



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Cambios morfofuncionales en un
modelo animal experimental de
enfermedad hepática por hígado
graso no alcohólico tras tratamiento
con cirugía bariátrica versus
dieta hipocalórica**

Tesis Doctoral
Eider Talavera Urquijo

Barcelona 2018

"E pur si muove"

Galileo Galilei (1564-1642)

A mi familia, por toda una vida.

A Piero, por seguir a mi lado.

*A mis maestros Koldo Pérdigo y Gaizka Errazti,
por todo lo enseñado, por todo lo vivido.*

Eternamente agradecida...



Universitat Autònoma de Barcelona

CAMBIOS MORFOFUNCIONALES EN UN MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD HEPÁTICA POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO TRAS TRATAMIENTO CON CIRUGÍA BARIÁTRICA VERSUS DIETA HIPOCALÓRICA

Doctoranda: Eider Talavera Urquijo

Directores:

Dr. Jose M. Balibrea

Dra. María Martell

Dr. Salvador Augustin

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis Dr. Jose M. Balibrea, Dra. María Martell y Dr. Salvador Augustin, por guiarme paso a paso en esta aventura, enseñarme tantísimo, darme todo el apoyo necesario y haber tenido la paciencia para que finalmente este trabajo fuera posible.

Del mismo modo quiero agradecer especialmente a Jose M. Balibrea y a Marc Beisani su confianza ciega ya desde los inicios de esta andadura, cuando no tenía más que ilusión para ofrecerles.

Por supuesto, este trabajo hubiera sido imposible sin la presencia, la habilidad y las horas (y horas) de Manel Cremades, Anna García y Sergi Recasens. De igual forma, la pasión, la dedicación y la perfección de Sarai Rodríguez ha sido clave para poder culminar este proyecto, y le doy infinitas gracias por su ayuda. También quiero agradecer enormemente a Aisha Chakkur y a Marc Arús el tiempo y esfuerzo empleados en el laboratorio. Y en general, a todo el equipo de “Malalties Hepàtiques” del VHIR (Vall d’Hebron Institut de Recerca), por su simpatía y buena acogida el tiempo que hemos pasado juntos. También especial agradecimiento a la Dra. Mayte Salcedo, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d’Hebron, por el análisis uno a uno de la infinidad de muestras al microscopio.

No quiero dejar de agradecer a mis compañeros residentes de estos últimos cuatro años la ayuda que me han dado siempre que la he necesitado. También gracias a los Servicios de Cirugía General y Aparato Digestivo y de Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital Vall d’Hebron, por facilitarme el tiempo para poder seguir trabajando en este proyecto.

Quiero también dejar escrito mi agradecimiento especial, con todo mi cariño, al “equipo”, que de algún u otro modo me ha dado las fuerzas para seguir día a día con el trabajo y la vida en general (a veces dura) en Barcelona, aún estando en la distancia: Patricia Mifsut (Patritxuli), Fernando Jiménez (“Fernandisco”), Lourdes Gorospe (mi “amatxu de quirófano”), Charo y Maite (“las Santander”), Nere, Olatzu y Anita.

Finalmente, termino mis agradecimientos con las razones reales que motivaron iniciar este proyecto. Todo ello nace de la necesidad de agradecer a cada uno de los miembros de mi familia que ha formado parte de mi desarrollo y crecimiento como persona, de ellos en especial a mis padres, Jose Mari Talavera e Idoia Urquijo, y a mi hermana, Garazi Talavera. También a quienes considero mi modelo a seguir, quienes han compartido su experiencia conmigo rato a rato “en el campo de batalla” y poco a poco me contagiaron el amor por esta profesión; mis maestros Koldo Pérdigo y Gaizka Errazti. A todos ellos les debo lo que soy y el hecho de haber llegado hasta aquí; no se si lejos o no, pero a cada paso que doy en el camino intento agradecerles lo mucho que han hecho por mí. Este trabajo es por ellos y para ellos; es un intento de devolverles al menos un pedacito de todo lo que me dieron.

“Eskerrik asko bihotz-bihotzez...”

RESUMEN

La enfermedad por hígado graso no alcohólico o NAFLD es la primera causa de enfermedad hepática crónica a nivel mundial. Es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico, y en su etiopatogenia participan diversos factores que aún no se conocen por completo (dietéticos, metabólicos, genéticos, medioambientales, inmunológicos e incluso microbiológicos, entre otros).

Actualmente no existe tratamiento definitivo conocido, siendo la pérdida de peso mediante dieta y ejercicio lo que por el momento se recomienda para su tratamiento. En relación a esto, en los últimos años se propone la cirugía bariátrica como posible terapia debido a su éxito en la pérdida de peso a largo plazo. Existen datos que demuestran la mejoría del NAFLD tras cirugía bariátrica, los cuales se extraen a partir de estudios observacionales que analizan fundamentalmente los cambios analíticos e histológicos en los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica y al mismo tiempo enfermos por NAFLD. Sin embargo, no existen aún ensayos clínicos randomizados ni evidencia suficiente que avale estos efectos en la enfermedad por hígado graso, y en opinión de las últimas guías, aún es pronto para considerar a la cirugía bariátrica como tratamiento establecido para el NAFLD.

Este trabajo, a partir de un modelo animal de enfermedad por NAFLD creado en ratas alimentadas con una fórmula de dieta rica en grasas, pretende añadir información a la ya existente acerca de la enfermedad y su tratamiento. En él se han querido evaluar los cambios propios de la enfermedad a un nivel bioquímico, histológico, hormonal, molecular y de expresión génica, y analizar después cuáles son los efectos de la cirugía bariátrica en comparación al tratamiento estándar actual, la dieta hipocalórica, a todos estos niveles.

De él se puede extraer que la cirugía bariátrica, concretamente la técnica de la gastrectomía vertical o "sleeve gastrectomy" (SG), es superior a la dieta hipocalórica para el tratamiento de fases iniciales de NAFLD. Su superioridad radica en una mayor pérdida de peso, reversión de signos histopatológicos de la enfermedad, mejoría del daño endotelial sinusoidal hepático, disminución de hiperleptinemia e insulinoresistencia, y también reducción del riesgo cardiovascular mediante la disminución del colesterol total, los triglicéridos en plasma y la mejoría global del NAFLD en sí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	14
TABLAS Y FIGURAS	17
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	23
1.2. NAFLD Y SU RELACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO LA OBESIDAD Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR	27
1.2.1. <i>Síndrome Metabólico</i>	27
1.2.2. <i>Obesidad</i>	29
1.2.3. <i>Riesgo cardiovascular</i>	29
1.3. ETIOPATOGENIA	30
1.3.1. <i>El efecto de la obesidad, el síndrome metabólico y la insulinoresistencia en el hígado</i>	32
1.3.2. <i>El tejido adiposo, órgano endocrino en la enfermedad por NAFLD</i>	33
1.3.3. <i>El hipotálamo, centro regulador implicado en la enfermedad por NAFLD</i>	37
1.3.4. <i>La creciente importancia de la microbiota, los ácidos biliares y el circuito enterohepático en la enfermedad por NAFLD</i>	38
1.3.5. <i>La influencia de la dieta, factor externo precursor de la enfermedad por NAFLD</i>	39
1.3.6. <i>Agregación familiar, genética y epigenética en la enfermedad por NAFLD</i>	41
1.4. TRATAMIENTO	45
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL	57
2.1. HIPÓTESIS	57
2.2. OBJETIVO	57
2.3. METODOS	57
2.3.1. <i>Animales</i>	57
2.3.2. <i>Modelo experimental</i>	58
2.3.3. <i>Dietas</i>	60
2.3.4. <i>Cirugías</i>	61
2.3.5. <i>Recogida de muestras</i>	63
2.3.6. <i>Análisis de datos</i>	64

2.3.6.1. Marcadores bioquímicos, hormonales y de inflamación en plasma	64
2.3.6.2. Histología	65
2.3.6.3. Marcadores de daño endotelial, inflamación, activación de HSC y fibrosis en tejido hepático	67
2.3.7. <i>Análisis estadístico</i>	73
3. RESULTADOS	77
3.1. EVOLUCIÓN DEL PESO	77
3.2. BIOQUÍMICA GENERAL, HORMONAS E INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN PLASMA	79
3.3. HISTOLOGÍA	82
3.4. DAÑO ENDOTELIAL	84
3.5. MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN TEJIDO HEPÁTICO	86
3.6. ACTIVACIÓN DE HSCs Y FIBROGÉNESIS	87
4. DISCUSIÓN	93
5. CONCLUSIONES	103
6. PROYECTOS FUTUROS	107
7. ANEXOS	111
8. REFERENCIAS	125
9. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES	145

ABREVIATURAS

17 β -HSD13	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 13
α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
AGEs	advanced glycation end-products
ALP	fosfatasa alcalina
ALT	alanin-transaminasa
AST	aspartato-transaminasa
AgRP	agouti-related peptide
CART	cocaine and amphetamine regulated transcript
Col1A1 o Col1	collagen type I alpha 1 chain
CRP	C-reactive protein
DM2	diabetes mellitus 2
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAmit	DNA mitochondrial
DNL	<i>de novo</i> lipogenesis
ECV	enfermedad cardiovascular
EDCs	endocrine-disrupting chemicals
ER	endoplasmic reticulum
ERC	enfermedad renal crónica
FA	fosfatasa alcalina
FFA	free fatty acids
FXR	farnesoid X receptor
GH	growth hormone
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLUT2	glucose transporter type 2
GLUT4	glucose transporter type 4
HDL	high-density lipoprotein
HFD	high-fat diet
HOMA-IR	homeostatic model assessment of insulin resistance
HSCs	hepatic stellate cells
IL-6	interleukin-6
IL-10	interleukin-10
IL17 α	interleukin-17 alpha
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	low-density lipoprotein
H&E	hematoxilín-eosina

IHC	inmunohistoquímica
IMC	índice de masa corporal
IR	insulinorresistencia
IRS-1	insulin receptor substrate 1
JNK	Jun N-terminal kinase
LD	lipid droplets
lncRNAs	long non-coding RNAs
LPS	lipopolysaccharide
LSG	laparoscopic sleeve gastrectomy
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
n-3 PUFAs	n-3 polyunsaturated fatty acids
NAFL	non-alcoholic fatty liver
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NFκB	factor nuclear kappa-B
NO	óxido nítrico
NPY	neuropeptide Y
PCR	proteína C reactiva
PECAM1/CD31	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PNPLA3	patatin-like phospholipid domain-containing protein 3
PNPLA3 148M	patatin-like phospholipid domain-containing protein 3 I148M variant
POMC	pro-opiomelanocortin
RBP4	retinol binding protein-4
R-PDGF	platelet-derived growth factor receptor
ROCK2	Rho-kinasa 2
ROS	reactive oxygen species
RT-qPCR	real time quantitative polymerase chain reaction
RYGB	Roux en Y gastric bypass
SCFAs	short-chain fatty acids
SD	standard diet
	desviación estándar de la media
SG	sleeve gastrectomy
SOCS3	suppressor of cytokine signaling-3
SREBP1c	sterol regulatory element binding protein-1c
TAG	tolerancia alterada a la glucosa
	tryglicéridos
TAS	tensión arterial sistólica

TAD	tensión arterial diastólica
TC	total cholesterol
TG	triglicéridos
TGF- β 1	transforming growth factor beta 1
TGR5	transmembrane G protein-coupled receptor 5
TLR	toll-like receptor
TLR4	toll-like receptor 4
TNF α	tumor necrosis factor alpha
VEGF	vascular endotelial growth factor
VHC	virus de la hepatitis C
VLCD	very low calorie diet
WB	western blot

TABLAS

Tabla 1. Causas de esteatosis secundaria	22
Tabla 2. Recomendaciones para la correcta modificación del estilo de vida en la enfermedad por NAFLD.	46
Tabla 3. Recientes estudios experimentales sobre el efecto de la cirugía bariátrica en el NAFLD.	52
Tabla 4. NASH CRN Histological Scoring System.	66
Tabla 5. Bioquímica, hormonas y citocinas en plasma.	80
Tabla 8. Condiciones WB para cada una de las proteínas estudiadas en este trabajo.	113
Tabla 9. Puntuación individual según NASH CRN Histological Scoring System	116
Tabla 10. Peso individual y media por grupo semanales.	118
Tabla 11. Diferencias de peso por grupo antes y después de los tratamientos (semana 10 vs 16)	119
Tabla 12. Comparación de pesos entre grupos antes de los tratamientos (semana 10)	120
Tabla 13. Comparación de pesos entre grupos después de los tratamientos (semana 16)	121
Tabla 14. Valor por cada individuo de los parámetros bioquímicos plasmáticos estudiados	122

FIGURAS

Figura 1. La enfermedad por NAFLD en personas no-obesas y sus posibles causas.	23
Figura 2. El espectro de la enfermedad por NAFLD y su evolución.	26
Figura 3. El síndrome metabólico es una constelación de alteraciones metabólicas interrelacionadas entre sí; entre ellas la enfermedad por NAFLD.	28
Figura 4. En la enfermedad por NAFLD existe una interrelación bidireccional entre el hígado y los órganos implicados en su etiopatogenia.	31
Figura 5. Teoría de los “good fat storers” y “bad fat storers” en la enfermedad por NAFLD.	42
Figura 6. Esquema de tratamiento del NAFLD.	48
Figura 7. Efectos metabólicos generales “BRAVE” de la cirugía bariátrica.	49
Figura 8. Posibles efectos metabólico-terapéuticos de la cirugía bariátrica en la enfermedad por NAFLD.	50
Figura 9. Modelo experimental.	60
Figura 10. Cirugía bariátrica modificada para roedores.	62
Figura 11. Vías de contracción en la musculatura lisa vascular.	69
Figura 12. Función, características y fenotipos de las HSCs en el hígado sano y enfermo.	71
Figura 13. Gráfica de evolución del peso semanal por individuo.	78
Figura 14. Gráfica de evolución del peso semanal por grupo.	79
Figura 15. Estudio de la presencia de esteatosis por tinción Oil Red.	82

Figura 16. Tinciones 0.1% Picro-Sirius Red (A), Hematoxilina-Eosina (B) y "SAF score" (C).	83
Figura 17. Marcadores de vasoconstricción y daño del endotelio sinusoidal, medidos por Western Blot.	84
Figura 18. Marcadores de vasodilatación del endotelio sinusoidal, medidos por Western Blot.	85
Figura 19. Medición de presencia de células positivas para CD43/campo 20x, por inmunohistoquímica.	86
Figura 20. Estudio de presencia de iNOS en tejido hepático, medido por Western Blot.	87
Figura 21. Medición de α SMA en tejido hepático, mediante técnica Western Blot.	88
Figura 22. Porcentaje de α SMA en área 20x medido por inmunohistoquímica en cortes parafinados.	88
Figura 23. Expresión génica de marcadores de activación y proliferación de las células HSCs medido por RT-qPCR.	90

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (o NAFLD según sus siglas en inglés “*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*”), descrita por primera vez en 1980, es a día de hoy la forma de enfermedad hepática más frecuente a nivel mundial y una de las primeras causas de trasplante hepático y hepatocarcinoma [1,2]. Su prevalencia en países occidentales se estima entre el 17 y 46% de los adultos [1], aunque no existen datos precisos de la misma debido a la ausencia de programas de diagnóstico poblacional. Por este motivo, se cree que la prevalencia podría ser incluso mayor. Además, su incidencia ha aumentado en los últimos años paralelamente al incremento de la obesidad y la diabetes mundial [2-4]. De acuerdo a últimas estimaciones, en EE.UU. el 68% de la población es obesa o tiene sobrepeso; según esto, entre 75 y 100 millones de estadounidenses podrían presentar NAFLD [5]. No obstante, también se ha identificado la enfermedad en un 7% de adultos con peso normal, más frecuentemente en mujeres jóvenes y sin afectación analítica del perfil hepático (*Figura 1*). [6,7].

Box 1 | Causes of NAFLD in individuals who are lean

- Environmental causes
 - High-fructose and/or high-fat diet
 - Dual aetiology fatty liver disease (concomitant obesity and excess alcohol intake)
- Metabolically obese, normal-weight phenotypes
- Congenital and acquired lipodystrophy
 - Such as associated with highly active antiretroviral therapy for HIV
- Genetic causes
 - *PNPLA3* variants
 - Congenital defects of metabolism (familial hypobetalipoproteinaemia, lysosomal acid lipase deficiency)
- Endocrine disorders
 - Such as polycystic ovary syndrome, hypothyroidism or growth hormone deficiency
- Drug-related causes
 - Such as amiodarone, methotrexate or tamoxifen
- Other causes
 - Jejunioileal bypass, starvation or total parenteral nutrition

Figura 1. La enfermedad por NAFLD en personas no-obesas y sus posibles causas. Fuente [7] : Younossi Z, Anstee QM, Marietti M et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2017) doi:10.1038/nrgastro.2017

La enfermedad consiste en la acumulación hepática de grasa en exceso y el daño derivado de la misma, asociado fundamentalmente a insulinoresistencia (IR) y en ausencia de otras causas de esteatosis secundaria (Tabla 1). Se define por la presencia de esteatosis en más del 5% de hepatocitos según el análisis histológico o si es mayor del 5.6% medido de forma cuantitativa según la fracción grasa/agua calculada mediante resonancia magnética (RM) [1].

Tabla 1. Causas de esteatosis secundaria

-
- Enfermedad hepática alcohólica
 - Fármacos
 - Hígado graso asociado a hepatitis C (genotipo 3)
 - Otros
 - Hemocromatosis
 - Hepatitis autoinmune
 - Enfermedad celíaca
 - A/hipo-betalipoproteinemia
 - Hipopituitarismo, hipotiroidismo
 - Inanición, nutrición parenteral total
 - Metabolopatías (enfermedad de Wolman)
-

En función de la evolución de la enfermedad podemos encontrar dos espectros histopatológicos diferentes con muy distinto pronóstico (Figura 2): 1) el hígado graso no alcohólico que consiste en la presencia de esteatosis simple con o sin signos inflamatorios inespecíficos leves (NAFL en inglés: “*Non-Alcoholic Fatty Liver*”), presente en la mayoría de pacientes con NAFLD (aproximadamente en un 70-75% de enfermos); 2) y la esteatohepatitis no alcohólica (o NASH por “*Non-Alcoholic Steatohepatitis*”) detectada en un 25-30% de individuos con NAFLD, que se define por la presencia de cambios inflamatorios y de degeneración hepatocitaria en el estudio histológico hepático y que podría progresar a formas más graves, desarrollando fibrosis, cirrosis e incluso hepatocarcinoma [1,2].

En cuanto al pronóstico, el principal factor determinante es la presencia de fibrosis. Se calcula que los pacientes con NASH poseen un riesgo aproximado del 20% de avanzar a formas irreversibles con cirrosis [8]. La presencia de factores de riesgo tales como un aumento de peso mayor de 5kg, la obesidad central, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, dislipemia y en general todos aquellos relacionados con el síndrome metabólico hacen que aumente la probabilidad de que la enfermedad progrese a estadios más avanzados [1,2].

Los pacientes afectados por NAFLD en general, y sobre todo aquellos con NASH, presentan un mayor riesgo de mortalidad en comparación a la población general debido fundamentalmente a enfermedad cardiovascular en primer lugar, seguido de muerte por cáncer y, por último, por enfermedad hepática. Se desconoce el número de casos de cirrosis por NAFLD que han necesitado un trasplante hepático; no obstante, se sabe que es la única causa de trasplante hepático que ha seguido incrementando en los últimos años, concretamente de 1.2 a 9.7% entre los años 2001 y 2009 [9]. Además, de los casos que se había catalogado como cirrosis criptogénicas décadas atrás, ahora se sabe que gran parte de ellos se atribuyen a cirrosis secundarias a enfermedad por NAFLD [10]. Debido a su creciente casuística, asociado al hecho de que los casos por VHC y alcohol continúan descendiendo gracias a los efectivos tratamientos hallados recientemente, se estima que la cirrosis por NAFLD sea la primera causa de trasplante hepático hacia el año 2020 [9,11].

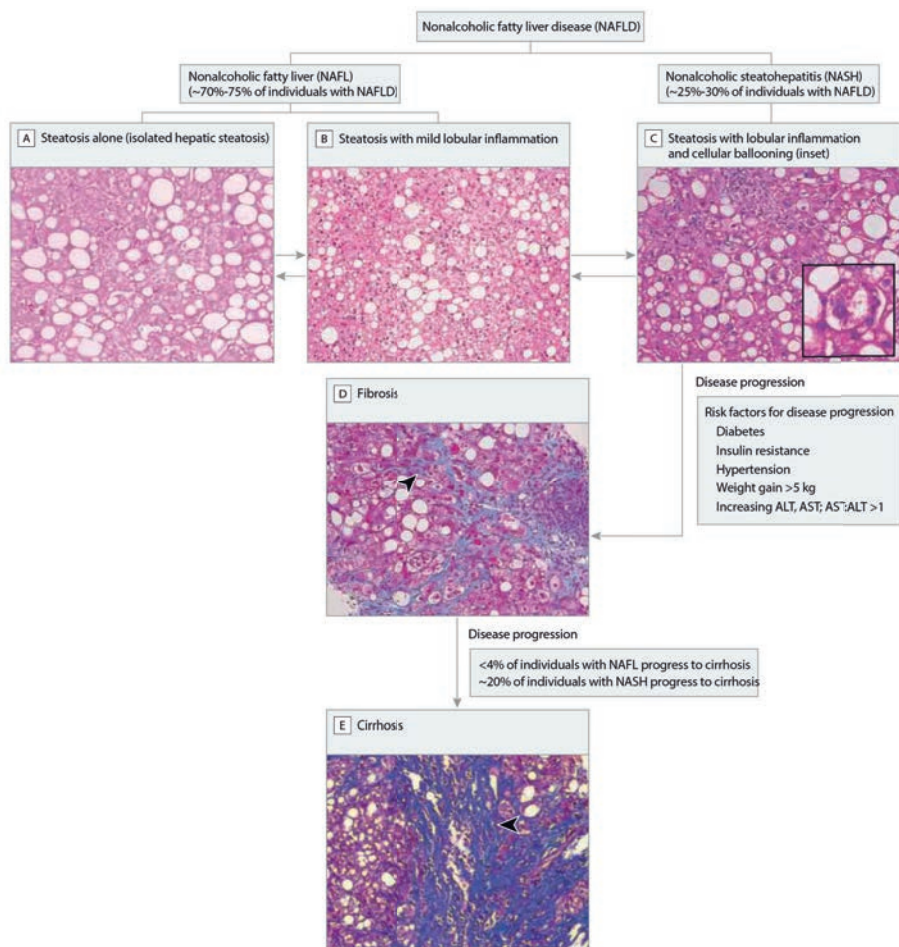


Figura 2. El espectro de la enfermedad por NAFLD y su evolución. Fuente [2]: Rinella M. E., Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. JAMA. 2015;313(22):2263-2273

1.2. NAFLD Y SU RELACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO, LA OBESIDAD Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR

A la hora de hablar de la enfermedad por hígado graso no alcohólico, es obligado hablar también tanto del síndrome metabólico como de la obesidad y el riesgo cardiovascular, debido a la gran conexión que existe entre la enfermedad por NAFLD y estas tres entidades, cada vez más presentes en la sociedad actual.

1.2.1. Síndrome Metabólico

La enfermedad por NAFLD está en estrecha relación tanto con la IR sistémica como con el síndrome metabólico, el cual se define por la presencia de tres o más de las siguientes alteraciones [12,13,15]: tolerancia alterada a la glucosa (TAG) o diabetes mellitus 2, hipertensión (TAS >130mmHg o TAD >85mmHg), hipertrigliceridemia (TG >150mg/dL), niveles bajos de lipoproteína de baja densidad (HDL <40mg/dL en hombres y <50mg/dL en mujeres) y obesidad central medida por el perímetro de la cintura (>102cm en hombres, >88cm en mujeres).

A pesar de estar definido por la presencia de al menos tres de las alteraciones mencionadas, el síndrome metabólico puede asociar muchas otras condiciones que son reflejo de la desregulación metabólica que existe a nivel general (*Figura 3*) [14]. Entre ellas se encuentra la enfermedad por NAFLD, que no se encuentra entre los criterios diagnósticos pero que es considerada ya la manifestación hepática del síndrome metabólico dada su estrecha relación [16].

De hecho, todos los componentes del síndrome metabólico se asocian a la presencia de grasa hepática, independientemente del índice de masa corporal (IMC) del paciente. Tanta es la asociación entre ambas condiciones que en cualquier paciente con síndrome metabólico conocido debería estudiarse la presencia o no de NAFLD, y viceversa, los pacientes afectados de NAFLD deberían ser evaluados en busca de la existencia de un síndrome metabólico definido [1].

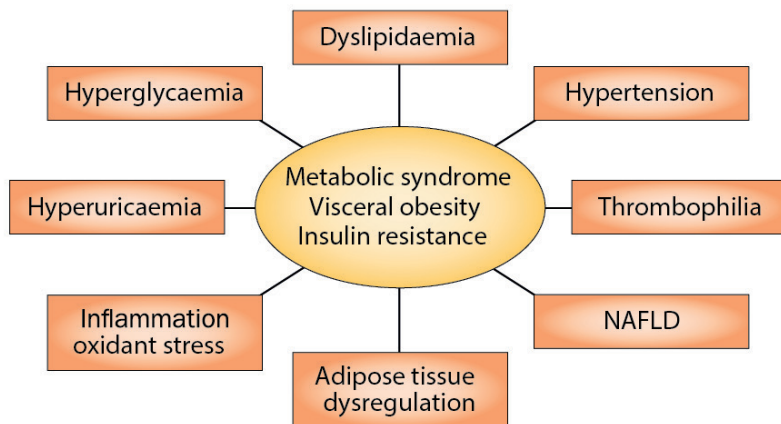


Figura 3. El síndrome metabólico es una constelación de alteraciones metabólicas interrelacionadas entre sí; entre ellas la enfermedad por NAFLD. Fuente [14]: Bonora, E. & Targher, G. (2012) Increased risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease in NAFLD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* doi:10.1038/nrgastro.2012.79

La acumulación grasa en el hígado altera la captación de glucosa para la glucogénesis hepática mediada por insulina y la producción de HDL a este nivel, dando lugar a un estado de hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia [16,17]. En pacientes no diabéticos, el índice HOMA-IR, que resulta del producto entre el nivel de glucosa en ayunas (en mmol/L) e insulina plasmática (en mU/ml), es un buen indicador de alteración de la sensibilidad a la insulina sin haber desarrollado aún diabetes [18]. En el contexto que nos atañe, sirve para identificar casos de IR asociada a NAFLD, sobre todo en pacientes con diagnóstico de NAFLD incierto (p.ej.: esteatosis definida por ultrasonidos en paciente normopeso), y también para detectar pacientes con NAFLD en riesgo a desarrollar NASH o progresión a fibrosis si durante el seguimiento se observa un empeoramiento del índice HOMA-IR [1,19].

1.2.2. Obesidad

La obesidad es la condición más frecuente en los pacientes con NAFLD y también el mayor factor de riesgo para su desarrollo [20]. Además, es un factor predictor de severidad de la enfermedad [21]. En su medición no sólo se debe tener en cuenta el IMC, sino también el perímetro de cintura y la adiposidad visceral. De hecho, personas con IMC menor a 30 kg/m² (e incluso menor a 25 kg/m²) pero con distribución visceral de la grasa corporal pueden estar afectos y presentar NAFLD con o sin alteración enzimática hepática [15,22]. Curiosamente la mayoría de los pacientes de NAFLD con normopeso asocian tanto IR como distribución visceral anómala de la grasa corporal [1,23,24].

