de  $\beta$  de  $< 0,2$  en un contraste bilateral, eran necesarios 20 participantes por grupo para detectar una diferencia  $\geq 0,2$  unidades, asumiendo una Desviación Estándar Común (DE) de 0,3.

#### 4.3. Patología hepática

Las muestras hepáticas fueron calificadas por un hepatopatólogo experimentado usando los métodos descritos por Kleiner [47].

Se evaluaron las muestras hepáticas en función de la presencia y el grado de esteatosis macrovesicular para ES y, según la inflamación portal y lobulillar, la fibrosis (intensidad y ubicación), la balonización hepatocelular y la hialina de Mallory, para identificar muestras de EHNA.

Las muestras con menos de un 5% de esteatosis macrovesicular sin presencia de inflamación se definieron como hígado normal.

Dependiendo de su patología hepática, las pacientes con OM fueron subclasificadas de acuerdo con la siguiente clasificación histológica:

- Hígado normal (n=20).
- Esteatosis simple (esteatosis micro/macrovesicular sin inflamación ni fibrosis, n=17).
- EHNA (n=19).

#### 4.4. Análisis bioquímicos

A cada paciente se le realizó un examen antropométrico, físico y bioquímico completo. Los parámetros bioquímicos se analizaron utilizando un analizador automático convencional tras 12 horas de ayuno. La RI se estimó mediante HOMA2-IR, una calculadora que estima la función de las células beta en reposo (%B) y la sensibilidad a la insulina (%S) como porcentajes de una población de referencia normal, para lo que bastan los valores de glucosa e insulina en plasma.

Los niveles de pro-NT se midieron con el *sphingotest pro-NT assay* (*SphingoTec GmbH, Hennigsdorf, Germany*). Se trata de un ELISA de quimioluminiscencia tipo "sándwich" o no competitivo, en el que se usan dos anticuerpos específicos para dos epítopos diferentes en el antígeno diana, empleando en este caso dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la pro-NT (trazadores y anticuerpo de captura). El ensayo se calibró usando diluciones de pro-NT nativo.

Las muestras de calibración (50  $\mu$ L) se pipetearon en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas de poliestireno blanco (*Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Austria*). Posteriormente, se agregó anticuerpo monoclonal anti-pro-NT marcado (200  $\mu$ L) y se incubaron las placas durante 20 horas a 22°C sin agitación.

El trazador no unido se eliminó usando una solución de lavado (350 µL por pocillo, cuatro veces), midiéndose la quimioluminiscencia restante posteriormente, durante 1 segundo por pocillo, usando el lector de luminiscencia de placas de microtitulación Centro LB 960 (*Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Alemania*).

El nivel de pro-NT se determinó utilizando una curva de calibración de cinco puntos (5,9–482 pmol/L). Los calibradores y las muestras se procesaron por duplicado con un coeficiente de variación requerido <15% entre los duplicados. Se informó del valor medio de los duplicados de cada muestra. La sensibilidad analítica (límite de detección) fue <3 pmol/L y el rango medible fue de 5,9 a 482 pmol/L.

#### **4.5. Expresión génica en el hígado**

Las muestras hepáticas recogidas durante la cirugía bariátrica se conservaron en RNAlater (*Qiagen, Hilden, Alemania*) a 4°C y se procesaron y almacenaron después a -80°C. El ARN total se extrajo de los tejidos utilizando el mini kit RNeasy (*Qiagen, Barcelona, España*).

La transcripción inversa a cDNA se realizó con el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA* (*Applied Biosystems, Madrid, España*). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el ensayo TaqMan diseñado previamente por Applied Biosystems para la detección los principales genes relacionados con el metabolismo de los lípidos hepáticos, entre los que encontramos los genes que codifican las siguientes proteínas: SREBP1c, SREBP2, transportador del cassette de unión a ATP miembro 1c de la subfamilia G (ABCG1c), transportador del cassette de unión a ATP miembro 1 de la subfamilia A (ABCA1), acetil-CoA carboxilasa (ACC1), carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A), carnitina O-octanoiltransferasa (CROT), PPARγ, PPARα, PPARδ, ácido graso sintasa (FAS), receptor X alfa del hígado (LXRβ), receptor X de ácidos biliares (FXR) y proteínas de unión a ácidos grasos (FABP).

La expresión de cada gen se calculó en relación a la expresión del ARN 18S. Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos utilizando el sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (*Applied Biosystem, Foster City, CA, EE. UU*).

#### **4.6. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS/PC+ para Windows (versión 23,0; SPSS, Chicago, IL, EE. UU). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de las variables. Las variables continuas se informaron como la media (desviación estándar), mientras que las variables no continuas se reportaron como la mediana y el rango intercuartílico (Percentil 25 – Percentil 75).

Los diferentes análisis comparativos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis (variables no paramétricas), según la presencia de dos o más grupos, respectivamente.

La fuerza de la asociación o correlación entre variables se calculó mediante el método de Spearman.

Por último, todos valores de  $p < 0,05$  se establecieron como estadísticamente significativos.

### **5. Resultados**

#### **5.1 Características basales de los sujetos**

Las características generales y determinaciones bioquímicas de la cohorte estudiada se presentan en la Tabla 3. En primer lugar, clasificamos a los sujetos según su índice de masa corporal (IMC) en dos grupos: mujeres con Normopeso ( $n=18$ ) y mujeres con OM ( $n=56$ ), siendo estos grupos comparables en términos de edad ( $p=0,079$ ).

Por una parte, se observó como las pacientes con OM presentaron niveles significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) de glucosa en ayunas, insulina, de evaluación del modelo de homeostasis de Insulino-Resistencia (mediante la calculadora HOMA2-IR), hemoglobina glucosilada (Hb1Ac), triglicéridos y colesterol total que las mujeres con Normopeso.

El colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDLc) presentó una disminución más significativa en el grupo de mujeres con OM que en el grupo de normopeso ( $p < 0,05$ ). Así como los niveles de Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT) y Fosfatasa alcalina (ALP) fueron más elevados en pacientes con OM en comparación con los de normopeso ( $p < 0,05$ ).

Variables	Normopeso (n = 18)	OM (n = 56)		EHGNA (n = 36)	
		HN (n = 20)	EHGNA (n = 36)	SS (n = 17)	EHNA (n = 19)
Edad (años)	43,50 ± 6,73	44,54 ± 10,02	48 ± 9,79	46,19 ± 10,78	49,63 ± 8,78
Peso (kg)	54,2 (51 - 65,43)a	115,5 (41,54 - 50,79)	119,5 (109 - 129,75)	120 (109,80 - 134)	119 (107 - 123)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21,97 (20,79-24,08)a	46,41 (41,53 - 50,79)	46,5 (44,03 - 51,69)	46,87 (43,03 - 56,09)	46,2 (44,26 - 48,59)
Cintura (cm)	71,5 (68,5 - 82,5)a	125,25 (115 - 144)	130 (124 - 136,5)	133 (124 - 137)	129 (122,75 - 133)
Glucosa (mg/dL)	90 (84,5 - 98,50)a	83 (76 - 95)	116 (103 - 152)b	115,5 (101,50 - 139,25)c	116 (103 - 152)d
Insulina (mUI/L)	7,8 (4,90 - 10,06)a	11 (7,31 - 14,03)	16,31 (10,69 - 24,26)b	17,6 (10,60 - 25,4)	15,24 (10,78 - 22,50)d
HOMA2-IR	1,05 (0,60 - 1,30)a	1,15 (0,90 - 1,65)	2,3 (1,45 - 3,4)b	2,65 (1,30 - 3,45)	2 (1,50 - 3,20)d
HbA1c (%)	5 (4,6 - 5,3)a	5 (4,6 - 5,3)	5,5 (5 - 6,5)b	5,8 (5 - 6,2)c	5,1 (4,9 - 6,6)
Colesterol (mg/dL)	197,59 ± 30,21a	166,60 ± 29,64	181,14 ± 34,12	177,25 ± 36,29	184,42 ± 32,81
cHDL (mg/dL)	64 (49,75 - 73)a	48 (40 - 57)	38,10 (35,75 - 43,25)b	36,5(29 - 41,05)c	41 (36,75 - 44)d
cLDL (mg/dL)	114,46 ± 28,85	89,61 ± 25,27	107,01 ± 29,12b	105,49 ± 30,69	108,53 ± 28,38 d
Triglicéridos (mg/dL)	85 (52,5 - 169,25)a	124 (75 - 167)	162 (122,50 - 239)b	168 (109,37- 243,75)	160 (124 - 239)
AST (UL/L)	19,5 (15,25 - 22,50)a	21 (18,25 - 26,25)	32 (24,75 - 54)b	31,5 (25,25 - 54) c	36,5 (20,50 - 52,50)d
ALT (UI/L)	15 (11,50 - 20,50)a	18,5 (16 - 27,25)	35 (27 - 53)b	33 (27,50 - 51,25) c	37 (24 - 62)d
GGT (UI/L)	11 (9 - 21)a	17 (10,50 - 26)	27,5 (15,75 - 43)b	30 (16 - 41)	25 (15 - 66)
ALP (UI/L)	55,71 ± 14,67a	60,33 ± 11,49	70,80 ± 15,71b	68,87 ± 15,58c	72,51 ± 16,07 d

**Tabla 3:** Variables de estudio antropométricas y bioquímicas clasificadas según el IMC y la clasificación histopatológica hepática.

OM, Obesidad mórbida; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; HN: hígado normal; SS, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; HOMA2-IR, método de evaluación del modelo homeostático 2 de la resistencia a la insulina; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDLc, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDLc, colesterol de lipoproteínas de baja densidad; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; ALP, fosfatasa alcalina. Los datos se expresan como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), según la distribución de las variables. (a) Existen diferencias significativas entre Normopeso y pacientes con OM ( $p < 0,05$ ). (b) Existen diferencias significativas entre pacientes con HN y EHGNA ( $p < 0,05$ ). (c) Existen diferencias significativas entre pacientes con HN y SS ( $p < 0,05$ ). (d) Existen diferencias significativas entre pacientes con HN y EHNA ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, clasificamos a las pacientes con OM de acuerdo con su clasificación histopatológica hepática como Hígado normal/sano (n=20) o EHGNA (n=36). Se encontró que los niveles de glucosa, insulina, HOMA2-IR, Hb1Ac, colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDLc) y triglicéridos aumentaron de manera significativa en sujetos con EHGNA en relación a sujetos con un hígado normal ( $p < 0,05$ ). Por último, cabe señalar que las enzimas hepáticas, AST, ALT y ALP tuvieron un valor más elevado en pacientes con EHGNA ( $p < 0,05$ ).

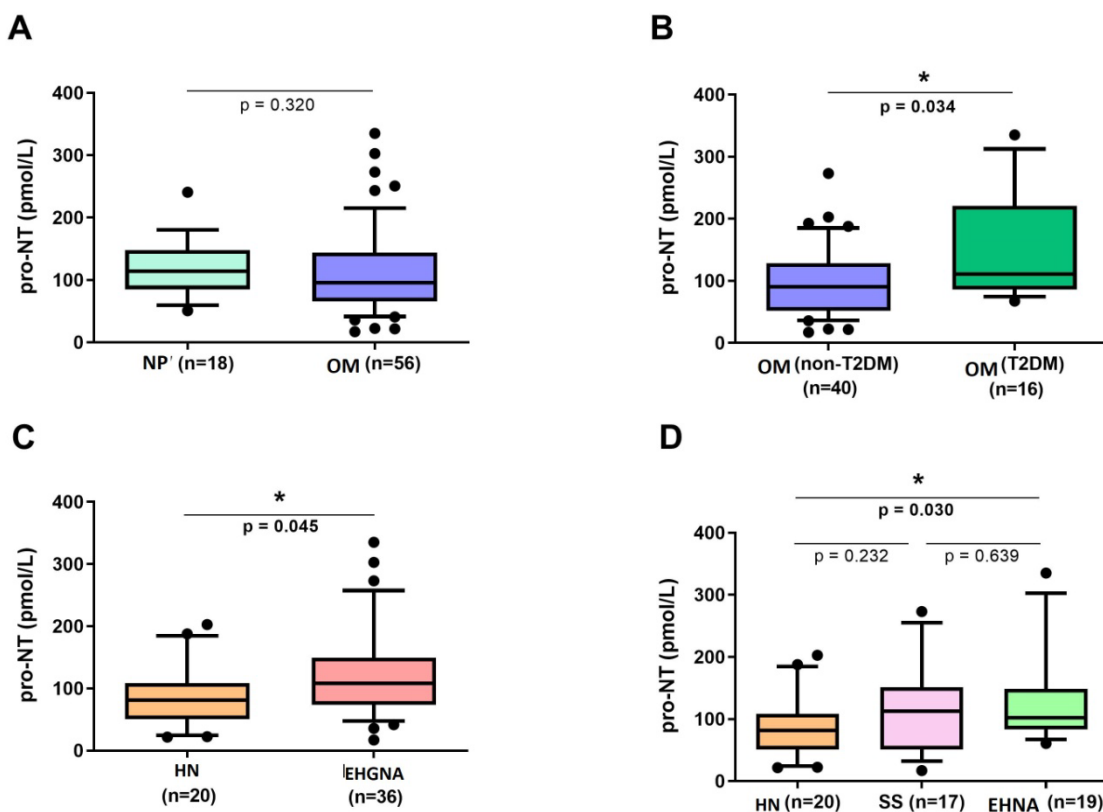
## 5.2. Niveles circulantes de Pro-neurotensina en la cohorte estudiada