1.2.3. Riesgo cardiovascular

Dado que el hígado es un centro regulador importante del metabolismo, donde se llevan a cabo acciones homeostáticas de la glucosa y los lípidos entre otras, en este contexto la enfermedad por NAFLD no es sólo una consecuencia de la disregulación metabólica sistémica sino que, además, el propio hígado enfermo contribuye al empeoramiento y perpetuación de la misma. Así pues, la enfermedad por hígado graso es también fuente de alteraciones metabólicas a otros niveles.

En este sentido, es importante mencionar que existe una estrecha relación entre el NAFLD y la enfermedad cardiovascular (ECV), hasta el punto en que los eventos cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en pacientes con hígado graso. Muchos estudios relacionan el NAFLD indirectamente a la ECV sosteniendo que la relación se debe al contexto de alteración metabólica global que existe en estos pacientes: grasa visceral hormonal e inflamatoriamente activa, desbalance de lipoproteínas circulantes, estado hormonal proaterogénico (p.ej.: IR o disminución de adiponectina circulante), estatus inflamatorio crónico sistémico en obesos, etc. Sin embargo, recientes estudios identifican la enfermedad por NAFLD como un factor de riesgo cardiovascular independiente a estas alteraciones añadidas, capaz de contribuir por sí mismo a la aparición y desarrollo de, por ejemplo, rigidez de las paredes arteriales o disfunción endotelial, características propias de la ECV [25,26].

Otra de las enfermedades a las que se asocia el NAFLD como factor de riesgo independiente es la enfermedad renal crónica (ERC). En un

amplio metaanálisis llevado a cabo por Musso G *et al.*, en el cual realizan la búsqueda de artículos relacionados desde 1980 a 2014 y obtienen una n final de 63902 pacientes, demuestran que el NAFLD es un factor independiente asociado a la ERC, y que la asociación es mayor cuanto más avanzada esté la enfermedad hepática [27].

1.3 ETIOPATOGENIA

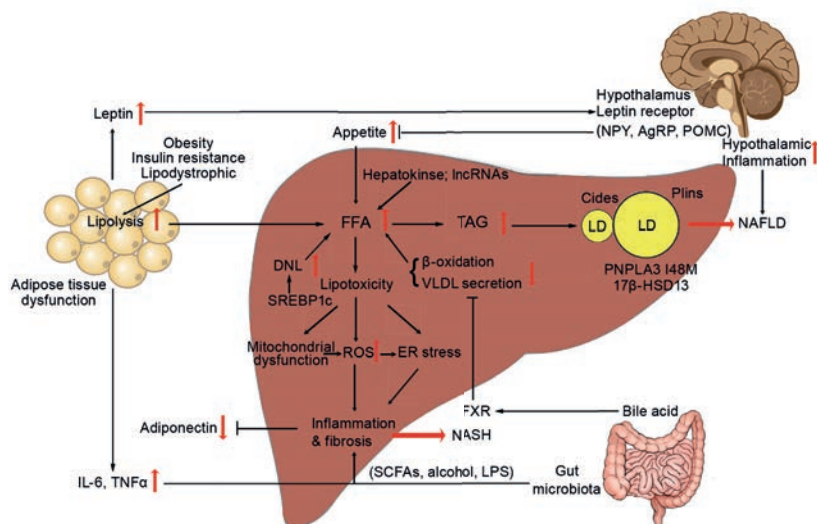
A pesar de su importancia, tanto por la preocupante crecida del número de casos a nivel mundial como por ser una enfermedad potencialmente grave en estadios finales, aún no se conocen con exactitud ni el origen ni el desarrollo de la afección. Son múltiples las teorías que explican cómo inicia la enfermedad y cuales son los factores implicados en su evolución. Lo que se sabe con seguridad es que se trata de una enfermedad multifactorial relacionada no sólo con aspectos metabólicos, sino también con factores genéticos, medioambientales, inmunológicos e incluso microbiológicos. No obstante, el orden en el que actúan cada uno de estos factores es desconocido.

Durante muchos años prevaleció la teoría de que el desarrollo de la enfermedad se daba en dos fases o “dos golpes” (“*two-hit theory*”) [28]: el primer “golpe” de la mano de la dieta rica en grasas, la obesidad y la IR, que serían las responsables del depósito y acumulación de triacilglicérols en el hígado, para después dar paso al segundo “golpe”, consistente en la respuesta hepática y sistémica al acúmulo graso inicial, el cual provocaría que citocinas extracelulares, adipocinas, endotoxinas bacterianas, la disfunción mitocondrial y el estrés del retículo endoplasmático hepático dieran lugar a una cascada inflamatoria y consecuente fibrogenesis en el hígado [29].

Sin embargo, la últimas investigaciones y lo último que se conoce sobre la etiopatogenia de la enfermedad se aleja de esta teoría de los “dos golpes” para dar lugar a una teoría más reciente, aún bajo análisis, que afirma que “múltiples golpes paralelos” (“*multiple-hit theory*”) serían responsables al mismo tiempo del inicio y desarrollo de la enfermedad [30,31]. Desde esta perspectiva, tanto la IR como la alteración e inflamación del tejido adiposo, liberación de adipocinas y otras muchas condiciones relacionadas con la alteración del metabolismo en general se interrelacionarían entre sí, provocando la acumulación grasa hepática,

la cual sería un fenómeno resultante del daño provocado por diversos mecanismos lesivos a nivel sistémico.

Así pues, la enfermedad por NAFLD sería el resultado de varios mecanismos dañinos, y esta a su vez se sustentaría por la interacción entre el hígado y otros órganos como el tejido adiposo, el intestino o el hipotálamo, participantes en la génesis y perpetuación de la enfermedad (Figura 4) [32].



*Figura 4. En la enfermedad por NAFLD existe una interrelación bidireccional entre el hígado y los órganos implicados en su etiopatogenia. (FFA: free fatty acids; TAG: tryglicerides; LD: lipid droplets; PNPLA3 I48M: patatin-like phospholipid domain-containing protein 3 I148M variant; 17β-HSD13: 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 13; DNL: de novo lipogenesis; SREBP1c: sterol regulatory element binding protein-1c; ROS: reactive oxygen species; ER: endoplasmic reticulum; FXR: farnesoid X receptor; SCFAs: short-chain fatty acids LPS: lipopolysaccharide; lncRNAs: long non-coding RNAs; NPY: neuropeptide Y; AgRP: Agouti-related peptide; POMC: pro-opiomelanocortin; IL-6: interleukin-6 TNFα: tumor necrosis factor alpha) Fuente [32]: Zhang X, Ji X, Wang Q, Li JZ. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Protein Cell.* 2017 Jun 22. doi: 10.1007/s13238-017-0436-0*

A continuación se explican brevemente cada uno de los mecanismos implicados en el inicio y desarrollo de la enfermedad. Algunos de ellos (como por ejemplo el papel del hipotálamo, la alteración en la microbiota o la influencia genética y epigenética) no se explican en profundidad dado que no han sido material de estudio en este trabajo, pero se mencionan debido a su relevancia en cuestión de etiopatogenia.

1.3.1. El efecto de la obesidad, el síndrome metabólico y la insulinoresistencia en el hígado

Como se ha explicado previamente, la enfermedad por NAFLD está muy ligada a la obesidad y sobre todo al síndrome metabólico, considerándose la expresión hepática de este último. En estos estados, la esteatosis hepática es el resultado del desequilibrio entre el influjo y la eliminación o salida de triglicéridos (TG) en el hígado. Una dieta rica en grasas hace que incremente la llegada de ácidos grasos libres desde el intestino al hígado, aumentando la lipogénesis de novo hepática, mientras que al mismo tiempo, en estados de obesidad, el flujo de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo es también mayor por un incremento en la lipólisis de este último. Los ácidos grasos libres en el hígado, mediante la acción de la enzima acil-CoA sintetasa y posteriormente la vía de la β -oxidación, son procesados para acumularse en forma de TG bien en gotas lipídicas hepáticas o como parte de lipoproteínas de bajo peso molecular (VLDL). El aumento del influjo de ácidos grasos libres al hígado y la saturación de las vías de eliminación hace que estos se acumulen en mayor proporción, generando no solo la resultante esteatosis hepática sino también un estado de lipotoxicidad que, entre sus efectos nocivos, provoca la alteración de la respuesta hepática a la insulina, lo cual traduce una IR hepática selectiva [33,34]. Dicho estado de IR hepática, a su vez, contribuye a una mayor acumulación de TG en gotas lipídicas inhibiendo su β -oxidación y también una mayor lipogénesis de novo mediante una mayor síntesis y actividad de la SREBP-1c [35]. De ahí que en la enfermedad por NAFLD, donde existe una respuesta hepática alterada a la insulina, se asocie normalmente la esteatosis con estados de hiperglucemia e hiperlipidemia.

Además del daño resultante del desbalance entre el influjo y eliminación de ácidos grasos en el hígado, existen otros mecanismos presentes en el hígado que participan en la generación de esteatosis y daño hepático propio de la enfermedad por NAFLD: 1) factores genéticos tales como la mutación de la proteína PNPLA3 I148M que impide la lipólisis

hepática [36-38] o la sobreexpresión de la enzima 17 β -HSD13 la cual contribuye a la lipogénesis hepática [39,40]; 2) algunas hepatocinas que se encuentran más elevadas de lo normal, como por ejemplo la fetuin-A, al parecer elemento conector entre obesidad, IR y NAFLD [41-43]; 3) presencia de ciertos micro-RNA y RNA no codificantes de cadena larga (lncRNA) (p.ej.: miR-122, miR-192, miR-375), que además de relacionarse con ciertas características de la enfermedad, también se consideran un posible marcador para el diagnóstico y seguimiento ya que se pueden medir en plasma [44-47]; 4) la propia lipotoxicidad intrahepática generada por los ácidos grasos acumulados, que dan lugar a disfunción mitocondrial y una serie de procesos bioquímico-metabólicos (aumento del estrés oxidativo hepático, estrés en el ER y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)) que son un punto clave en la progresión hacia la esteatohepatitis o NASH mediante la activación de células de Kupffer [48,49].

1.3.2. El tejido adiposo, órgano endocrino en la enfermedad por NAFLD

El tejido adiposo, compuesto no sólo por adipocitos y preadipocitos sino también por fibroblastos, macrófagos, monocitos y células endoteliales, resulta ser un órgano endocrino implicado en la homeostasis energética y regulación metabólica local, periférica y central en el organismo. No sólo es fuente de ácidos grasos libres, sino que también genera ciertas señales y hormonas que ejercen un efecto metabólico-endocrino a nivel sistémico.

En cuanto al tejido adiposo como fuente de ácidos grasos libres, ya se ha explicado previamente que en estados de obesidad, donde hay un exceso de ácidos grasos almacenados en los adipocitos, también existe una mayor liberación de estos hacia el hígado y, por tanto, es parte responsable del desbalance y acumulación grasa hepática que se da en la enfermedad por NAFLD.

Desde el punto de vista endocrinológico, el tejido adiposo es un órgano endocrino en sí, capaz de sintetizar y segregar diferentes hormonas y elementos que tienen efecto en múltiples sistemas, entre ellos el hígado. Dichas señales provenientes de los adipocitos, llamadas por ello de forma genérica adipocinas, son sensibles al estado metabólico global y se autorregulan en base a las necesidades energéticas del organismo. A continuación se exponen algunas de las adipocinas que se han visto relacionadas a la enfermedad por NAFLD [50,51]:

- **LEPTINA.** Considerada hormona anorexígena, la leptina aumenta en estados de sobrealimentación y tiene su efecto tanto a nivel central – en el hipotálamo- reduciendo el apetito como a nivel periférico reduciendo la producción de insulina y promoviendo el gasto energético mediante la oxidación de ácidos grasos e inhibición de la lipogénesis. También evita el depósito ectópico de grasa en tejidos como el hígado o el músculo esquelético. No obstante, en organismos con exceso calórico, y por tanto en individuos obesos, los niveles de leptina son paradójicamente altos ya que existe una resistencia central y hepática a la leptina que evita que ésta ejerza su efecto anorexígeno a estos niveles [52]. En la enfermedad por NAFLD también se produce un estado de hiperleptinemia asociado a resistencia leptínica periférica [53]. Tanto es así, que diversos estudios han llegado a relacionar los niveles séricos de leptina con el grado de esteatosis hepática [54,55]. Pero además, se cree que la leptina juega un papel importante en la inflamación y fibrogénesis hepática, desde que se conoce que esta hormona es capaz de aumentar la presencia de especies tipo ROS en el hígado, provocando la activación de células de Kupffer que, a su vez, sintetizan citocinas como el TNF α contribuyendo así a la activación de las células hepáticas estrelladas (HSCs – *hepatic stellate cells*), responsables del inicio de la fibrogénesis [56].

- **ADIPONECTINA.** Es una hormona sintetizada exclusivamente en el tejido adiposo que presenta múltiples isoformas oligoméricas en la circulación. Hay varios efectos específicos de cada isoforma descritos en la literatura, pero a modo general se puede decir que la adiponectina, a través de su acción sobre sus receptores AdipoR1 y AdipoR2, estimula la sensibilidad periférica a la insulina, promueve la utilización hepática de glucosa y la oxidación de ácidos grasos tanto en el hígado como en el músculo y otros órganos periféricos. Además, es una proteína con efecto anti-angiogénico, anti-aterogénico y anti-proliferativo. A pesar de sintetizarse únicamente en el tejido adiposo, se han observado niveles séricos bajos de la misma en estados de obesidad, IR y síndrome metabólico. Una de las posibles explicaciones a esto es que el ambiente hipóxico que existe en los adipocitos (por su expansión y por tanto dificultad en el aporte de oxígeno) haga que disminuya la síntesis de esta hormona. Así pues, también se han detectado niveles anormalmente bajos de adiponectina en pacientes con NAFLD, lo cual favorecería la resistencia insulínica y acumulación de grasa hepática [57]. Añadido a todo ello, se sabe que la adiponectina tiene cierto efecto antifibrogénico en el hígado ya que inhibe la producción de TNF α por las HSCs, por lo tanto, se cree que su bajo nivel en el NAFLD podría

contribuir en cierta forma al desarrollo de estadios avanzados de la enfermedad [51,58].

- **RESISTINA.** Aún no se conoce con exactitud su función en humanos, pero en ratones se ha observado que la resistina actúa a favor de la resistencia insulínica hepática y la gluconeogénesis [59]. En humanos, se han detectado niveles séricos elevados en individuos obesos [60] y también en pacientes con NAFLD. Al parecer, esta hormona tendría relación con la severidad de la enfermedad por hígado graso no alcohólico, ya que se le supone un poder proinflamatorio hepático a través de la estimulación de la liberación de diversas citocinas como TNF α o IL-6 por parte de las HSCs [61,62]. No obstante, todavía se necesitan más estudios para elucidar cuál es el verdadero papel de esta hormona en la patogenia del NAFLD.

- **VISFATINA.** Los niveles de visfatina se muestran elevados en pacientes con obesidad, exceso de grasa visceral, DM2 y síndrome metabólico. Igualmente ocurre en pacientes con enfermedad por NAFLD, aunque aún se desconoce su participación en el desarrollo de la misma. Algunos estudios han hallado una correlación positiva entre los niveles séricos de visfatina y la inflamación portal hepática [63,64].

- **RBP4 (RETINOL BINDING PROTEIN-4).** Es la proteína de transporte para el retinol en sangre, y su elevación se ha asociado a estados de IR fundamentalmente [65]. Por ende, también se puede observar su ascenso en individuos obesos y con síndrome metabólico. De su relación y efecto en el NAFLD poco se sabe. Es importante señalar que, a pesar de su conocida relación con estados de resistencia insulínica, se han detectado niveles altos de RBP4 en pacientes con NAFLD no-diabéticos. Además, también hay trabajos específicos que han podido demostrar una correlación positiva entre los niveles de RBP4 y ciertas enzimas hepáticas (ALT y GGT) [66]. Sin embargo, otros han hallado una relación inversa entre el grado de fibrosis hepática y la presencia de RBP4 en sangre [67].

- **TNF α (TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA).** Es la citokina más estudiada en el NAFLD. Aunque sea fabricada por una gran variedad de células del organismo, gran parte de su liberación se da en los adipocitos y en el hígado a partir de células de Kupffer y HSCs. Esta poderosa citokina tiene efectos metabólicos, proinflamatorios, proliferativos y necróticos. Así pues, se ve envuelta en cada una de las fases de la enfermedad por NAFLD: 1) tiene relación con la IR asociada a la obesidad y es un elemento

clave en la resistencia insulínica hepática, ya que produce la fosforilación de la serina asociada al receptor insulínico hepático IRS-1, paso clave y necesario para inhibir la translocación de GLUT4 y así generar resistencia periférica a la insulina [68-70]; 2) también participa en la lipólisis del tejido adiposo, aumentando el flujo de ácidos grasos hacia el hígado, y produce la activación de la proteína SREBP-1c promoviendo la lipogénesis y esteatosis hepática [50]; 3) además, induce y forma parte de una cascada inflamatoria intrahepática que inicia con la activación del factor nuclear kappa-B (NFkB) en los hepatocitos [71], lo cual a su vez provoca la síntesis y liberación de más citocinas proinflamatorias –entre las que se encuentra nuevamente el TNF α – que terminan por alterar la función mitocondrial, haciendo que se generen especies ROS hepatotóxicas y que finalmente se de la muerte celular del hepatocito [72]. Tal es su asociación a la enfermedad por NAFLD, que niveles mayores de TNF α se asocian a estadios más avanzados de la misma tanto en adultos como en niños, siendo esta citokina un buen marcador y predictor de NASH [73-75].

- **INTERLEUKINA-6.** La IL-6 es otra citokina inflamatoria sistémica que se produce en adipocitos, hepatocitos, células inmunitarias y células endoteliales. Su participación en la enfermedad por NAFLD es controvertida. Por un lado, se sabe que contribuye a la IR por diversos mecanismos, y sobre todo IR hepática [76,77]. Además, se ha visto que una exposición crónica a IL-6 provoca daño hepático inflamatorio, y en comparación a otras hepatopatías crónicas, la enfermedad por hígado graso no alcohólico es la que mayores niveles de IL-6 muestra [78]. Sin embargo, en contraposición también se ha demostrado un efecto hepatoprotector de la IL-6 tras exposiciones cortas a la misma y en casos de esteatosis [68,79]. Así pues, con la evidencia de la que se dispone hasta ahora, se puede afirmar que la IL-6 es una citokina proinflamatoria relacionada con la IR, pero que su rol exacto en la patogénesis del NAFLD y su relación con las diferentes fases de la misma aún están por dilucidarse.

- **MCP-1 (MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1).** El MCP-1, citokina sintetizada por los adipocitos, aumenta sus niveles tanto en tejido adiposo como en plasma en estados de obesidad, y se ha relacionado al desarrollo de IR y esteatosis hepática en ratones obesos genéticamente modificados [80]. El MCP-1 es una de las razones por las cuales se cree que la proporción de macrófagos en tejido adiposo aumenta considerablemente en pacientes obesos (10% de macrófagos en tejido adiposo de individuos no obesos, frente a un 40% en obesos), debido a su acción quimio-atrayente de

monocitos [81]. Los macrófagos, células inmunitarias del sistema inmune innato, juegan un papel principal en el inicio y mantenimiento del estado inflamatorio basal que existe en los obesos [82]. Éstos, además del aumento en número, también tienden a su diferenciación hacia el fenotipo M1 (en vez de M2) por la acción de toxinas bacterianas que llegan desde el intestino al tejido adiposo (principalmente LPSs, que se unen a los receptores TLR4), lo cual contribuye a la inflamación del tejido adiposo por el aumento de síntesis de TNF α e IL-6, y disminución de interleukinas anti-inflamatorias como el IL-10, por parte de estos macrófagos M1 [83].

1.3.3. El hipotálamo, centro regulador implicado en la enfermedad por NAFLD

El sistema nervioso central, en concreto el hipotálamo, es un centro regulador del gasto energético global. Mediante el procesamiento de información aferente y creación de señales eferentes, se encarga de ajustar los cambios necesarios para mantener la homeostasis metabólica. Entre los puntos reguladores del hipotálamo se encuentra el núcleo arcuato, que resulta ser el centro encargado del control de la ingesta calórica y el peso corporal [84].

La leptina, adipokina proveniente de la grasa visceral, es una de las señales periféricas mejor caracterizadas y estudiadas. Su efecto anorexígeno en el hipotálamo consiste en la promoción de la síntesis de neuropéptidos anorexígenos en el núcleo arcuato, como la proopiomelanocortina (POMC) –precursor de la α -hormona estimulante de melanocitos (α -MSH)– o el péptido transcriptasa regulado por anfetamina y cocaína (CART), quienes disminuyen el apetito, activan el eje hormonal tiroideo y aumentan el gasto energético en el organismo [85,86]. Pero además, también disminuye la presencia de neuropéptidos orexígenos como el neuropéptido Y (NPY) o la proteína r-Agouti (AgRP), las cuales sí aumentarían en presencia de señales orexígenas periféricas, como la grelina [85,87].

Todo este proceso de regulación de la leptina se ve alterado en estados de obesidad y síndrome metabólico, por la ya comentada resistencia leptínica que existe en estas situaciones. En el caso del hipotálamo, dicha resistencia leptínica es probablemente secundaria al estado de inflamación crónico propio de la obesidad. La inflamación crónica sistémica incluye también la inflamación hipotalámica, generada a través de diferentes vías

del sistema inmunitario innato (TLR4, JNK, SOCS3, citocinas, estrés del ER, etc.) [88-91].

Esta incapacidad del sistema central para la regulación energética por falta de respuesta a la leptina favorece la persistencia del apetito y la ingesta calórica, la dislipemia y acumulación de ácidos grasos, la IR generalizada y, derivado de todo ello, la esteatosis y afectación hepática en forma de NAFLD.

1.3.4. La creciente importancia de la microbiota, los ácidos biliares y el circuito enterohepático en la enfermedad por NAFLD

La microbiota intestinal es esencial para la integridad de la función de barrera mucosa, la absorción de nutrientes y la homeostasis energética. Cambios en la misma (disbiosis) se han relacionado con múltiples enfermedades graves, como son la obesidad, la diabetes, el NAFLD, aterosclerosis, diversas alergias, enfermedades gastrointestinales (inflamatorias, colon irritable, etc.), enfermedades autoinmunes y cáncer [92-94].

Los individuos obesos muestran una menor diversidad en la flora intestinal, y también un anómalo descenso de *Bifidobacterium* y respectivo aumento de *Firmicutes*, por lo que se cree que la disbiosis es uno de los factores precursores de la obesidad [95,96]. No obstante, también se ha podido establecer una relación inversa al objetivar que la obesidad puede también alterar la microbiota [97].

La evidencia que establece que la disbiosis es relevante en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones, en concreto la enfermedad por NAFLD, es cada vez mayor [98,99]. A través de la circulación portal, el hígado es la primera estación de los nutrientes y metabolitos provenientes del intestino. Por ello, no resulta extraño que la alteración en la microbiota pueda afectar directa o indirectamente a este órgano. Además, cuando el hígado recibe estos elementos, es el primer órgano en generar respuesta hormonal e inflamatoria a los mismos, creando una relación bidireccional hepático-intestinal.

Actualmente, y según la información veraz de la que se dispone hasta ahora, son cinco los mecanismos que se proponen como efectores

del daño hepático cuando existe disbiosis intestinal [98,99]: 1) la alteración en la digestión de alimentos y aprovechamiento calórico; 2) la expresión de péptidos activos; 3) daño en la permeabilidad de la barrera intestinal e inflamación; 4) producción de etanol endógeno por la microbiota; y 5) alteración del metabolismo de la colina. A estos cinco mecanismos, recientemente se le añade un mecanismo más que se ve directamente influenciado por el efecto de la disbiosis; este es el metabolismo y la acción reguladora de los ácidos biliares [100].

1.3.5. La influencia de la dieta, factor externo precursor de la enfermedad por NAFLD

La dieta y el estilo de vida se consideran importantes modificantes externos que contribuyen al desarrollo de la obesidad y sus complicaciones. Hábitos de la era moderna como el sedentarismo o las dietas ricas en grasas saturadas, azúcares refinados, etc. son cada vez más frecuentes, sobre todo en países occidentales, y se piensa que representan una de las causas principales del aumento de la obesidad, la diabetes, la enfermedad por NAFLD y, en definitiva, todas aquellas afecciones relacionadas con el síndrome metabólico en estos países durante los últimos años.

Este tipo de estilo de vida poco saludable se ha relacionado epidemiológicamente directamente con la enfermedad por NAFLD [101]. En concreto, son varios los nutrientes que se han identificado y descrito como posibles contribuyentes a su desarrollo. A continuación se presentan algunos de ellos [99]:

- **Grasas y colesterol.** La dieta rica en grasas (grasas saturadas y ácidos grasos trans) y el colesterol actúan sinérgicamente e inducen la enfermedad por NAFLD y su desarrollo a NASH mediante las siguientes acciones [102-105]:

- Desarrollo de esteatosis.
- Disbiosis intestinal, mediante la reducción de biodiversidad de la microbiota y el aumento del ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*.
- Aumento de receptores TLR4 en el hígado.
- Inducción de inflamación en el tejido adiposo.

- Mayor cantidad de acetato, sustrato para la formación de ácidos grasos.

- **Fructosa y sucrosa.** Estos dos nutrientes, sobre todo la fructosa, se han podido relacionar ampliamente con la progresión de la enfermedad a esteatohepatitis y fibrosis hepática [106]. Además, la fructosa no requiere de la insulina para su metabolismo, por lo que su acción es independiente a la IR. En un importante y amplio estudio de cohortes llevado a cabo sobre la base de datos del “*Framingham Heart Study’s Offspring cohort*” (iniciada en 1971, con n=5124) y la “*Third Generation (Gen3) cohort*” (iniciada en 2002, n=4095) se observó que el riesgo de desarrollar NALFD era mayor en los individuos que habitualmente consumían bebidas azucaradas, particularmente en personas obesas o con sobrepeso [107]. Los mecanismos que se proponen para este efecto son:

- Contribución al daño en la barrera mucosa intestinal.
- Aumento de la endotoxemia y translocación bacteriana en el organismo.
- Aumento de la presencia de receptores TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 en el hígado.
- Estímulo y expresión de SREBP1c, resultando en incremento de la lipogénesis hepática.

- **Glicotoxinas o AGEs.** Las glicotoxinas o AGEs (“*advanced glycation end-products*”) están presentes sobre todo en alimentos fritos, horneados o asados a altas temperaturas, lo cual predomina en la dieta de países occidentales. Durante su estudio se ha detectado un incremento de sus receptores (RAGE) en enfermedades inflamatorias intestinales, y se cree que su presencia en el intestino ayuda a perpetuar la inflamación crónica que existe en estos procesos [108]. También hay presencia de RAGEs en las HSCs, y se ha visto que la unión de las glicotoxinas a este nivel favorece la proliferación de estas células y la síntesis de colágeno, lo que contribuye a la inflamación y fibrosis hepática. Por tanto, aunque aún exista la necesidad de continuar investigando sobre el papel concreto que tienen los AGEs en la enfermedad por NAFLD, se cree que estos pueden contribuir a la esteatosis, estrés oxidativo y fibrosis hepática [109].