En primer lugar, estudiamos los niveles de pro-NT en mujeres con OM y mujeres con normopeso, pero no encontramos diferencias significativas, como se muestra en la Figura 5A. Posteriormente, determinamos las diferencias en los niveles de pro-NT entre las pacientes diabéticas y no diabéticas

con OM, objetivándose niveles más altos de pro-NT en las pacientes diabéticas, como se muestra en la Figura 5B. Finalmente, cuando estudiamos las diferencias en los niveles de pro-NT entre diabéticas y no diabéticas en la cohorte con OM y EHGNA, no encontramos diferencias significativas ( $p=0,133$ ).

También se analizaron las posibles diferencias en los niveles de pro-NT según la presencia o ausencia de EHGNA. En este análisis, encontramos niveles significativamente más elevados de pro-NT en mujeres con OM y EHGNA que en mujeres con obesidad mórbida sin EHGNA, como se muestra en la Figura 5C.

Además, para estudiar el posible papel de la pro-NT en la progresión de EHGNA, la cohorte con obesidad mórbida se clasificó en Hígado Normal (HN), Esteatosis simple (SS) y Esteatohepatitis (EHNA). En este sentido, encontramos diferencias significativas entre el grupo HN y NASH. No obstante, no encontramos diferencias entre los sujetos HN y SS ni entre los grupos SS y EHNA, como se muestra en la Figura 5D.



**Figura 5:** (A) Niveles séricos de pro-NT en mujeres con Normopeso (NP) y mujeres con OM. (B) Niveles séricos de pro-NT en mujeres diabéticas con OM y mujeres no diabéticas con OM. (C) Niveles séricos de pro-NT en mujeres con OM e Hígado normal frente a EHGNA. (D) Niveles séricos de pro-NT en mujeres con OM con HN frente a SS frente a EHNA.

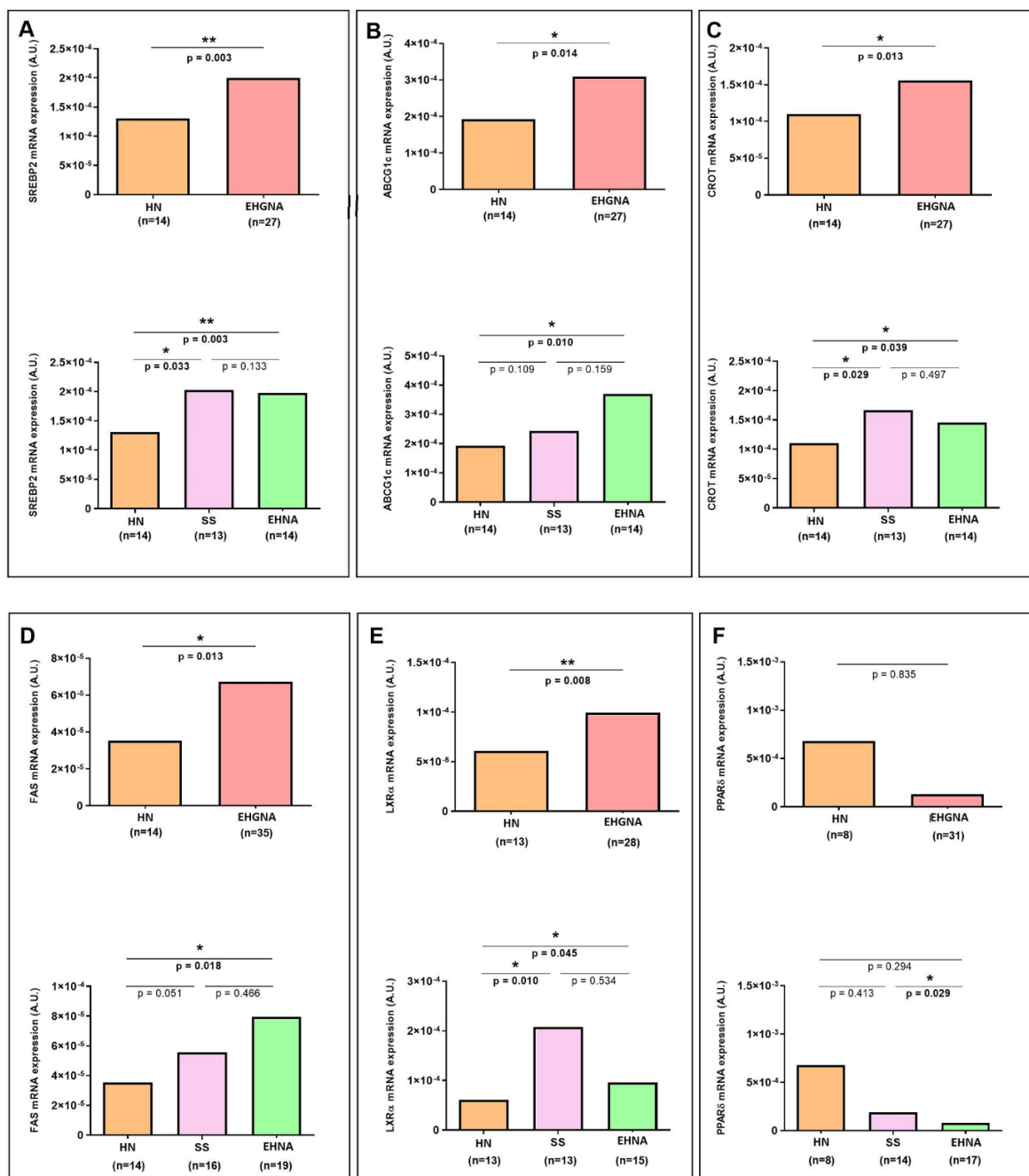
NP: normopeso; OM, obesidad mórbida; HN; hígado normal; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; SS, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativo.

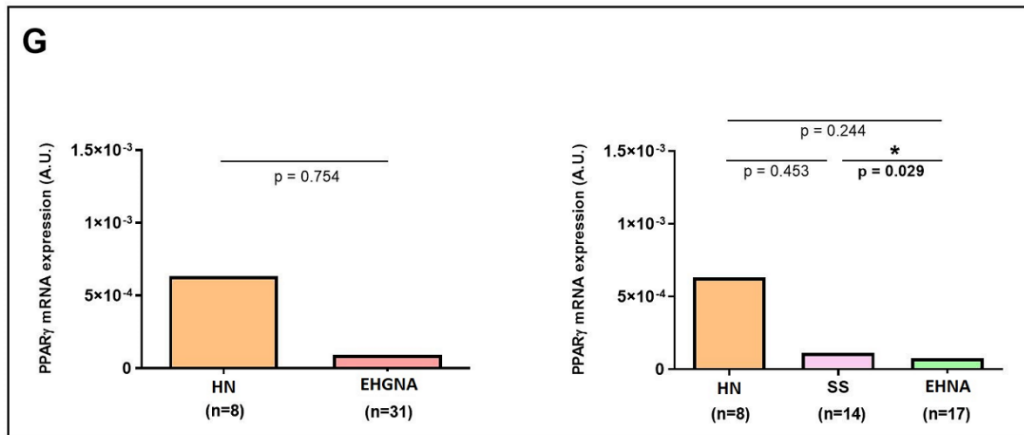
Dado que los niveles de pro-NT pueden verse afectados por el uso de fármacos antidiabéticos, nuestro objetivo fue determinar si existían niveles diferenciales de pro-NT entre aquellos pacientes con o sin medicación antidiabética, pero no se encontraron diferencias significativas en la cohorte de obesidad mórbida ( $p=0,267$ ) o en la cohorte EHGNA ( $p=0,198$ ). En cuanto al tratamiento de la dislipemia, no hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de pro-NT en aquellos pacientes con o sin

tratamiento hipolipemiante en ninguna cohorte de pacientes (cohorte de obesidad mórbida [p=0,864] y cohorte de EHNA [p=0,412]).

### 5.3. Expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo de los lípidos hepáticos

Dado que NT y pro-NT parecen guardar relación con la absorción grasa en el intestino delgado, y la infiltración y acumulación en el tejido hepático, primero quisimos analizar la expresión hepática de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos hepáticos SREBP1c, SREBP2, ABCG1c, ABCA1, ACC1, CPT1A, CROT, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FAS, LXR $\alpha$ , FXR y FABP en función de la presencia o ausencia de EHNA y la clasificación histopatológica del hígado. Posteriormente, se analizará si estas expresiones guardan relación con la pro-NT. Cabe señalar que encontramos diferencias significativas en la expresión de mRNA de los genes SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ , como se muestra en la Figura 6.





**Figura 6:** Diferencia de la expresión en hígado de ARNm de SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  entre los grupos HN frente a EHGNA y entre los grupos HN, SS y EHNA.

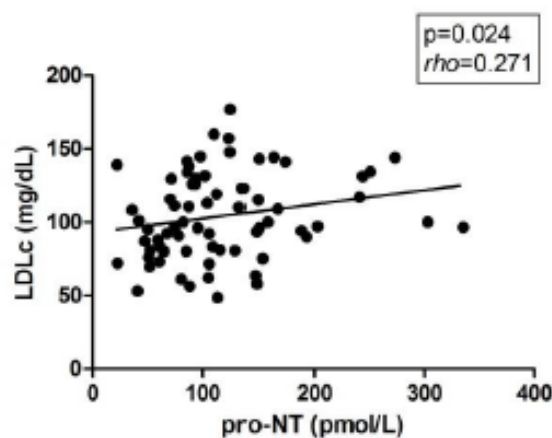
HN; hígado normal; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; SS, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; SREBP2, proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 2; ABCG1c, transportador del cassette de unión a ATP miembro 1c de la subfamilia G; CROT, carnitina O-octanoiltransferasa; FAS, ácido graso sintasa; LXR $\alpha$ , receptor X alfa del hígado; PPAR $\delta$ , receptor de peroxisoma-proliferador activado delta y PPAR $\gamma$ , receptor de peroxisoma-proliferador activado gamma.  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

#### 5.4 Correlaciones de los niveles de pro-NT con parámetros bioquímicos y clínicos y con la expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo de los lípidos en el hígado

Por el hecho de encontrar diferencias en los niveles de pro-NT según la presencia de EHGNA, decidimos determinar si existía una relación entre los niveles circulantes de pro-NT y la inflamación lobulillar o, la presencia de balonización hepática; pero no se encontró ninguna correlación significativa ( $[rho=0,190; p=0,157]$  y  $[rho=0,173; p=0,199]$ , respectivamente).

Como hemos mencionado anteriormente, dado que se ha descrito una relación entre la pro-NT y la absorción de lípidos a nivel intestinal, también se analizó la existencia de algún tipo de asociación en este sentido entre los niveles plasmáticos de pro-NT y parámetros metabólicos lipídicos, así como con la expresión de mRNA de los principales genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático.

En cuanto a los parámetros bioquímicos que representan el metabolismo de los lípidos, encontramos una correlación positiva entre los niveles de pro-NT y los niveles de LDLc (Figura 7).



**Figura 7:** Correlación entre los niveles plasmáticos de pro-NT y LDLc. Pro-NT, pro-neurotensina; LDLc, colesterol de lipoproteínas de baja densidad.  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativo.

Finalmente, cuando analizamos la asociación de los niveles de pro-NT con la expresión hepática de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (SREBP1c, SREBP2, ABCG1c, ABCA1, ACC1, CPT1A, CROT, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FAS, LXR $\alpha$ , FXR y FABP), no encontramos ninguna correlación significativa.

## 6. Discusión

Este estudio ha tenido por objeto evaluar el rol del péptido NT en la patogénesis de la EHGNA (analizando los niveles de su precursor en lugar de la NT, dada su mayor estabilidad) en una cohorte de mujeres con EHGNA asociada a obesidad y, además, investigar su relación con el metabolismo lipídico. Los hallazgos más destacados indican que las mujeres con EHGNA asociada a OM presentaban niveles incrementados de pro-NT respecto a las mujeres con OM sin EHGNA. Además, los niveles de pro-NT fueron mayores en las pacientes con EHNA que en aquellas con hígado normal. A ello se ha de añadir que los niveles de pro-NT se correlacionaban de manera positiva con los niveles de colesterol LDL; sin embargo, no se encontró asociación con la expresión de RNA de los principales genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático.