- **Edulcorantes artificiales.** Aunque su uso esté muy extendido entre dietas hipocalóricas, el consumo de estos edulcorantes se ha relacionado con el desarrollo de obesidad, diabetes enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y dificultad para el aprendizaje [110]. Por este motivo, las guías clínicas recomiendan la restricción en su uso [111]. El mecanismo de acción principal que relaciona a estos productos con dichas enfermedades metabólicas es la inducción de intolerancia a la glucosa mediante cambios en la microbiota [112]. Estos cambios, además, provocan una mayor presencia del receptor GLUT2 en el intestino, lo cual resulta en una mayor absorción de fructosa y consecuente favorecimiento de lipogénesis de novo hepática y esteatohepatitis [113].

1.3.6. Agregación familiar, genética y epigenética en la enfermedad por NAFLD

Además del desarrollo de la enfermedad por NAFLD debido a alteraciones metabólicas y factores externos como la dieta o el sedentarismo, existen otras líneas de investigación que proponen la posibilidad de que exista una posible agregación familiar y predisposición genéticas, junto con cambios epigenéticos que, añadido a los factores de riesgo descritos (síndrome metabólico, obesidad, diabetes, la dieta, sedentarismo, etc.), ayudan y pueden ser el punto de inflexión en algunos casos para el desarrollo de la enfermedad [80,114].

En relación a ello, al observar la forma en que evoluciona el NAFLD una vez establecido, existe un determinado comportamiento de la enfermedad que hace entrever una posible influencia genética. Y es que, es cierto que hay personas que desarrollan esteatosis (NAFL) y quedan estacionarias para toda la vida sin evolucionar a esteatohepatitis a pesar de añadirse comorbilidades que sean agravantes, y por el contrario, algunas personas que evolucionan más rápidamente a estadios NASH o que incluso siquiera llegan a desarrollar esteatosis como tal y pasan directamente a presentar esteatohepatitis de inicio. A los pacientes del primer caso se les ha conocido como "*good fat storers*" (almacenadores de grasa buena) según esta teoría, mientras que a los que desarrollan rápidamente NASH se les conoce como "*bad fat storers*" (almacenadores de grasa mala). Al parecer, los "*good fat storers*" podrían presentar mecanismos hepáticos compensatorios al acúmulo de grasa inicial que resistan al daño inicial y retrasen la aparición de IR e inflamación hepática. En el momento en que estos mecanismos se agotaran, estos individuos podrían desarrollar NASH.

Sin embargo, los “*bad fat storers*” serían aquellos individuos carentes de los mecanismos defensivos, bien por falta en su impronta génica o en su DNA funcional y, por tanto, progresarían rápidamente a fases avanzadas de la enfermedad (Figura 5) [80].

Entorno a esta idea, se han llevado a cabo múltiples estudios sobre si existe agregación familiar en el NAFLD, o si existen diferencias étnicas, polimorfismos, diferencias en el género o factores externos que modifiquen la expresión génica y produzcan cambios epigenéticos influyentes para el inicio o progresión de la enfermedad.

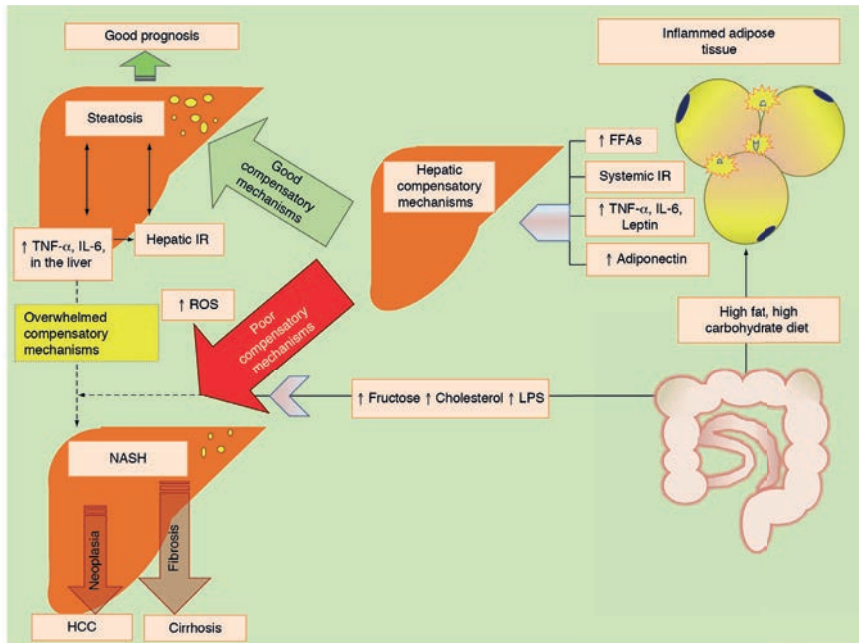


Figura 5. Teoría de los “*good fat storers*” y “*bad fat storers*” en la enfermedad por NAFLD. En el momento en que los mecanismos compensatorios de los “*good fat storers*” se agotaran, estos individuos podrían llegar a desarrollar NASH sobre esteatosis hepática. Los “*bad fat storers*”, sin embargo, son aquellos que desarrollan NASH rápidamente o que ni siquiera pasan por una fase inicial de esteatosis, debido a la carencia de mecanismos defensivos. Fuente [80]: Radwan MM, Radwan BM, Nandipati KC, et al. Immunological and molecular basis of nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9(8):727–38

Respecto a la agregación familiar, sí parece haber una mayor tendencia a desarrollar la enfermedad en familias que tienen algún miembro afecto. Existe un estudio de Schwimmer *et al.* [115] que investiga la heredabilidad de la afección observando a niños con sobrepeso, con y sin enfermedad por NAFLD: entre los niños con sobrepeso afectados por NAFLD un 78% tenía alguno de los padres con esteatosis y el 59% de ellos algún hermano con esteatosis; entre los niños sin NAFLD, sin embargo, sólo el 37% tenía padres con esteatosis y el 17% hermanos con esteatosis.

Sobre la relación con la etnia, un trabajo llevado a cabo sobre población estadounidense comparando a latinos con afroamericanos y sujetos de raza blanca [116], observó que los latinos eran el grupo que más esteatosis mostraba (45% en latinos frente a 33% en blancos y 24% en afroamericanos), pero sorprendentemente el grupo afroamericano, a pesar de ser el que menos esteatosis tenía, era el grupo con mayor tasa de obesidad e IR. Esto apoya la teoría de que la etnia condiciona el tipo de respuesta y adaptación a la obesidad y al síndrome metabólico y, por tanto, también al desarrollo de NAFLD.

En cuanto al género, también existen diferencias evidentes. Según estudios poblacionales, la enfermedad es más frecuente en hombres con un ratio de 6:1 entre hombres y mujeres en la adolescencia. No obstante, dicho ratio disminuye con la edad hasta ser de 1:1 en octogenarios. Se cree que esta diferencia entre sexos sea por el efecto protector de los estrógenos frente al síndrome metabólico y el NAFLD [117]. Así pues, determinados estados hormonales también pueden influir protegiendo al individuo o, por el contrario, favoreciendo la enfermedad (p.ej: deficiencia de GH, hipotiroidismo, déficit de dehidroepiandrosterona o el síndrome de ovario poliquístico son enfermedades propensas a desarrollar NAFLD y NASH) [80].

Por todo ello, observando el comportamiento de la enfermedad en su evolución y cómo puede agregarse en familias, etnias o por sexo, se están llevando a cabo múltiples estudios genómicos intentando identificar aquellos genes alterados que se relacionan con la enfermedad. Hasta el momento son muchos los polimorfismos que se han identificado en genes implicados en el metabolismo grasoso y de carbohidratos, reacciones redox y de interacciones entre endotoxinas y citocinas. Algunos de esos polimorfismos se repiten en la enfermedad por NAFLD y NASH, estableciendo así una posible relación causal. Entre ellos, por mencionar algunos ejemplos,

están el del gen de la proteína PNPLA3 con el polimorfismo I148M [118], ya comentado previamente, o polimorfismos en el gen que sintetiza el TNF α [119]. Sin entrar en detalles, lo importante de descubrir polimorfismos génicos asociados a la enfermedad es el hecho de confirmar que sí existe una susceptibilidad genética especial en ciertos individuos a desarrollar la afección, simplemente por la presencia de alteraciones en su DNA.

La misma susceptibilidad se ha detectado en personas que, por estar expuestas a determinados factores o compuestos externos, sufren cambios en la expresión de sus genes, es decir, cambios epigenéticos [114]. A estos factores y elementos, capaces de irrumpir en la función endocrina y/o metabólica de órganos como el hígado, se los conoce como EDCs (“*endocrine-disrupting chemicals*” o también “*metabolism-disrupting chemicals*”). Pueden ser bien naturales o bien compuestos fabricados por el ser humano. Los que más se han estudiado hasta el momento son aquellos químicos ambientales artificiales (la mayoría pesticidas), de entre los cuales hasta 123 se han relacionado con la enfermedad por NAFLD en roedores [120].

Los EDCs también pueden hacer su efecto en tiempo perinatal, que resulta ser un periodo ventana con particular vulnerabilidad. En roedores, se ha comprobado que los EDCs en este tiempo reprograman genes mediante la metilación de DNA y/o modificación de histonas, y que esto se relaciona con el aumento de aparición de NALFD en la edad adulta. Sin embargo, aún no se han publicado trabajos que investiguen la relación de dichas alteraciones con la propia susceptibilidad de desarrollar la enfermedad (es decir, no necesariamente con el desarrollo de la afección en sí). Faltan estudios que determinen qué grado de susceptibilidad provocan los EDCs y cual es su poder para generar el NAFLD, sabiendo en cada una de las alteraciones si el efecto viene dado por la modificación epigenética que deriva en enfermedad hepática directamente, o si la aparición de NALFD se da porque el cambio epigenético genera una predisposición a la obesidad y síndrome metabólicos que después dan lugar a la enfermedad indirectamente [114].

En el caso de que la exposición perinatal supusiera una reprogramación del metabolismo hepático y un riesgo directo a desarrollar NAFLD sin necesidad de comorbilidades asociadas, estaríamos ante una posible explicación de aquellos casos de enfermedad (la mayoría en forma de NASH) que aparecen sin asociar alteraciones propias del síndrome metabólico.

1.4. TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento del NAFLD hoy día es reducir la progresión de la enfermedad y las comorbilidades relacionadas a ella. Debido a que, epidemiológicamente, la enfermedad por NAFLD se relaciona a unos malos hábitos de vida insana, mala dieta y sedentarismo, la primera recomendación ante cualquier paciente independientemente de la fase en la que se encuentre es adherirse a un estilo de vida sano, con dieta y ejercicio. En cuanto a qué tipo de dieta se recomienda o qué clase de ejercicio es mejor en el NAFLD, y cuáles son los objetivos a alcanzar con ello, estas cuestiones han sido motivo de debate que ha generado múltiples estudios y ensayos clínicos en la materia. Finalmente, la última guía clínica de la EASL-EASD-EASO ("*European Association for the Study of Liver-Diabetes-Obesity*", respectivamente) [1] establece una serie de recomendaciones basadas en la evidencia hasta el momento. Según ésta, el objetivo mediante la restricción calórica en la dieta es la disminución de un 7-10% del peso total y la dieta debería carecer de todos aquellos componentes que agraven la enfermedad (alimentos procesados, ricos en fructosa, etc.), siguiendo el tipo de dieta mediterránea. En la tabla 2 se explican de forma extendida estas y otras recomendaciones.

Existe interés sobre el efecto que crea una dieta hipocalórica hiperproteica estricta sobre la enfermedad, nacido a raíz de la conexión que existe entre esta dieta y el paciente bariátrico. La presencia de NAFLD en la población obesa candidata a cirugía bariátrica es de un 75-100% [121] y este tipo de dieta se ha utilizado durante años atrás de forma habitual en tiempo preoperatorio para la reducción del volumen hepático, facilitando así el acto quirúrgico. A partir de esta relación, varios estudios se han llevado a cabo sobre el tema. Por ejemplo, el grupo de Schwenger KJP et al. [122] encontró que en todos los pacientes de una serie homogénea de 139 obesos candidatos a cirugía, dicha dieta administrada en tiempo preoperatorio durante aproximadamente 3 semanas (que fue el tiempo medio administrado), mejoraba parámetros tanto antropométricos (IMC) como analíticos (glucosa, FA, colesterol total, LDL, HDL y recuento plaquetar) medidos antes y después de la dieta. Esta mejoría se dió por igual en pacientes posteriormente diagnosticados o no de NAFLD (esteatosis o NASH) mediante biopsia hepática intraoperatoria, entre los cuales se presentó la enfermedad hasta en un 76.3%. A pesar de que este trabajo sólo observó los efectos indirectos de la misma en parámetros analíticos y de IMC, y aunque no se trate aún de una dieta recomendada

para el tratamiento del NAFLD, parece ser que la restricción calórica de esta forma tiene también efectos beneficiosos sobre la misma.

Tabla 2. Recomendaciones para la correcta modificación del estilo de vida en la enfermedad por NAFLD.

Área	Recomendación	Evidencia científica
Restricción calórica	<ul style="list-style-type: none"> 500-1000kcal por debajo de las necesidades diarias, para inducir una pérdida de peso de 500-1000gr/ semana 	La restricción calórica induce la pérdida de peso y reducción de grasa hepática, independientemente de la composición de la dieta [123]
	<ul style="list-style-type: none"> Objetivo: 7-10% de pérdida de peso total 	Una intervención del estilo de vida durante 12 meses con una media de pérdida de peso de 8% reduce significativamente la esteatosis hepática [124]
	<ul style="list-style-type: none"> Enfoque de mantenimiento a largo plazo, incluyendo terapia cognitivo-conductual 	Si existe una reganancia de peso, la grasa hepática aumenta pero los efectos metabólicos se mantienen y la progresión a DM2 se retrasa [125]
Composición de macronutrientes	<ul style="list-style-type: none"> Ingesta baja-moderada de grasa y moderada-alta de CH* Dieta cetogénica baja en CH o hiperproteica 	La dieta mediterránea ha demostrado una mayor reducción de la grasa hepática, comparado con una dieta baja en grasa/alta en CH [126,127]
Fructosa	<ul style="list-style-type: none"> Evitar las bebidas y comidas ricas en fructosa 	La alta ingesta de fructosa se ha asociado al desarrollo de NAFLD [128]
Alcohol	<ul style="list-style-type: none"> Mantener la ingesta de alcohol estrictamente por debajo del límite de riesgo (30gr hombres; 20gr mujeres) 	Según estudios epidemiológicos, la ingesta moderada de alcohol (vino) por debajo del límite se asocia a una menor prevalencia de NAFLD, NASH y fibrosis [129-131]. La total abstinencia es obligatoria en enfermos con NASH-cirrosis, a fin de reducir el riesgo de HCC* [132]

Área	Recomendación	Evidencia científica
Café	<ul style="list-style-type: none"> Sin limitación 	Es un factor protector hepático en el NAFLD y otras hepatopatías de diferente origen, reduciendo la afectación histológica y mejorando la función hepática [133]
Ejercicio físico	<ul style="list-style-type: none"> Se prefiere 150-200min/ semana de ejercicio aeróbico moderado en 3-5 sesiones Ejercicio de resistencia (anaerobio) también es efectivo, favorece el fitness musculoesquelético, con efectos en los factores de riesgo metabólicos Altas tasas de fatiga por inactividad y somnolencia diurna reducen la adherencia al ejercicio 	El ejercicio físico ejerce un efecto dosis-dependiente, y el ejercicio vigoroso (correr) supone un mayor beneficio que el ejercicio moderado (caminar rápido), incluyendo en el NASH y fibrosis [134-136] No obstante, continuar el compromiso de seguir haciendo cualquier ejercicio físico o aumentar el nivel del mismo es mejor que seguir en la inactividad

*CH: carbohidratos; HCC: hepatocarcinoma. Fuente [1]: Association E, Association E, Easd D, Association E, Easo O. Clinical Practice Guidelines EASL – EASD – EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. Clinical Practice Guidelines. J Hepatol [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>

Añadido a la dieta y ejercicio, hay quienes proclaman la necesidad de añadir terapias cognitivo-conductuales que ayuden a la adherencia al tratamiento. Pero además, existen otras estrategias terapéuticas que podrían ayudar al tratamiento de la enfermedad si se añaden a los cambios en el estilo de vida, como son los suplementos nutricionales (n3 PUFA-s, antioxidantes naturales, prebióticos, probióticos y simbióticos), fármacos o incluso la cirugía bariátrica (Figura 6) [137].

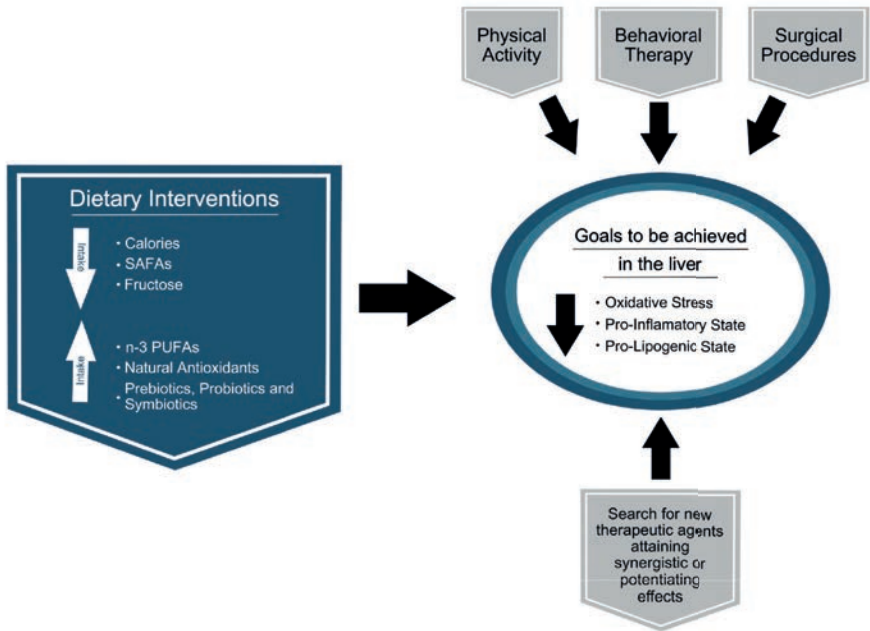


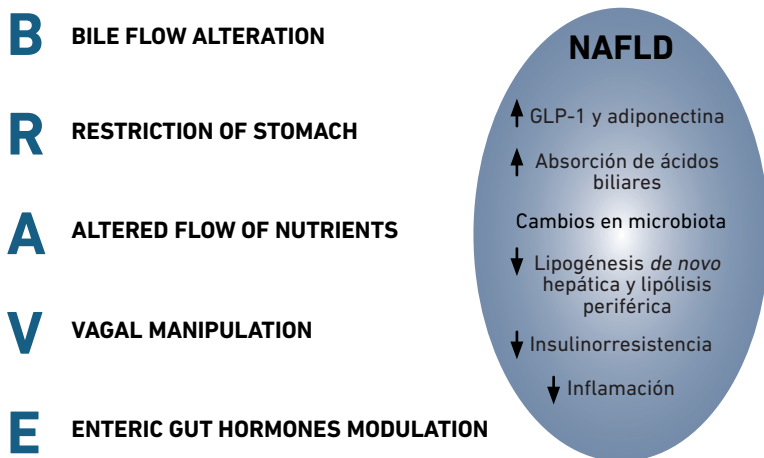
Figura 6. Esquema de tratamiento del NAFLD. El objetivo del tratamiento del NAFLD es evitar su progresión disminuyendo los factores que la empeoran, como son el estrés oxidativo, el estado proinflamatorio y prolipogénico. A los cambios en el estilo de vida pueden añadirse intervenciones que ayuden a alcanzar dichos objetivos. (SAFAs: saturated fatty acids; n-3 PUFAs: n-3 polyunsaturated fatty acids) Fuente [137]: *Hernandez-Rodas MC., Valenzuela R., Videla LA. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 25168-25198*

Actualmente existe una gran actividad científica entorno a la necesidad de encontrar un tratamiento añadido a los cambios del estilo de vida, ya que la adherencia a la dieta y ejercicio a largo plazo no resulta ser efectiva. No obstante, esto supone un reto muy difícil ya que la enfermedad por NAFLD es el resultado de un compendio de alteraciones metabólicas (obesidad, IR, dislipemia, estrés oxidativo, etc.), de múltiples señales provenientes de distintos órganos y, por lo tanto, encontrar un único fármaco o tratamiento que anule todos estos efectos es un gran desafío. Por el momento, ninguno de los suplementos o fármacos que se han planteado como posibles estrategias están aprobados para su uso corriente como tratamiento en el NAFLD, ya que no existen estudios de fase III con ninguno

de ellos y, por tanto, aunque se hayan observado efectos beneficiosos en numerosos ensayos clínicos, no existe aún la seguridad suficiente para su utilización.

Hasta el momento, y mientras no se encuentre el fármaco que pueda actuar sobre todas y cada una de las vías etiopatogénicas de la enfermedad, el tratamiento que se recomienda es la pérdida de peso y los cambios en el estilo de vida mediante la dieta y el ejercicio. En este sentido, la cirugía bariátrica se propone como otra posible herramienta terapéutica en el NALFD, ya que es la medida más efectiva que existe a corto y largo plazo para la pérdida de peso hasta el momento, y que además evita problemas como la escasa adherencia a las dietas y el ejercicio [138].

Pero además, son bien conocidos los efectos metabólicos de la cirugía bariátrica en la obesidad y la diabetes, llamados en conjunto “BRAVE” según su acrónimo en inglés (*Figura 7*) [139].



*Figura 7. Efectos metabólicos generales “BRAVE” de la cirugía bariátrica. B: alteración del flujo de ácidos biliares; R: restricción de la capacidad del estómago; A: tránsito alterado de los nutrientes; V: manipulación vagal; E: regulación de hormonas entéricas. Estos cambios metabólicos podrían ayudar a la enfermedad por NAFLD en los puntos que se muestran en la figura. Fuente [139]: Bower G. et al. *Bariatric Surgery and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review of Liver Biochemistry and Histology. OBES SURG (2015) 25:2280–2289**

Su papel como cirugía metabólica podría ser la clave para el tratamiento de NAFLD, ejerciendo acción sobre más de una diana al mismo tiempo, y presentando además continuación de sus efectos a largo plazo (Figura 8).

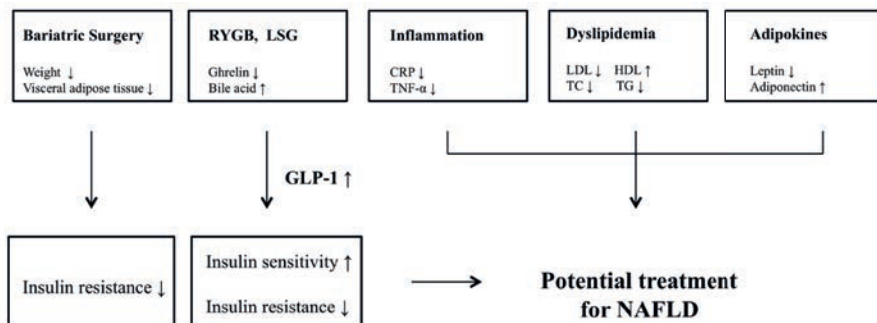


Figura 8. Posibles efectos metabólico-terapéuticos de la cirugía bariátrica en la enfermedad por NAFLD. RYGB: Roux en Y gastric bypass; LSG: laparoscopic sleeve gastrectomy; CRP: C-reactive protein; TC: total cholesterol; TG: tryglicerids; HDL: high density lipoprotein. Fuente [138] : Sasaki et al. Bariatric surgery and non-alcoholic fatty liver disease: current and potential future treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Oct 27;5:164

Esta propuesta se publicó en 2014, en una de las escasas revisiones que existen sobre el papel de la cirugía bariátrica en el NAFLD. Desde entonces hasta ahora, a los posibles mecanismos hay que añadir otras muchas vías que actualmente se están estudiando a nivel experimental: más adipokinas y señales inflamatorias (algunas ya mencionadas en este trabajo), la restauración de la microbiota intestinal y cambio del perfil de ácidos biliares, cambios epigenéticos y alteración de la transcripción génica, etc.

Numerosos estudios observacionales han descrito ya la mejoría analítica e histológica del NAFLD y NASH tras procedimientos bariátricos. [138,140,141]. La primera gran revisión sobre el tema es un metaanálisis publicado en la base Cochrane en el año 2010, de la mano de Chavez-Tapia et al. [140]. En él se concluye que la cirugía bariátrica es capaz de revertir la esteatosis y esteatohepatitis grasa, e incluso también mejorar la fibrosis en algunos casos. Como dato, en una serie prospectiva de seguimiento a un año de pacientes con NASH que fueron intervenidos, la reversión de la

esteatohepatitis se dio hasta en un 84% de casos, y el 34% mejoraron la fibrosis según datos histológicos [142]. No obstante, ya en esta primera revisión señalaban la necesidad de más estudios y mayor calidad de los mismos, dada la inexistencia hasta el momento de estudios randomizados a corto y largo plazo que evaluaran los efectos reales de la cirugía sobre el NAFLD. Desde entonces hasta ahora, aún no existen ensayos clínicos aleatorizados que estudien esta posibilidad terapéutica en humanos, por lo que la efectividad a corto y largo plazo, así como la seguridad de su aplicación en esta enfermedad en concreto es aún desconocida. Tampoco se han descrito los efectos de la cirugía bariátrica teniendo en cuenta el procedimiento llevado a cabo [1]. Las revisiones hasta ahora publicadas hablan sobre los beneficios de la cirugía bariátrica en general, pero no diferencian los efectos en base a si los procedimientos son malabsortivos, restrictivos o mixtos. La evidencia de la que se dispone hasta ahora se basa sobre todo en resultados analíticos e histológicos tras el bypass gástrico en Y de Roux ("BGR" técnica mixta, malabsortiva y restrictiva) y la banda gástrica (técnica restrictiva). Sobre otras técnicas populares y comunes en el mundo de la cirugía bariátrica no hay apenas evidencia siquiera observacional, como es el caso de la gastrectomía vertical o "sleeve gastrectomy" (técnica restrictiva), de la cual sólo existen dos estudios observacionales prospectivos describiendo únicamente cambios analíticos en plasma tras la realización del procedimiento [141,143,144].

Se entiende que la evidencia descriptiva hasta ahora publicada sea sobre todo en pacientes intervenidos mediante un BGR, ya que hasta el momento ésta ha sido la técnica *gold standard* más aclamada y realizada en bariátrica. Este procedimiento aúna restricción y malabsorción, potenciando así el efecto de pérdida de peso a corto y largo plazo, junto con el de regulación del metabolismo. Sin embargo, en los últimos años existe una tendencia al alza de realizar cada vez más gastrectomías verticales a nivel mundial [145], ya que es un procedimiento técnicamente más sencillo, reproducible, menos invasivo en el tracto gastrointestinal, que no tiene las complicaciones relativas a una técnica malabsortiva (fundamentalmente malnutrición, además de alterar el circuito enterohepático) y que además ha demostrado ejercer también un efecto metabólico sistémico, consiguiendo ser una de las técnicas recomendadas para el tratamiento de la diabetes no respondedora a fármacos en pacientes con obesidad de clase I (IMC 30-35) [146,147]. Son varios los mecanismos reguladores del metabolismo que se le atribuyen a esta técnica; entre los más estudiados se encuentran la disminución de la grelina debido a la resección del fundus

gástrico o el efecto incretínico mediante el aumento de GLP-1 a nivel de intestino delgado. Otras teorías se encuentran aún en desarrollo y fases experimentales, como su efecto sobre la microbiota y la circulación de ácidos biliares.