Por otro lado, hemos de señalar que, en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de pro-NT en mujeres con normopeso y aquellas con OM, en línea con estudios previos [48]. Sin embargo, los pacientes con EHGNA demostraron niveles incrementados de pro-NT respecto a pacientes con OM en ausencia de EHGNA. Por tanto, la presencia de EHGNA, y no la presencia de obesidad, se asoció con niveles plasmáticos elevados de pro-NT. Estos resultados son similares a los de Barchetta et al. [49, 50] y de Mohamed et al. [51], aunque este último estudio se limita a calcular valores medios de pro-NT en controles sanos y pacientes de EHGNA para demostrar asociación sin analizar si existe relación entre los niveles de pro-NT y los distintos rangos de IMC para normopeso, sobrepeso y obesidad tanto en individuos sanos como pacientes de EHGNA. Además su cohorte incluyó individuos de diversas edades pertenecientes a ambos sexos en los dos grupos, y el diagnóstico de EHGNA para el grupo de pacientes de EHGNA se basó en la ecografía hepática y la analítica y no en la histopatología, todo lo cual puede haber introducido factores de confusión en el estudio.

En cuanto a las discrepancias de esta asociación entre pro-NT y EHGNA con la literatura científica previa, un estudio de 2017 demostró niveles disminuidos de NT en mujeres con OM y EHGNA [52]. Una posible explicación a este hallazgo puede tener que ver con la estabilidad de la pro-NT en plasma frente a la de su precursor. La NT tiene una vida media de 2-6 minutos en humanos [53, 54], por lo que no parece una molécula muy estable como marcador de enfermedad. La pro-NT, sin embargo, es mucho más estable, ya que según estudios *in vitro* permanece en suero y plasma al menos 48 horas a temperatura ambiente [54]. Sin embargo, como hemos apuntado ya, tanto los niveles de pro-NT [46] como los de NT se incrementan tras cirugía bariátrica [41, 42, 43], con efectos inhibidores sobre el apetito [46], quizá en respuesta a la merma en la capacidad de absorción grasa. Dada su vida media, la metabolización de la NT se producirá cerca del lugar en que se secreta, el intestino, de lo que se deduce que sus órganos diana han de ser el intestino y el hígado a través del eje hepato-intestinal. Se sabe que endopeptidasas como la 3.4.24.16 contribuyen a la degradación de la NT [55], y el nivel de éstas aparece incrementado en modelos animales de obesidad [56], lo que podría explicar los bajos niveles de NT en pacientes obesos respecto a la elevación de la pro-NT, y la normalización al alza de tanto la NT como su precursor tras cirugía bariátrica. En esta misma línea, se podría especular con que la metabolización de la NT se produce en parte a nivel hepático y que el mecanismo se encuentra alterado en la EHNA, motivando las diferencias que se observan en su presencia en plasma con respecto a su precursor. Sin embargo, el mecanismo de degradación de la NT en la EHNA no está descrito, por lo que son necesarios estudios en esa línea para arrojar más luz sobre estas diferencias

entre moléculas en pacientes de EHGNA. Por último, el rol anorexígeno de la NT en la neuromodulación del apetito no parece coherente con el incremento de los niveles de pro-NT en EHGNA descrito en el presente estudio y otros [49, 50, 51], ya que en principio debería promover la disminución de la ingesta con la consiguiente disminución en el consumo de grasas y carbohidratos. En este sentido, podría existir algún mecanismo de resistencia a la hormona a nivel cerebral, como ya se ha teorizado también en el caso de la leptina, que promueve la saciedad y sin embargo se encuentra elevada en EHGNA [57].

En cuanto a los niveles de pro-NT y su asociación con la histopatología de los distintos estadios de la EHGNA, se encontraron diferencias significativas entre los grupos con HN y EHNA. Sin embargo, no se describieron diferencias significativas entre los grupos con ES y EHNA, lo que sin embargo sí se había evidenciado en el estudio de Barchetta et al. [48]. Estas discrepancias podrían explicarse por las características diferenciales entre las poblaciones de ambos estudios, como pueden ser la edad, sexo e IMC. Además, no se halló asociación entre los niveles de pro-NT y la presencia de inflamación lobular o balonización hepática, como sí se pudo objetivar en el reciente estudio de Dongiovanni et al. [58]. Estos autores describieron también varias asociaciones entre diversas variantes genéticas de la NT y la fibrosis avanzada y el hepatocarcinoma en pacientes con EHGNA, lo que probablemente esté relacionado con la actividad proteica de la NT. Por todo lo señalado, algunos autores han considerado que la pro-NT es un péptido implicado en la patogénesis de la EHGNA/EHNA por medio de una absorción intestinal incrementada de lípidos y la inducción de condiciones pro-inflamatorias en el tejido adiposo [59].

Por último, el estudio también se centró en comprobar si la pro-NT influye en el metabolismo lipídico, dado que la NT puede incrementar la absorción intestinal de lípidos [49]. La única relación descrita fue una correlación positiva con el colesterol LDL. Este resultado concuerda con el estudio de Barchetta et al., donde también se describió una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de colesterol LDL y pro-NT [49]. Se ha de señalar que nuestras pacientes obesas no presentaban dislipemia severa; solo 15 de las pacientes presentaban dislipemia leve, y 9 de ellas seguían tratamiento con estatinas. Además, nuestras pacientes con OM se sometieron a una dieta muy hipocalórica tres meses antes de pasar por quirófano, mientras que las pacientes con normopeso seguían una dieta normal, lo que condicionó que las pacientes con OM presentaran niveles de colesterol LDL inferiores a los de las pacientes con normopeso. La correlación entre el colesterol LDL y la pro-NT se puede explicar porque en las pacientes con OM, a medida que la EHGNA progresa, los niveles de pro-NT se incrementan, promoviendo la absorción intestinal de lípidos y provocando un incremento en los niveles de colesterol LDL en plasma.

Al analizarse la expresión hepática de determinados genes relacionados con el metabolismo lipídico, encontramos distinta expresión de los genes SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , y PPAR $\gamma$  en nuestra cohorte de pacientes con OM con o sin EHGNA. En este sentido, nuestras pacientes de EHGNA mostraron niveles de expresión incrementado de los genes SREBP2 y ABCG1 implicados en la secreción de lipoproteínas, y de CROT y FAS, que se relacionan con la oxidación grasa y la acumulación de grasa hepática [60, 61]. Asimismo, nuestras pacientes de EHGNA mostraron niveles disminuidos de PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ , que se había relacionado con anterioridad con un incremento de la sensibilidad a la insulina [62]. Cuando evaluamos la posible relación entre la pro-NT y la expresión hepática de estos genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático, no encontramos asociación alguna. En este sentido, el estudio de Barchetta et al. [50] mostró que los niveles plasmáticos de pro-NT se asociaban con niveles elevados de TG tras ajustar para múltiples factores de confusión [48].

Es importante señalar que, aunque nuestra población de estudio nos permitió establecer una relación clara entre mujeres con OM y EHGNA y alteración de los niveles de pro-NT sin la interferencia de

factores de confusión, como son la edad o el sexo, estos resultados no son extrapolables a hombres, mujeres de otras edades, individuos con otros grados de obesidad o individuos con normopeso. Había mujeres en nuestra cohorte en tratamiento con antidiabéticos orales o hipolipemiantes, que son medicamentos con efectos potenciales sobre el transporte de la bilis y que se ha demostrado que pueden afectar a la secreción de otros péptidos intestinales [63]. Por esta razón, se estudió el efecto de tales tratamientos en los niveles de pro-NT pero no se hallaron diferencias significativas entre las pacientes sometidas a estas terapias y las que no las seguían.

## 7. Conclusiones

Nuestro estudio confirma que los niveles de pro-NT se elevan en EHGNA/EHNA y que existe asociación entre los niveles de pro-NT y los niveles de colesterol LDL. Por tanto, aunque son necesarios nuevos estudios para confirmar el rol de la pro-NT en la progresión de la EHGNA y para evaluar esta molécula como posible diana terapéutica, parece demostrada su relación con el desarrollo de esta enfermedad tan prevalente.

## 8. Bibliografía

1. Romero-Gómez M. Esteatohepatitis no alcohólica. *Med Clin (Barc)*. 2022;159(8):388-95.
2. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
3. Younossi Z & Henry L. Non-alcoholic Steatohepatitis: Global Impact and Clinical Consequences. *EMJ Hepatol*. 2022;10(1):74-83.
4. Hagström H et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol*. 2017;67(6):1265-73.
5. Reddy YK et al. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a study with paired liver biopsies. *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10(3):245-54.
6. Wong VW et al. Disease progression of nonalcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010;59(7):969-74.
7. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 Apr;13(4):643-54.e1-9; quiz e39-40.
8. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, Wai-Sun Wong V, Yilmaz Y, George J, Fan J, Vos MB. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019 Jun;69(6):2672-82.
9. Paik JM et al. Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescents and young adults. *Hepatology*. 2022;75(5):1204-17.
10. Lazo M et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 2013;178(1):38-45.

11. Balakrishnan M, Patel P, Dunn-Valadez S, Dao C, Khan V, Ali H, El-Serag L, Hernaez R, Sisson A, Thrift AP, Liu Y, El-Serag HB, Kanwal F. Women Have a Lower Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease but a Higher Risk of Progression vs Men: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jan;19(1):61-71.e15.
12. Estudio multicéntrico NASH Registry. (n.d.). [www.sepd.es](http://www.sepd.es)
13. Sanyal AJ et al. Prospective study of outcomes in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2021;385:1559-69.
14. 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. *J Clin Med*. 2022 Aug 31;11(17):5144.
15. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, Qiu Y, Burns L, Afendy A, Nader F. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol*. 2019;71:793-801.
16. Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, Targher G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2018;41:372-82.
17. Ziolkowska S, Binienda A, Jabłkowski M, Szemraj J, Czarny P. The Interplay between Insulin Resistance, Inflammation, Oxidative Stress, Base Excision Repair and Metabolic Syndrome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 15;22(20):11128.
18. Day CP, James OLW. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998;114:842-5.
19. Luo Y, Lin H. Inflammation initiates a vicious cycle between obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Immun inflammation Dis*. 2021;(Sep 2020):59-73.
20. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52:1836-46.
21. Brea A., Puzo J. Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico y enfermedad cardiovascular. *Clin Invest en Ateroscl*. 2010;22869:259-71.
22. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids*. 2011;2011:783976.
23. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett*. 2007;112(2):61-7.
24. 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. *World J Gastroenterol*. 2022 Jul 7;28(25):2890-9.
25. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43:1317-25.
26. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score. A non invasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.

27. Caballería Rovir L, Majeed I, Martínez Escudé A, Arteaga Pillasagua I, Pere Torán M. Esteatosis hepática: diagnóstico y seguimiento. *FMC*. 2017;24(7):378-89.
28. Graffigna M, Catoira N, Soutelo J, Azpelicueta A, Berg G, Perel C, Migliano ME, Aranguren M, Musso C, Farias J. Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 2017;54(1):37-46.
29. Li Q, Dhyani M, Grajo JR, Sirlin C, Samir AE. Current status of imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2018 Aug 27;10(8):530-42.
30. Wong VW, Zelber-Sagi S, Cusi K, Carrieri P, Wright E, Crespo J, & Lazarus JV. Management of NAFLD in primary care settings. *Liver International*. 2022;42(11):2377-89.
31. Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, Ibdah JA. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Mar;294(3):G619-26.
32. Li Y, Liu L, Wang B, Wang J & Chen D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomedical Reports*. 2013;1(1):57-64.
33. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratziu V, Sanyal AJ, Sejling AS, Harrison SA; NN9931-4296 Investigators. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2021 Mar 25;384(12):1113-24.
34. Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, Leteurtre E, Arnalsteen L, Hollebecque A, Louvet A, Dharancy S, Cocq P, Jany T, Boitard J, Deltenre P, Romon M, Pattou F. The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1617-24.
35. Kitabgi P, Carraway R, Leeman SE. Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem* 1976; 251:7053-8.
36. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122: 542-9.
37. Kitabgi P. Prohormone convertases differentially process pro-neurotensin/ neuromedin N in tissues and cell lines. *J Mol Med* 2006;84:628-34
38. Mustain WC, Rychahou PG, Evers BM. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18:75-82.
39. Blackburn AM, Fletcher DR, Bloom SR, et al. Effect of neurotensin on gastric function in man. *Lancet* 1980;1:987-9.
40. Schroeder LE, Leininger GM. Role of central neurotensin in regulating feeding: Implications for the development and treatment of body weight disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Mar;1864(3):900-16.
41. Weiss H, Labeck B, Klocker J, et al. Effects of adjustable gastric banding on altered gut neuropeptide levels in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2001;11: 735-9.