En cuanto a los efectos beneficiosos de la cirugía bariátrica concretamente en la enfermedad por NAFLD, actualmente se están publicando cada vez más estudios experimentales que intentan dar explicación a los cambios observados en los estudios descriptivos. Entre ellos, merece destacar algunos de los más recientes en la tabla 3:

Tabla 3. Recientes estudios experimentales sobre el efecto de la cirugía bariátrica en el NAFLD.

Autor	Año	Animal de experimentación	Técnica quirúrgica	Parámetro estudiado
Du et al. [148]	2017	Ratones C57BL/6J wild-type	SG	Cambios en la regulación génica del metabolismo lipídico
Ezquerro et al. [149]	2016	Ratas Wistar Han	SG	Aumento del ratio acil-grelina/desacil-grelina, DNAmít hepático y β -oxidación de FFA
Ding et al. [150]	2016	Ratones C57BL/6J wild-type	SG	Activación de receptor TGR5 y cambio en el perfil de ácidos biliares circulantes
Mosinski et al. [151]	2016	Ratas Sprague Dawley	BGYR	Disminución del estrés del ER y apoptosis de hepatocitos
Myronovych et al. [152]	2014	Ratones C57BL/6J wild-type	SG	Cambios en ácidos biliares circulantes y supresión de genes lipogénicos hepáticos, independiente a la pérdida de peso
Verbeek et al. [153]	2014	Ratones C57BL/6J wild-type	BGYR	Mejoría en la IR, fibrosis y función mitocondrial hepática

SG: sleeve gastrectomy; BGYR: bypass gástrico en Y de Roux; DNAmít: DNA mitocondrial; FFA: free fatty acids; TGR5: transmembrane G protein-coupled receptor 5

Sin embargo, tal y como indican las últimas guías, tan importantes como la última declaración de la IFSO ("*International Federation for the Surgery of Obesity and metabolic disorders*") sobre la cirugía bariátrica en la obesidad y enfermedades relacionadas [154], la evidencia sigue siendo mínima y por el momento es prematuro considerar la cirugía bariátrica un tratamiento establecido para la enfermedad por NAFLD.

**ESTUDIO
EXPERIMENTAL**

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

2.1. HIPÓTESIS

La hipótesis que se propone es que la cirugía bariátrica es capaz de modificar y mejorar las alteraciones relacionadas con el NAFLD de manera amplia, abordando más de un mecanismo etiopatogénico de la enfermedad, y de una forma más eficaz y duradera en comparación a la dieta hipocalórica.

2.2. OBJETIVO

El objetivo del ensayo clínico que plantea este trabajo es el de, a partir de un modelo experimental de NAFLD en ratas creado mediante dieta rica en grasas, estudiar ciertas alteraciones bioquímicas, histológicas, hormonales, moleculares tisulares y de expresión génica de la enfermedad, y comparar los cambios que se producen en estos valores tras aplicar tratamiento mediante dieta hipocalórica (VLCD o “*very low calorie diet*”) vs. cirugía bariátrica (Bypass gástrico en Y de Roux –BGYR- o Gastrectomía vertical –SG-).

Además de los resultados que se obtengan, este estudio también tiene la intención de aportar mayor validez a la evidencia publicada hasta ahora, con la intención de proporcionar nuevos datos que ayuden a consolidar la indicación de la cirugía metabólica-bariátrica como posible tratamiento para la enfermedad por NAFLD.

2.3. METODOS

2.3.1. Animales

Para realizar el estudio experimental se han utilizado 42 ratas Wistar Han macho, no modificadas genéticamente, de 7-8 semanas de edad y un peso inicial medio de 200-250gr (proveedor: Harlan Laboratories Models, S.L.). Las ratas fueron estabuladas en jaulas y alimentadas según el grupo al que pertenecían (más adelante se explica), bajo condiciones estándar de laboratorio: a temperatura ambiente, con luz de intensidad media respetando el ciclo circadiano diurno y nocturno, con 3 individuos de diferente grupo en cada jaula distribuidos aleatoriamente y con acceso

libre a agua potable.

Para el planteamiento y ejecución del trabajo se han seguido las directrices del tratado de la Unión Europea para el cuidado ético de animales de experimentación (Directiva EC 86/ 609/EEC para experimentos con animales) y previo a su inicio se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Germans Trias i Pujol, donde se llevó a cabo la parte experimental con animales (CEIC HUGTiP; Ref. EO-12-048).

2.3.2. Modelo experimental (Figura 9)

Los 42 individuos se randomizaron a 6 grupos de estudio:

1. Grupo control (n=7): recibieron una dieta estándar *ad libitum* (SD, "*standard diet*"): dieta genérica de mantenimiento para roedores Teklad Global 14% de proteína, Teklad Diets Madison WI; Harlan Laboratories) durante todo el estudio, hasta su sacrificio.
2. Grupo obesos HFD (n=7): recibieron una dieta hipercalórica rica en grasas *ad libitum* (HFD, "*high-fat diet*"): Ref. TD.06414 Harlan Laboratories, Inc. Madison, WI) hasta el final del estudio experimental.
3. Grupo VLCD (n=7): grupo de ratas que inicialmente recibieron una dieta hipercalórica rica en grasas *ad libitum* (HFD) hasta alcanzar la ganancia ponderal deseada, y al que posteriormente se le cambió la dieta por una de bajo contenido calórico *ad libitum* (VLCD o "*very low-calorie diet*"): Ref. TD.140200 Harlan Laboratories, Inc. Madison) hasta el final del estudio experimental.
4. Grupo Sham (n=7): grupo de ratas que inicialmente recibieron una dieta hipercalórica rica en grasas *ad libitum* (HFD) hasta alcanzar la ganancia ponderal deseada, y al que posteriormente se le sometió a un estrés quirúrgico diferente a la cirugía bariátrica (procedimiento sham, se explica más adelante). Permanecieron en dieta absoluta las 12-24h primeras horas postoperatorias, y de ahí en adelante recibieron una dieta estándar *ad libitum* (SD) hasta el final del estudio.

5. Grupo Sleeve o SG (n=7): grupo de ratas que inicialmente recibieron una dieta hipercalórica rica en grasas *ad libitum* (HFD) hasta alcanzar la ganancia ponderal deseada, y que posteriormente fueron tratadas mediante cirugía bariátrica realizándoles una gastrectomía vertical (SG o "*sleeve gastrectomy*", se explica más adelante). Durante el postoperatorio inmediato se las mantuvo con una dieta líquida enriquecida en glucosa y, dependiendo de la evolución clínica, a las 24-48 horas reiniciaron dieta estándar *ad libitum* (SD) hasta el final del estudio.

6. Grupo Bypass o BGYR (n=7): grupo de ratas que inicialmente recibieron una dieta hipercalórica rica en grasas *ad libitum* (HFD) hasta alcanzar la ganancia ponderal deseada, y que posteriormente fueron tratadas mediante cirugía bariátrica realizándoles un bypass gástrico en Y de Roux (BGYR, se explica más adelante). Durante el postoperatorio inmediato se las mantuvo con una dieta líquida enriquecida en glucosa y, dependiendo de la evolución clínica, a las 24-48 horas reiniciaron dieta estándar *ad libitum* (SD) hasta el final del estudio.

Los animales que formaban parte de los tres grupos en los que había que realizar una intervención quirúrgica fueron estabulados de forma aleatoria pero habiendo siempre un representante de cada grupo en cada jaula. De esta forma se pretendió eliminar posibles factores de confusión secundarios a motivos ambientales.

Para considerar obesas a las ratas de los grupos que recibieron HFD a su inicio, se estableció un mínimo de ganancia ponderal de >20% respecto del grupo control. Este objetivo de ganancia ponderal se alcanzó en la semana 10 del estudio.

Una vez alcanzado el objetivo de ganancia ponderal, entre la semana 10 y 11 del estudio se realizaron las correspondientes intervenciones previstas para cada grupo, ya especificadas previamente (cambio de dieta a hipocalórica en el grupo VLCD e intervenciones quirúrgicas en los grupos Sham, SG y BGYR). También con el objetivo de minimizar posibles factores de confusión, las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas por un único investigador y se operaron un animal de cada grupo quirúrgico cada día (1 sham + 1 sleeve + 1 bypass cada día, por un único cirujano investigador).

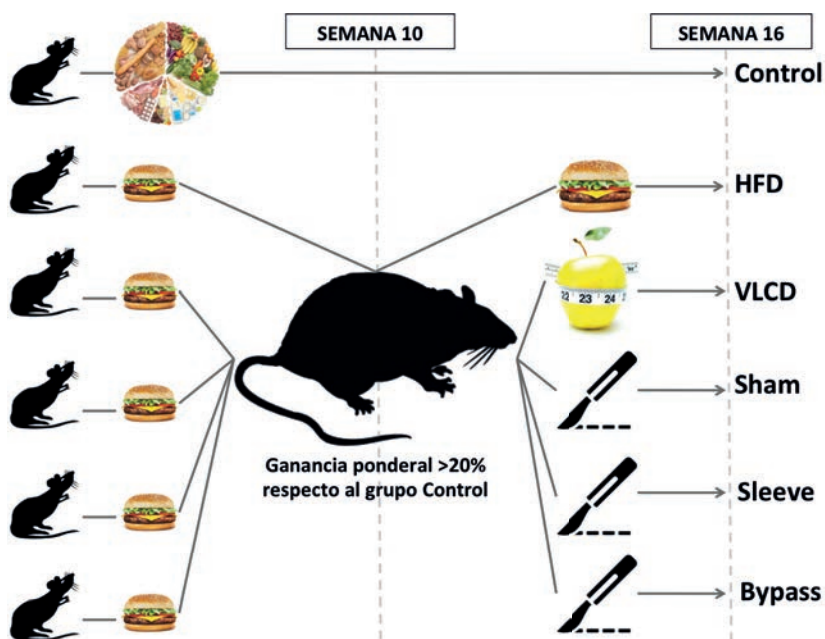


Figura 9. Modelo experimental. Tras recibir dieta hipercalórica rica en grasas, las ratas alcanzaron el objetivo de ganancia ponderal deseado en la semana 10. En ese momento se llevaron a cabo los respectivos tratamientos (cambio a dieta VLCD o cirugía: sham, sleeve o bypass) y se continuó el estudio hasta la semana 16, momento en el que se sacrificaron todos los grupos y se tomaron las muestras para estudio. Los grupos control y HFD mantuvieron su dieta inicial hasta el final del estudio. Los grupos quirúrgicos continuaron con una dieta estándar desde la cirugía hasta su sacrificio.

2.3.3. Dietas

Dieta estándar (SD). Fórmula fija diseñada para la longevidad y mantener el normopeso en roedores, con un contenido calórico de 2.9kcal/gr y macronutrientes distribuidos de la siguiente forma: 67% de carbohidratos, 13% de grasas y 20% de proteínas (Teklad Global 14% proteica, Teklad Diets Madison WI; Harlan Laboratories).

Dieta hipercalórica rica en grasas (HFD). Dieta con un contenido hipercalórico de 5.1kcal/gr, la mayoría provenientes de la grasa: 21.3% proviene de los carbohidratos, 60.3% de las grasas y 18.4% de las proteínas (Ref. TD.06414 Harlan Laboratories, Inc. Madison, WI).

Dieta hipocalórica (VLCD). Formula hipocalórica e hiperproteica, con un 45% de carbohidratos, 20% de grasas y 35% de proteínas, que aportan 3.6kcal/gr (Ref. TD.140200 Harlan Laboratories, Inc. Madison). Esta dieta, administrada a las ratas obesas, pretende simular la restricción calórica que se les aplica a los individuos obesos como tratamiento en el NAFLD.

2.3.4 Cirugías (Figura 10)

Las cirugías se llevaron a cabo con isoflurane inhalado como único medio anestésico, administrado mediante una máscara para roedores conectada a una máquina de anestesia veterinaria, a concentración de 5% durante la inducción y posteriormente 1-2% según necesidad para su mantenimiento. En el momento de la inducción se rasuró el abdomen de los animales, se desinfectó la superficie a intervenir con povidona yodada y se administró meloxicam (1mg/kg) y amoxicilina-clavulanico (150mg/kg) subcutáneos para la analgesia y profilaxis antibiótica respectivamente [155].

SHAM

La intervención tipo sham consistió en realizar una laparotomía media suprainfraumbilical y únicamente movilizar el paquete intestinal y el estómago, con una duración total de la intervención de unos 5-10min.

GASTRECTOMÍA VERTICAL

La intervención de gastrectomía vertical (Sleeve) se modificó y adaptó para roedores, pero siempre siguiendo los mismos principios que el propio procedimiento en humanos [156]. Se accedió a la cavidad abdominal mediante una laparotomía media suprainfraumbilical en todos los casos. Se realizó una gastrectomía vertical, resecao aproximadamente el 80-90% del estómago de esta forma, y posteriormente se cerró la gastrectomía mediante una sutura continua no-absorbible de polipropileno 6/0 (Prolene®, Ethicon US). El procedimiento duró alrededor de 45-60min en todos los casos.

BYPASS GÁSTRICO EN Y DE ROUX

Al igual que la gastrectomía vertical, el procedimiento de BGYR se adaptó para roedores siguiendo los principios básicos en humanos [157]. Se decidió modificar el modelo original en cuanto a las longitudes de asa: se realizó un asa biliopancreática de unos 10-12cm, anastomosada al asa alimentaria a unos 20cm del ciego. Dada su complejidad en ratas, esta intervención llegó a alcanzar alrededor de las 3-4h de duración.

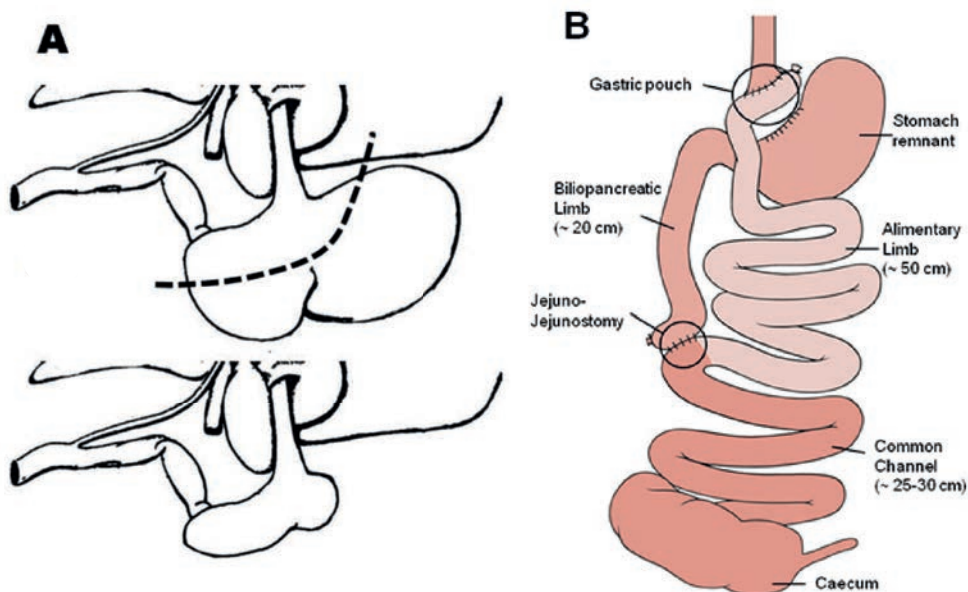


Figura 10. Cirugía bariátrica modificada para roedores. A) Gastrectomía vertical: se realiza la sección vertical del estómago, reseca la curvatura mayor y extrayendo aproximadamente el 80-90% del volumen gástrico total; B) Bypass gástrico en Y de Roux: se realiza un bypass malabsortivo del tracto gastrointestinal y se añade una parte restrictiva creando un "pouch" o reservorio a expensas del estómago proximal. La longitud de las asas del bypass fueron modificadas, realizado un asa biliopancreática de 10-12cm y creando un asa común a unos 20cm del ciego. Fuentes [156,157]: Ph D, Johnson FK. Development of a sleeve gastrectomy weightloss model in obese Zucker rats. NIH Public Access. 2010;157(2): 567-83 / Bueter, M., Abegg, K., Seyfried, F., Lutz, T.A., le Roux, C.W. Roux-en-Y Gastric Bypass Operation in Rats. J. Vis. Exp.2012;(64),e3940.

En todos los casos las intervenciones concluyeron con el cierre de la laparotomía media mediante sutura continua no-absorbible de seda 2/0 (PERMA-HAND®, Ethicon US).

Todos los grupos quirúrgicos continuaron recibiendo analgesia subcutánea con meloxicam (1 mg/kg) y los grupos de SG y BGYR recibieron también amoxicilina-clavulánico subcutáneo (150mg/kg) durante las siguientes 24-48h, según criterio clínico.

Las ratas del grupo Sham permanecieron en dieta absoluta las 12-24h primeras horas postoperatorias, y de ahí en adelante recibieron una dieta estándar *ad libitum* (SD) hasta el final del estudio. A las de los grupos SG y BGYR, por el contrario, durante el postoperatorio inmediato se las mantuvo con una dieta líquida enriquecida en glucosa y, dependiendo de la evolución clínica, a las 24-48 horas reiniciaron dieta estándar *ad libitum* (SD) hasta el final del estudio.

2.3.5. Recogida de muestras

Tras las intervenciones, se mantuvo a las ratas bajo observación y recogida de datos ponderales semanales durante un mes y medio, hasta la finalización del estudio en la semana 16.

En este tiempo hubo pérdidas en los grupos Sham y Bypass: 1 de los individuos sham falleció durante la inducción anestésica, previo a iniciar la intervención; el grupo de Bypass superó las intervenciones en el tiempo intraoperatorio, pero 5 de los 7 individuos fallecieron durante el seguimiento postoperatorio. Por lo tanto, en el momento de los sacrificios la n final fue de 36 (Control n=7; Obesas n=7; VLCD n=7; Sham n=6; Sleeve n=7; Bypass n=2).

Respecto a la recogida de datos sobre los pesos, estos se recogieron semanalmente desde la semana 1 hasta la 16, pudiendo registrar la evolución previa y posterior a los tratamientos.

En la semana 16 se llevaron a cabo los sacrificios y recogida de muestras para su análisis en el laboratorio. Todos los sacrificios se llevaron a cabo bajo anestesia general con isoflurane inhalado.

Se tomaron muestras de sangre de la arteria carótida, se procesaron los tubos en la centrifuga a 1500-2000g durante 10 minutos y se almacenaron a 4°C hasta la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales plasmáticos.

Las biopsias de parénquima hepático se tomaron previo lavado del mismo instilando suero fisiológico a través de la vena porta, con la intención de lavar y retirar el mayor contenido de sangre posible y eliminar así cualquier interferencia a la hora de hacer las determinaciones proteicas pertinentes. En cada animal se tomaron cinco muestras:

- 1 biopsia de aproximadamente 0.5cm fijada en 4% paraformaldehído durante 24-48h, posteriormente pasada a 50% etanol hasta 7 días máximo para su deshidratación y finalmente fijada en bloques de parafina para realizar estudios inmunohistoquímicos (IHC) e histológicos.
- 3 muestras de aproximadamente 1cm congeladas en isopentano y guardadas en crioviales para su almacenamiento y preservación a -80°C, con intención de utilizarlas para estudios de medición de proteínas mediante Western Blot (WB) y estudios histológicos.
- 1 muestra de aproximadamente 0.5cm guardada en solución RNAlater en microviales "RNAse free" a 4°C, para la determinación de expresión génica cuantitativa mediante estudios de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR o "Real time quantitative polymerase chain reaction").

2.3.6. Análisis de datos (ANEXO 1: Técnicas de laboratorio)

2.3.6.1. Marcadores bioquímicos, hormonales y de inflamación en plasma

A partir de las muestras de sangre obtenidas y mediante técnicas ELISA/EIA (Anexo 1) se estudiaron niveles plasmáticos de:

- Bioquímica general, perfil hepático y lipídico: aspartato-transaminasa y alanin-transaminasa (AST y ALT), fosfatasa alcalina (ALP), lactato deshidrogenasa (LDH), albúmina, creatinina, urea, sodio, potasio, glucosa, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL) y triglicéridos.

- Hormonas: insulina, leptina, grelina y visfatina.
- Citokinas inflamatorias: IL6, IL10, MCP-1, IL17 α y TNF α .

La interleukina IL17 α es una citokina presente en la inflamación crónica propia de la obesidad, que además se ha relacionado con la progresión del NAFLD hacia esteatohepatitis y NASH [158]. Por el contrario, la IL10 es una interleukina reguladora de la respuesta inflamatoria, tiene un efecto anti-inflamatorio sistémico y también ejerce un efecto protector hepático frente a la esteatosis y el síndrome metabólico [68].

* A partir de los valores de glucosa e insulina, se calculó el índice HOMA-IR para cada grupo, el cual se menciona ya en este trabajo (*Introducción* → “NAFLD y su relación con el síndrome metabólico, la obesidad y la diabetes”).

2.3.6.2. Histología

Por un lado, a partir de muestras de hígado congeladas en isopentano se realizaron tinciones Oil Red de todos los individuos para el estudio cuantitativo de la esteatosis presente en los hígados de cada uno de los grupos.

Por otro lado, a partir de las muestras en bloques de parafina se realizaron cortes de 3- μ m de grosor para el estudio específico de fibrosis mediante la tinción 0.1% Picro-Sirius Red, y también para visualizar la presencia de esteatosis, esteatohepatitis (inflamación lobulillar, ballooning en los hepatocitos) y/o cirrosis mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E).

Tanto los cortes en H&E como los teñidos con 0.1% Picro-Sirius Red fueron revisados por una anatomopatóloga experta, quien estudió y cuantificó las alteraciones relativas al NAFLD mencionadas para después puntuar su presencia siguiendo el sistema de puntuación histológica del “NASH Clinical Research Network” (NASH CRN) [159,160] (*Tabla 4*). La puntuación de cada corte y por cada característica se adjunta en el Anexo 2.

Tabla 4. NASH CRN Histological Scoring System.

Esteatosis	<5%	0
	5-33%	1
	33-66%	2
	>66%	3
Inflamación lobulillar	No foci	0
	<2 foci x200	1
	2-4 foci x200	2
	>4 foci x200	3
Ballooning hepatocelular	No ballooning	0
	Pocas células	1
	Muchas células / Ballooning prominente	2
Fibrosis	No fibrosis	0
	Leve fibrosis perisinusoidal (Zona 3)	1a
	Moderada fibrosis perisinusoidal (Zona 3)	1b
	Fibrosis portal/periportal	1c
	Fibrosis Zona 3 + portal/periportal	2
	Fibrosis en puente	3
	Cirrosis	4

Fuentes [159,160]: Kleiner DE, Brunt EM, Van NattaM, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–21 / Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol*. 2014;5(3):211–8.

Basándose en los datos y la puntuación obtenida mediante este sistema de puntuaje, se calculó el “SAF score” tal y como describe el trabajo de Bedossa *et al.* [161]. A diferencia del “NAS activity score”, el “SAF score” pretende identificar los casos de NAFL y NASH distinguiendo el grado de esteatosis (S), actividad inflamatoria (A) –con la suma de la inflamación lobulillar y el ballooning– y la fibrosis (F). Este score ofrece la ventaja de identificar aquellos casos de NASH y diferenciarlos de los hígados que puedan mostrar inflamación lobulillar o ballooning por cualquier otra causa diferente a NAFLD. El “NAS activity score”, en cambio, no es capaz de hacer esta distinción.

2.3.6.3. Marcadores de daño endotelial, inflamación, activación de HSC y fibrosis en tejido hepático

Daño endotelial:

Varios estudios han demostrado que el daño endotelial hepático es incluso anterior al desarrollo de esteatosis en la evolución del NAFLD, en gran parte debido a la IR que también afecta a las células endoteliales de la microcirculación hepática [162,163]. Siguiendo los trabajos de Pasarín *et al.*, mediante técnica de WB (*Anexo 1*) realizamos el análisis de la expresión de varias proteínas implicadas en la vasoconstricción y vasodilatación sinusoidal, con la intención de evaluar las alteraciones precoces de la enfermedad:

- *Rho-kinasa 2 (ROCK2)*: kinasa responsable de varias funciones celulares, entre ellas la constricción de la musculatura lisa mediante la inhibición de la defosforilación de la miosina [164]. En estados de resistencia vascular intrahepática (p.ej.: cirrosis) existe mayor activación de la vía de señalización RhoA/Rho-kinasa, la cual es fundamental para la regulación del tono vascular (*Figura 11*) [165,166].
- *Moesina y p-Moesina*: proteínas intermedias en la vía de la vasoconstricción modulada por RhoA/Rho-kinasa. La Rho-kinasa 2 (ROCK2), tras su activación, previo a provocar la constricción de la miosina impidiendo su defosforilación, induce la fosforilación de la proteína moesina resultando mayor cantidad de p-moesina. En este estudio se han medido la moesina total y su porción activa, p-moesina, como indicadores de activación de la vía RhoA/Rho-kinasa y, por tanto, de vasoconstricción [166].
- *CD31 (PECAM1, "platelet and endothelial cell adhesion molecule 1")*: proteína de membrana presente en plaquetas, monocitos, neutrófilos, algunos tipos de células T y parte importante de las uniones intercelulares entre las células endoteliales. Sus funciones consisten en la migración de leucocitos, angiogénesis y activación de integrinas. En estados normales no se expresa en las células del endotelio sinusoidal hepático, ya que el endotelio sinusoidal es fenestrado y no presenta gran parte de las proteínas de unión que presenta el resto del endotelio

vascular del organismo. No obstante, cuando existe un daño hepático, las células sinusoidales sufren un cambio de fenotipo (capilarización) que hace que la proteína CD31 se exprese también en estas. Por tanto, su presencia en el hígado indica el cambio fenotípico de las células sinusoidales en respuesta al daño hepatocitario [167].

- *Akt/p-Akt*: la proteína Akt es una proteína intermedia de la vía de la vasodilatación insulino dependiente en las células del endotelio sinusoidal. Su porción activa, la p-Akt, induce la fosforilación de eNOS, que a su vez provoca la liberación de óxido nítrico (NO), lo cual tiene un efecto vasodilatador local [163].
- *eNOS/p-eNOS*: proteína efectora vasodilatadora en las células endoteliales. Su fosforilación (p-eNOS) hace que se libere mayor cantidad de óxido nítrico (NO), lo cual tiene un efecto vasodilatador mediante la defosforilación de la miosina y ulterior relajación. Al igual que las proteínas Akt/p-Akt, en estados de IR y síndrome metabólico, tanto Akt como eNOS ven disminuída su acción por defecto de activación de esta vía, ya que es insulino dependiente en las células endoteliales [163,165].