42. Näslund E, Melin I, Grybäck P, et al. Reduced food intake after jejunoileal bypass: a possible association with prolonged gastric emptying and altered gut hormone patterns. *Am J Clin Nutr* 1997;66:26-32.
43. Sarson DL, Scopinaro N, Bloom SR. Gut hormone changes after jejunoileal (JIB) or biliopancreatic (BPP) bypass surgery for morbid obesity. *Int J Obes* 1981;5:471-80.
44. Li J, Song J, Zaytseva YY, et al. An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet induced obesity. *Nature* 2016;533:411-15.
45. Melander O, Maisel AS, Almgren P, et al. Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA* 2012;308:1469-75.
46. Christ-Crain M, Stoeckli R, Ernst A, Morgenthaler NG, Bilz S, Korbonits M, Struck J, Bergmann A, Müller B, Keller U. Effect of gastric bypass and gastric banding on proneurotensin levels in morbidly obese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91(9):3544-7.
47. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, et al. Diseño y validación de un sistema de puntuación histológica para la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *hepatología* 2005;41:1313-21.
48. Barchetta I, Bertocchini L, Sentinelli F, Bailetti D, Marini G, Cimini FA, Ceccarelli V, Struck J, Schulte J, Loche S, Cossu E, Melander O, Cavallo MG, Baroni MG. Circulating pro-neurotensin levels predict bodyweight gain and metabolic alterations in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2021 Mar 10;31(3):902-10.
49. Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, Bertocchini L, Ceccarelli V, Chiappetta C, Leonetti F, Di Cristofano C, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Neurotensin Is a Lipid-Induced Gastrointestinal Peptide Associated with Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nutrients*. 2018 Apr 23;10(4):526.
50. Barchetta I, Cimini FA, Leonetti F, Capoccia D, Di Cristofano C, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Increased Plasma Proneurotensin Levels Identify NAFLD in Adults With and Without Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Jun 1;103(6):2253-60.
51. Mohamed AA, Abo-Elmatty DM, Ezzat O, Mesbah NM, Ali NS, Abd El Fatah AS, Alsayed E, Hamada M, Hassnine AA, Abd-Elsalam S, Abdelghani A, Hassan MB, Fattah SA. Pro-Neurotensin as a Potential Novel Diagnostic Biomarker for Detection of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2022 Jun 22;15:1935-43.
52. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, Martínez S, Sabench F, Aguilar C, Villar B, Sirvent JJ, Del Castillo D, Richart C. Low Circulating Levels of Neurotensin in Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Severe Obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2018 Feb;26(2):274-8.
53. Leeman SE, Carraway RE. Neurotensin: discovery, isolation, characterization, synthesis and possible physiological roles. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;400:1-16.
54. Ernst A, Hellmich S, Bergmann A. Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation. *Peptides*. 2006;27:1787-93.

55. Barelli H, Fox-Threlkeld JE, Dive V, Daniel EE, Vincent JP, Checler F. Role of endopeptidase 3.4.24.16 in the catabolism of neurotensin, in vivo, in the vascularly perfused dog ileum. *Br J Pharmacol.* 1994 May;112(1):127-32.
56. Cavalcanti DM, Castro LM, Rosa Neto JC, Seelaender M, Neves RX, Oliveira V, Forti FL, Iwai LK, Gozzo FC, Todiras M, Schadock I, Barros CC, Bader M, Ferro ES. Neurolysin knockout mice generation and initial phenotype characterization. *J Biol Chem.* 2014 May 30;289(22):15426-40.
57. Martín-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez-Ridruejo J, García-Buey L, & Moreno-Otero R. Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 2013;105(7):409-20.
58. Dongiovanni P, Meroni M, Petta S, Longo M, Alisi A, Soardo G, Valenti L, Miele L, Grimaudo S, Pennisi G, Antonio G, Consonni D, Fargion S, Fracanzani AL. Neurotensin up-regulation is associated with advanced fibrosis and hepatocellular carcinoma in patients with MAFLD. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020 Oct;1865(10):158765.
59. Okubo H, Kushiyama A, Nakatsu Y, Yamamotoya T, Matsunaga Y, Fujishiro M, Sakoda H, Ohno H, Yoneda M, Asano T. Roles of Gut-Derived Secretory Factors in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Their Possible Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 8;19(10):3064.
60. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 6;107(27):12228-32.
61. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martí A, Martínez S, Sabench F, Hernández M, Aguilar C, Sirvent JJ, Del Castillo D, Richart C. miR33a/miR33b\* and miR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 24;17(10):1620.
62. Azhar S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Future Cardiol.* 2010;6:657-91.
63. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, Baker D, Van Horn S, Thomas E, Rajpal D, Spivak A, Brown JR, Nunez DJ. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2014 Jul 2;9(7):e100778.

## ANEXO

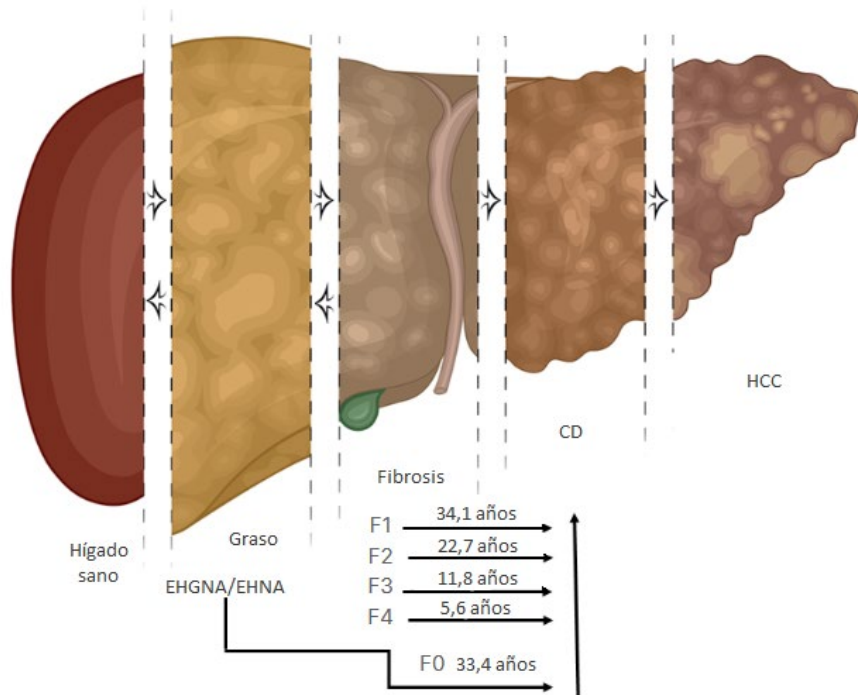


Figura 1: Progresión de la fibrosis en la EHNA (adaptado de [3])