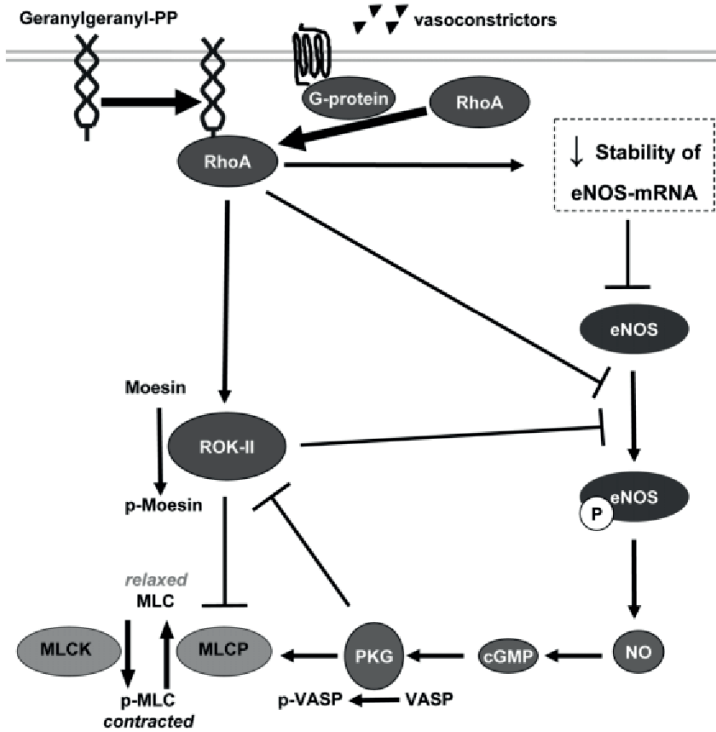


Figura 11. Vías de contracción en la musculatura lisa vascular. En la imagen se explica la vía de acción ROCK2 o ROK-II, su interacción con la moesina y p-moesina, además de mostrar su efecto sobre la vía vasodilatadora de e-NOS. Fuente [165]: *Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. Hepatology. 2007 Jul;46(1):242-53*
 ROK-II: rho-kinasa 2; MLCP: myosin light chain phosphatase; MLC: myosin light chain; p-MLC: phospho-myosin light chain; PKG: protein kinase G.

Inflamación hepática:

Además del estudio histológico sobre la presencia de inflamación hepática, también se estudió la presencia de proteínas que se elevan ante un daño inflamatorio en el hígado, mediante estudio por WB e inmunohistoquímica (*Anexo 1*):

- *iNOS* ("*inducible nitric oxide synthase*"): enzima sintetasa de óxido nítrico que aumenta su concentración en los hepatocitos tras el estrés oxidativo inflamatorio, al igual que otros productos derivados de la activación del receptor nuclear hepatocitario NF- κ B, como las interleukinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF α o TGF- β 1. La producción aumentada de NO en los hepatocitos resulta tóxica, llevando a estos a su apoptosis. Además, la presencia aumentada de iNOS a su vez es capaz de activar las células de Kupffer, las cuales también son productoras de iNOS, lo cual perpetúa este ciclo inflamatorio en el hígado [168]. El estudio de su concentración en las muestras de tejido hepático congelado se realizó mediante WB.
- *CD43*: proteína de membrana panleucocitaria, marcadora del infiltrado inflamatorio adaptativo (linfocitos T) en respuesta a una agresión hepatotóxica. Su presencia se analizó mediante inmunohistoquímica, sobre cortes a partir de tejido congelado [163].

Activación de HSCs y fibrogénesis:

La fibrosis hepática es un proceso de cicatrización en principio reversible por el gran poder regenerativo hepático, que se da en respuesta a daños hepáticos tanto agudos como crónicos, y que se encuentra a caballo entre el proceso regenerativo hepático y la formación de cicatrices permanentes que, con el paso de los años, dan lugar a cirrosis.

Para que el proceso de fibrosis se lleve a cabo, es fundamental la activación de las HSCs. Estas células se encuentran en el espacio de Disse, estratégicamente situadas para la interacción con los hepatocitos, el endotelio y las células nerviosas. Así pues, además de ser un factor clave para la fibrogénesis, son células que contribuyen a la activación del sistema inmune mediante la liberación de citocinas, sustancias quimiotácticas, e interacción con las células inmunitarias.

Previo al inicio de la fibrosis hepática, las HSCs reciben el estímulo inicial de daño hepático (normalmente provenientes de células como las de Kupffer, hepatocitos y sinusoidales) que hace que estas HSCs pasen de un estado quiescente a un estado activo. Este estado inicial de activación hace que tanto el fenotipo como el patrón de expresión génica cambie en las HSCs. Si el estímulo externo persiste, el estado de activación se perpetúa, haciendo que las HSCs cambien su comportamiento y desempeñen funciones de proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, degradación de matriz extracelular y de mayor liberación de citocinas proinflamatorias. Dependiendo del daño externo y de su evolución, el poder regenerativo hepático puede frenar el proceso de fibrogénesis haciendo que las HSCs pasen de nuevo a un estado quiescente o induciendo su apoptosis (*Figura 12*) [169,170].

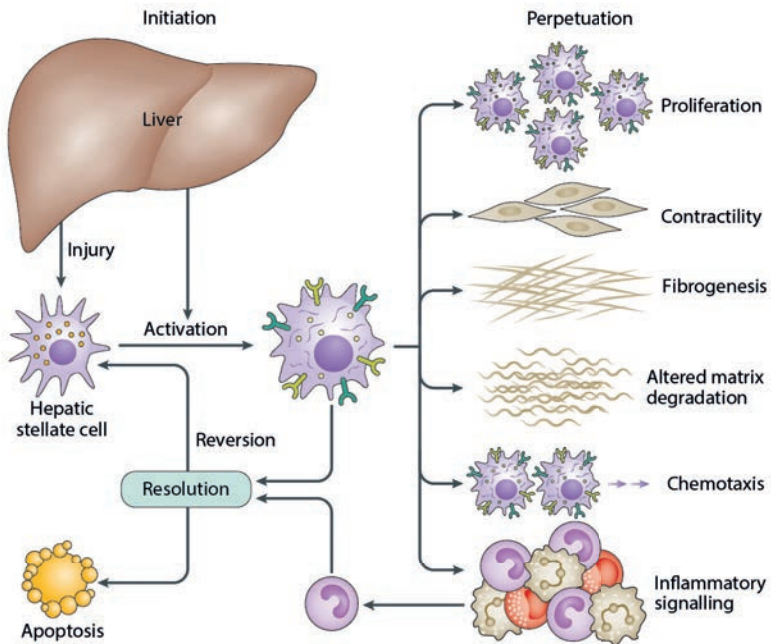


Figura 12. Función, características y fenotipos de las HSCs en el hígado sano y enfermo.
 Fuente [170]: Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2017 14, 397–411

La activación de las HSCs y el proceso de fibrogénesis requieren de unas señales intercelulares específicas. En este estudio analizamos la activación de las HSCs y el proceso fibrogenético mediante la medición de ciertas señales implicadas en el proceso:

- *α -SMA (alpha-smooth muscle actin)*: tras su activación, en el momento de cambio fenotípico e inicio de funciones proliferativas, las HSCs expresan α -SMA. El α -SMA es pues un marcador de activación de estas células, que indica que las HSCs se encuentran activas respondiendo a un daño externo mediante funciones proliferativas y fibrogénicas [171,172]. En nuestro trabajo estudiamos la presencia de esta proteína mediante WB e inmunohistoquímica, y también su expresión con técnica de RT-qPCR (Anexo 1).
- *Col1A1 o Col1 ("collagen type I alpha 1 chain")*: gen que se expresa en las HSCs activas para la producción de fibras de colágeno tipo 1. Su expresión se estudió mediante RT-qPCR.
- *PDGF/R-PDGF ("platelet-derived growth factor" y "platelet-derived growth factor receptor")*: la unión del factor de crecimiento PDGF a su receptor RPDGF en la membrana celular de las HSCs es una de las vías de activación de las HSCs más conocidas. Las HSCs activas, además, tienen la capacidad autocrina de producir factores de crecimiento, activando a otras células a su alrededor. La unión entre ambos produce una serie de señales intracelulares que finalmente terminan por inducir la proliferación de las HSCs. A esto le sigue el cambio al fenotipo fibrogénico y contráctil. Así pues, la presencia de PDGF y RPDGF se correlaciona con la cantidad de fibrosis e inflamación hepática [169,173]. En nuestro estudio se cuantificó su expresión mediante RT-qPCR.
- *VEGF ("vascular endothelial growth factor")*: al igual que el PDGF, este factor de crecimiento contribuye a la activación y proliferación de las HSCs, y también es sintetizado y secretado por estas últimas, ejerciendo un efecto tanto autocrino como paracrino sobre las células endoteliales de los sinusoides, donde favorece la angiogénesis [169]. También se llevaron a cabo estudios de RT-qPCR para cuantificar su expresión.

2.3.7. Análisis estadístico

En este estudio, los resultados se expresan como media \pm error o desviación estándar de la media (SD). La comparación entre las medias se realizó utilizando los test estadísticos t-Student o ANOVA según los grupos, o el test de Kruskal-Wallis en el caso de que se detectara una falta de homogeneidad entre los grupos para la variable estudiada. La significancia estadística se ha considerado en $p < 0.05$, con un intervalo de confianza de 95%. El análisis estadístico se ha realizado con los programas "STATA versión 13.0" (StataCorp LP, Texas, USA) e "IBM SPSS statistics 21.0".



RESULTADOS

3. RESULTADOS

En el análisis de los datos y resultados, dada la pérdida de 5 de los 7 individuos de Bypass durante la fase experimental (n final=2), se decidió no incluir a este grupo ya que la diferencia en número respecto al resto de grupos lo hace estadísticamente imposible de comparar.

3.1. EVOLUCIÓN DEL PESO

Gracias al pesaje semanal de cada uno de los animales participantes, desde la semana 1 hasta la finalización del estudio en la semana 16, se han podido elaborar curvas de evolución del peso antes y después de los tratamientos (*Figuras 13 y 14*). Las tablas con las medias de los pesos por individuo y por grupo, y también las estadísticas, se adjuntan en el Anexo 3. En ellas se puede observar lo siguiente:

1. El grupo Control sigue una ganancia de peso estable durante todo el estudio, al igual que el grupo de obesas (HFD) que también mantiene un incremento de peso wconstante, aunque en un rango mayor, como era esperable.
2. El grupo VLCD muestra una ganancia de peso durante la ingesta de dieta hipercalórica que, posteriormente, al introducir la dieta hipocalórica, ni continúa incrementando ni desciende significativamente, sino que más bien se mantiene estable.
3. Tanto el grupo Sham como Sleeve (SG) experimentan un descenso de peso llamativo a partir de la semana 10-11, tras las cirugías. No obstante, es el grupo SG el que mayor pérdida de peso muestra.
4. Globalmente, si se comparan las diferencias globales de todos los grupos conjuntamente antes y después de las intervenciones, existen diferencias significativas ($p=0.014$). Sin embargo, si se estudian las diferencias grupo por grupo, encontramos que existen diferencias significativas en las variaciones ponderales en todos los grupos antes y después de la semana 10 ($p<0.001$ en todos), salvo en el grupo VLCD que no muestra diferencias antes y después de la introducción de la dieta hipocalórica ($p=0.791$).

- En cuanto a la comparación entre grupos, en la toma de peso previa a los tratamientos no existe diferencia entre ellos. Sin embargo, al finalizar el estudio existen diferencias: los grupos quirúrgicos sham y SG muestran diferencias frente al grupo de obesas HFD, y también frente al grupo VLCD, aunque la diferencia entre sham y VLCD roza la significancia estadística ($p=0.050$) mientras que la diferencia entre SG y VLCD es amplia ($p=0.002$). Sorprendentemente, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo VLCD y el grupo de obesas HFD ($p=0.059$).

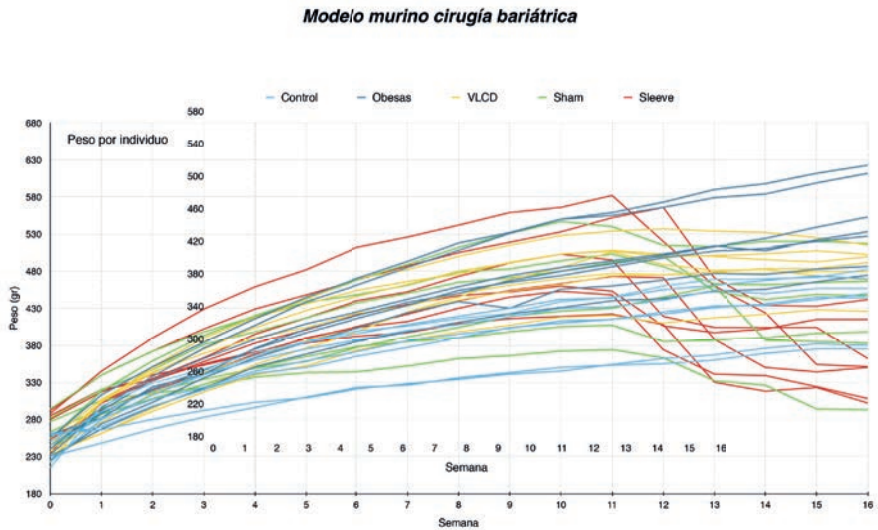


Figura 13. Gráfica de evolución del peso semanal por individuo. (Azul claro: grupo Control; Azul oscuro: grupo Obesas (HFD); Amarillo: grupo dieta hipocalórica VLCD; Verde: grupo Sham; Rojo: grupo Sleeve).

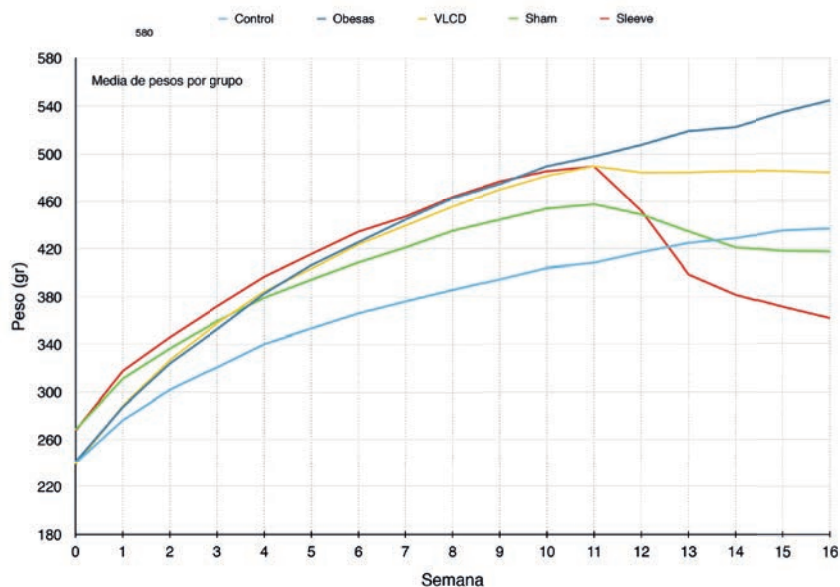


Figura 14. Gráfica de evolución del peso semanal por grupo. (Azul claro: grupo Control; Azul oscuro: grupo Obesas (HFD); Amarillo: grupo dieta hipocalórica VLCD; Verde: grupo Sham; Rojo: grupo Sleeve).

3.2. BIOQUÍMICA GENERAL, HORMONAS E INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN PLASMA

En la Tabla 5 se muestran los valores medios \pm SD de cada grupo por cada elemento estudiado. En el Anexo 4 se adjunta la tabla de valores por cada marcador estudiado en cada individuo.

Entre los resultados obtenidos, y al hacer la comparación entre grupos, llama la atención la capacidad del grupo SG para disminuir tanto los niveles de leptina como de insulina y del índice de insulinoresistencia HOMA-IR, siendo el único grupo que consigue esta reducción (Leptina: $p=0.0006$ sleeve vs HFD, $p=0.0311$ sleeve vs VLCD / Insulina: $p=0.0098$ sleeve vs HFD / HOMA-IR: $p=0.0261$ sleeve vs HFD). Sin embargo, no se han

conseguido diferencias en los niveles de visfatina, y el análisis de la grelina resultó no válido.

Respecto a la bioquímica general, destaca la mejora del perfil lipídico en los grupos quirúrgicos, existiendo una disminución significativa del colesterol total y triglicéridos tanto en sham como en SG respecto al grupo de obesas HFD. El grupo de dieta VLCD también muestra una reducción del colesterol total frente a HFD ($p=0.017$), pero los triglicéridos no se reducen de forma significativa. No hubo diferencias en el perfil hepático e iónico. Únicamente se observa una leve reducción de la albúmina plasmática en los grupos quirúrgicos, en comparación a HFD y controles.

En cuanto a los marcadores de inflamación sistémica, no se han encontrado diferencias en ninguna de las citocinas proinflamatorias estudiadas. Sin embargo, destaca una leve elevación de la citokina anti-inflamatoria IL-10 en el grupo SG, en comparación a HFD y VLCD ($p=0.0404$ sleeve vs HFD, $p=0.0317$ sleeve vs VLCD).

Tabla 5. Bioquímica, hormonas y citocinas en plasma.

	Control	HFD	VLCD	Sham	Sleeve	p
IL-6 (pg/mL)	73.2	73.2	73.2	73.2	73.2	No valid
IL-10(pg/mL)	48.39 ±13.4	17.18 ±5.1	15.18 ±5.9	62.18 ±26.5	191.50 ±42.2	0.035 ^a
IL-17α (pg/mL)	28.22 ±12.2	14.38 ±4.4	18.22 ±6.9	25.77 ±12.8	46.16 ±34.4	0.8512
MCP-1 (pg/mL)	2304.58 ±144.1	2631.55 ±283.9	2628.18 ±456.0	1814.97 ±198.8	3588.42 ±627.2	0.1665
TNFα (pg/mL)	32.65 ±9.7	24.43 ±4.8	19.63 ±8.4	15.96 ±5.0	31.77 ±19.0	0.5236
Grelina (pg/mL)	6.90	6.90	6.90	6.90	6.90	No valid
Leptina (pg/mL)	7451.81 ±1265.3	16029.58 ±1864.6	14521.07 ±4943.8	7476.33 ±2114.6	2326.54 ±651.8	0.0029 ^b
Visfatina (ng/mL)	1.84 ±0.7	3.00 ±2.1	1.68 ±0.7	3.96 ±2.2	3.38 ±2.0	0.9982
Insulina (UI/L)	1631.76 ±541.0	1645.85 ±637.1	1189.85 ±244.9	936.84 ±130.2	703.12 ±380.2	0.0373 ^c
HOMA-IR	34.32 ±10.4	26.36 ±3.8	17.78 ±3.4	14.17 ±2.5	10.97 ±5.7	0.0381 ^d
Albumina (g/L)	26.35 ±0.5	25.97 ±0.6	25.13 ±0.4	19.72 ±1.3	18.3 ±0.2	0.0016 ^e
AST (U/L)	85.78 ±8.7	78.25 ±12.2	62.63 ±4.4	65.20 ±8.1	78.00 ±10.5	0.2470
ALT (U/L)	49.06 ±6.3	34.05 ±4.5	23.58 ±1.9	27.88 ±4.4	21.75 ±2.0	0.0706

	Control	HFD	VLCD	Sham	Sleeve	p
ALP (U/L)	79.80 ±4.6	110.00 ±10.6	76.00 ±6.9	73.80 ±3.7	212.67 ±63.8	0.1002
LDH (U/L)	398.70 ±108.8	491.17 ±182.2	513.75 ±71.1	491.92 ±133.5	512.95 ±183.5	0.4154
Colesterol total (mg/dL)	77.50 ±2.9	82.71 ±7.6	63.29 ±4.5	59.60 ±6.7	58.71 ±4.5	0.0294 ^f
HDL (mg/dL)	44.78 ±1.0	43.73 ±3.1	76.00 ±6.9	73.80 ±3.7	212.67 ±63.8	0.1002
Triglicéridos (mg/dL)	160.72 ±14.3	248.65 ±43.2	98.58 ±12.1	64.48 ±9.2	54.64 ±6.8	0.0003 ^g
Na (mmol/L)	142.58 ±0.7	144.07 ±1.0	143.16 ±1.3	146.60 ±1.4	144.72 ±1.1	0.1685
K (mmol/L)	4.75 ±0.1	4.51 ±0.4	4.47 ±0.2	4.28 ±0.2	4.35 ±0.5	0.7613
Creatinina (mg/dL)	0.45 ±0.0	0.31 ±0.0	0.31 ±0.0	0.39 ±0.0	0.40 ±0.0	0.0007 ^h
Urea (mg/dL)	35.38 ±1.4	32.83 ±1.6	38.95 ±1.1	43.00 ±2.4	38.12 ±6.2	0.0762

a IL-10: p=0.0404 sleeve vs HFD; p=0.0317 sleeve vs VLCD / b Leptina: p=0.0006 for sleeve vs HFD; p=0.0311 for sleeve vs VLCD / c Insulina: p=0.0098 sleeve vs HFD / d HOMA-IR: p=0.0261 sleeve vs HFD / e Albumina: p=0.0121 sham vs control; p=0.0058 sleeve vs control; p=0.0293 sleeve vs HFD / f Colesterol total: p=0.017 VLCD vs HFD; p=0.049 sham vs control; p=0.010 sham vs HFD; p=0.023 sleeve vs HFD / g Triglicéridos: p=0.0051 sham vs HFD; p=0.0166 sleeve vs control; p=0.0005 sleeve vs HFD / h Creatinina: p=0.001 HFD vs control; p=0.001 VLCD vs control.

3.3. HISTOLOGÍA

En primer lugar, se presentan los resultados cuantitativos de esteatosis medidos por tinción Oil Red (*Figura 15*), mostrando y comparando el porcentaje de esteatosis presente por el área total en cada corte. Este análisis refleja claramente que el modelo animal de obesas HFD consigue desarrollar esteatosis con amplia diferencia en comparación al grupo control ($p < 0.001$). Al analizar el efecto de los tratamientos sobre dicha esteatosis, se puede observar que tanto la dieta VLCD como ambos grupos quirúrgicos consiguen revertir la acumulación grasa con éxito ($p < 0.01$: VLCD vs HFD, SG vs HFD; $p < 0.001$: sham vs HFD).

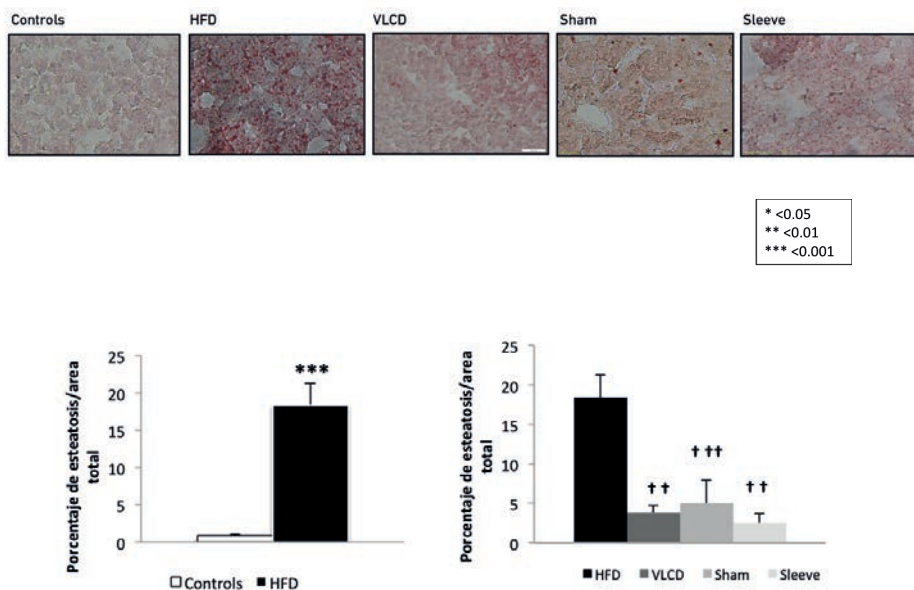


Figura 15. Estudio de la presencia de esteatosis por tinción Oil Red.

(* = vs control; † = vs HFD)

En segundo lugar, los cortes teñidos con 0.1% Picro-Sirius Red y H&E se exponen junto a los resultados de actividad de la enfermedad NAFLD y NASH, según el "SAF score" (Figura 16). La presencia o no de NAFLD y NASH se expone en forma de porcentaje, dentro de cada grupo. Gracias a ello se observa que el 71.43% de ratas obesas HFD muestran características compatibles con enfermedad por NAFLD y NASH. Ninguna de ellas desarrolló fibrosis en este estudio.

Examinando los grupos de tratamiento, las alteraciones histológicas tanto de NAFLD como NASH remitieron en gran medida en los grupos sham y SG (16.67% y 33.33% respectivamente), y revirtieron completamente en el grupo VLCD.

Todos los grupos del estudio, incluso el grupo control, presentan desde una leve a moderada actividad inflamatoria e incluso fibrosis en algunos individuos, exceptuando las obesas HFD en este último caso. No obstante, ninguna de estas alteraciones fue atribuible a NAFLD en los grupos control y VLCD, debido a la ausencia de esteatosis. Y entre los casos de fibrosis, sólo uno en el grupo sham podría atribuirse a la enfermedad por NAFLD.

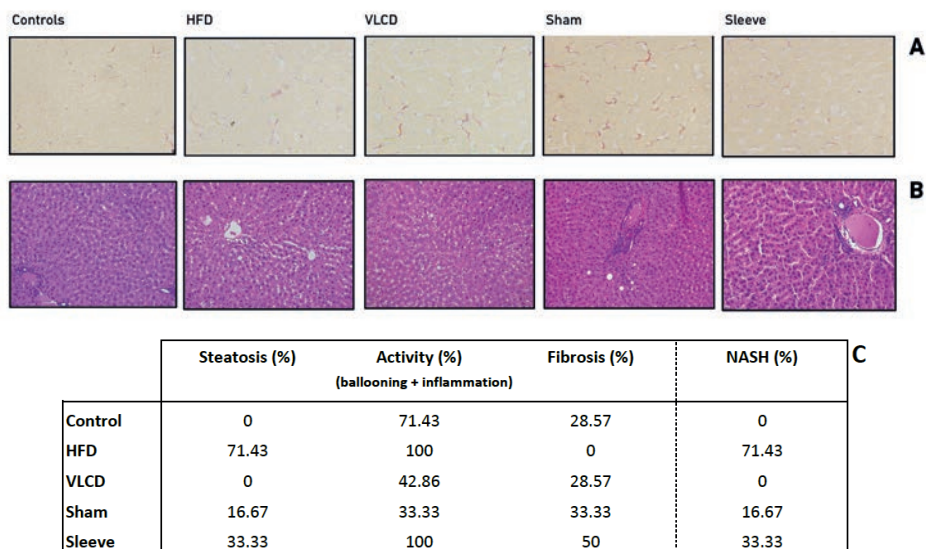


Figura 16. Tinciones 0.1% Picro-Sirius Red (A), Hematoxilina-Eosina (B) y "SAF score" (C).

3.4. DAÑO ENDOTELIAL

En las siguientes figuras (*figuras 17 y 18*) se presentan los resultados del análisis de proteínas medidas por WB, para el estudio de la afectación del endotelio sinusoidal hepático. De forma global, tanto los marcadores de vasoconstricción como de dilatación indican que la dieta HFD ejerce un efecto deletéreo sobre la función endotelial, lo cual mejora parcialmente en el grupo SG.