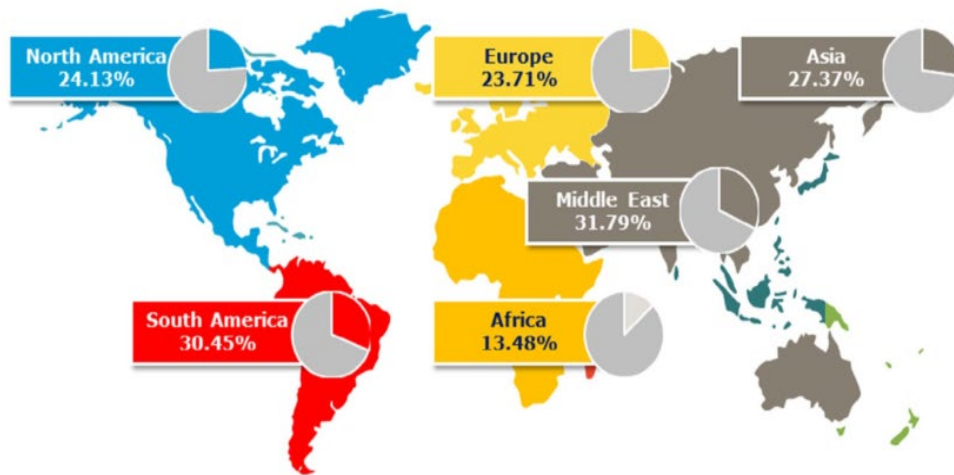
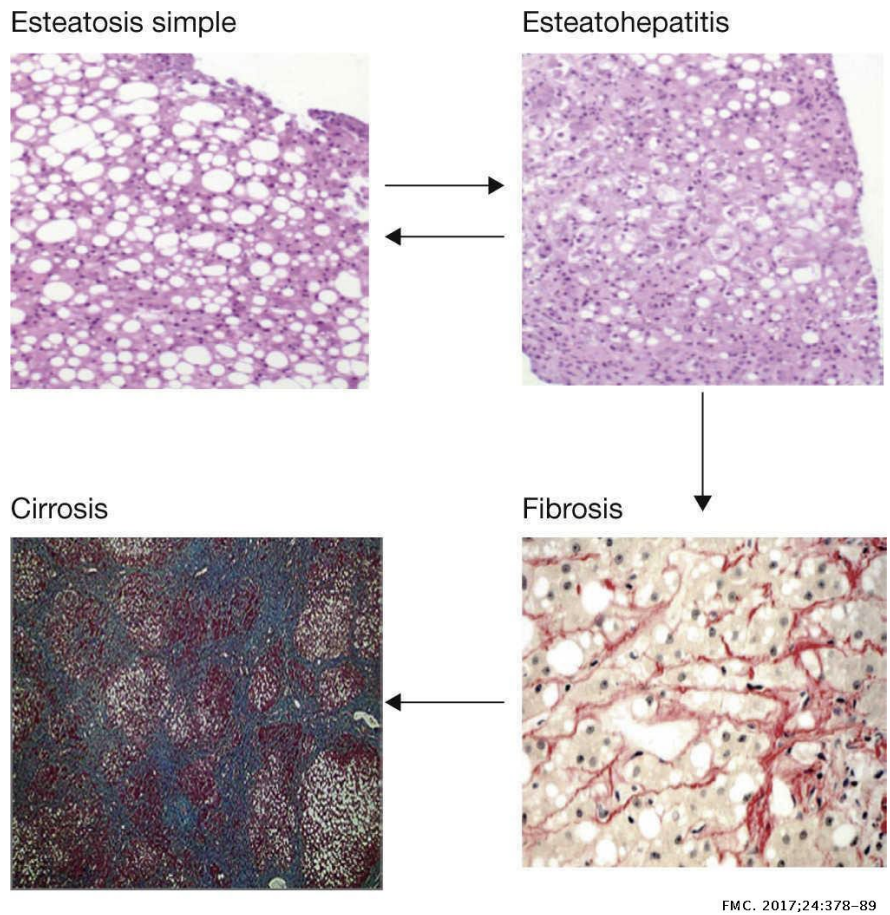
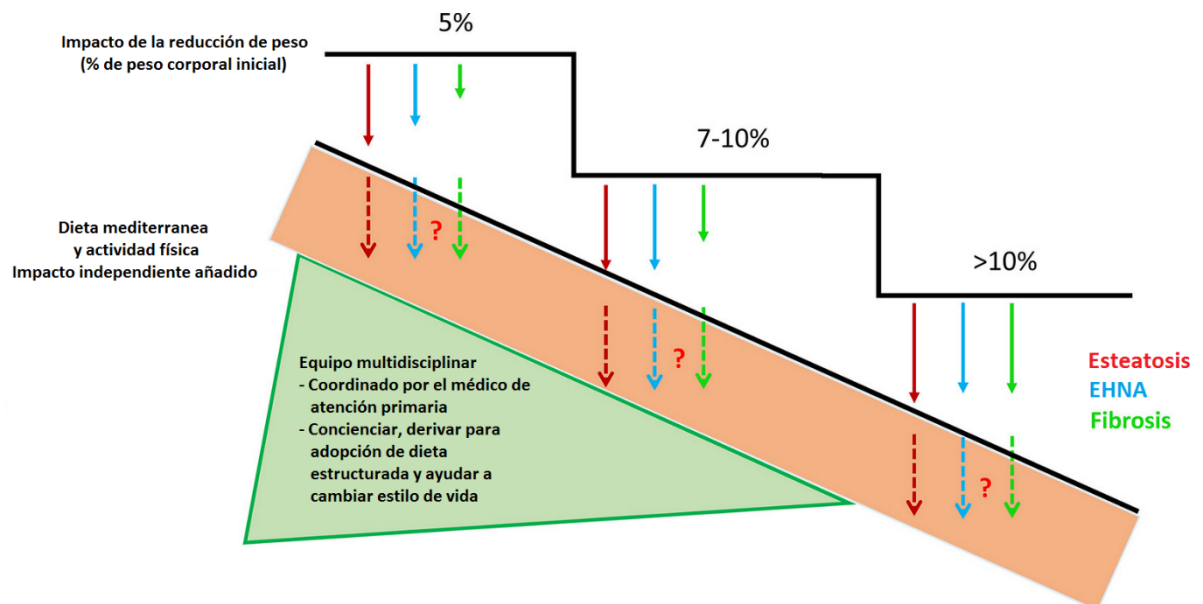


Figura 2: Prevalencia global de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) en 2018 (En: [8])



**Figura 3:** Lesiones histológicas en la EHGNA (En: [27])



**Figura 4:** Efecto dosis-respuesta de la dieta y pérdida de peso en las diferentes etapas de la EHGNA (En: [30] nuestra traducción)