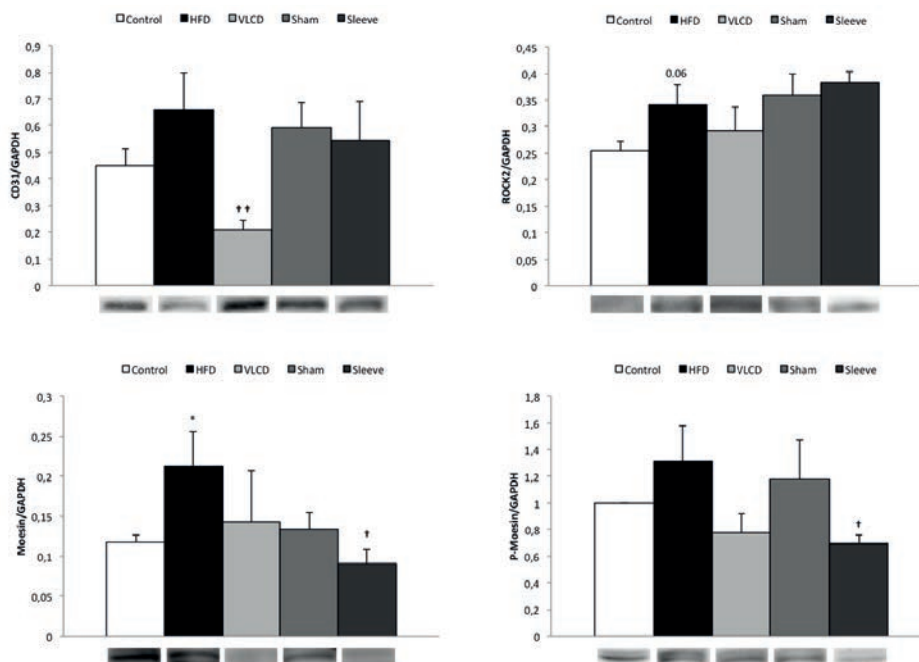


Figura 17. Marcadores de vasoconstricción y daño del endotelio sinusoidal, medidos por Western Blot. (* = vs control; † = vs HFD)

En el análisis de ROCK2 no se encuentran diferencias significativas entre los grupos, aunque el grupo HFD está cercano a la diferencia estadística frente al grupo control ($p=0.06$). Sin embargo, según los datos de la moesina y p-moesina se puede observar cierta tendencia a la vasoconstricción en el modelo de NAFLD que posteriormente revierte en el grupo SG: el grupo HFD presenta un valor de moesina total elevado que posteriormente disminuye significativamente en el grupo SG ($p<0.05$ HFD vs control; $p<0.05$ SG vs HFD), y la p-moesina disminuye también significativamente en SG respecto al grupo HFD ($p<0.05$). Respecto al CD31, no existe una elevación significativa en el modelo alimentado con HFD respecto al grupo control, pero sí que se observa una disminución importante del mismo en el grupo de dieta VLCD ($p<0.01$).

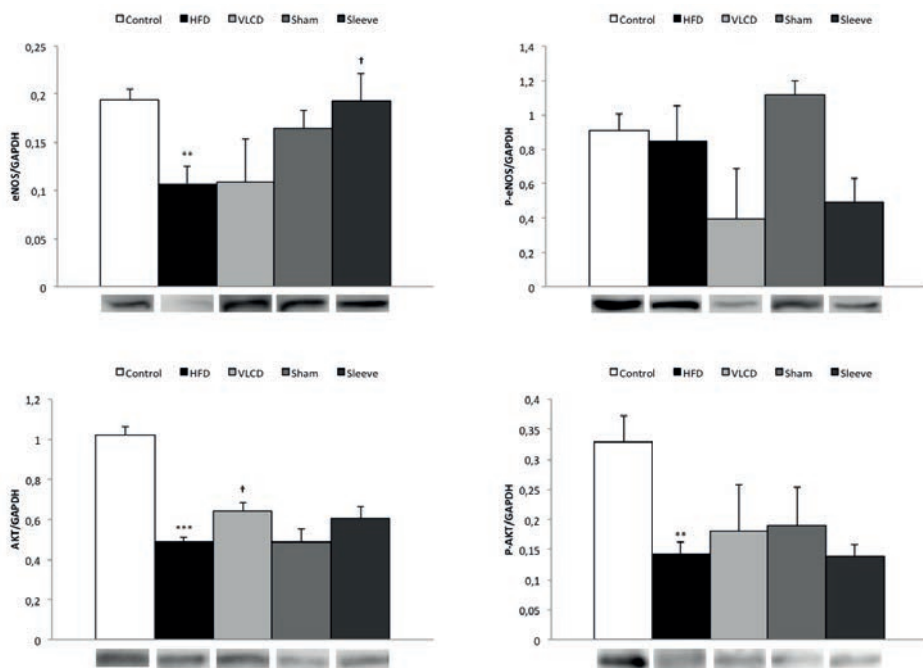


Figura 18. Marcadores de vasodilatación del endotelio sinusoidal, medidos por Western Blot. (* = vs control; † = vs HFD)

Observando los resultados de eNOS y p-eNOS, se puede ver que la presencia de la proteína vasodilatadora total se ve mermada en el grupo HFD respecto al control ($p < 0.01$), y que ésta se eleva de forma significativa únicamente en el grupo SG frente a HFD ($p < 0.05$). No obstante, los niveles de proteína activa p-eNOS no reflejan estos mismos cambios, ni tampoco existen diferencias significativas a destacar. Respecto Akt y p-Akt, nuevamente el modelo HFD ve disminuido tanto su valor total como la fracción activa p-Akt respecto al grupo control ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente). Sin embargo, entre los grupos de tratamiento no hay cambios relevantes, excepto un leve aumento de la fracción total Akt en el grupo VLCD respecto a HFD ($p < 0.05$).

3.5. MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN TEJIDO HEPÁTICO

Para evaluar la presencia de inflamación en el hígado, además de llevar a cabo estudios histológicos con H&E, se quiso medir la presencia de proteínas relacionadas con la cascada inflamatoria hepática. Así pues, se realizaron estudios de IHC para medir la presencia de CD43 (células positivas para CD43 por campo 20x) (Figura 19) y medición de cantidad de iNOS por WB (Figura 20).

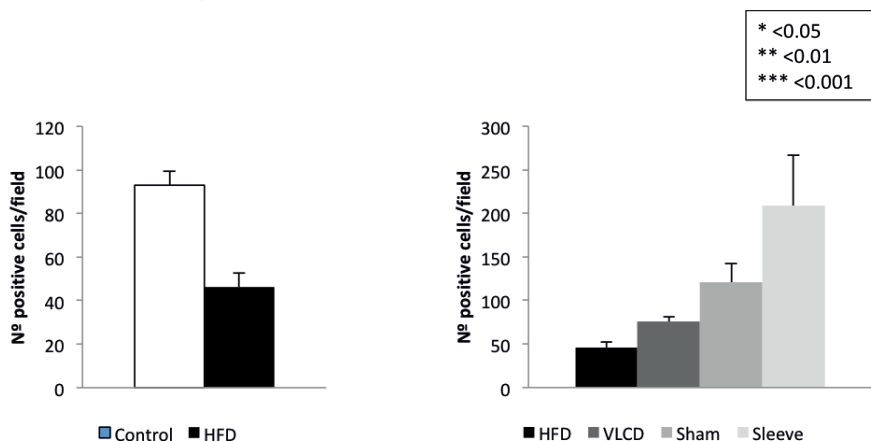


Figura 19. Medición de presencia de células positivas para CD43/campo 20x, por inmunohistoquímica.

Al evaluar si el modelo de NAFLD alimentado con dieta hipercalórica (HFD) ha desarrollado inflamación por esta técnica, contrariamente a lo esperado se puede observar que la densidad o presencia de células/campo en HFD es significativamente menor en HFD comparado a las ratas control ($p < 0.001$). Es posible que la presencia de gotas lipídicas en cada corte y por campo haya interferido en los resultados de este análisis, aunque el motivo real de la poca presencia de células inflamatorias CD43 no se conoce con exactitud. Igualmente, al estudiar los grupos de tratamiento, se observa un aumento de presencia de CD43 respecto a HFD, esperable al mostrar tan pocas células este último grupo. Lo que sí se puede obtener de este estudio, y que se correlaciona con los siguientes, es que los grupos quirúrgicos, sobre todo SG, muestran un notable y significativo aumento de células positivas para CD43 ($p < 0.01$ sham vs HFD; $p < 0.001$ SG vs HFD).

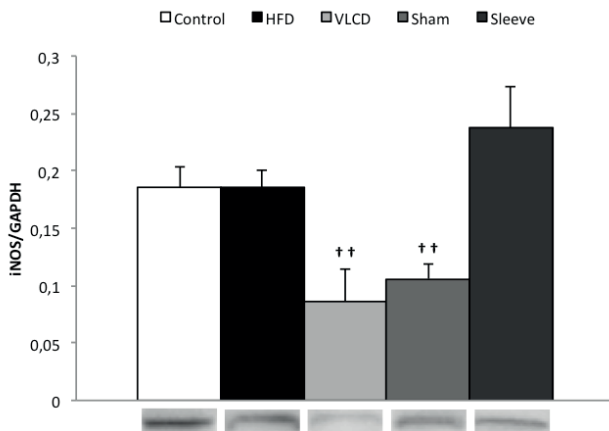


Figura 20. Estudio de presencia de iNOS en tejido hepático, medido por Western Blot.

En estos resultados es destacable el hecho de que el grupo VLCD y sham presentan un descenso significativo de iNOS frente a HFD ($p < 0.001$). No obstante, el propio grupo HFD no presenta un incremento de iNOS diferente al del grupo control, por lo que el descenso de la proteína en VLCD y sham es difícilmente interpretable en este contexto. Por otro lado, es de señalar la tendencia al aumento de iNOS presente en el grupo SG, no estadísticamente significativa aunque sí en consonancia con el aumento de CD43 visto por IHC.

3.6. ACTIVACIÓN DE HSCs Y FIBROGENESIS

En las siguientes figuras se muestran, por un lado, la medición de activación de las HSCs a través del estudio de presencia de α SMA tanto por WB como por IHC (*Figura 21 y 22*) y, por otro lado, el estudio por RT-PCR de marcadores de activación y proliferación de las células HSCs (indicadores del proceso de fibrogenesis en marcha) (*Figura 23*).

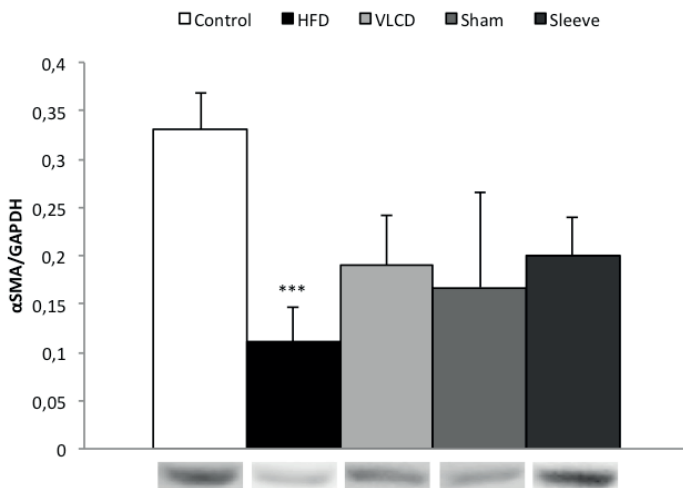


Figura 21. Medición de α SMA en tejido hepático, mediante técnica Western Blot.

La medición de α SMA por esta técnica no parece mostrar diferencias ni aumentos significativos entre los grupos. Únicamente destaca un descenso no esperado de su presencia en el grupo HFD respecto al grupo control ($p < 0.001$).

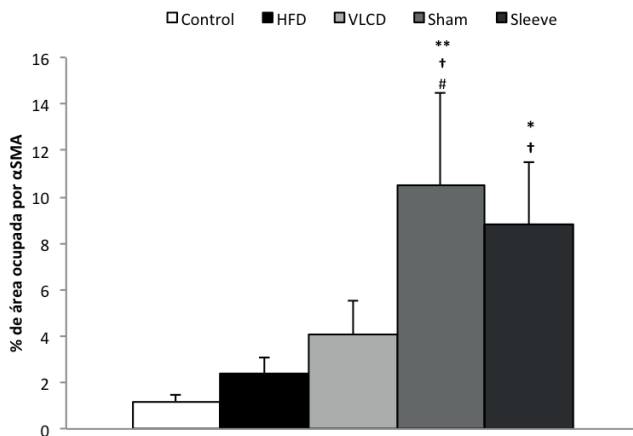


Figura 22. Porcentaje de α SMA en área 20x medido por inmunohistoquímica en cortes parafinados. (* = vs control; † = vs HFD; # = vs VLCD)

A diferencia de la técnica por WB, en este caso no existen diferencias de activación y presencia de α SMA entre el grupo HFD y control, pero sí un notable incremento de la misma en los grupos quirúrgicos: el grupo sham muestra diferencias con el grupo control ($p < 0.01$), HFD y VLCD ($p < 0.05$); mientras que el grupo SG muestra un aumento significativo respecto al grupo control y HFD ($0 < 0.05$).

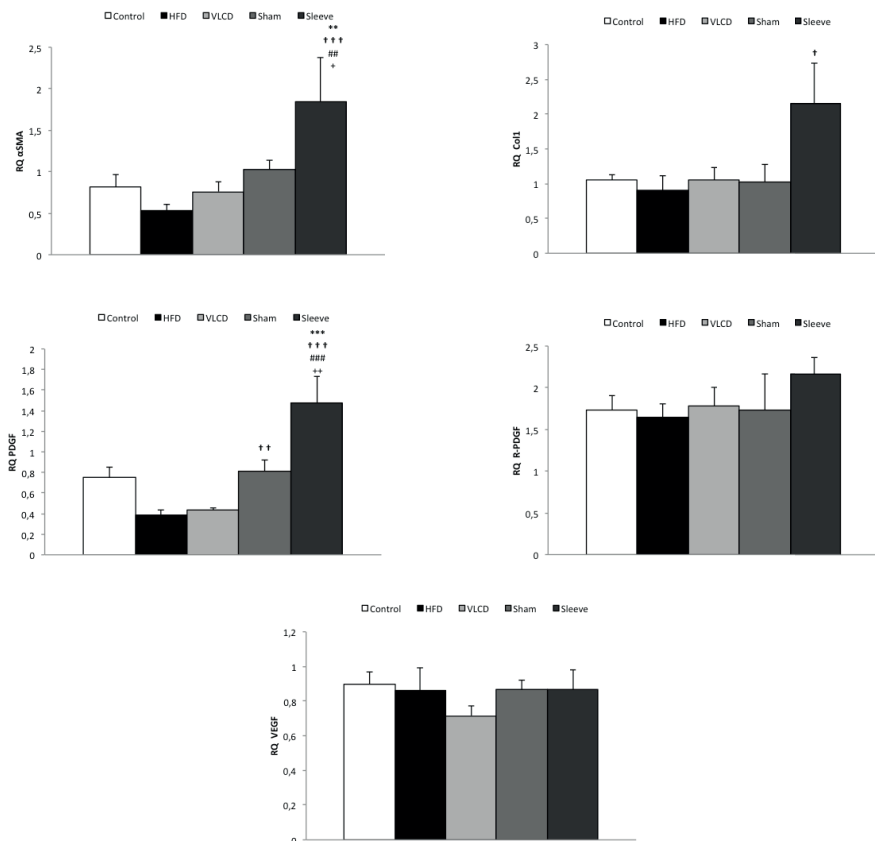


Figura 23. Expresión génica de marcadores de activación y proliferación de las células HSCs medido por RT-qPCR. (* = vs control; † = vs HFD; # = vs VLCD; + = vs sham)

Destaca la expresión aumentada de αSMA y PDGF en el grupo SG frente al resto de grupos del estudio, indicando que podría existir activación de las HSCs en las ratas operadas con sleeve. Además, también hay un aumento de Col1 en SG frente a HFD, lo que indica que estas HSCs podrían estar en fase de fibrogénesis sintetizando procolágeno-1. No obstante, al estudiar la expresión de VEGF y R-PDGF, no existen diferencias entre los grupos.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Este trabajo pretende aportar evidencia sobre los efectos de la cirugía bariátrica en la enfermedad por NAFLD, estudiando los cambios a un nivel histológico, bioquímico, hormonal y molecular. Estos cambios, además, se han querido comparar con el tratamiento validado actualmente en la práctica clínica, es decir, la dieta hipocalórica pobre en grasas. En cuanto a las técnicas bariátricas, se decidió llevar a cabo las dos más populares en la actualidad: el bypass gástrico en Y de Roux (BGRY) y la gastrectomía vertical o “sleeve” (SG).

Debido a la alta mortalidad postoperatoria en el grupo de BGRY, en el momento de los sacrificios la *n* de este grupo fue de 2. Ello motivó a su eliminación a la hora de llevar a cabo los análisis estadísticos para cada parámetro estudiado, ya que la diferencia en número respecto al resto de grupos hacía imposible su comparación y sólo agregaba una excesiva heterogeneidad a toda la muestra. Por lo tanto, aunque se haya creado un grupo de BGRY en este estudio, en los resultados sólo se considera el grupo SG de entre las dos cirugías bariátricas inicialmente planteadas.

En resumen, de los resultados se puede extraer que la cirugía bariátrica, concretamente la técnica de la gastrectomía vertical o “sleeve gastrectomy” (SG), es superior a la dieta hipocalórica para el tratamiento de fases iniciales de NAFLD. Su superioridad radica en una mayor pérdida de peso, reversión de signos histopatológicos de la enfermedad, mejoría del daño endotelial sinusoidal hepático, disminución de hiperleptinemia e IR, y también reducción del riesgo cardiovascular mediante la disminución del colesterol total, los triglicéridos en plasma y la mejoría global del NAFLD en sí.

Analizando en profundidad cada uno de los aspectos del trabajo, sobre el modelo experimental se puede afirmar que la alimentación a base de dieta HFD consiguió el objetivo de crear un modelo experimental de NAFLD, pudiendo observar cambios tipo NAFL y hasta fases iniciales de NASH en las ratas obesas, como era de esperar según la literatura disponible sobre ello [174]. Esta afirmación se sustenta tanto en los datos de los pesos como en la histología y las alteraciones de los análisis llevados a cabo tras los sacrificios.

En cuanto al peso (*Figuras 13 y 14*), los grupos quirúrgicos experimentan un notable descenso del peso tras las intervenciones, siendo el grupo SG el que mayor pérdida de peso presenta. El grupo de dieta hipocalórica (VLCD), en cambio, a partir de la semana 10 muestra únicamente un cese del incremento de peso, sin presentar disminución del mismo, y se mantiene estable en forma de “meseta” hasta la finalización del estudio. Llama la atención que el grupo VLCD es el único de entre todos los grupos del estudio que no presenta una diferencia significativa comparando el peso justo antes del inicio del tratamiento (semana 10) y al finalizar el estudio (semana 16). Tampoco es capaz de diferenciarse estadísticamente del grupo HFD al final del estudio. Por lo tanto, evaluando a los tres grupos de tratamiento y teniendo en cuenta únicamente la variación del peso, la cirugía se muestra superior a la dieta hipocalórica según este trabajo, destacando al grupo SG como el que mayor pérdida de peso presenta frente a HFD y VLCD.

Si se analiza más allá del peso, en cuanto a los datos histológicos tanto la dieta hipocalórica como la cirugía (sham y SG) son capaces de revertir la esteatosis determinada por Oil Red y H&E, y también las características propias del NASH estudiadas por H&E y Picro-Sirius Red, aplicando el “SAF score” (*Figuras 15 y 16*). Este score considera que las alteraciones del tipo inflamatorias o fibróticas sin acompañarse de esteatosis no son en principio atribuibles a la enfermedad por NAFLD [161]. Teniendo esto en cuenta, el 71.43% de las ratas modelo (HFD) desarrolla con éxito una histología compatible con la enfermedad por NAFLD y NASH inicial sin fibrosis, lo cual revierte a un 33.33% de las ratas SG y un 16.67% en las ratas sham. Sorprendentemente, y en contraste con los resultados de la variación del peso, el grupo VLCD es el que consigue revertir por completo las características histológicas propias del NAFLD a un 0%. No obstante, hay señalar que esta reversión completa por histología en el grupo de dieta hipocalórica parece deberse al total vaciamiento de las gotas lipídicas, ya que ninguna de las ratas del grupo presenta esteatosis pero sí datos de inflamación y fibrosis (42.86% y 28.57% respectivamente). Siendo estrictos y consecuentes con el método de análisis utilizado, estas alteraciones no deben considerarse propias del NAFLD, aunque tendrían que evaluarse con precaución y valorar dos posibles explicaciones a esta alteración: 1) existe un factor externo ajeno a la enfermedad estudiada, no identificado, que ha provocado la inflamación y fibrosis de algunos individuos, lo cual explicaría la presencia de estas alteraciones también en las ratas control (71.43% de ratas con signos inflamatorios y 28.57% con fibrosis); o 2) puede que

las alteraciones provocadas por la dieta hipercalórica, propias del NAFLD, reviertan no de forma inversa a la secuencia natural de su aparición, sino que es posible que el vaciamiento de las gotas lipídicas en los hepatocitos desaparezca antes que los cambios inflamatorios y fibrogenéticos. Ambas hipótesis explicarían también el hecho de que en los grupos quirúrgicos exista un mayor descenso de la esteatosis en comparación con la reversión de los signos inflamatorios y fibróticos. No disponemos de herramientas ni de datos para un mayor análisis de estos cambios, por lo que ambas posibilidades son factibles y este dilema en concreto queda sin respuesta. De cualquier manera, y siendo por el momento fieles a la definición actual de NAFLD y al método utilizado, es el grupo VLCD el que mayor reversión histológica de la enfermedad presenta.

Sin embargo, el éxito de "curación" de la dieta hipocalórica registrado al menos en la histología no se refleja en la variación del peso ni en el resto de los datos estudiados en este trabajo.

Atendiendo a la presencia o no de daño endotelial (*Figuras 17 y 18*), se puede afirmar que el modelo de NAFLD alimentado con HFD consigue desarrollar alteraciones propias de daño del sinusoides endotelial hepático, al igual que ocurre en los trabajos de Pasarín et al. [162,163]. Concretamente, la elevación significativa de las proteínas vasoconstrictoras moesina y p-moesina, junto a la disminución de proteínas vasodilatadoras e-NOS, Akt y p-Akt, indican que el modelo se ha comportado según lo esperado. El único grupo que consigue revertir algunas de estas alteraciones de una forma estadísticamente significativa es el grupo quirúrgico SG. En concreto, este grupo consigue disminuir la cantidad de moesina y p-moesina, y elevar la proporción de e-NOS total, lo cual indica al menos una tendencia a la mejoría en este aspecto tras el tratamiento quirúrgico con sleeve. Es cierto que el grupo VLCD muestra una mínima elevación de Akt total frente a HFD, aunque es el único cambio aislado en este grupo y no valorable como reversión real del daño si analizamos los datos globalmente. También presenta un nivel menor de CD31 en comparación a HFD, aunque en este caso el modelo no presenta una elevación patológica de este marcador y, por tanto, el descenso del mismo en el grupo VLCD es irrelevante.

A pesar de tener datos a favor del daño endotelial presente en el modelo, y su reversión tras tratamiento con SG, este trabajo no explica el por qué de la alteración de unos marcadores y no otros. Por ejemplo, los niveles de p-eNOS no varían entre grupos cuando su proporción total no

activa (eNOS) sí varía. En este sentido, consideramos que los resultados deben interpretarse con precaución, a falta de estudios específicos in vivo (hemodinámicos, de función endotelial y resistencia vascular intrahepática fundamentalmente) que analicen con detalle y expliquen la trascendencia de los cambios descritos en las proteínas vasodilatadoras y vasoconstrictoras mencionadas.

Continuando con el análisis de cambios intrahepáticos, parece ser que el modelo animal de NAFLD creado en este estudio (contrariamente a lo observado por tinción H&E) no ha desarrollado cambios inflamatorios, al menos no los suficientes como para elevar la expresión de iNOS y presencia de leucocitos CD43+, si consideramos al grupo control como normal (*Figuras 19 y 20*). Dado que no existen diferencias entre HFD y control, al menos en la medición de iNOS, el modelo estaría exento de cambios tipo NASH, lo cual difiere del estudio por H&E, donde veíamos que el grupo control, paradójicamente, presenta también ciertos cambios inflamatorios. Por tanto, estos resultados deben interpretarse cautelosamente, ya que es posible que la ausencia de diferencias entre el modelo y el grupo control se deba a esta supuesta presencia de signos inflamatorios en este último. Respecto al descenso de CD43 en el grupo HFD en comparación al grupo control, no existe explicación fisiológica que lo apoye, por lo que se asume como un error en la técnica, posiblemente por la presencia de gotas lipídicas que interfieran en la cantidad y conteaje de células positivas por campo.

Lo que sí se puede extraer del estudio de estos marcadores inflamatorios es que, tanto iNOS como CD43 tienden a aumentar en el grupo quirúrgico SG. Esta tendencia a elevar marcadores inflamatorios en el grupo quirúrgico y, por tanto, la presencia de señales inflamatorias en el tejido hepático de estos individuos, tiene relación con el siguiente hallazgo, y es que al estudiar la activación de HSCs es precisamente el grupo SG quien parece tener dichas células activas, en respuesta probablemente a una cascada inflamatoria ya iniciada en los hepatocitos (*Figuras 21, 22 y 23*). En concreto, las ratas tratadas con SG presentan un mayor nivel de α SMA determinada por IHC y también una mayor expresión génica de α SMA, PDGF y Col1, indicando que las HSCs de este grupo podrían estar no sólo activas si no también en fase proliferativa y de fibrogénesis. No obstante, también el grupo sham muestra una elevación significativa de α SMA por IHC, e incluso de expresión de PDGF respecto al grupo HFD, por lo que estos cambios relativos a la activación de HSCs parecen no tener relación a la cirugía bariátrica en sí, sino que más bien podrían producirse en respuesta

a la propia agresión quirúrgica, independientemente del efecto metabólico del SG.

Según los hallazgos histológicos por H&E y Picro-Sirius Red, esta activación de HSCs en los grupos SG y sham no se traduce a presencia de fibrosis visible histológicamente, al menos no relacionada con el NAFLD. De todos los individuos de ambos grupos, sólo uno del grupo sham presentó fibrosis asociada a esteatosis, por lo que únicamente un solo sujeto desarrolló fibrosis relacionada a la enfermedad por NAFLD.

Dicha activación de HSCs y presencia de inflamación en el hígado tampoco se relaciona con la alteración de enzimas hepáticas en plasma, por lo que no parece generar un daño hepático citolítico ni tampoco funcional. Según el estudio bioquímico plasmático (*Tabla 5*), tanto la batería de enzimas hepáticas como el perfil iónico fueron normales en todos los grupos. Incluso, aunque se haya detectado la presencia de inflamación y activación de HSCs en el tejido hepático de los grupos quirúrgicos, tampoco se observa una elevación de citocinas inflamatorias a nivel sistémico en plasma. De hecho, la única citokina que varía su nivel y se eleva precisamente en el grupo SG es la citokina reguladora o anti-inflamatoria IL-10 en comparación a los grupos HFD y VLCD. Esto puede ser debido a uno de los efectos “metabólicos” beneficiosos de esta cirugía, concretamente el de regular el estado inflamatorio crónico sistémico presente en personas obesas, a favor de una mayor expresión y presencia de citocinas reguladoras como la IL-10.

Otro de los cambios que destacan al analizar los parámetros plasmáticos medidos es que los grupos quirúrgicos, tanto sham como SG, son capaces de mejorar el perfil lipídico disminuyendo los niveles de colesterol total y triglicéridos de forma significativa en comparación a las obesas HFD. El hecho de que ambos grupos hayan logrado este efecto metabólico puede estar relacionado con la disminución del peso, ya que es una de las características que ambos grupos comparten. El grupo de dieta VLCD también muestra una reducción del colesterol total frente a HFD, pero no es capaz de modificar el nivel de triglicéridos en este sentido. Este efecto más moderado sobre la dislipemia también podría estar relacionado con el peso, aunque se necesitan mayores estudios para apoyar esta hipótesis.

Lo más llamativo del análisis de los parámetros plasmáticos son los cambios hormonales. En este sentido, el único grupo de tratamiento que

presenta un cambio respecto al modelo de NAFLD es el grupo de cirugía bariátrica SG. Únicamente el SG es capaz de disminuir los niveles de leptina, disminuyendo el estado de hiperleptinemia propio del NAFLD, y también de mejorar la IR disminuyendo los niveles de insulina y mejorando el índice HOMA-IR. Ningún otro grupo es capaz de alcanzar este efecto metabólico, el cual resulta ser muy beneficioso en el NAFLD debido a su etiopatogenia, donde la resistencia a la insulina juega un papel crucial en su aparición y desarrollo, y donde la resistencia a la leptina a su vez favorece y perpetúa la disregulación metabólica y el daño hepático.

Hasta el momento, no existen estudios experimentales semejantes al trabajo que se presenta, al menos no tan amplios como este. La mayoría de los ensayos experimentales llevados a cabo para dilucidar el efecto de la cirugía bariátrica en el NAFLD se centran en algunas vías muy específicas de alteración, como ocurre en los estudios mostrados en la tabla 3. La peculiaridad de este trabajo radica, por un lado, en el multianálisis de varias vías de alteración relacionadas con el NAFLD al mismo tiempo y, por otro lado, en el hecho de comparar los efectos de la cirugía bariátrica con el tratamiento aceptado actualmente, la dieta hipocalórica. Por lo tanto, es muy complejo poder discutir o comparar estos resultados con otros ya existentes en la literatura, exceptuando la construcción del modelo animal de NAFLD a base de dieta en ratas Wistar Han, ya desarrollado por el grupo de Pasarín *et al.* [162,163]. Sin embargo, de este trabajo es posible extraer algunas ideas que definitivamente aportan información y arrojan cierta luz a la escasa evidencia actual.

Habiendo conseguido desarrollar animales con enfermedad por NAFLD, al menos hasta presentar características de NASH inicial, parece ser que la cirugía bariátrica SG es superior a la dieta hipocalórica para su tratamiento en este contexto. De los resultados mostrados se puede elucidar que la técnica metabólico-bariátrica de sleeve es capaz no sólo de disminuir el peso en mayor medida y también de revertir de forma importante las características histopatológicas de la enfermedad, sino que, además de esto, es el único tratamiento que consigue mejorar las alteraciones relacionadas con el daño endotelial, la hiperleptinemia y la IR. Asimismo, también contribuye a la mejora de factores relacionados con el riesgo cardiovascular, como son los triglicéridos y el colesterol total plasmáticos. Esto sumado al hecho de que la mejoría del NAFLD es en sí una contribución a la disminución del riesgo cardiovascular, ya que ha demostrado ser un factor de riesgo independiente del mismo. Por lo

tanto, parece que esta estrategia terapéutica mediante cirugía bariátrica tipo SG podría ser una buena opción terapéutica para el NAFLD, superior a la dieta hipocalórica, que puede tratar, revertir y disminuir en cierta forma su morbimortalidad, al menos en estadíos iniciales.

También a favor del SG, es preciso señalar que aunque se haya demostrado una mayor activación de HSCs tras esta cirugía, en nuestro estudio esto no se traduce en un mayor daño hepático, ni histológico ni tampoco bioquímico o de función hepática. Por tanto, en comparación a la dieta hipocalórica, según este estudio la cirugía tipo SG muestra únicamente un mayor número de efectos beneficiosos y ningún efecto adverso.

Es importante tener en cuenta que los cambios y efectos medidos en este trabajo se producen en un modelo de estadíos iniciales, hasta el momento en que la enfermedad muestra signos de esteatohepatitis tipo NASH leves, sin desarrollar fibrosis o cirrosis. Se considera una limitación del estudio el hecho de que estos resultados no se puedan aplicar también a fases avanzadas de la enfermedad. Según este trabajo solamente se puede afirmar que la superioridad de la cirugía bariátrica sobre la dieta hipocalórica se produce en fases tempranas.

En cuanto al método, es importante explicar que el grupo control fue sacrificado sin estar en ayunas por equivocación. En el análisis de valores de insulina y HOMA-IR se puede ver un aumento anómalo de los mismos en este grupo, que se explica por este error metódico. Sin embargo, esto no influyó a la hora de encontrar diferencias significativas entre subgrupos ni tampoco globales, por lo que fue irrelevante.

Otra de las grandes limitaciones del estudio es que sus resultados deben interpretarse con cautela debido al carácter descriptivo experimental del mismo y a que su impacto en la práctica clínica es aún desconocido.

No obstante, resulta esperanzador hallar resultados que indiquen la posibilidad de aplicar terapias más efectivas que las actuales, ya en el inicio del desarrollo de la afección. Es de suma importancia considerar a la enfermedad por NAFLD como un problema de salud público actual, creciente, realizar su diagnóstico temprano y abordar el problema eficaz y eficientemente desde un principio, para evitar su desarrollo a fases más graves y todo lo que ello conllevaría tanto para el gasto público como para los propios pacientes. Para ello, es necesario dirigir los esfuerzos tanto

a la realización de un diagnóstico poblacional y cribaje efectivos, como hacia la búsqueda de tratamientos con mayor impacto y efectos a largo plazo. La cirugía bariátrica se postula como posible tratamiento, idea que también apoyan los resultados de este estudio. Sin embargo, aún son necesarios ensayos clínicos randomizados en humanos que aporten la suficiente validez y evalúen fiablemente las consecuencias de su aplicación en enfermos de NAFLD. Estos ensayos también deberían diferenciar los resultados en base al tipo de técnica bariátrica llevada a cabo (restrictivas, malabsortivas o mixtas) e identificar cuál o cuáles serían adecuadas para el tratamiento de NAFLD. Al mismo tiempo, también es necesario realizar estudios comparativos con otros tratamientos, ya sean dietéticos o farmacológicos, a fin de comprobar realmente la superioridad de la cirugía sobre el resto.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- La alimentación *ad libitum* a base de dieta hipercalórica rica en grasas en ratas Wistar Han –sin modificar genéticamente– consigue crear un modelo experimental de NAFLD, pudiendo observar cambios tipo NAFL y hasta fases iniciales de NASH.
- Tras aplicar los tratamientos, el grupo que mayor pérdida de peso presenta es el tratado mediante SG, mientras que el grupo de dieta VLCD se mantiene en forma de “meseta” hasta finalizar el estudio.
- Todos los grupos de tratamiento, tanto de dieta VLCD como quirúrgicos (sham y SG), son capaces de revertir características histológicas de la enfermedad. De entre ellos, sólo la dieta VLCD es capaz de revertir completamente dichas características según el “SAF score” aplicado para su análisis.
- Únicamente el grupo SG presenta mejoría significativa del daño endotelial según la expresión proteica hepática medida, aunque dichos resultados deben interpretarse con precaución al carecer de estudios específicos *in vivo*.
- Sólo la cirugía bariátrica (SG) es capaz de mejorar el estado hormonal propio de la enfermedad, reduciendo los niveles de leptina en plasma y la IR, ambas de forma significativa. Además, también mejora el estado lipémico a través de la reducción del colesterol total y los triglicéridos, contribuyendo así a disminuir el riesgo cardiovascular.
- La cirugía SG, a pesar de presentar una mayor activación de HSCs, no ha provocado daños hepáticos demostrables, ni citolíticos ni funcionales. Tampoco presenta alteraciones inflamatorias plasmáticas; al contrario, parece favorecer la regulación del sistema inmune mediante el aumento de citokina anti-inflamatoria IL-10. Por tanto, parece ser una opción segura de tratamiento para esta enfermedad.

- En global, según los resultados de este trabajo, la cirugía bariátrica es superior a la dieta hipocalórica en el tratamiento de la enfermedad por NAFLD. Conscientes del carácter descriptivo experimental de dichos resultados, urge ahora elaborar ensayos clínicos randomizados y comparativos a fin de aclarar el papel de la cirugía metabólica sobre esta entidad.

PROYECTOS FUTUROS

6. PROYECTOS FUTUROS

De este trabajo se extraen las siguientes ideas que se proponen como posibles estudios de investigación futuros:

1. Un estudio experimental animal similar, consiguiendo incluir el grupo de BGYR, para añadir información sobre los efectos según el tipo de técnica bariátrica (restrictiva o mixta) y también intentar aportar evidencia sobre el efecto de la alteración del circuito enterohepático propio del BGYR en el NAFLD.
2. Un estudio experimental similar en ratas, utilizando un modelo que consiga desarrollar NAFLD y NASH avanzado, con inflamación y fibrosis establecidas (p.ej.: utilizando ratas de raza Sprague Dawley) para analizar el efecto de la dieta VLCD vs cirugía bariátrica en estas fases.
3. El análisis específico de los efectos de la cirugía bariátrica y la dieta sobre el daño endotelial en el NAFLD, utilizando un modelo experimental similar pero realizando el análisis específico in vivo.
4. Utilizando el mismo modelo experimental, cambiar los parámetros analizados por otros que estudien las alteraciones de la microbiota.
5. Utilizando el mismo modelo experimental, cambiar los parámetros analizados por otros que estudien las alteraciones del circuito y efecto de los ácidos biliares.
6. Elaborar un estudio clínico observacional prospectivo en humanos, analizando el efecto de la cirugía bariátrica restrictiva tipo sleeve sobre la enfermedad por NAFLD, estudiando parámetros tanto antropométricos como hormonales, bioquímicos, moleculares e incluso histológicos (incluyendo biopsias hepáticas intraoperatorias y postoperatorias comparativas).

7. Poniendo atención al 7% de patología NASH no relacionada con la obesidad, intentar crear un modelo experimental animal de este tipo y analizar el efecto puramente metabólico de la cirugía bariátrica (sleeve) en sujetos NASH no obesos, midiendo los cambios en parámetros histológicos, bioquímicos, hormonales, de expresión génica, de microbiota y ácidos biliares.

ANEXOS

ANEXO 1

Análisis bioquímico plasmático: técnica ELISA

La detección de marcadores bioquímicos en sangre por técnica ELISA se llevó a cabo en el Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (IGTP), según técnica ELISA sándwich típica. Los resultados se recogieron por cada individuo de cada grupo, como se muestra en la *tabla 14* del *Anexo 4*. La técnica ELISA sándwich implica la unión de un anticuerpo de captura a una microplaca. Luego, se añaden muestras que contienen una cantidad desconocida de la proteína diana o analito de interés y se unen al anticuerpo de captura. Después de los pasos de lavado para eliminar la microplaca de las sustancias no unidas, se agrega un conjugado de HRP (enzima *horseradish peroxidase*, anticuerpo secundario o streptavidin) para la detección.

Tinciones histológicas

Las muestras de hígado, dentro de un casete, se fijaron en PFA 4% durante 24h y se pasaron a una solución de etanol 50%. Los siguientes pasos de deshidratación, la inclusión en bloques de parafina, los cortes histológicos (3µm) y la tinción de H&E fueron realizados por la Unidad de anatomía patológica del Hospital Vall d'Hebron. En estas secciones histológicas también se realizó la tinción de 0.1% Picro-Sirius Red que, resumidamente, consiste en la tinción de las muestras con rojo picrosirio 0.1% durante 1h en agitación suave a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 5 min con agua acidificada, secado de los portaobjetos y montaje con DPX. También se llevó a cabo la tinción de colorante Oil Red sobre cortes congelados mediante isopentano y cortados al criotomo, incubando las muestras con colorante Oil Red durante 6 minutos y aclarando después con propilenglicol al 85% durante 1 minuto y hematoxilina durante 1-2 minutos.

Técnica Western Blot

Para el análisis de proteínas hepáticas se perfundió hígado con suero salino para eliminar la sangre, las muestras se congelaron directamente en isopentano y se almacenaron a -80°C. Estas muestras se trituraron en frío evitando su descongelación hasta convertirlas en polvo, se homogeneizaron en tampón de lisis con tritón, se sonicaron en 3 ciclos

de 10seg a máxima potencia y finalmente se centrifugaron a 14.000 rpm y 4°C durante 10min. El sobrenadante se recogió y la proteína total se cuantificó con el kit de ensayo BCA (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA), leyendo la reacción colorimétrica con nanodrop.

La electroforesis se realizó utilizando el sistema *XCell SureLock*[®] en geles de SDS-poliacrilamida 10%, cargando 40µg de proteína por muestra. La transferencia se realizó con el módulo *blot XCell II*[™] en membranas de PVDF con poro de 0.45µm (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA). Al finalizar la transferencia las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con leche desnatada 5% o con *phosphoblocker* 5% (Cell biolabs, San Diego, CA, USA) para proteger las proteínas fosforiladas. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, así como las diluciones y tiempos de incubación aparecen detallados en la *Tabla 8*. Las membranas se revelaron con el kit *ECL prime* (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) en el sistema de imagen *Odyssey*[®]Fc (LI-COR, Lincoln, NE, USA) y se cuantificaron con *Image Studio Lite* (Lincoln, NE, USA). En los casos en los que se analizó la proteína fosforilada y la total o en los que se reveló en la misma membrana dos proteínas con peso molecular similar, las membranas se incubaron con *Restore*[™] WB Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) durante 30 min a 55 °C, para eliminar los anticuerpos previos. Después de éste proceso la membrana debe bloquearse de nuevo.

Tabla 8. Condiciones WB para cada una de las proteínas estudiadas en este trabajo.
 PVDF: polifluoruro de vinilideno; RT: room temperature; O/N: overnight; BSA: bovine serum albumin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Proteína	PM (kDa)	Membrana	Transferencia	Bloqueo	Anticuerpo 1°	Incubación	Dilución	Anticuerpo 2°	Incubación	Dilución	Revelado
a-SMA	42	PVDF	1h, RT	5% leche en polvo en TTBS1X	rabbit anti- α -SMA, Abcam (4°C)-alicutado a -20°C (alicutos de 20ul)	1h, RT	1/200 en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/30000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 1-2min, high)
Akt	60	PVDF	1h, RT / 90° (Bio-Rad)	5% BSA en TTBS1X	rabbit anti-Akt, Cell Signaling (-20°C)	O/N, 4°C	1/1000 en 5% BSA en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/50000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 5min, high), Film (2min)
p-Akt	60	PVDF	1h, RT / 90° (Bio-Rad)	Phosphoblocker 5% en TTBS1X	rabbit anti-p-Akt, Cell Signaling (-20°C)	O/N, 4°C	1/500 en 5% Phosphoblocker en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/30000 en Phosphoblocker 5% en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 5min, high), Film (10min)
CD31	130	PVDF	O/N	5% leche en polvo en TTBS1X	rabbit anti-CD31, Sta Cruz (4°C)	1h, RT	1/200 en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/30000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 5-10min, high)
GAPDH	36	PVDF	1h, RT / O/N	5% leche en polvo en TTBS1X	mouse anti-GAPDH, Ambion (-20°C)	1h, RT	1/5000 en TTBS1X	anti-mouse ECL GE Healthcare (4°C)	1h, RT	1/50000 en TTBS1X	LAS 3000 (increment, 10-30sec, high)
eNOS	140	PVDF	O/N	5% BSA en TTBS1X	mouse anti-eNOS, BD Transd Lab (-20°C)	1h, RT	1/500 en TTBS1X	anti-mouse ECL GE Healthcare (4°C)	1h, RT	1/30000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 5min, high)
p-eNOS	140	PVDF	O/N	Phosphoblocker 5% en TTBS1X	rabbit anti-p-eNOS, Cell Signaling (-20°C)	O/N, 4°C	1/250 en 5% BSA en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/30000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 5-10 min, high) / Film (1min)
iNOS	130	PVDF	O/N	5% leche en polvo en TTBS1X	mouse anti-mouse iNOS, BD Transd Lab (-20°C)	1h, RT	1/500 en TTBS1X	anti-mouse Calbiochem (4°C)	1h, RT	1/30000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 8min, high)
Moesina	77	PVDF	1h, RT	5% BSA en TTBS1X	mouse anti-moesin, Sta Cruz (4°C)	1h, RT	1/300 en TTBS1X	anti-mouse Calbiochem (4°C)	1h, RT	1/30000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 1-2 min, high)
p-Moesina	77	PVDF	1h, RT	Phosphoblocker 5% en TTBS1X	rabbit anti-p-moesin, Sta Cruz (4°C)	1h, RT	1/200 en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/50000 en Phosphoblocker 5% en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 2-5 min, high)
Rock-2	140	PVDF	O/N/1h, RT	5% leche en polvo en TTBS1X	rabbit anti-Rock-2, Sta Cruz (4°C)	1h, RT	1/200 en TTBS1X	anti-rabbit Cell Signaling (-20°C)	1h, RT	1/50000 en TTBS1X	LAS 3000 (precision, 1min, high)

Inmunohistoquímica

IHC se usó para detectar CD43 y α SMA en el tejido hepático. Los antígenos enmascarados durante la fijación rutinaria se recuperaron incubando las secciones de parafina hidratada de 3 μ m en tampón de citrato durante 20 minutos a 95°C y se dejaron a temperatura ambiente durante 25 minutos más en el mismo tampón. Después de lavar 3 veces con PBS 1X con agitación, se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena incubándose durante 10 min con una solución de H₂O₂ al 3% (también con agitación). Luego las secciones se lavaron dos veces, 5 minutos con dH₂O y 5 minutos más con PBS 1X. Todas las siguientes incubaciones se realizaron en una cámara de humedad. Para reducir la unión inespecífica, las secciones se bloquearon con 200 μ L de suero animal (aquel en el que se crió el anticuerpo secundario de cada marcador estudiado) en una dilución 1/20 en PBS 1X durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se incubaron O/N (“*over night*”) a 4°C con 200 μ L de anticuerpo primario. Después de lavar tres veces con PBS 1X 5 min para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las muestras se incubaron con unas pocas gotas de anticuerpo secundario 30 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces más con PBS 1X 5 min para eliminar también el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente se llevó a cabo la contratinción con solución de hematoxilina de Mayer durante 10 segundos, se lavaron con abundante agua del grifo y se dejaron en dH₂O durante 5 min. Luego, se deshidrataron y se montaron en DPX. Los cortes se visualizaron al microscopio óptico Olympus BX61 equipado con una cámara digital.

Técnica RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction)

Para el análisis del RNA mensajero (mRNA) las muestras de hígado se mantuvieron en *RNAlater* (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) al menos 24h y después se almacenaron a -80°C. La lisis del tejido (aprox. 30mg) previa a la extracción de RNA se hizo con tubos *Fastprep lysis matrix D* (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA) y el sistema *FastPrep FP120*. El RNA total fue extraído usando el kit *RNeasy mini* (QIAGEN, Venlo, Nederland) y la retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) se realizó con el kit *High capacity cDNA reverse transcription* (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR a tiempo real se desarrollo en placas de 384 pocillos con todas las muestras por triplicado. Para cada reacción se añadió: a) una mezcla de 4.5 μ l de *Taqman*

universal PCR master mix más 0.5µl de la sonda específica; b) 5µl de la muestra cDNA (40ng).

Para la cuantificación de la reacción se utilizó el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) y para el análisis la aplicación on-line *ThermoFisher Cloud*.

ANEXO 2

Tabla 9. Puntuación individual según NASH CRN Histological Scoring System

		Esteatosis	Balonización	Inflamación lobulillar	Estadio fibrosis
Control	1	0	0	1	1
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	1	0	0
	5	0	1	0	0
	6	0	1	1	
	7	0	1	0	1
HFD	8	1	1	0	0
	9	1	1	1	0
	10	1	2	1	1
	11	2	2	1	0
	12	0	0	1	0
	13	0	1	0	0
	14	1	1	0	0
VLCD	15	0	0	0	0
	16	0	0	0	0
	17	0	1	0	1
	18	0	1	0	0
	19	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
	21	0	1	0	1

		Esteatosis	Balonización	Inflamación lobulillar	Estadio fibrosis
Sham	22	1	1	1	0
	23	0	0	0	0
	24	0	0	0	0
	25	0	0	1	0
	26	0	0	0	0
	27	0		0	1
Sleeve	28	Muestra no extraída			
	29	1	1	1	0
	30	1	1	1	0
	31	0	0	1	1
	32	0	0	1	1
	33	0	1	0	0
	34	0	1	2	1

ANEXO 3

Tabla 10. Peso individual y media por grupo semanales. 1 (rosa): control; 2 (azul): HFD; 3 (amarillo): VLCD; 4 (azul claro): sham; 5 (verde): sleeve

Grupo	Rata	Peso 0	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Peso 4	Peso 5	Peso 6	Peso 7	Peso 8	Peso 9	Peso 10	Peso 11	Peso 12	Peso 13	Peso 14	Peso 15	Peso 16
1	1	250	290	318	340	366	384	395	408	419	430	442	444	455	461	468	474	470
1	2	245	282	307	323	345	359	371	386	395	403	413	415	422	431	436	445	444
1	3	258	270	298	320	342	350	363	377	390	404	410	415	425	433	434	442	450
1	4	230	248	263	283	296	310	323	336	347	360	350	355	360	369	375	375	375
1	5	261	266	280	292	303	309	321	328	334	341	345	354	362	367	376	382	380
1	6	223	280	313	340	360	375	387	400	408	418	430	432	441	454	450	457	457
1	7	215	298	329	348	370	385	399	406	416	423	439	445	460	469	470	472	483
2	240,28571	276,28571	381,71428	320,85714	340,28571	353,14285	365,85714	375,85714	385,42857	394,57142	404,14285	408,28571	417,14285	425,42857	429,435,28571	437,437,437	437	437
2	8	230	267	297	322	351	368	385	398	411	422	431	440	443	453	456	466	475
2	9	245	288	321	346	375	397	416	434	454	465	474	486	498	507	511	520	527
2	10	255	313	351	384	416	445	470	493	518	532	550	555	566	579	584	599	612
2	11	260	282	324	341	376	402	420	430	450	467	480	490	501	513	524	539	553
2	12	233	292	333	362	388	409	425	442	459	474	485	494	503	514	508	522	533
2	13	225	274	303	336	363	384	403	424	439	430	456	460	468	477	476	483	487
2	14	240	296	338	376	407	439	461	485	508	531	550	559	573	590	598	612	623
3	241,14285	287,42857	323,85714	352,42857	382,28571	406,28571	425,71428	444,85714	462,71428	474,42857	489,42857	497,71428	507,42857	519,522,42857	534,28571	544,28571	544,28571	544,28571
3	15	254	307	344	369	390	404	423	433	450	461	470	477	475	479	484	484	492
3	16	240	276	315	343	366	386	403	424	441	453	462	474	475	478	477	480	480
3	17	237	261	295	323	354	376	398	425	445	469	485	506	489	481	483	474	469
3	18	240	303	351	390	418	436	454	466	476	492	503	508	503	500	496	493	500
3	19	222	306	348	385	416	442	470	482	500	515	528	534	537	534	532	525	515
3	20	245	304	342	375	404	427	446	462	480	491	503	507	500	501	504	508	503
3	21	233	261	291	317	340	352	373	386	398	407	418	420	410	417	422	428	426
4	238,71428	288,28571	326,57142	357,42857	384,403,28571	423,85714	439,71428	455,71428	469,71428	481,28571	489,42857	484,14285	484,28571	485,42857	484,57142	483,57142	483,57142	483,57142
4	23	254	318	359	393	420	443	468	489	512	531	547	540	515	513	520	520	517
4	24	240	287	308	327	350	365	378	385	390	398	405	407	385	387	390	396	398
4	25	263	295	317	334	349	358	377	391	404	419	426	430	445	460	387	385	383
4	26	294	340	372	398	419	438	448	461	479	483	494	503	486	463	462	465	463
4	27	277	306	315	323	337	343	344	352	362	366	372	374	363	332	326	294	293
4	28	282	320	347	381	398	417	437	450	465	471	480	492	500	453	442	449	447
5	268,33333	311,33333	359,33333	378,83333	394,408,66666	421,33333	435,33333	444,66666	454,437,66666	460,454,66666	465,454,66666	465,454,66666	465,454,66666	465,454,66666	465,454,66666	465,454,66666	465,454,66666	465,454,66666
5	29	240	302	332	358	383	401	421	435	447	452	460	463	406	397	402	415	415
5	30	235	304	335	363	395	417	440	452	473	491	503	495	419	404	404	404	362
5	31	253	294	319	342	368	390	404	412	430	445	453	448	374	341	339	324	308
5	32	288	345	390	429	459	482	512	526	542	559	566	582	520	460	424	354	351
5	33	285	320	333	355	371	383	392	397	409	416	419	422	408	330	318	323	302
5	34	280	317	340	353	370	389	405	422	440	454	463	473	471	388	350	344	350
5	35	292	340	372	402	429	448	468	487	505	519	533	552	566	471	434	433	442
5	267,57142	317,42857	345,85714	371,71428	396,42857	415,71428	434,57142	447,28571	463,71428	476,57142	485,28571	489,28571	489,28571	489,28571	489,28571	489,28571	489,28571	489,28571

Tabla 11. Diferencias de peso por grupo antes y después de los tratamientos (semana 10 vs 16)

Grupo	(I) Pre_Post	(J) Pre_Post	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b
						Lower Bound
Control	1	2	-32.857*	8.563	.001	-50.344
	2	1	32.857*	8.563	.001	15.370
Obesas	1	2	-54.857*	8.563	.000	-72.344
	2	1	54.857*	8.563	.000	37.370
VLCD	1	2	-2.286	8.563	.791	-19.773
	2	1	2.286	8.563	.791	-15.201
Sham	1	2	41.000*	9.249	.000	22.112
	2	1	-41.000*	9.249	.000	-59.888
Sleeve	1	2	116.429*	8.563	.000	98.941
	2	1	-116.429*	8.563	.000	-133.916

Tabla 12. Comparación de pesos entre grupos antes de los tratamientos (semana 10)

(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
Obesas	VLCD	8.143	28.830	.780	-51.358	67.644
	Sham	30.929	30.007	.313	-31.002	92.859
	Sleeve	-2.714	28.830	.926	-62.216	56.787
VLCD	Obesas	-8.143	28.830	.780	-67.644	51.358
	Sham	22.786	30.007	.455	-39.145	84.717
	Sleeve	-10.857	28.830	.710	-70.358	48.644
Sham	Obesas	-30.929	30.007	.313	-92.859	31.002
	VLCD	-22.786	30.007	.455	-84.717	39.145
	Sleeve	-33.643	30.007	.273	-95.574	28.288
Sleeve	Obesas	2.714	28.830	.926	-56.787	62.216
	VLCD	10.857	28.830	.710	-48.644	70.358
	Sham	33.643	30.007	.273	-28.288	95.574

Tabla 13. Comparación de pesos entre grupos después de los tratamientos (semana 16)

(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
Obesas	VLCD	60.714	30.690	.059	-2.626	124.055
	Sham	126.786*	31.943	.001	60.859	192.713
	Sleeve	168.571*	30.690	.000	105.231	231.912
VLCD	Obesas	-60.714	30.690	.059	-124.055	2.626
	Sham	66.071*	31.943	.050	.144	131.998
	Sleeve	107.857*	30.690	.002	44.517	171.198
Sham	Obesas	-126.786*	31.943	.001	-192.713	-60.859
	VLCD	-66.071*	31.943	.050	-131.998	-.144
	Sleeve	41.786	31.943	.203	-24.141	107.713
Sleeve	Obesas	-168.571*	30.690	.000	-231.912	-105.231
	VLCD	-107.857*	30.690	.002	-171.198	-44.517
	Sham	-41.786	31.943	.203	-107.713	24.141

ANEXO 4

Tabla 14. Valor por cada individuo de los parámetros bioquímicos plasmáticos estudiados

	L-6	IL-20	IL-17a	MCP-1	TNFA	Ghrelin	Leptin	Vitadina	Glucosa	Insulina	HOMA-IR	Albumin	AST	ALT	ALP	Colet	HDL	Trigü	Creat	LDH	Urea	Na	K	
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	ng/mL	mg/dL	µU/L	mg/dL	g/L	U/L	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	mg/dL	mmol/L	mmol/L	
1	Control	71.20	70.14	5376	2,864.16	38.81	6.90	12,584.52	0.72	326.9	84.16	67.90												
2		71.20	31.01	4.81	2,160.08	37.02	6.90	7,200.97	6.62	9.22	6.99	25.5	70.00	27.2	70.00	76.0	42.3	192.20	0.38	305.70	32.00	162.6	4.50	
3		71.20	43.67	7.30	17,302.26	2.40	18.34	2,488.28	0.50	408.9	6.07	26.2	83.10	46.4	90.00	80.0		113.60	0.46	186.50		139.8	4.20	
4		71.20	91.65	90.57	2,659.72	77.52	6.90	7,569.51	6.89	309.6	10.47	28.3	126.10	66.4	77.00	79.0	42.6	204.90	0.44	879.80	35.10	162.2	5.00	
5		71.20	7.30	9.61	2,897.23	2.40	6.90	6,804.23	4.02	311.6	52.31	40.40	25.9	85.60	65.4	67.00	79.0	47.1	130.70	0.41	434.40	40.60	163.4	5.30
6		71.20	87.64	21.65	2,395.33	61.28	6.90	10,101.01	1.64	249.4	112.65	66.87	25.0	66.40		64.0		138.00	0.58			165.1	4.60	
7		71.20	7.30	9.61	2,564.26	29.10	6.90	5,167.23	0.50	329.1	54.10	42.96	27.2	66.10	41.9	95.00	87.0	47.1	186.90	0.45	189.10	35.80	162.4	4.90
8	HFD	71.20	7.30	7.30	1,873.19	2.40	6.90	17,821.54	1.26	270.3	52.83	35.26	25.0	57.30	22.7	100.00	61.0	38.5	145.50	0.33	313.10	32.80	164.0	4.70
9		71.20	7.30	7.30	3,880.69	19.07	6.90	9,855.78	0.50	208.8	54.97	28.35	24.7	59.00	22.9	109.00	72.0	37.0	467.20	0.33	177.60	32.40	162.3	3.80
10		71.20	26.46	24.71	2,475.01	16.89	6.90	2,905.07	15.60	204.8	70.45	36.62	29.0	137.80	46.4	158.00	97.0	40.7	246.60	0.36	1,454.90	38.90	161.2	6.50
11		71.20	40.72	36.75	2,889.93	33.67	6.90	18,576.51	0.50	195.1	38.72	18.85	25.1	60.90	31.5	85.00	48.0	42.3	229.30	0.27	263.40	28.60	164.2	3.80
12		71.20	7.30	7.30	1,498.39	38.83	6.90	9,144.45	0.50	196.2	57.33	27.77	25.3	60.20	30.3	84.00	67.0	42.2	231.90	0.26	246.30	27.90	168.9	3.80
13		71.20	23.89	13.23	2,464.93	33.38	6.90	15,845.39	1.02	250.2	12.38	7.65	26.7	94.30	58.9	124.00	164.0	59.7	169.40	0.29	673.70	34.80	162.8	5.00
14		71.20	7.30	7.31	1,142.92	26.61	6.90	20,346.30	1.62	279.1	45.32	31.23				108.0			0.32			162.1	4.00	
15	MLO	71.20	7.30	28.79	1,856.66	2.40	6.90	6,797.80	0.50	254.5	38.22	24.20	23.8	54.30	26.1	57.00	71.0	48.5	144.90	0.36	564.30	36.20	138.0	5.10
16		71.20	44.01	55.67	2,246.75	59.28	6.90	6,898.78	2.58	300.2	17.65	12.44	26.3	77.80	30.5	100.00	64.0	42.3	96.80	0.36	546.40	61.40	160.8	6.90
17		71.20	7.30	13.89	5,240.30	30.39	6.90	26,797.14	5.60	185.2	70.56	32.27				59.0			0.27			143.8	5.10	
18		71.20	33.15	7.30	2,867.64	6.85	6.90	38,472.85	0.96	129.8	28.77	9.22				39.0			0.20			164.5	3.60	
19		71.20	7.30	7.30	2,260.21	2.40	6.90	11,275.78	1.16	186.3	29.96	13.79	25.6	68.5	18.8	68	75.0	47.7	78.9	0.32	695.10	36.80	167.4	4.30
20		71.20	7.30	7.30	2,044.33	2.40	6.90	7,226.45	0.50	247.0	14.91	9.09				48.0			0.33			161.3	3.90	
21		71.20	7.30	7.30	1,837.57	33.67	6.90	3,994.08	0.50	232.5	40.54	23.27	24.8	52.90	20.9	93.80	45.0	39.8	75.70	0.30	250.00	61.40	164.3	6.40
22		71.20	56.26	17.77	1,837.55	16.40	6.90	14,949.44	16.10	199.7	29.33	14.46	18.0	95.70	39.7	85.00	69.0	40.4	69.80	0.43	1,030.00	34.20	180.7	4.60
23		71.20	24.15	87.88	1,346.04	2.40	6.90	5,955.43	0.50	199.7	29.29	14.44				81.00	38.0	22.9	37.90	0.29	365.50	27.70	169.2	3.50
24		71.20	34.36	7.30	2,528.67	21.03	6.90	12,174.09	5.62	32.77														
25		71.20	186.28	27.04	1,634.66	33.58	6.90	233.75	0.50	235.6	6.30	20.1	59.60	24.2	65.00	80.0	44.5	44.60	0.36	179.20	43.90	163.0	3.80	
26		71.20	66.71	7.30	1,316.16	2.40	6.90	7,057.92	2.55	219.5	22.81	12.26	21.1	72.80	38.6	65.00	49.0	30.1	78.90	0.43	540.00	29.40	163.8	4.60
27		71.20	226.18	35.39	3,016.65	53.80	6.90	14,977.78	14.40	242.0	23.11	16.89	18.3	69.10	23.0	87.00	55.0	30.8	37.40	0.47	980.00	30.20	162.8	6.20
28	Sham	3,537.48	266.59	251.23	5,045.64	137.01	6.90	193.40	0.50	158.2	7.99	3.12	17.9	117.80	14.8	407.00	59.0	32.8	49.70	0.46	1,230.80	40.60	163.7	5.10
29		71.20	380.98	7.30	5,505.03	2.40	6.90	5,551.73	0.50	211.1	83.93	42.75	16.9	108.50	15.8	444.00	40.0		84.40	0.47	458.10	67.90	160.0	4.70
30		71.20	158.88	7.30	1,450.72	2.40	6.90	1,005.22	0.50	244.3	1.63	0.99	17.4	57.80	23.7	127.00	69.0	43.3	72.70	0.36	177.10	34.50	164.2	3.50
31		71.20	159.84	7.30	5,333.86	2.40	6.90	2,653.36	0.50	220.7	12.92	7.84	17.6	61.60	28.1	155.00	47.0	39.2	35.10	0.29	156.50	26.70	165.1	3.60
32		71.20	166.72	7.30	2,307.84	2.40	6.90	2,738.30	0.50	273.7	2.31	1.56	18.7	53.20	28.1	54.00	73.0	44.7	48.90	0.35	69.20	28.80	164.5	3.00

REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

1. Association E, Association E, Easd D, Association E, Easo O. Clinical Practice Guidelines EASL – EASD – EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. Clinical Practice Guidelines. J Hepatol [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
2. Rinella M. E., Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. JAMA. 2015;313(22):2263-2273.
3. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. Gastroenterology. 2011;140(1): 124-131.
4. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al; American Gastroenterological Association; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. Gastroenterology. 2012;142(7): 1592-1609.
5. Trust for America's Health; Robert Wood Johnson Foundation. Adult obesity in the United States. <http://stateofobesity.org/adult-obesity>. Accessibility verified May 5, 2015.
6. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. Medicine 2012;91:319–327.
7. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology (2017) doi:10.1038/nrgastro.2017. Published online 20 September 2017
8. 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;13:643–654, e641–e649; quiz e639–e640.

9. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011; 141: 1249-1253

10. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-669

11. Khullar V, Dolganiuc A, Firpi RJ. Pre-and-post transplant considerations in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Transplant* 2014; 4(2): 81-92

12. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, et. al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:524

13. Saadeh S. "Nonalcoholic Fatty liver disease and obesity." *Nutr Clin Pract* 2007; 22: 1-10

14. Bonora, E. & Targher, G. (2012) Increased risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease in NAFLD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* doi:10.1038/nrgastro.2012.79

15. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients* 2013;5:1544–1560.

16. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with nonalcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* 2015;21:739–746.

17. Yki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:901–910.

- 18.** Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419.
- 19.** McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol* 2015;62:1148–1155.
- 20.** Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44–52.
- 21.** Frith J, Day CP, Robinson L, Elliott C, Jones DE, Newton JL. Potential strategies to improve uptake of exercise interventions in non alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2010;52:112–116.
- 22.** Gomez-Ambrosi J, Silva C, Galofre JC, Escalada J, Santos S, Millan D, et al. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:286–294.
- 23.** Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007;133:496–506.
- 24.** Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:165–169.
- 25.** Fotbolcu H, Zorlu E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multisystemic disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22(16): 4079-4090
- 26.** Athyros VG, Tziomalos K, Katsiki N, Doumas M, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Cardiovascular risk across the histological spectrum and the clinical manifestations of non-alcoholic fatty liver disease: An update. *World J Gastroenterol* 2015; 21(22): 6820-6834

- 27.** Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, et al. (2014) Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Med* 11(7): e1001680
- 28.** Day CPJ, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits". *Gastroenterology*. 1998. 114:842–845
- 29.** Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci*. 2014. 15:8591–8638
- 30.** Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008. 28:370–379
- 31.** Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016. 65:1038–1048
- 32.** Zhang X, Ji X, Wang Q, Li JZ. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Protein Cell*. 2017 Jun 22. doi: 10.1007/s13238-017-0436-0
- 33.** Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014. 146:726–735
- 34.** Cook JR, Langlet F, Kido Y, Accili D. Pathogenesis of selective insulin resistance in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 2015. 290:13972–13980
- 35.** Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocr Rev* 2008. 29:939–960
- 36.** Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008. 40:1461–1465
- 37.** Anstee QDC. The genetics of nonalcoholic fatty liver disease: spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Semin Liver Dis* 2015. 35:270–290
- 38.** Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KM, Gromada J, Cohen JC, Hobbs HH. Pnpla3^{I148M} knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets

and develop hepatic steatosis. *Hepatology* 2015. 61:108–118

39. Crunk AE, Monks J, Murakami A, Jackman M, Maclean PS, Ladinsky M, Bales ES, Cain S, Orlicky DJ, McManaman JL. Dynamic regulation of hepatic lipid droplet properties by diet. *PLoS ONE* 2013. 8:e67631

40. Su W, Wang Y, Jia X, Wu W, Li L, Tian X, Li S, Wang C, Xu H, Cao J et al. Comparative proteomic study reveals 17beta-HSD13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014. 111:11437–11442

41. Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Bialokoz-Kalinowska I, Bobrus-Chociej A, Kowalska I. Hepatokines and nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol* 2016. 63:459–467

42. Mori K, Emoto M, Inaba M. Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011. 5:124–146

43. Stefan N, Haring HU. Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nat Med* 2013. 19:394–395

44. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, Flichman D, Mirshahi F, Sanyal AJ, Sookoian S. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum noncoding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 2015. 64:800–812

45. Gerhard GS, DiStefano JK. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015. 7:226–234

46. DiStefano JK, Gerhard GS. Circulating microRNAs in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016. 10:161–163

47. Chen Y, Huang H, Xu C, Yu C, Li Y. Long non-coding RNA profiling in a non-alcoholic fatty liver disease rodent model: new insight into pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017 doi:10.3390/ijms18010021

48. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 2007. 9:2277–2293

- 49.** Vonghia L, Michielsen P, Francque S. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* 2013; 14:19867–19890
- 50.** Stojisavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20:18070–18091
- 51.** Giby VG, Ajith TA. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2014; 6(8): 570-579
- 52.** Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA, Guerra B. Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Exp Physiol* 2010; 95: 160-171
- 53.** Huang XD, Fan Y, Zhang H, Wang P, Yuan JP, Li MJ, Zhan XY. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2888-2893
- 54.** Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409
- 55.** Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, Erdil A, Yaman H, Saka M, Deveci MS, Bagci S, Gulsen M, Karaeren N, Dagalp K. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3584-3589
- 56.** Canbakan B, Tahan V, Balci H, Hatemi I, Erer B, Ozbay G, Sut N, Hacibekiroglu M, Imeryuz N, Senturk H. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2008; 7: 249-254
- 57.** Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de lasio R, Gentilcore E, Natale S, Cassader M, Rizzetto M, Pasquali R, Marchesini G. Plasma adiponectin in non-alcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3498-3504

- 58.** Mirza MS. Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Gastroenterol* 2011; 2011: 592404
- 59.** Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, Donnini D, Faggian D, Mussap M, Plebani M, Avellini C, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1081-1086
- 60.** Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; 50: 1511-1525
- 61.** Murad A, Hassan H, Husein H, Ayad A. Serum resistin levels in nonalcoholic fatty liver disease and their relationship to severity of liver disease. *JEMDSA* 2010; 15: 53-56
- 62.** Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005; 174: 5789-5795
- 63.** Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 412-421
- 64.** Aller R, de Luis DA, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Velasco MC, Alvarez T, Pacheco D, González JM. Influence of visfatin on histopathological changes of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1772-1777
- 65.** Klötting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M, Kahn BB. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 2007; 6: 79-87
- 66.** Seo JA, Kim NH, Park SY, Kim HY, Ryu OH, Lee KW, Lee J, Kim DL, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kim SG. Serum retinol-binding protein 4 levels are elevated in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68: 555-560

- 67.** Alkhoury N, Lopez R, Berk M, Feldstein AE. Serum retinol-binding protein 4 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 985-989
- 68.** Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 727-735
- 69.** Seo YY, Cho YK, Bae JC, Seo MH, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Lee WY. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2013; 28: 41-45
- 70.** Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005; 54: 2939-2945
- 71.** Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 1166-1172
- 72.** Kodama Y, Taura K, Miura K, Schnabl B, Osawa Y, Brenner DA. Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology* 2009; 136: 1423-1434
- 73.** Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 39-45
- 74.** Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163
- 75.** Manco M, Marcellini M, Giannone G, Nobili V. Correlation of serum TNF- α levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 954-960

- 76.** Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 3417-3427
- 77.** Wunderlich FT, Ströhle P, Könner AC, Gruber S, Tovar S, Brönneke HS, Juntti-Berggren L, Li LS, van Rooijen N, Libert C, Berggren PO, Brüning JC. Interleukin-6 signaling in liver- parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. *Cell Metab* 2010; 12: 237-249
- 78.** Kumar R, Prakash S, Chhabra S, Singla V, Madan K, Gupta SD, Panda SK, Khanal S, Acharya SK. Association of pro- inflammatory cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res* 2012; 136: 229-236
- 79.** Teoh N, Field J, Farrell G. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. *J Hepatol* 2006; 45: 20-27
- 80.** Radwan MM, Radwan BM, Nandipati KC, et al. Immunological and molecular basis of nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9(8):727–38.
- 81.** Kanda H, Tateya S, Tamori Y et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(6), 1494–1505
- 82.** Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(12), 1796–1808
- 83.** Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11(11), 738–749
- 84.** Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404:661–671
- 85.** Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005; 184:291–318

- 86.** Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; 393:72–76
- 87.** Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamatetreated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15043–15048
- 88.** De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJA, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146:4192–4199
- 89.** Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008; 135:61–73
- 90.** Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DML, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009; 29:359–370
- 91.** Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E1003–E1012
- 92.** Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 65-80
- 93.** Chan YK, Estaki M, Gibson DL. Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. *Ann Nutr Metab* 2013; 63 Suppl 2: 28-40
- 94.** Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; 148: 1258-1270
- 95.** Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck

AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772

96. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol* 2012; 7: 91-109

97. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11070-11075

98. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol* 2014; 20(44):16452-16463

99. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Jul;13(7):412-25

100. Yuan L, Bambha K. Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015; 7(28): 2811-2818

101. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 2011;17:3377-3389

102. Savard, C. et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* 2013; 57, 81-92

103. de Wit, N. et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012; 303, G589-G599

104. Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, Patrice, D. & Bäckhed, F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT Inflammation through TLR signaling. *Cell Metab.* 2015; 22, 658-668

105. Jakobsdottir, G., Xu, J., Molin, G., Ahrne, S. & Nyman, M. High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation,

liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. PLoS ONE 2013; 8, e80476

106. Ishimoto, T. et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. Hepatology 2013; 58, 1632–1643

107. Ma, J. et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. J. Hepatol. 2015; 63, 462–469

108. Ciccocioppo, R. et al. Role of the advanced glycation end products receptor in Crohn's disease inflammation. World J. Gastroenterol. 2013; 19, 8269–8281

109. Leung, C. et al. Dietary glycotoxins exacerbate progression of experimental fatty liver disease. J. Hepatol. 2014; 60, 832–838

110. Swithers, S. E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. Trends Endocrinol. Metab. 2013; 24, 431–441

111. AlKhater, S. A. Paediatric non-alcoholic fatty liver disease: an overview. Obes. Rev. 2015; 16, 393–405

112. Suez, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature 2014; 514, 181–186

113. Payne, A. N., Chassard, C. & Lacroix, C. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host–microbe interactions contributing to obesity. Obes. Rev. 2012; 13, 799–809

114. Foulds CE, Treviño LS, York B, Walker CL. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. Nat Rev Endocrinol. 2017 Aug;13(8):445-457

115. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2009; 136(5), 1585–1592

- 116.** Browning JD, Szczepaniak SL, Dobbins R et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40,1387–1395
- 117.** Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88(6), 2404–2411
- 118.** He S, Mcphaul C, Li JZ et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(9), 6706–6715
- 119.** Hu ZW, Luo HB, Xu YM et al. Tumor necrosis factor–alpha gene promoter polymorphisms in Chinese patients with nonalcoholic fatty liver diseases. *Acta Gastroenterol. Belg.* 2009; 72(2), 215–221
- 120.** Al Eryani, L. et al. Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol. Pathol.* 2015; 43, 482–497
- 121.** Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006;45(4):600–6.
- 122.** Schwenger, KJP. et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Morbidly Obese Individuals Undergoing Bariatric Surgery: Prevalence and Effect of the Pre-Bariatric Very Low Calorie Diet. *Obes Surg.* 2018 Apr;28(4):1109-1116
- 123.** Boden G. High- or low-carbohydrate diets: which is better for weight loss, insulin resistance, and fatty livers? *Gastroenterology* 2009;136: 1490–1492.
- 124.** Lazo M, Solga SF, Horska A, Bonekamp S, Diehl AM, Brancati FL, et al. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:2156–2163.
- 125.** Perreault L, Pan Q, Mather KJ, Watson KE, Hamman RF, Kahn SE. Effect of regression from prediabetes to normal glucose regulation on long-term reduction in diabetes risk: results from the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet* 2012;379:2243–2251.

126. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol* 2012;56:255–266.

127. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2013;59:138–143.

128. Barrera F, George J. The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. *Clin Liver Dis* 2014;18:91–112.

129. Liangpunsakul S, Chalasani N. What should we recommend to our patients with NAFLD regarding alcohol use? *Am J Gastroenterol* 2012;107:976–978.

130. Kwon HK, Greenson JK, Conjeevaram HS. Effect of lifetime alcohol consumption on the histological severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2014;34:129–135.

131. Dunn W, Sanyal AJ, Brunt EM, Unalp-Arida A, Donohue M, McCullough AJ, et al. Modest alcohol consumption is associated with decreased prevalence of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Hepatol* 2012;57:384–391.

132. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972–1978.

133. Saab S, Mallam D, Cox 2nd GA, Tong MJ. Impact of coffee on liver diseases: a systematic review. *Liver Int* 2014;34:495–504.

134. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol* 2012;56:255–266.

135. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012;57:157–166.

- 136.** Bacchi E, Negri C, Targher G, Faccioli N, Lanza M, Zoppini G, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). *Hepatology* 2013;58:1287–1295.
- 137.** Hernandez-Rodas MC., Valenzuela R., Videla LA. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 25168-25198
- 138.** Sasaki et al. Bariatric surgery and non-alcoholic fatty liver disease: current and potential future treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Oct 27;5:164
- 139.** Ashrafian H, Athanasiou T, Li JV, et al. Diabetes resolution and hyperinsulinaemia after metabolic Roux en-Y gastric bypass. *Obes Rev.* 2011;12(5):e257–72
- 140.** Chavez-Tapia Norberto C, Tellez Avila Felix I, Barrientos-Gutierrez T, et al.. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(1)
- 141.** Bower G. et al. Bariatric Surgery and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review of Liver Biochemistry and Histology. *OBES SURG* (2015) 25:2280–2289
- 142.** Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric surgery reduces features of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Gastroenterology* 2015;149:377–388.
- 143.** Bell LN, Temm CJ, Saxena R, et al. Bariatric surgery-induced weight loss reduces hepatic lipid peroxidation levels and affects hepatic cytochrome P-450 protein content. *Ann Surg.* 2010;251(6):1041–8
- 144.** Coupaye M, Riviere P, Breuil MC, et al. Comparison of nutritional status during the first year after sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* 2014;24(2):276–83
- 145.** Mechanick J, Youdim A, Jones D, et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient–2013 update: cosponsored by American

Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. *Obesity* 2013; 21: S1–27

146. Abbatini, Francesca et al. Type 2 diabetes in obese patients with body mass index of 30–35 kg/m²: sleeve gastrectomy versus medical treatment *Surgery for Obesity and Related Diseases* , Volume 8 , Issue 1 , 20 – 24

147. Clinical Issues Committee, ASMBS. Bariatric surgery in class I obesity (body mass index 30–35 kg/m²). *Surgery for Obesity and Related Diseases* , Volume 9, Issue 1 , e1 - e10

148. Du J, Tian J, Ding L et al. Vertical sleeve gastrectomy reverses diet-induced gene-regulatory changes impacting lipid metabolism. *Scientific Reports* 7, Article number: 5274 (2017) DOI:10.1038/s41598-017-05349-2

149. Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Moncada R, Valentí V, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Rodríguez A. Acylated and desacyl ghrelin are associated with hepatic lipogenesis, β -oxidation and autophagy: role in NAFLD amelioration after sleeve gastrectomy in obese rats. *Sci Rep.* 2016;6:39942.

150. Ding L et al. Vertical sleeve gastrectomy activates GPBAR-1/TGR5 to sustain weight loss, improve fatty liver, and remit insulin resistance in mice. *Hepatology.* 2016 Sep;64(3):760–773

151. Mosinski JD, Pagadala MR, Mulya A. Gastric bypass surgery is protective from high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and hepatic endoplasmic reticulum stress. *Acta Physiol (Oxf).* 2016 Jun;217(2):141–51

152. Myronovych A, Kirby M, Ryan KK et al. Vertical sleeve gastrectomy reduces hepatic steatosis while increasing serum bile acids in a weight-loss-independent manner. *Obesity (Silver Spring).* 2014 Feb;22(2):390–400

153. Verbeek J, Lannoo M, Pirinen E, et al Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with non-alcoholic steatohepatitis *Gut* 2015;64:673–683

154. De Luca, M. et al. Indications for Surgery for Obesity and Weight-Related Diseases: Position Statements from the International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO). *Obes. Surg.* 2016 Aug;26(8):1659–96.

- 155.** Patrick Sharp, Jason S. Villano; *The Laboratory Rat*, Second Edition. CRC Press, 11 dic. 2012
- 156.** Ph D, Johnson FK. Development of a sleeve gastrectomy weightloss model in obese Zucker rats. NIH Public Access. 2010;157(2): 567–83.
- 157.** Bueter, M., Abegg, K., Seyfried, F., Lutz, T.A., le Roux, C.W. Roux-en-Y Gastric Bypass Operation in Rats. *J. Vis. Exp.* 2012;(64),e3940.
- 158.** Harley IT, Stankiewicz TE, Giles DA. IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 2014 May;59(5):1830-9
- 159.** Kleiner DE, Brunt EM, Van NattaM, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–21
- 160.** Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol*. 2014;5(3):211–8
- 161.** Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751–9
- 162.** Pasarín M, Abalde JG, Rodríguez-Vilarrupla A. et al. Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD. *Journal of Hepatology* 2011 vol. 55 j 1095–1102
- 163.** Pasarín M, La Mura V, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Pagán JC, et al. (2012) Sinusoidal Endothelial Dysfunction Precedes Inflammation and Fibrosis in a Model of NAFLD. *PLoS ONE* 7(4): e32785.
- 164.** Svenja Hartmann, Anne J. Ridley, Susanne Lutz. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol*. 2015; 6: 276
- 165.** Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology*. 2007 Jul;46(1):242-53

- 166.** Zhou Q, Hennenberg M, Trebicka J, et al. Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut*. 2006 Sep;55(9):1296-305
- 167.** Couvelard A, Scoazec JY, Feldmann G. Expression of cell-cell and cellmatrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol* 1993; 143: 738–752
- 168.** de Andrade KQ, Moura FA, dos Santos JM, de Araujo OR, de Farias Santos JC, Goulart MO. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of n-acetylcysteine. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30269–308
- 169.** Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 April; 25(2): 195–206
- 170.** Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2017 14, 397–411
- 171.** Washington K, Wright K, Shyr Y, Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol*. 2000 Jul;31(7):822-8
- 172.** Mann DA, Smart DE, Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*. 2002 Jun; 50(6): 891–896
- 173.** Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CR, et al. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab Invest*. 2008; 88:1090–100
- 174.** Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 2014;20(26): 8364-8376

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

9. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

PUBLICACIONES:

- **Morphofunctional changes after sleeve gastrectomy and very low calorie diet in an animal model of non-alcoholic fatty liver disease.**

E. Talavera-Urquijo, S. Rodríguez-Navarro, M. Beisani, M.T. Salcedo-Allende, A. Chakkur, M. Arús-Avilés, M. Cremades, S. Augustin, M. Martell, J.M. Balibrea; *Obes Surg.* 2017 Jul 15. doi: 10.1007/s11695-017-2805-4

COMUNICACIONES:

- **Efectos de la gastrectomía vertical sobre la enfermedad NAFLD en un modelo animal**

Comunicación oral en junio de 2016, en el 18º Congreso de la Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad y de las Enfermedades Metabólicas (SECO) (Barcelona, España).

- **Efectos de la gastrectomía vertical sobre la enfermedad NAFLD en un modelo animal – daño endotelial y esteatosis**

Comunicación oral en noviembre de 2016, en el 20º Congreso Nacional de la Asociación Española de Cirujanos (AEC) (Madrid, España).

- **Histopathological, inflammatory and hormonal changes after sleeve gastrectomy and very low calorie diet in an animal model of non-alcoholic fatty liver disease**

Comunicación póster en agosto de 2017, en el 22o Congreso Mundial de la "International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders" (IFSO) (Londres, UK).

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona