



NEUROTENSINA I PRONEUROTENSINA COM BIOMARCADOR DE LA MALALTIA PER FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC

Beatriz Villar Navas

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

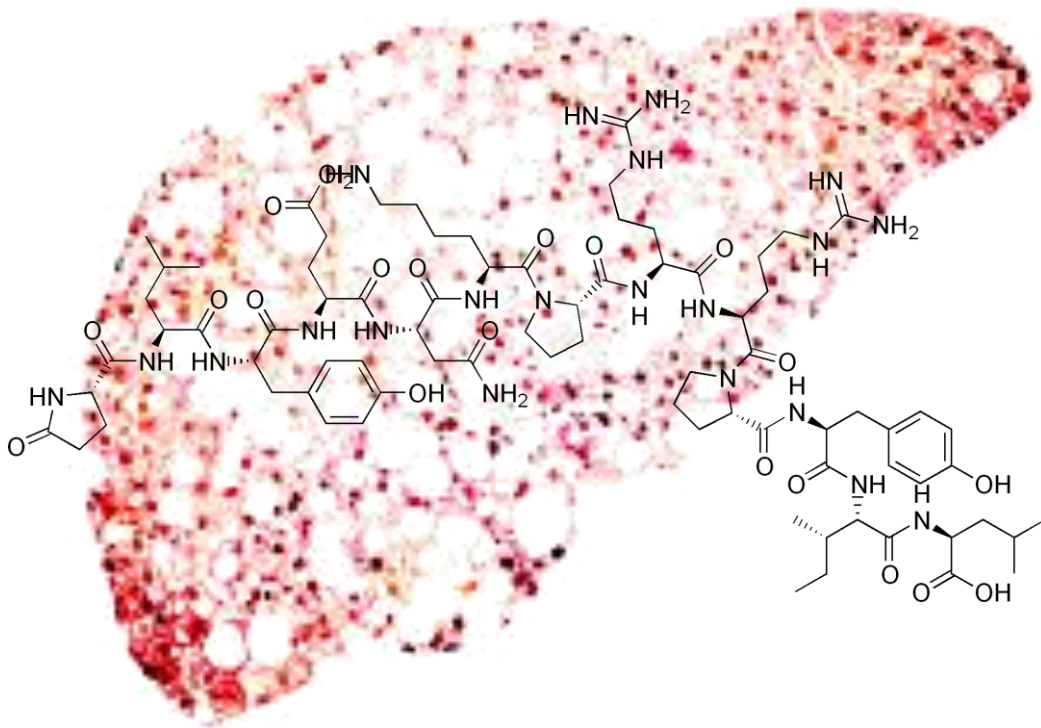
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Neurotensina i Proneurotensina com biomarcador de la malaltia per fetge gras no alcohòlic

BEATRIZ VILLAR NAVAS



TESI DOCTORAL – TESIS DOCTORAL- DOCTORAL THESIS
2021



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "....."Neurotensina i Proneurotensina com biomarcadors de la malaltia per fetge gras no alcohòlic.....", que presentaBeatriz Villar Navas..... per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departamentde Biomedicina..... d'aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado "..... Neurotensina y Proneurotensina como biomarcadores de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....", que presentaBeatriz Villar Navas..... para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamentode Biomedicina..... de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled "...Neurotensin and Proneurotensin as a biomarkers of nonalcoholic fatty liver disease.....", presented byBeatriz Villar Navas..... for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Departmentof Biomedicine..... of this university.

Tarragona, 30 juny 2021 / Tarragona, 30 Junio 2021

El/s director/s de la tesi doctoral
El/los director/es de la tesis doctoral
Doctoral Thesis Supervisor/s

M Teresa Auguet Quintillá

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

NEUROTENSINA I PRONEUROTENSINA COM BIOMARCADOR DE LA MALALTIA PER FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC

Beatriz Villar Navas

Neurotensina i Proneurotensina com biomarcador de la malaltia per fetge gras no alcohòlic |

A Guillem i Oriol

AGRAÏMENTS

M'agradaria tenir unes paraules d'agraïment a totes aquelles persones que han fet possible, de forma directa o indirecta, l'elaboració d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, donar les gràcies a la Dra. Maria Teresa Auguet Quintillà per confiar en mi, guiar-me i ajudar-me en el món de l'investigació i les Malalties metabòliques. És admirable com a professional i persona.

A Laia Bertran Ramos i la resta de companys de la Unitat de Recerca del Hospital Universitari de Joan XXIII, per la seva ajuda i el treball elaborat. Moltes gràcies Laia per fer-me entendre el món de l'estadística.

A la meva família, per fer possible que pogués tenir temps per dedicar-me en aquest projecte i animar-me en els moments més complicats perquè ho pogués aconseguir. Gràcies Marc, per entendre la dificultat d'aquest projecte i creure en mi des d'un principi.

A les meves amigues Fiorella, Jessica, Patricia i Gloria perquè m'han animat a seguir i han estat sempre al meu costat quan les he necessitat.

I per finalitzar, agrair a tots els pacients que han participat en els estudis, així com, als membres del tribunal i avaluadors externs de la tesi.

Moltes gràcies a tots.

ÍNDIX

I. ABREVIATURES	1
II. RESUM.....	4
III. INTRODUCCIÓ.....	6
1. MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC.....	6
Factors de risc per la MFGNA	7
1.1. EPIDEMIOLOGIA DE LA MFGNA	10
Prevalença i Incidència Global.....	10
Prevalença a Amèrica	11
Prevalença a Europa	11
Prevalença a Àsia	11
Prevalença Orient Mitjà i Turquia	12
Prevalença a l'Àfrica	12
Prevalença a Austràlia i països del Pacífic	12
Edat, sexe i ètnia.....	12
Evolució clínica.....	12
1.2. PATOGÈNESI DE LA MFGNA.....	16
Relació entre la MFGNA i la síndrome metabòlica.....	21
Paper de la microbiota intestinal en MFGNA i síndrome cardiometabòlic.....	27
Mecanisme de fibrogènesi	29
1.3 DIAGNÒSTIC I ESTADIATGE DE LA MFGNA	30
Avaluació clínica de la MFGNA	30
Diagnòstic histològic.....	31
Diagnòstic no invasiu de MFGNA	32
Diagnòstic no invasiu d'EHNA.....	34
Diagnòstic no invasiu de fibrosi relacionada amb la MFGNA	37
Mètodes diagnòstics per avaluar el progrès i seguiment de la MFGNA amb el tractament	40
1.4. TRACTAMENT DE LA MFGNA.....	43
1.4.1. Alimentació, activitat física i exercici en la gestió de l'EHNA.....	43
1.4.2. Teràpia farmacològica.	44
1.4.3. Teràpia quirúrgica i endoscòpica.....	51
1.4.4. Trasplantament de fetge.....	52
2. NEUROTENSINA	53

2.1. Què és? La seva expressió en condicions fisiològiques.....	53
2.2. Neurotensina i Obesitat.....	54
2.3. Neurotensina i MFGNA.....	55
IV. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	56
V. MATERIAL I MÈTODES.....	57
Subjectes.....	57
Estudi histològic de les biòpsies hepàtiques	58
Anàlisi bioquímica.....	58
Expressió gènica hepàtica.....	58
Anàlisi estadística.....	59
VI. RESULTATS	60
VI.I. Nivells plasmàtics de neurotensina baixos en dones amb MFGNA	60
Característiques basals dels subjectes.....	60
Nivells plasmàtics de NT	61
Correlació entre els nivells plasmàtics de NT i els valors bioquímics	63
VI.II. Nivells circulants de pro-neurotensina i la seva relació amb EHNA i el metabolisme dels lípids hepàtics.....	64
Característiques basals dels subjectes.....	64
Nivells circulants de pro-NT en la població estudiada.....	65
Expressió hepàtica dels principals gens relacionats amb el metabolisme dels lípids hepàtics	66
Correlacions dels nivells plasmàtics de pro-NT amb els paràmetres bioquímics del metabolisme lipídica i amb l'expressió hepàtica dels principals gens del metabolisme lipídica hepàtica.....	69
VII. DISCUSIÓ	70
VIII. CONCLUSIÓ.....	74
IX. BIBLIOGRAFIA	75
X. ANNEXES	97

I. ABREVIATURES

AASLD: associació americana per l'estudi de la malaltia hepàtica

Acetil-CoA: coenzim acetil A

ABCA1: "ATP binding cassette subfamily A member 1"

ABCG1c: "ATP-binding cassette sub-family G member 1"

ACC1: "acetyl-CoA carboxylase 1"

ADN: àcid desoxiribonucleic

ARN: àcid ribonucleic

AUROC: àrea sota la corba

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartat aminotransferasa

ApoB: Apoproteïna B

BOAT7: proteïna 7 que conté el domini O-acetiltransferasa lligat a la membrana

Cer: ceramides

CH: Carcinoma hepatocel·lular

CPT1A: "carnitine palmitoyltransferase 1A"

CROT: "carnitine O-octanoyltransferase"

ChREBP: proteïna d'unió a elements sensibles a carbohidrats

DAG: diacilglicerols

DAMPs: patrons moleculars associats al dany

DM: Diabetes mellitus

EHNA: Esteatohepatitis no alcohòlica.

ES: Esteatosis simple

FABP: "fatty acid-binding proteins"

FDA: Administració d'aliments i fàrmacs

FIAF: proteïna produïda a les cèl·lules L intestinals

FFA: àcids grassos lliures -> **AGL**

FA: fosfatasa alcalina

FAS: "fatty acid synthase"

FGF21: factor de creixement de fibroblastes 21

FXR: receptor X farnesoide

GGT: gamma-glutamil transferasa

GSK-3 β : glucogen sintasa cinasa 3 β

Hb1Ac: Hemoglobina glicosilada

HN: histologia hepàtica normal

HSD17B13: 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipus 13

HSC: cèl·lules estrellades hepàtiques

HTA: hipertensió arterial

ICAM-1: molècules d'adhesió intercel·lular

IMC: Índex de massa corporal

IL-1: Interleuquina 1

IL-6: Interleuquina 6

IRS-1: Substrat receptor d'insulina 1

IRD-2: fosfatidilinositol-3-cinasa associada al substrat receptor d'insulina 2

JNK: Cinasa N-terminal c-Jun

LCN2: lipocalin 2

LPL: lipoproteïna lipasa

LPS: lipopolisacàrids

cLDL: lipoproteïna d'alta densitat

cHDL: lipoproteïna de baixa densitat

LOXL2: "lysoxidase like 2"

LXRb: "liver X receptor b"

MCV: malaltia cardiovascular

MPC-1: proteïna quimioteràpica 1

MFGNA: Malaltia per fetge gras no alcohòlic

MRC: malaltia renal crònica

NHANESIII: Enquesta nacional de Salut i Nutrició transversal

NT: Neurotensina

NK: cèl·lules assassines naturals

NF-kB: cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B

OMS: Organització Mundial de la Salut

OM: Obesitat mòrbida

PAI-1: inhibidor d'activador de plasminogen 1

PAMPs: patrons moleculars associats a patògens

PPAR α : receptor α del proliferador actiu de peroxisoma

PN: pes normal

PNPLA3: proteïna 3 que conté el domini fosfolipasa similar a la patatina

Pro-NT: Proneurotensina

PXR: receptor X de l'embaràs

RBP4: proteïna transportadora de retinol tipus 4

RE: reticle endoplasmàtic

SCFA: àcids grassos de cadena curta

SREBP-1c: proteïna d'unió a l'element regulador de l'esterol

TAC: Tomografia axial automatitzada

TG: triglicèrids

TGR5: receptor de tipus membrana per a àcids biliars

TLR4: receptor "Toll like 4"

TLR9: receptor "Toll like 9"

TM6SF2: "Transmembrana 6 super family member 2"

TxH: Transplantament hepàtic

VDR: receptor de calcitriol

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat

VPN: valor predictiu negatiu

VPP: valor predictiu positiu

8-iso-PGF2 α : 8-iso-prostaglandina F2 α urinària

II. RESUM

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat per investigar el possible paper com a biomarcador pel diagnòstic i seguiment de la malaltia per fetge gras no alcohòlic (MFGNA) del pèptid neurotensina (NT) i/o el seu precursor, pro-neurotensina (pro-NT).

La MFGNA s'ha convertit en la causa més freqüent de malaltia hepàtica crònica en nens i adults, associada a l'epidèmia mundial de l'obesitat i la síndrome metabòlica^{1,2}. Degut a aquesta magnitud clínica, s'ha convertit en una prioritat millorar els nostres coneixements de la seva fisiopatologia i desenvolupar nous tractaments³. Una de les molècules relacionades amb la fisiopatologia de l'obesitat és la NT. No obstant, la seva relació amb la MFGNA ha estat escassament estudiada i les dades són controvertides.

La NT és un pèptid de 13 aminoàcids que s'expressa en el sistema nerviós central i al tracte gastrointestinal, predominantment a les cèl·lules enteroendocrines de l'intestí prim⁴. Està involucrada en el metabolisme dels nutrients, particularment en la degradació dels greixos a l'intestí prim⁵ i també actua com neuromodulador, al regular l'efecte anorexígen⁶. Els nivells plasmàtics de pro-NT elevats en dejú, s'han associat amb un major risc de diabetis mellitus tipus 2 (DM2), malaltia cardiovascular i mort⁷.

Hi ha estudis en humans i animals que suggereixen una relació entre l'obesitat i la NT. S'han trobat nivells plasmàtics de NT més baixos en pacients amb obesitat mòrbida (OM) que en els controls amb pes normal. A més, després de la col·locació de la banda gàstrica i la cirurgia de bypass es va observar un augment dels nivells de NT⁸. Christ-Chain et al.⁹ van descriure un augment de la pro-NT circulant després del bypass gàstric bariàtric en pacients amb obesitat severa; el que suggereix que la regulació de la secreció de la NT s'altera a l'obesitat humana. A més, després del bypass gàstric, hi ha una disminució persistent de l'apetit que es correlaciona amb l'augment dels nivells de NT, suggerint que aquesta pot ajudar a explicar els efectes persistents de la cirurgia bariàtrica sobre la sacietat.

Pel contrari, un estudi del 2016 va mostrà nivells plasmàtics més alts de pro-NT en pacients obesos i amb resistència a la insulina, a la vegada que es duplicava el risc de patir obesitat més endavant en aquells subjectes no obesos. No obstant, no es va estudiar la presència de MFGNA⁵. Es mostrava així una relació directa entre la NT i l'augment d'absorció de greixos intestinals i l'obesitat; suggerint que la NT podria ser un marcador pronòstic d'obesitat futura i un objectiu potencial pel tractament de malalties relacionades amb l'obesitat.

Degut a que s'han associat els nivells plasmàtics de la NT amb la presència de obesitat i síndrome metabòlica, essent aquestes circumstàncies factors de risc per la MFGNA, l'objectiu de la present tesi doctoral va ser estudiar la seva relació amb la presència de la MFGNA i si podia arribar a considerar-se com biomarcador de l'esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA).

En aquest sentit, es va realitzar un primer estudi on es van mesurar els nivells plasmàtics de NT en 20 dones amb pes normal i 51 dones amb OM. La cohort es va subclassificar segons la seva histologia hepàtica com OM sense MFGNA (n=18) o OM amb MFGNA (n=33). El grup de MFGNA va incloure a 15 dones amb esteatosis simple (ES) i 18 dones

amb EHNA. Per quantificar la NT en plasma, es va utilitzar un immunoassaig múltiple en sandvitx, amb una plataforma basada en perles magnètiques Luminex.

Es van obtenir uns nivells de NT disminuïts significativament en dones amb OM i MFGNA (36260.85 ng/ml; $p=0.001$), en comparació amb dones amb OM i funció hepàtica normal (116561.95 ng/ml; $p=0.001$) i amb dones amb pes normal (136862.58 ng/mL; $p=0.001$). No es va trobar diferències entre les dones amb ES i EHNA ($p=0.415$). Per tant, la presència de MFGNA, però no l'obesitat, es va associar amb nivells plasmàtics baixos de NT.

Posteriorment al nostre estudi, Barchetta et al.¹⁰ van demostrar que subjectes amb MFGNA, comprovada per biòpsia, tenia nivells plasmàtics de pro-NT significativament més elevats que els que no tenien MFGNA. A més a més, els nivells circulants de pro-NT es correlacionaven positivament amb la presència i la gravetat de la MFGNA. En pacients amb OM també es va evidenciar que els nivells circulants de pro-NT es correlacionaven positivament amb la presència i gravetat de la MFGNA i l'evidència histològica d'inflamació del teixit adipós visceral que condueix a una inflamació sistèmica de baix grau, un augment dels àcids grassos circulants, la resistència a la insulina i un dipòsit aberrant de greix a nivell hepàtic¹¹. Així, aquests estudis suggereixen que la NT podria ser parcialment responsable de la patogènesi de la MFGNA/EHNA a través de l'augment d'absorció de greix intestinal i la inducció de condicions proinflamatòries en el teixit adipós¹².

Els resultats discordants entre l'estudi de Barchetta et al.¹⁰ i el nostre podien deure's a les diferències de sexe de la mostra i a la variabilitat d'analitzar els nivells sanguinis de la NT (inestable) i la pro-NT (estable)¹³.

Per tant, vam decidir analitzar els nivells de pro-NT en les dones amb OM i MFGNA per investigar el paper de la pro-NT en la patogènesi de la MFGNA, i a la vegada, investigar la seva relació amb el metabolisme lipídic hepàtic.

En aquest segon estudi vam determinar els nivells plasmàtics de pro-NT de 56 dones amb OM i 18 amb pes normal. Totes les pacients amb OM es van subclassificar segons la histologia hepàtica en fetge normal ($n=20$) i MFGNA ($n=36$). El grup de MFGNA estava format per 17 dones amb ES i 19 amb EHNA. Les mostres es van analitzar amb un immunoassaig de quimioluminescència en sandvitx per quantificar pro-NT en plasma i RT-qPCR per avaluar els nivells de ARNm hepàtic de diferents gens relacionats amb el metabolisme hepàtic dels lípids.

Els principals resultats van ser que els nivells de pro-NT eren més alts en pacients obeses amb MFGNA que en pacients amb OM i sense MFGNA. A més a més, els nivells de pro-NT eren més alts en pacients amb EHNA que en el grup amb fetge normal. Es va evidenciar que l'expressió hepàtica de gens relacionats amb el metabolisme lipídic estan alterats en la MFGNA i que encara que els nivells de pro-NT es correlacionaven amb les lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL), no hi havia associació amb l'expressió hepàtica dels principals gens relacionats amb el metabolisme lipídic.

Per tant, encara que són necessaris més estudis per confirmar el paper de la pro-NT en la progressió de la MFGNA i per avaluar aquesta molècula com a possible diana terapèutica de l'EHNA, aquesta molècula sembla estar relacionada amb el desenvolupament d'aquesta malaltia tan prevalent.

III. INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC

La malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) és la conseqüència de l'acumulació de triglicèrids i àcids grassos lliures en el citoplasma dels hepatòcits, en absència d'un consum excessiu d'alcohol o altres causes d'esteatosi secundària (**Taula 1**); amb o sense inflamació i fibrosi.

Taula 1. Causes més freqüents d'esteatosi hepàtica secundària.

ESTEATOSI MACROVESICULAR

- Consum excessiu d'alcohol:
 - > 40 g/dia en homes
 - > 20 g/dia en dones
- Fàrmacs: amiodarona, tamoxifè, metotrexat, corticoides, carbamazepina, irinocetan, cisplatí, 5-FU, asparraginas
- Hepatitis C (genotip 3 del VHC)
- Lipodistrofies
- Nutrició parenteral
- Deprivació calòrica subaguda o crònica greu

ESTEATOSI MICROVESICULAR

- Síndrome de Reye
- Fàrmacs: àcid valproic, antirretrovirals (zidovudina i didanosina), AAS, AINE (Ibuprofè i naproxé), amiodarona, cocaïna, tetraciclins, vitamina A
- Esteatosi associada a l'embarç, síndrome de HELLP
- Errors innats del metabolisme: dèficits de lipasa àcida lisosomàtica (malaltia de Wolman en nens, malaltia per acúmulo de èsters de colesterol als adults), altres

La MFGNA comprèn diferents etapes de l'evolució, depenent del grau d'inflamació i/o fibrosi:

- Esteatosi simple (ES):*** Presència de greix al fetge sense fibrosi i amb inflamació lleu o sense (requereix presència de greix en > 5% dels hepatòcits). Aquesta és la forma més prevalent.
- Esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA):*** presència de greix al fetge, balonització hepatocitària i inflamació lobulillar. Histològicament és indistingible de l'esteatohepatitis alcohòlica. Engloba diferents graus de fibrosi, des de casos sense fibrosi fins a cirrosi.
- Cirrosi criptogènica:*** La majoria de pacients inicialment definits com a cirrosi criptogènica eren dones d'entre 50 i 60 anys, amb antecedents d'obesitat, diabetis mellitus de tipus 2 (DM2) i transaminases discretament elevades. La MFGNA va ser identificat retrospectivament com una causa subjacent en el 30-75% de la cirrosi criptogènica¹⁴⁻¹⁶.

Moltes vegades en l'estat terminal de la malaltia (cirrosi) ja no hi ha dades d'esteatosi o inflamació en la histologia. A més, un cop establerta la cirrosi és difícil avaluar la presència de factors de risc metabòlics concomitants ja que sovint es modifica l'estat metabòlic (alteració del metabolisme de la glucosa, desnutrició,

ascites). Per tant, s'ha de considerar l'exposició passada a factors de risc metabòlic en pacients cirròtics¹⁷.

FACTORS DE RISC PER A LA MFGNA

Els factors que es descriuen a continuació s'associen amb un augment de 2 o 3 vegades el desenvolupament de MFGNA i poden ser fonamentals pel diagnòstic i pronòstic de la malaltia¹⁸:

- Síndrome metabòlica:
 - Obesitat (IMC>30Kg/m²), especialment si és de distribució abdominal (perímetre de cintura > 102 cm en homes i > 88 cm en dones).
 - Diabetis mellitus de tipus 2 i glucèmies alterades en dejú.
 - Hipertensió arterial
 - Hipertrigliceridèmia
 - Disminució del colesterol HD
- Sobrecàrrega fèrrica dismetabòlica (ferritina 500-1500 mg/l, saturació transferida < 40-50%, ferro intrahepàtic > 150 mmol/g)
- Certs polimorfismes genètics (PNPLA3-I148 M, TM6SF2-E167K).
- Altres factors, amb un nivell més baix d'associació: síndrome d'ovari poliquístic (hiperandrogenisme funcional ovàric), diabetis mellitus tipus 1, hipotiroïdisme primari, síndrome d'apnea-hipopnea obstructiva del son, hipopituïtarisme anterior, hipogonadisme, resecció pancreàtica-duodenal.

La MFGNA ha estat fortament lligada a l'**obesitat**. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix com a sobrepès un índex de massa corporal (IMC) $\geq 25\text{Kg/m}^2$ i com a obesitat un $\text{IMC} \geq 30\text{Kg/m}^2$. No obstant, en les poblacions asiàtiques, l'OMS ha classificat la població per risc d'afectacions relacionades amb l'obesitat, sent l' $\text{IMC} \geq 27,5\text{Kg/m}^2$ un risc elevat per a aquestes malalties¹⁹. En aquest context, la millor manera d'avaluar el risc i la progressió de MFGNA és conjuntament amb l'IMC i el perímetre de cintura^{20,21}. La prevalença de l'obesitat en adults varia en diferents països (**Figura 1**).

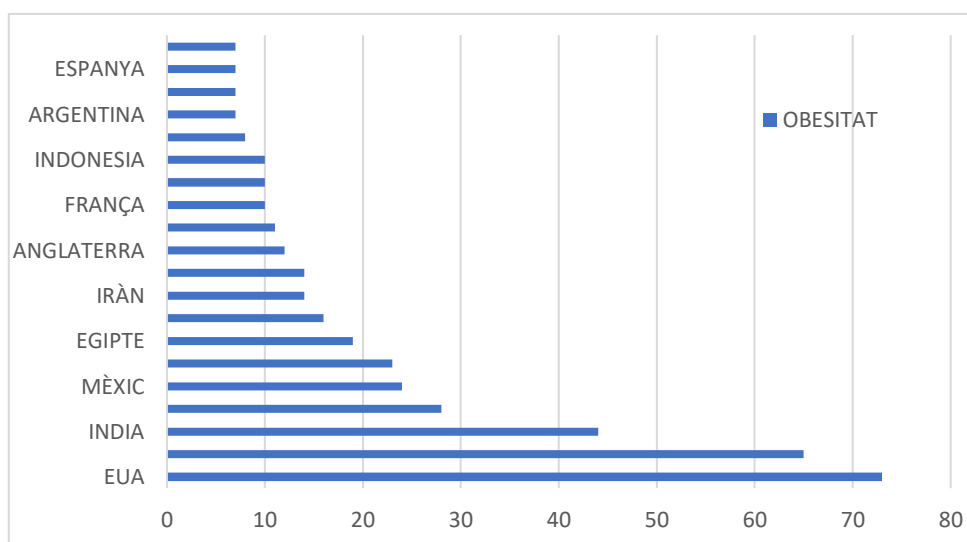


FIGURA 1. Països amb major prevalença d'obesitat i sobrepès en adults (Població Mundial 7.505.257.673 i Població Obesa Mundial 774.000.000)²².

La prevalença de la MFGNA és proporcional a l'augment de l'IMC²³. De fet, en individus molt obesos, sotmesos a procediments de reducció de pes i cirurgia bariàtrica, augmenta per sobre del 90%²³, sent la prevalença en la població general del 25%. Per tant, és essencial incloure la gestió del pes en qualsevol estratègia terapèutica contra la MFGNA.

Paral·lelament a l'augment de la prevalença de l'obesitat, la **DM2** també està augmentant a tot el món; sent un altre factor de risc important per la MFGNA i EHNA²³. La prevalença de DM2 en MFGNA i EHNA supera el 60%²⁴ i, a més a més, sembla accelerar el curs de la MFGNA i ser un predictor independent de fibrosi avançada, carcinoma hepatocel·lular i mortalitat²⁵. Per tant, la DM2 en pacients amb EHNA s'ha de considerar com un factor amb implicacions pronòstiques i com a possible diana terapèutica.

La síndrome d'apnea-hipoapnea obstructiva de la son (SAHOS) afecta el 35-45% de les persones obeses²⁶. Hi ha evidència que la SAHOS podria alterar la història natural de la MFGNA, el desenvolupament de EHNA i la seva progressió a fibrosi.

La hipòxia crònica intermitent (esdeveniments repetitius hipoxèmics e hipercàpnics) produeix un augment de les citocines proinflamàtores, disfuncions endotelials, estrès oxidatiu, desregulació del metabolisme i resistència a la insulina. A més, la hipòxia crònica intermitent pot provocar dany hepàtic, inflamació i fibrinogènesi¹³²⁶

Estudis epidemiològics i genètics demostren l'herència de la MFGNA i ajuden a entendre la seva variabilitat en fenotips i el seu risc de progressió. Principalment s'han relacionat amb la MFGNA tres **variants genètiques**: PNPLA3, TM6SF2 i els gens de la proteïna reguladora de la glucoquinasa²⁷. Certs polimorfismes (**Taula 2**) d'un únic nucleòtid (SNPs) situats en els gens PNPLA3 i TM6SF2 confereixen susceptibilitat al desenvolupament i una major progressió de la MFGNA a etapes més agressives²⁸.

Taula 2. Resum de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) relacionats amb la MFGNA²⁹

GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME DE LÍPIDS I GLUCOSA	
Apolipoproteïna C III	APOC3 rs2854116, rs2854117
Receptor del peroxisoma-proliferador-activat α Receptor del peroxisoma-proliferador-activat γ Coactivador 1- α	PPAR α , rs1800206, PPARY, rs1801282, PPARGC1A, rs2290602
Proteïna transportadora d'àcids grassos Adiponectina Receptor de leptina Resistina	FATP5, rs56225452 ADIPQ rs2241766, rs 1501299 LEPR rs62589000, rs6700986 RETN rs 3745367
GENS IMPLICATS EN LA PATOGÈNESI DE LA MFGNA	
TNF-α, lligant inductor de l'apoptosi relacionat amb el TNF-α Receptor de tipus Toll Enzim superòxid dismutasa 2 Citocrom P450 2E1 Factor 6 kruppel-like Factor de creixement transformatant β1 Angiotensina II, Receptor d'Angiotensina II	TNF- α rs1800629, rs361525, TRAIL rs6763816, rs 4491934 TLR4 rs 4986790 SOD2 rs4880 CYP2E1 rs2031920 KLP6 rs3750816 TGF- β 1 rs1800471 AGII rs699, AGTR1 rs3772622, rs 37772633

Hi ha un subtipus de MFGNA, anomenada **MFGNA magre**, que es produeix en individus no obesos i cobreix diferents etiologies: lipodistròfia congènita o adquirida (tractament del VIH), factors genètics (polimorfisme en PNPLA3), defectes del metabolisme congènit (deficiència d'àcid lisosòmic lipasa), trastorns endocrins (síndrome d'ovari poliquístic, hipotiroïdisme, deficiència hormonal del creixement), fàrmacs (amiodarona, metotrexat, tamoxifè), bypass jeju-ileal, dejú i rebre nutrició parenteral exclusiva^{30,31}.

La seva prevalença als Estats Units és del 7%, mentre que a les zones rurals d'Àsia representa el 25-30%. Els asiàtics i els caucàsics tenen prevalences similars de MFGNA. Encara que els asiàtics tenen una càrrega metabòlica inferior a la dels caucàsics, es tracta d'una població amb més presència del polimorfisme genètic PNPLA3 rs738409 GG²⁵.

Els pacients amb MFGNA magre, en comparació amb els pacients obesos, són més joves i tenen una menor prevalença de síndrome metabòlica (2-48% MFGNA magre vs. 22-64% MFGNA amb sobrepès o obesitat)³². No obstant això, un estudi recent mostra que comparteixen un perfil metabòlic similar, amb presència semblant de resistència a la insulina i dislipèmia.³³ Una altra dada a tenir en compte, és que els pacients amb MFGNA magra presenten un major risc de morbiditat i mortalitat i una menor supervivència que els pacients amb MFGNA i obesitat, en el temps d'espera per al trasplantament de fetge^{25,34}.

1.1 EPIDEMIOLOGIA DE LA MFGNA

Prevalença i Incidència Global

Al 2018, la **MFGNA** és la forma més comuna de malaltia hepàtica crònica al món ^{25,35}. Els resultats d'un metaanàlisi format per 86 estudis de 22 països, amb una mostra de 8 milions d'individus i un diagnòstic per la imatge, mostren una prevalença global del 25%, augmentant a tot el món¹(**Figura 2**).

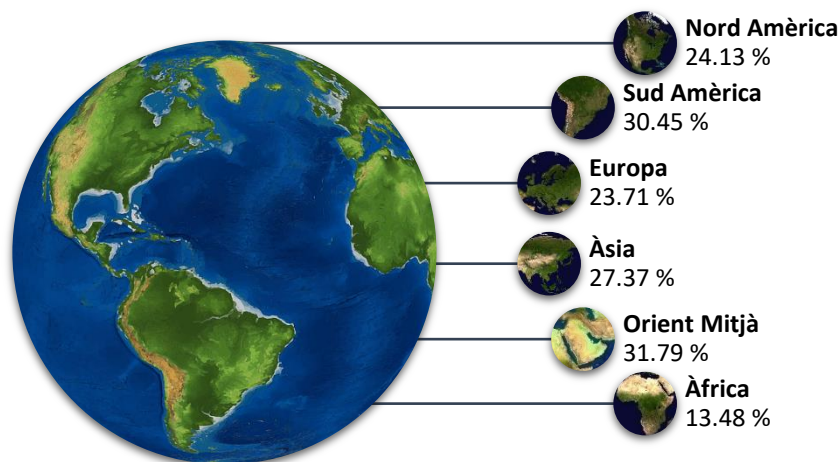


FIGURA 2. Prevalença global de la MFGNA²³

Hi ha poques dades precises sobre la incidència de la MFGNA en la població general. Aquest mateix metaanàlisi va estimar una incidència a Àsia de 52.34 per cada 1.000 persones-anys (95% CI, 28.31-96.77) i una taxa de 28 per cada 1.000 persones-anys (95% CI, 19.34-40.57) a Occident¹.

L'estàndard d'or pel diagnòstic de **EHNA** segueix sent la biòpsia hepàtica; però, això no és factible en estudis poblacionals generals i no hi ha una avaluació directa de la incidència o prevalença de la EHNA. No obstant, s'estima una prevalença global de EHNA d'un 3-5%, per mitjans indirectes²⁵.

Aquesta última dècada, s'ha intensificat el debat sobre si la MFGNA és una manifestació hepàtica de la síndrome metabòlica o si és a l'inrevés; La prevalença de la síndrome metabòlica ha anat augmentant juntament amb l'augment de la DM2, l'obesitat, les malalties cardiovasculars i els càncers associats a l'obesitat i malalties hepàtiques avançades (hepatocarcinoma)^{1,36,37}.

L'augment de la prevalença d'aquestes malalties està relacionat amb estils de vida no saludables, particularment dietes poc saludables. A més, quants més components de la síndrome metabòlica estiguin presents, més sembla augmentar el risc de progressió a EHNA^{38,39}.

Un nombre creixent de publicacions, han relacionat la resistència a la insulina, la MFGNA, la cirrosi criptogènica i l'hepatocarcinoma⁴⁰⁻⁴³. Tot i que la cirrosi, per si sola, ja és una condició preneoplàsica; tant l'obesitat com la DM2 són factors de risc

reconeguts per al carcinoma hepàtic, independentment de la presència o etiologia de la cirrosi⁴⁴⁻⁴⁷.

Les dades de prevalença de la MFGNA varien en funció de la població estudiada (edat, sexe, raça, comorbiditats), diferències geogràfiques i mètodes diagnòstics utilitzats. A més, la majoria de les dades provenen d'estudis realitzats amb tècniques no invasives (ecografia o ressonància magnètica).

Vegem les dades de les diferents regions, tot i que la prevalença global de la MFGNA és elevada:

Prevalença a Amèrica

La prevalença de la MFGNA a Amèrica del Nord és del 24%; mentre que a Amèrica del Sud s'estima en un 30.45%, basada en un diagnòstic d'ultrasons¹. Prevalença marcada per la prevalença de l'obesitat: la MFGNA a Perú és del 12.5% (on hi ha una població obesa del 15%) i al Brasil la prevalença de MFGNA és del 29%, on hi ha un 35% d'obesitat¹. A més de l'obesitat, també sembla haver una alta prevalença en la població hispana mexicana del polimorfisme genètic PNPLA3-I148 M que contribueix al desenvolupament de la MFGNA^{25,30}.

Prevalença a Europa

La prevalença estimada a Europa és del 20-30% de la MFGNA i aproximadament del 3% del EHNA¹. La prevalença varia segons els països, sent més alta als països del sud d'Europa²³.

Un estudi poblacional realitzat a Espanya va mostrar una prevalença de MFGNA del 33% en homes i del 20% en dones, avaluant pacients amb ecografia i exclouent aquells pacients que tenien malaltia hepàtica d'un altre origen o consum excessiu d'alcohol⁴⁸. Atès que la prevalença de DM2 en la població espanyola és del 13.8%⁴⁹, les taxes estimades de EHNA en aquesta població serien del 5.5-9.7%.

Prevalença a Àsia

Les dades a Àsia estan evolucionant. En les últimes dues dècades, la urbanització en molts països asiàtics ha empès les persones cap a estils de vida més sedentaris i una sobrenutrició, augurant l'epidèmia d'obesitat i, en conseqüència, l'augment de la MFGNA. La seva prevalença oscil·la entre el 15% i el 40%, amb un rang de EHNA entre el 2-3%.

La MFGNA magre és més comú als països asiàtics que als occidentals, creient que afecta al 8-19% de la població asiàtica, sobretot a zones rurals⁵⁰.

Els esdeveniments clínics i les taxes de fibrosi avançada són similars entre la MFGNA magre i l'associada a l'obesitat, tot i que els pacients amb MFGNA magre asiàtic tenen taxes més baixes d'EHNA, fibrosi hepàtica o anomalies metabòliques. Això sembla explicar-se perquè el genotip PNPLA3rs738409 és més comú en asiàtics amb MFGNA sense síndrome metabòlica que els caucàsics (així s'explica que malgrat la menor càrrega metabòlica dels asiàtics, totes dues poblacions tenen prevalences similars). Les manifestacions extrahepàtiques de la MFGNA a Àsia són similars a occident, incloses les complicacions dels sistemes cardiovascular, gastrointestinal i renal²³.

Prevalença Orient Mitjà i Turquia

Els estudis a l'Iran descriuen una prevalença del 4.1%, amb una prevalença d'EHNA del 2.9%; mentre que Israel descriu una prevalença de MFGNA del 30% i Aràbia Saudita del 16.6%^{25,50}.

Prevalença a l'Àfrica

La prevalença i incidència a l'Àfrica és bastant desconeguda, ja que no hi ha molts estudis epidemiològics. S'estima que la prevalença del 13.48%¹.

Prevalença a Austràlia i països del Pacífic

La prevalença de la MFGNA a Austràlia és del 20-30%, sent la malaltia hepàtica més comuna. Austràlia és un dels països amb més població amb sobrepès i obesitat del món. No obstant això, a Nova Zelanda la prevalença de MFGNA és només del 13%.²³

Edat, sexe i ètnia

Respecte a l'edat, a mesura que aquesta augmenta també augmenta la prevalença i la fibrosi associada a MFGNA²⁵ i el CH⁵¹.

Tot i que és controvertit, el sexe masculí s'ha considerat un factor de risc per a la MFGNA. La seva prevalença en homes és el doble que en les dones^{48,52-54}. No obstant això, hi ha estudis que suggereixen que les dones tenen un major risc de MFGNA^{21,23,52,55-58}.

Tot i que l'ètnia i la raça no es poden considerar un risc per a la MFGNA, la prevalença més alta s'observa en els hispans, seguida dels blancs no hispans; i la prevalença més baixa correspon als afroamericans^{23,25,50}. Dades més recents suggereixen que aquestes diferències ètniques responen a la variació genètica relacionada amb el gen PNPLA3⁵⁶.

Evolució clínica

Durant l'última dècada, s'ha avançat molt en el coneixement de la història natural de la MFGNA, tot i que encara falten estudis longitudinals que avaluin les variables clíniques, bioquímiques i patològiques que prediuen la progressió de la fibrosi⁵⁷.

La història natural dependrà del diagnòstic inicial⁵⁸. Així, els pacients amb esteatosi hepàtica presenten un curs favorable amb un percentatge baix de casos amb capacitat d'avançar cap a fases d'inflamació i fibrosi (EHNA). Fins a un 30-40% dels pacients amb EHNA tenen fibrosi avançada (definida com a F3-F4 en la biòpsia) en el moment del diagnòstic, i fins a un 20% acabarà progressant a la cirrosi al llarg de 10-15 anys⁵⁹.

En comparació amb altres etiologies, la cirrosi de la MFGNA es diagnostica a una edat més avançada, probablement degut a un ritme més lent de progressió a la fibrosi (una mitjana de 14 anys) i també es descompensa més tard a la vida¹⁷. Degut al seu curs silencios, la insuficiència hepàtica és sovint la primera manifestació clínica en el moment del diagnòstic de la cirrosi relacionada amb la MFGNA. En les primeres etapes de la cirrosi (Child-Pugh A), les taxes de mortalitat relacionades amb el fetge són més baixes en pacients amb MFGNA. Però un cop descompensada la cirrosi (Child-Pugh B i C), els pacients amb MFGNA tenen un deteriorament hepàtic ràpidament progressiu que

conduïx a una mortalitat, general i relacionada amb el fetge, similar a la cirrosi a causa d'altres etiologies⁴⁰.

La progressió de la MFGNA s'ha descrit en múltiples estudis i encara que molts conclouen que EHNA és una progressió de la MFGNA, les dades recents mostren que no sembla una relació lineal, ja que s'han descrit subtipus de MFGNA sense les característiques histològiques d'EHNA que poden desenvolupar malaltia hepàtica progressiva⁶⁰. A més, s'ha observat l'existència d'una regressió de la malaltia hepàtica en el seguiment durant un període llarg de temps⁶⁰. Els factors associats independentment a la regressió espontània d'EHNA i la fibrosi associada a EHNA no es coneixen del tot⁶¹. No obstant això, els factors associats a la síndrome metabòlica, especialment la presència de DM2, semblen promoure la progressió a EHNA³⁸. Hi ha dades actuals que mostren una estreta relació entre l'augment de la prevalença de DM2 i la progressió de l'EHNA. De fet, atesa la creixent epidèmia mundial d'obesitat i DM2, s'ha estimat un augment del 178% en morts de causa hepàtica relacionades amb l'EHNA al 2030⁶¹.

Les complicacions de la MFGNA/EHNA es descriuen a tot el món. La taxa de cirrosi és menor a Àsia en comparació amb els països occidentals. S'estima que entre un 10-15% dels pacients amb MFGNA als Estats Units i Europa tenen fibrosi avançada¹.

La NHANES III (Enquesta Nacional de Salut i Nutrició Transversal, que inclou més de 12.000 adults) va informar d'un augment de 2.5 vegades la prevalença de cirrosi relacionada amb EHNA i un augment de 2 vegades la prevalença de fibrosi avançada en MFGNA²³.

No obstant, cal senyalar que la primera causa de mort a la MFGNA és la cardiopatia coronària, seguida de neoplàsies extrahepàtiques i la associada al CH. Les comorbiditats dels pacients condicionen la seva supervivència, amb la resistència a la insulina i la síndrome metabòlica com a denominador comú²⁸.

L'EHNA té una mortalitat del 10-12% als 10-15 anys de diagnòstic⁶².

Mortalitat relacionada amb la malaltia hepàtica

Els pacients amb MFGNA, especialment aquells amb EHNA comprovada histològicament, tenen un major risc de mort per causes hepàtiques.

Un estudi de 289 pacients amb MFGNA, que van ser seguits durant 150 mesos, va mostrar que els que tenien EHNA tenien un risc 6 vegades més alt de mort per causes hepàtiques. A més, la mort relacionada amb la malaltia hepàtica va augmentar dues vegades en pacients amb DM2 o EHNA demostrada histològicament²³. Altres estudis associen independentment la resistència a la insulina i la síndrome metabòlica amb una major mortalitat cardiovascular i hepàtica^{1,30,38,39}.

Tot i que l'EHNA s'associa amb un augment de la mortalitat relacionada amb el fetge, és l'etapa de la fibrosi que augmenta el risc de mort en pacients amb MFGNA⁶³.

El grau de fibrosi es considera el factor predictiu més fort per correlacionar la progressió de MFGNA amb complicacions que amenacen la vida⁶⁴. El grau de fibrosi, especialment la fibrosi sinusoidal de la zona 3, la fibrosi periportal (grau 2), la fibrosi avançada (grau 3) o la cirrosi (grau 4) prediuen de forma independent la mortalitat relacionada amb el

fetge^{60,65}. Els pacients amb fibrosi F3 o F4 tenien set vegades més risc de CH en comparació amb les persones sense patologia hepàtica²⁴.

Tot i que la malaltia cardiovascular és la primera causa de mort en la MFGNA, un estudi multicèntric recent suggereix que això és cert en casos en què la cirrosi no existeix; ja que en aquell estudi van morir amb complicacions hepàtiques el 50% de pacients amb fibrosi F3, el 73% del que tenien cirrosi incipient i el 100% dels que tenien cirrosi avançada. Això suggereix que la mortalitat hepàtica dominarà en casos de MFGNA amb fibrosi avançada²³.

Malalties extrahepàtiques i mortalitat associada en MFGNA

La funció hepàtica fonamental és el metabolisme de la glucosa i els lípids, que en el cas de la MFGNA s'altera, de manera que hi ha un augment significatiu de les malalties cardiovasculars, malalties renals cròniques (MRC) i DM2.

La magnitud del desenvolupament d'aquestes manifestacions extrahepàtiques va paral·lela a la gravetat subjacent de la MFGNA; per tant, els pacients amb EHNA tindran més risc d'incidents cardiovasculars e incidents relacionats amb MRC o DM2.

La presència de la variant genètica del PNPLA3, l'acumulació de teixit adipós visceral, la dieta i la microbiota intestinal modifiquen encara més el risc de desenvolupar aquestes complicacions extrahepàtiques²⁶.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la causa de mort de la majoria de pacients amb MFGNA, especialment en casos de MFGNA magre, està relacionada amb **malalties cardiovasculars (MCV)**.

La MFGNA confereix un risc dos vegades major de patir malalties cardiovasculars^{66,67}, entre les causes principals tenim²⁸:

- Augment de la resistència global i hepàtica a la insulina, que determina la dislipèmia aterogènica, amb un augment de la cardiopatia coronària⁶⁸.
- Primers canvis en el metabolisme energètic del miocardi que indueixen canvis estructurals i funcionals del múscul cardíac (disfunció i hipertròfia del ventricle esquerre⁶⁹, que s'associa amb l'augment de la insuficiència cardíaca congestiva presentada per aquests pacients⁷⁰.
- Cinc vegades més risc de fibril·lació auricular independentment de la síndrome metabòlica i altres factors de risc, com s'ha demostrat en pacients amb DM2⁷¹.

A més, la presència de DM2, el LDL elevat, la sobreproducció de glucosa hepàtica, la presència de factors inflamatoris, la proteïna C reactiva, els factors de coagulació i la resistència a la insulina són característiques comuns en pacients amb MFGNA i aquests augmenten el risc de mort de MCV^{36,72}.

Tot i que la presència d'EHNA pot indicar un risc de resistència a la insulina, dades recents suggereixen que l'etapa de fibrosi és la que confereix risc de MCV. En aquest context, la fisiopatologia subjacent que accelera el desenvolupament de la fibrosi en MFGNA també pot promoure el desenvolupament de la MCV⁷³; però es necessiten més investigacions sobre aquesta vinculació²⁴.

Així, la síndrome metabòlica s'associa amb un augment de la mortalitat. És a dir, la probabilitat de supervivència disminueix a mesura que augmenta la presència de components de la síndrome metabòlica³⁸.

Carcinoma hepatocel·lular i Trasplantament de Fetge

A nivell mundial, el càncer de fetge és el cinquè càncer diagnosticat amb més freqüència i la tercera causa de mort relacionada amb el càncer.

La taxa d'incidència de CH en pacients amb MFGNA és de 0.44 per cada 1.000 persones-any²⁴. L'obesitat, la DM2 i la MFGNA en absència de cirrosi es reconeixen independentment com a factors de risc per al desenvolupament de CH^{64,74-77}.

Els CH en EHNA es presenten freqüentment com a tumors de major grandària i pitjor evolució que els associats a malalties hepàtiques d'altres etiologies²⁸. També es va demostrar que els pacients amb MFGNA eren més grans, tenien una supervivència menor, més MCV i més probabilitats de morir del seu tumor primari hepàtic; només el 5% dels pacients que van rebre un trasplantament de fetge tenien CH associat a MFGNA. Els pacients amb CH associats a MFGNA tenien un risc de mort 1.2 vegades superior a l'any que el CH d'altres etiologies³⁶. Així, els investigadors van concloure que el CH associat a MFGNA comporta una alta càrrega de mortalitat i és la segona causa de trasplantament de fetge més freqüent als Estats Units i la causa de trasplantament que més ha augmentat⁷⁸.

Tot i que la majoria dels pacients amb CH tenen cirrosi subjacent, hi ha evidència que una petita proporció de casos de MFGNA poden desenvolupar CH abans que sigui evident la fibrosi hepàtica⁷⁹. Així, els pacients amb EHNA i sense cirrosi poden desenvolupar CH. Calen més estudis per identificar els factors de risc per CH en pacients amb EHNA no cirròtics²⁴; però es recomana un cribratge als pacients, no cirròtics, amb fibrosi i obesitat (IMC>35 kg/m²) o DM2²⁸.

1.2. PATOGÈNESI DE LA MFGNA

Tot i que es creu que l'epidèmia de la MFGNA està impulsada majoritàriament pels estils de vida poc saludables, cal tenir en compte dos grups etiològics⁸⁰ (**Figura 4**):

Causes relacionades amb l'estil de vida poc saludable.

Basada en un balanç energètic positiu, amb una ingesta calòrica més elevada (especialment glucosa, fructosa i greixos saturats); i amb un comportament sedentari, que produeix un augment de la massa total i visceral del greix, DM2, disbiosi intestinal, resistència a la insulina i augment de la insuficiència hepàtica.

Causes independents amb l'estil de vida.

L'envelliment i la genètica també juguen un paper important. Nombrosos canvis genòmics i epigenòmics heretats i adquirits tenen un efecte acumulatiu sobre el fenotip d'envelliment⁸¹. A més, es creu que la disminució de la massa muscular esquelètica i el deteriorament funcional relacionat amb l'edat contribueixen a la patogènesi de moltes malalties cròniques no transmissibles (incloent la MFGNA)⁸².

El declivi hormonal relacionat amb l'edat, en ambdós sexes, es tradueix en una redistribució del teixit adipós del cos inferior al cos superior i de dipòsits subcutanis a dipòsits viscerals, augmentant l'emmagatzematge ectòpic de lípids en el fetge⁸³⁻⁸⁵.

Els estudis de seqüenciació d'exomes han proporcionat una forta evidència que la variabilitat genètica en PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, GCKR, HSD17B13 i altres gens s'associa amb la susceptibilitat i progressió de la MFGNA. Aquests gens estan fortament involucrats en la regulació de la mobilització de triglicèrids de les gotes lipídiques (PNPLA3), la secreció de VLDL (TM6SF2), la remodelació de la cadena d'acilfosfatidilinositol hepàtic (MBOAT7), la lipogènesi *de novo* (GCKR) o senyalització de lípids i estradiol bioactius (HSD17B13).

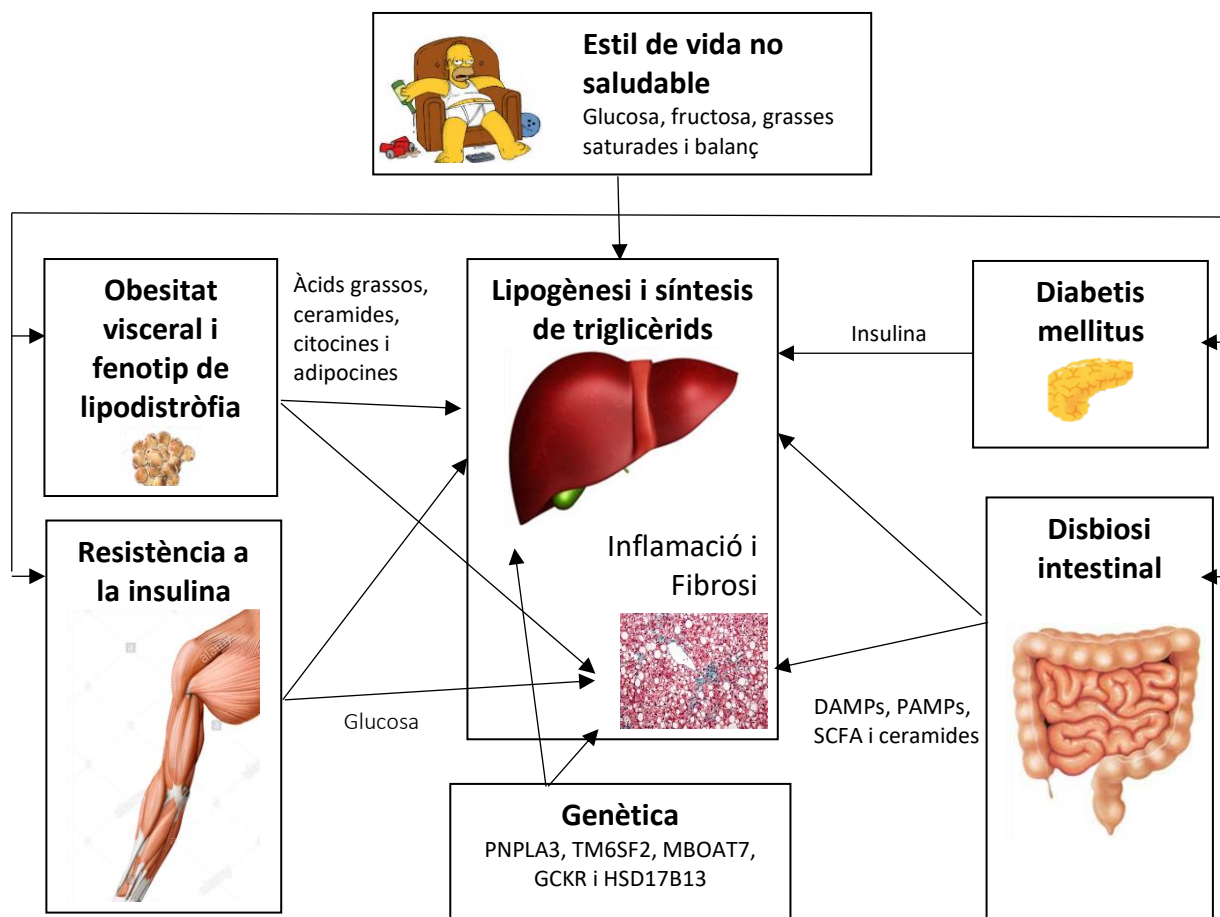


FIGURA 4. Causes de la MFGNA⁸⁰. Un estil de vida poc saludable amb un balanç positiu (dieta hipercalòrica i comportament sedentari. En aquestes condicions, la hiperinsulinèmia i la hiperglucèmia associades a DM2 agreugen la lipogènesi hepàtica de *novo*. La disbiosi intestinal, mitjançant l'augment de l'alliberament de DAMPs i PAMP, de lipopolisacàrids, l'alliberament desregulat d'àcids grassos de cadena curta o *short chain fatty acids* (SCFA) i ceramides que indueixen la inflamació i fibrosi hepàtica. A més, un fenotip similar a la lipodistròfia amb expansió del teixit adipós visceral dona com a resultat un patró desregulat de citocines, adipocines i un major alliberament d'àcids grassos i ceramides. Una predisposició genètica a l'acumulació hepàtica de lípids, inflamació i fibrosi també contribueix a la patogènesi de la MFGNA. DAMPs: patrons moleculars associats al dany. PAMP: patrons moleculars associats a patògens. GCKR: proteïna reguladora de la glucocinasa A. HSD17B13: 17 beta hidroxioesteroide deshidrogenasa tipus 13. BOAT7: proteïna 7 que conté el domini O-acetiltransferasa lligat a la membrana. PNPLA3: proteïna 3 que conté el domini fosfolipasa similar a la patatina. TM6SF2: Transmembrana 6 super family member 2.

La MFGNA està fortament associada a comorbiditats metabòliques, com l'obesitat, la DM2 i la dislipèmia. El fetge secreta proteïnes ("hepatocines"), metabòlits i ARN no codificants que actuen com a factors autocrins o paracrins, que influeixen en el metabolisme d'altres teixits. En la MFGNA, la secreció de diverses proteïnes hepàtiques s'altera i exerceix efectes pleiotròpics sobre el metabolisme lipídic i de glucosa, així com sobre l'acció i secreció d'insulina (**Figura 5**). Les hepatocines en el múscul esquelètic i el

teixit adipós afecten vies implicades en la inflamació, la lipogènesi/lipòlisi i l'oxidació d'àcids grassos, i poden promoure la resistència a la insulina. A més, algunes hepatocines influeixen en la secreció d'insulina a nivell pancreàtic, afectant independentment la captació de glucosa i el metabolisme en teixits perifèrics⁸⁶.

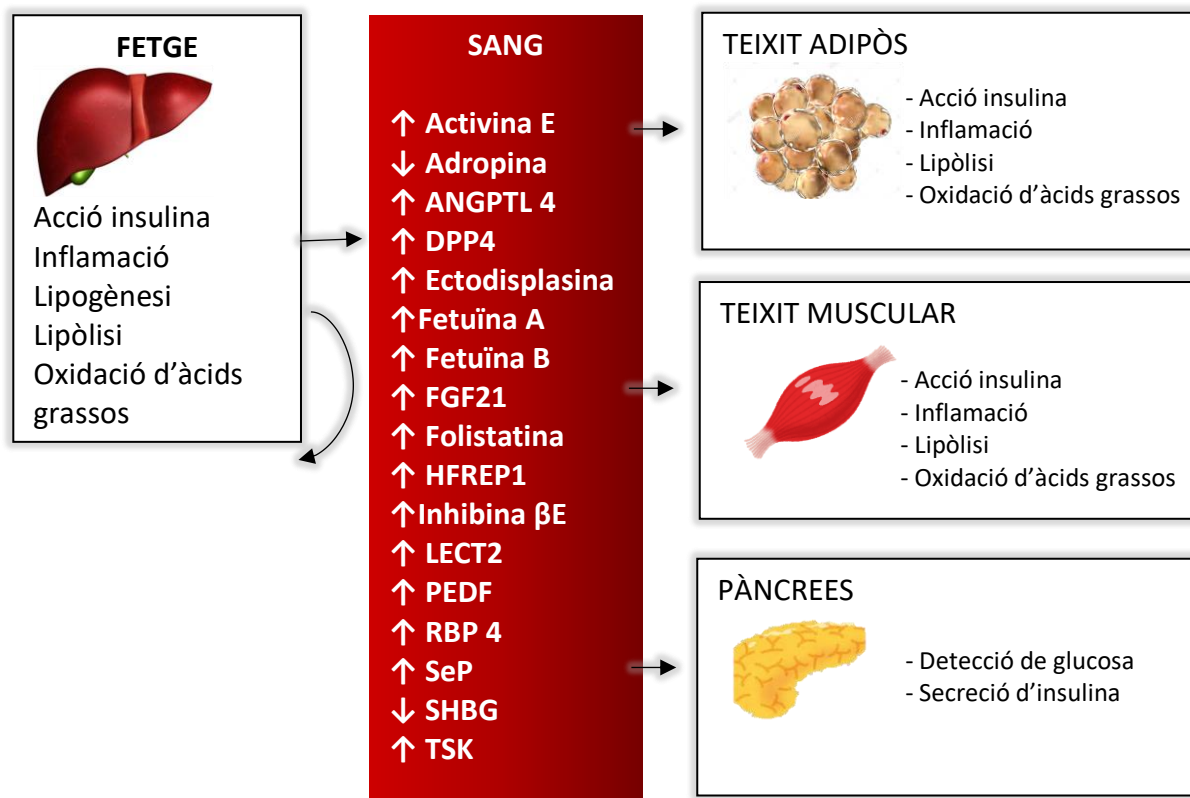


FIGURA 5. Processos metabòlics generals influenciats per hepatocines en la MFGNA⁸⁶.

Els lípids generats en el fetge i els seus metabòlits poden funcionar com a molècules de senyalització per regular l'acció de la insulina i altres processos metabòlics (**Figura 6**). Els àcids grassos (AG) són absorbits per hepatòcits i es poden convertir en acilcarnitina, mitjançant l'oxidació en les mitocondries. L'acilcarnitina es pot secretar del fetge i induir resistència a la insulina en teixits perifèrics.

Els cossos cetònics, produïts durant l'oxidació d'àcids grassos en les mitocondries, també poden ser secretats pels hepatòcits, alterant el metabolisme oxidatiu i afectant la sensibilitat a la insulina en els teixits perifèrics.

El fetge juga un paper important en el metabolisme de les lipoproteïnes: absorbeix les restes dels quilomicrons de la circulació i secreta lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), que transporta triglicèrids (TG) i altres lípids als teixits perifèrics.

El colesterol, sintetitzat a nivell hepàtic o absorbit de lipoproteïnes, es pot convertir en àcids biliars, que són secretats i afecten el flux biliar i el metabolisme perifèric, activant diferents receptors en l'absorció de lípids intestinals.

Finalment, el fetge secreta exosomes que transporten metabòlits (per exemple, ceramida o lisofosfatidocolina) que condueixen a l'activació de cèl·lules estrellades i a la fibrosi de forma paracrina.

Els canvis que es produeixen en aquestes vies en la MFGNA, es mostren en la següent figura amb fletxes vermelles (augmentar ↑ o disminuir ↓) o ? en cas de ser desconegut⁸⁶.

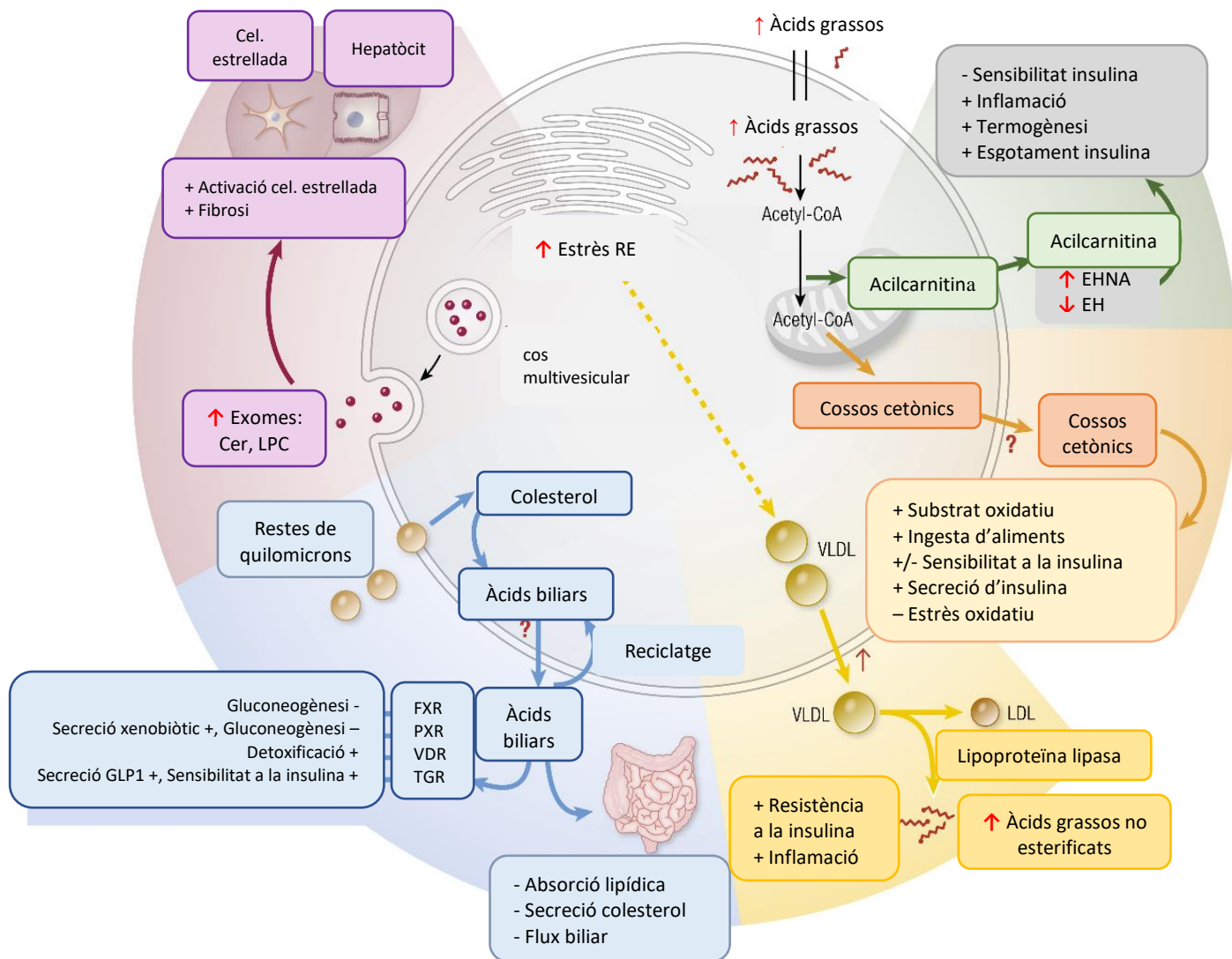


FIGURA 6. Secreció metabòlica hepàtica⁸⁶. Les diferents vies de secreció estan codificades amb diferents colors a l'esquema. Acetil-CoA: coenzim acetil A. Cer: ceramides. LPC: lipopolisacàrids. RE: reticle endoplasmàtic. FXR: receptor X farnesoide. PXR: receptor X de l'embaràs. VDR: receptor de calcitriol. TGR5: receptor de tipus membrana per a àcids biliars.

La patogènesi de la MFGNA no es coneix del tot. La hipòtesi més acceptada avui dia és la del "cops múltiples o multiple-hit" (Figura 7)⁸⁷, que considera l'associació de diferents factors nocius sobre subjectes genèticament predisposats a patir MFGNA. Aquests factors inclouen la resistència a la insulina, les hormones secretades pel teixit adipós, els factors nutricionals, la microbiota intestinal i els factors genètics i epigenètics²⁹.

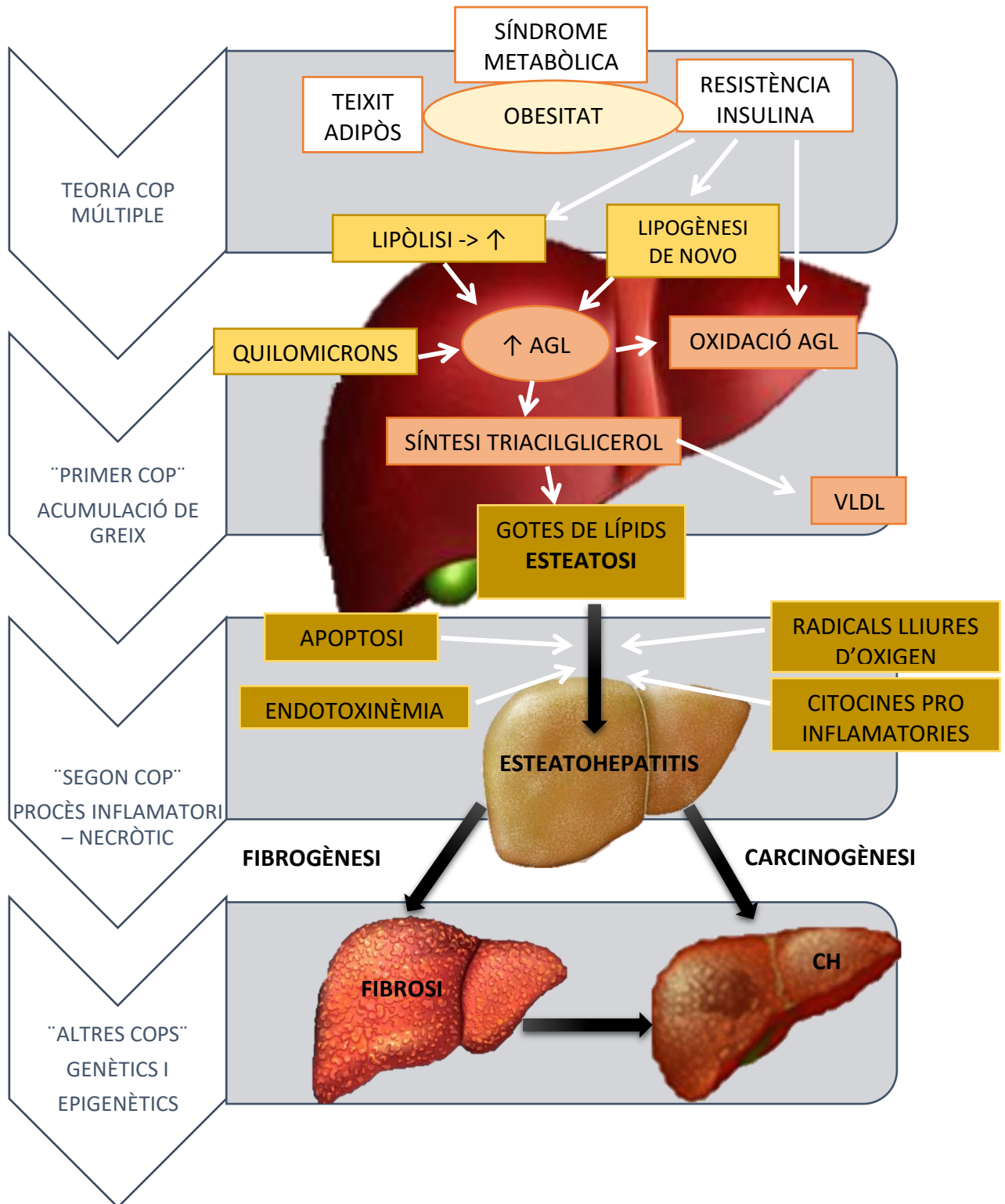


FIGURA 7. Patogènesi de la MFGNA²⁹. AGL: àcids grassos lliures.

El primer pas es produeix amb l'acumulació de greix en els hepatòcits com a gotes lipídiques en el citoplasma, produint una ES. Es tracta d'un estat reversible associat a l'emmagatzematge anormal de TG⁶².

L'esteatosi hepàtica pot representar una condició vulnerable per al segon cop, que causa inflamació hepàtica i necrosi, i pot progressar a la fibrosi i la cirrosi hepàtica. L'oxidació excessiva d'AG pot provocar estrès oxidatiu amb formació de radicals lliures i disfunció mitocondrial, donant lloc a un estat de lipotoxicitat⁸⁸.

La resposta immunitària a la lipotoxicitat promou processos inflamatoris, que poden conduir a la fibrogènesi i a la progressió de la MFGNA⁸⁷. A nivell hepàtic, les vies inflamàtores s'activen a través de cèl·lules Kupffer, neutròfils i cèl·lules assassines naturals (NK); així com la producció de citocines proinflamàtores (interleuquina (IL-6), TNF- α i IL-1). D'altra banda, la lipotoxicitat també activa una resposta inflamàtòria en el teixit adipós i la desregulació de l'adiponectina i la inducció de la leptina⁸⁹⁻⁹².

Aquest segon cop també inclou l'apoptosi i la endotoxèmia bacteriana derivada de l'intestí. La microbiota intestinal pot canviar el metabolisme lipídic a nivell sistèmic, ja que pot passar de l'oxidació a la síntesi *de novo*⁹³⁻⁹⁵. La MFGNA s'associa amb el sobrecreixement bacterià a l'intestí prim i una major permeabilitat, que causa endotoxèmia i activació de les cèl·lules Kupffer⁹⁶.

L'etapa necroinflamàtòria, típica de l'EHNA, produeix l'activació de cèl·lules estrellades hepàtiques (responsables de la fibrogènesi) i l'activació de cèl·lules progenitores (promotors de l'hepatocarcinogènesi)^{95,97,98}.

El tercer cop inclou factors genètics. Diversos estudis han demostrat l'agregació familiar i les variabilitats racials en la prevalença de la MFGNA²⁹.

Ara aprofundim en cadascun d'aquests punts:

Relació entre la MFGNA i la síndrome metabòlica

Lipogènesi hepàtica i major entrada d'àcids grassos lliures

La MFGNA es caracteritza per l'acumulació excessiva de TG en hepatòcits. Els TG es sintetitzen a partir d'àcids grassos (AG) i glicerol.

L'AG prové de la seva absorció a la circulació general o de la lipogènesi hepàtica *de novo* de glucosa. Els AG es catabolitzen principalment per β -oxidació a les mitocondries o peroxisomes, emmagatzemant l'excés en forma de TG com a gotes lipídiques en els hepatòcits. Els TG dels hepatòcits són hidrolitzats o secretats en la circulació com VLDL. La suspensió de qualsevol d'aquestes rutes afavoreix l'esteatosi hepàtica⁹⁹.

La β -oxidació d'AG està regulada principalment pel receptor α del proliferador de peroxisoma activat (PPAR α). Uns nivells baixos de PPAR α s'han associat amb MFGNA /EHNA⁹⁹.

La hiperglucèmia afavoreix la lipogènesi *de novo*, regulada per la insulina a través de la proteïna d'unió a elements reguladors de l'esterilització (SREBP-1c).

El 60% d'AG en el fetge s'origina en teixit adipós blanc¹⁰⁰; la disfunció dels adipòcits pot provocar el desbordament d'AG i l'aparició de MFGNA/EHNA. Els pacients amb lipodistròfia sovint presenten MFGNA/EHNA, marcada resistència a la insulina i EHNA amb fibrosi avançada¹⁰¹; destacant la importància de l'eix adipós-hepàtic a l'aparició de MFGNA/EHNA.

La composició de la dieta influeix en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica¹⁰².

Un estudi recent realitzat en persones no diabètiques, amb obesitat, va mostrar que la sobrealimentació amb greixos saturats augmentava el contingut de TG intrahepàtics¹⁰³. Els greixos saturats també induïen resistència a la insulina i endotoxèmia, a la vegada que augmentaven significativament els nivells plasmàtics de ceramides, que també propicien a la resistència a la insulina. Aquestes dades suggereixen que el greix saturat té un paper en la lipogènesi hepàtica en subjectes no diabètics.

La fructosa dietètica també estimula la lipogènesi i l'acumulació de greix hepàtic¹⁰⁴. En un estudi d'intervenció, on es va instaurar una dieta baixa en carbohidrats i alta en proteïnes, en subjectes obesos i amb MFGNA, es va observar una reducció significativa del greix hepàtic i una millora dels factors de risc cardiometabòlics. Aquesta troballa es va associar amb una disminució de la lipogènesi hepàtica de *novo*, un augment de les concentracions de β -hidroxibutirat sèric i l'alteració de la microbiota.

Així, la lipogènesi hepàtica *de novo* i la interacció entre dieta i microbiota tenen un paper important en el desenvolupament de la MFGNA¹⁰⁵.

Mecanismes inflamatoris; principal determinant de la progressió de la MFGNA a EHNA

Els TG emmagatzemats com gotes lipídiques no son prou tòxics per als hepatòcits. Diversos estudis demostren l'absència de correlació entre el grau d'acumulació de TG i la gravetat de la MFGNA; a més, l'estatohepatitis s'atenua amb la progressió de la fibrosi¹⁰⁶. Per tant, és probable que els precursors o intermediaris del TG siguin perjudicials per als hepatòcits (per exemple, el palmitat, el diacilglicerol i la ceramida).

El palmitat augmenta l'estrès oxidatiu en el reticle endoplasmàtic, donant lloc a l'activació de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) i la lipoapoptosi.

El diacilglicerol activa la proteïna quinasa C i interromp la senyalització d'insulina.

La ceramida regula l'expressió de la SREBP-1 i afavoreix la producció de palmitat. A més, les cèl·lules riques en greixos són propenses a la peroxidació lipídica, que condueix a disfuncions mitocondrials i del reticle endoplasmàtic. L'augment del colesterol també provoca disfunció mitocondrial i l'activació de l'inflamasoma (Complexe multiproteic d'alt pes molecular que activa les caspases inflamàtores i les citocines de la família de la IL-1).

Així, la lipotoxicitat és una de les principals causes de lesió d'hepatòcits en EHNA¹⁰⁶.

Els hepatòcits danyats alliberen mediadors proinflamatoris, que a la vegada, activen la cel·lularitat immunitària i les cèl·lules Kupffer. Aquestes cèl·lules activades alliberen molècules bioactives que danyen encara més els hepatòcits o augmenten la seva sensibilitat als lipopolisacàrids derivats de microbiota o àcids biliars secundaris, augmentant la mort cel·lular i la inflamació^{107,108}.

En definitiva, l'acumulació de greix hepàtic estimula la producció de citocines inflamàtores⁷⁰. L'EHNA activa la patogènesi de la síndrome cardiometabòlica, mitjançant l'alliberament sistèmic de diversos mediadors d'estrès inflamatori, protrombòtic i oxidatiu^{109,110} (**Figura 8**).

Els receptors immunes tipus Toll (TLR) poden activar vies proinflamàtores. TLR2 i TLR4 indueixen la resistència a la insulina, fonamental en la patogènesi de la MFGNA, l'obesitat i la síndrome metabòlica¹¹⁴. El TLR4 s'activa mitjançant àcids grassos i endotoxèmia, que acaba activant la NF-κB i provocant un major alliberament de citocines inflamatòries (IL-6, IL-1β, TNF-α i MCP-1), que juguen un paper important en la fisiologia de la síndrome metabòlica¹¹⁵.

Lipotoxicitat en el desenvolupament de la MFGNA

La lipotoxicitat condueix a la MFGNA per dos mecanismes:

- a) L'augment de la concentració hepàtica de diacilglicerols (DAG), produeix un augment del greix saturat hepàtic. Les activitats dels complexos mitocondrials, de la cadena respiratòria, disminueixen en el teixit hepàtic dels pacients amb EHNA. La lipoapoptosi en hepatòcits és característica de l'EHNA.
- b) L'estrès oxidatiu produeix una sobreactivació de la senyalització de la cinasa c-Jun N-terminal / proteïna c-Jun (c-JNK/c-Jun), que indueix la mort cel·lular en l'EHNA¹¹⁶.

L'estrès oxidatiu metabòlic i la inflamació indueixen la progressió de l'EHNA, ja que la resistència a la insulina i la disminució de l'activitat de la fosfatidilinositol-3-cinasa associada al substrat receptor d'insulina 2 (IR-2), dirigeixen el flux d'AG a vies que augmenten els metabòlits, com DAG i ceramides¹¹⁷.

Paper de la resistència a la insulina en el desenvolupament de la MFGNA i la síndrome cardiometabòlica

La resistència a la insulina és el mecanisme fisiopatològic clau en el desenvolupament de la MFGNA (**Figura 9**). Els nivells d'alanina aminotransferasa (ALT), aspartat aminotransferasa (AST) i gamma-glutamil transferasa (GGT) són indicadors de salut hepatocel·lular i la funció hepàtica anormal s'associa amb l'aparició de DM2.

Molts estudis han demostrat que els nivells elevats d'aquests enzims hepàtics s'associen al desenvolupament de la resistència a la insulina i la síndrome metabòlica^{118,119}. Altres estudis han demostrat que els nivells hepàtics de DAG s'associen a la resistència a la insulina, jugant un paper clau en el desenvolupament de la MFGNA a través del deteriorament de la senyalització d'insulina¹²⁰⁻¹²². Altres estudis suggereixen que l'augment de ceramides a nivell hepàtic és el principal mediador de la resistència a la insulina hepàtica en el context de la MFGNA, sense definir clarament el mecanisme pel qual es produeix¹²⁰.

Per tant, l'acumulació d'AG en el fetge indueix una resistència a la insulina, la qual cosa contribueix a augmentar la producció endògena de glucosa; actuant com a estímul per augmentar encara més la resistència a la insulina a nivell general i produint arterioesclerosi accelerada^{123,124}.

La MFGNA està relacionada amb la resistència a la insulina i la producció de molts factors de risc cardiometabòlic; existint una relació bidireccional entre elles i és difícil establir la relació causa/conseqüència entre els factors de risc cardiometabòlic i la MFGNA.¹²⁵

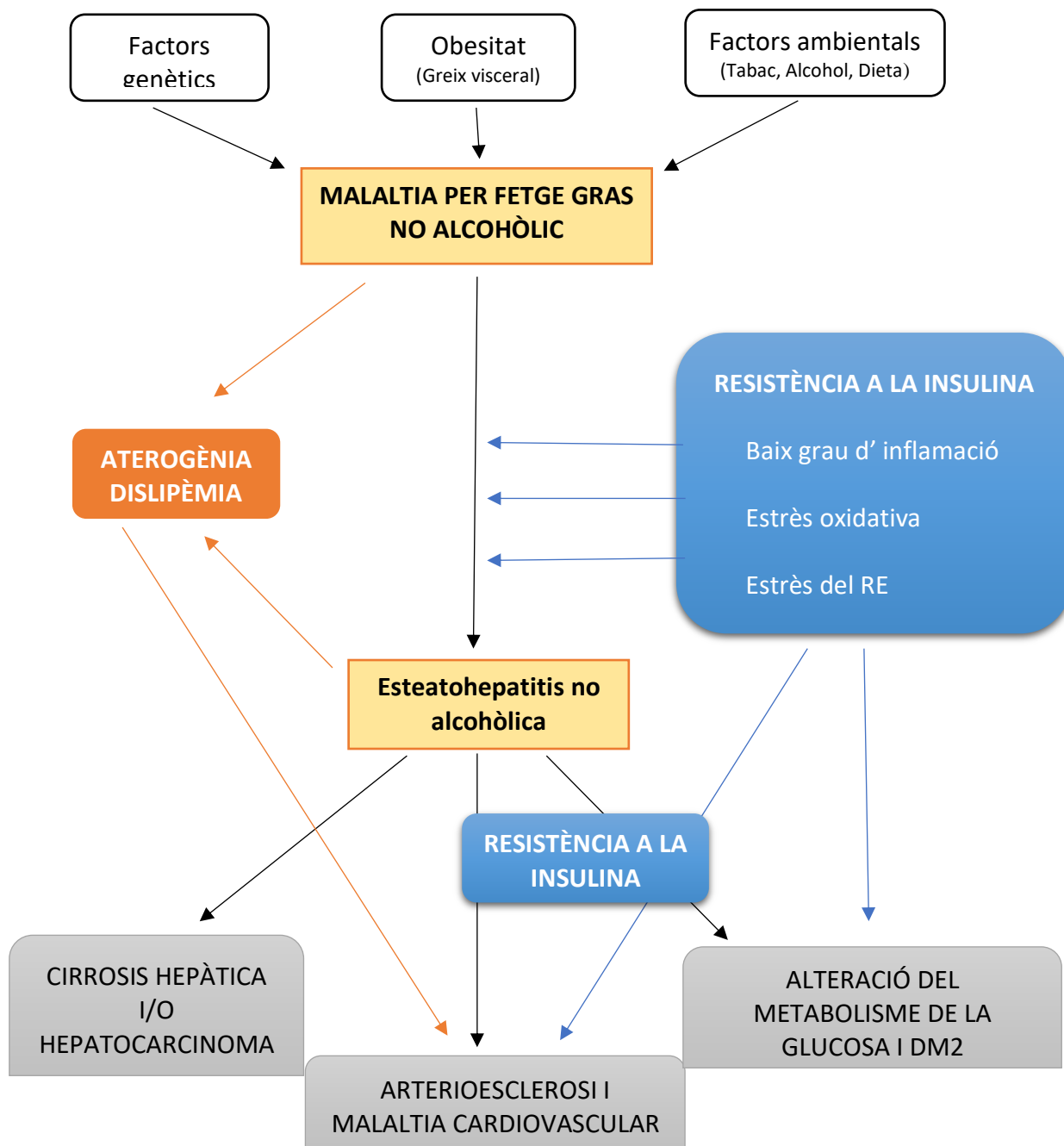


FIGURA 9. Factors relacionats amb la MFGNA/EHNA i la síndrome cardiometabòlica¹¹¹. RE: reticle endoplasmàtic

D'altra banda, la sarcopènia s'associa amb la MFGNA i la DM2. Els pacients sarcopènic tenen dos o tres vegades més risc de la MFGNA^{82,126}. La irisina (mioquina secretada pel múscul esquelètic) disminueix la resistència a la insulina, augmentant la despesa energètica corporal i modificant els receptors activats per proliferadors peroxisòmics alfa (PPAR α), que tenen un paper crucial en la β -oxidació d'àcids grassos en el fetge^{121-123,127-129}.

En resum, la MFGNA està involucrada en fluxos metabòlics i processos inflamatoris; cada vegada més postulant-se com a component de la síndrome cardiometabòlica basada en la resistència a la insulina hepàtica i perifèrica¹¹¹.

Alteracions en el metabolisme lipídic en la MFGNA/EHNA

Com s'ha comentat anteriorment, el fetge té un paper important en la síntesi, emmagatzematge i alliberament de lípids; a més de ser un lloc important d'aclariment d'insulina. L'AG en excés (per ingesta o procedent de teixit adipós visceral) i la seva eliminació hepàtica alterada condueix a una major acumulació de greix hepàtic i resistència a la insulina. Així, els AG i els seus metabòlits juguen un paper important en l'aparició i progressió de la lipotoxicitat hepàtica, resultant en EHNA^{130,131}.

Els hepatòcits contenen gotes lipídiques a la llum del reticle endoplasmàtic, on s'acoblen partícules VLDL. Cinèticament, els AG deterioren la supressió VLDL1 induïda per insulina i augmenten les partícules VLDL 1 riques en TG en pacients amb resistència a la insulina o MFGNA.

L'augment de VLDL1 redueix els precursors VLDL i disminueix la degradació de l'apolipoproteïna B (ApoB). Els AG també augmenten l'activitat de la glucosa-6 fosfat, augmentant així la glucosa basal produïda al fetge i augmentant la resistència a la insulina hepàtica. A més, els AG activen JNK, que augmenta la resistència a la insulina mitjançant la fosforilació de l'IRS-1 i l'IRS-2¹¹¹. D'altra banda, la SREBP - 2 s'altera en els hepatòcits de la MFGNA, sent un factor important en l'homeòstasi lipídica i relacionada amb la funció autofàgica¹¹¹.

En resum, l'augment d'AG i la formació de VLDL1 són mecanismes patològics clau en l'alteració del metabolisme lipídic dels subjectes amb MFGNA o en la resistència a la insulina¹³². El metabolisme aberrant de lípids i adipòcits disfuncionals recluten a nivell hepàtic, poblacions cel·lulars del sistema immunitari, inclosos els macròfags, que contribueixen al desenvolupament de la malaltia cardiovascular¹³³.

Estrès oxidatiu en la MFGNA i la síndrome cardiometabòlica

La MFGNA pot amplificar l'estrès oxidatiu i la inflamació sistèmica que condueix al desenvolupament de DM2 i malalties cardiovasculars. Molts estudis clínics troben marcadors d'estrès oxidatiu en pacients amb MFGNA, com l'homocisteïna, el pèptid derivat de NOX2 soluble (NOX2-dp) i la 8-iso-prostaglandina F2 α urinària (8-iso-PGF2 α)¹¹¹.

Altres factors en la relació entre la MFGNA i les malalties cardiometabòliques

Els pacients amb MFGNA tenen nivells baixos d'adiponectina, que s'associen a la resistència a la insulina, disfunció endotelial, aterosclerosi i esdeveniments cardiovasculars¹³⁴.

També s'associa amb el desenvolupament de la MFGNA/EHNA, l'estrès del reticle endoplasmàtic (definit com l'acumulació de proteïnes desplegadas o mal desplegadas), fet que s'ha relacionat amb el desenvolupament o progressió de l'arterioesclerosi. L'estrès del reticle endoplasmàtic, condueix a un augment del glucogen sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β) i una activació de caspases que promouen l'apoptosi de les cèl·lules

endotelials vasculars, conduint al desenvolupament accelerat d'esteatosi hepàtica i aterosclerosi¹³⁴.

A més, els factors relacionats amb la fibrinòlisi i l'hemostàsia (fibrinogen i inhibidor activador de plasminogen-1 (PAI-1)) estan fortament associats amb la MFGNA^{128,134}.

Així, l'acumulació de greix ectòpic hepàtic i la posterior alteració de vies metabòliques (la inflamació, el metabolisme lipídic, l'homeòstasi de glucosa i l'oxidació), provoquen disfunció biològica en òrgans i teixits vitals relacionats amb la síndrome cardiometabòlica^{133,135}.

Paper de la microbiota intestinal en la MFGNA i la síndrome cardiometabòlica

La microbiota intestinal esta formada principalment per bacteries, virus i fongs; amb diverses funcions, com la nutrició de l'hoste, la mineralització òssia, la regulació del sistema immunitari, el metabolisme xenobiòtic, la proliferació de cèl·lules intestinals i la protecció contra patògens¹³⁶.

La microbiota és específica d'un individu i altament resistent als canvis. No obstant això, es pot veure afectada per diversos factors, intrínsecs i extrínsecs, com la genètica del subjecte, els hàbits alimentaris, els antibiòtics i els canvis ambientals¹³⁷. La microbiota intestinal comprèn al voltant de 1.000 espècies diferents, però els *Firmicutes* i els *Bacteroides* representen més del 90% del total¹³⁸.

L'alteració en la composició -quantitativa o qualitativa- de la microbiota habitual, es coneix com a disbiosi intestinal^{139,140}. Generalment, aquest procés inclou un canvi desfavorable en la composició dels bacteris, amb una reducció dels autòctons (*Firmicutes*) i el creixement d'altres tàxons (*Bacteroidetes*, *Actinobacteries*)¹⁴¹.

El fetge i l'intestí estan estretament relacionats. Els canvis ambientals en l'intestí influeixen en el fetge a través de la circulació del portal.

La disbiosi intestinal té un paper en la patogènesi de la MFGNA i els trastorns cardiometabòlics¹³⁹. Els pacients amb MFGNA o EHNA tenen un creixement bacterià patològic en l'intestí prim, amb una proporció més baixa de bacteris de la família *Ruminococcaceae* i *Bacteroides*, mentre que tenen una major proporció de *Clostridium coccoides*; en comparació amb controls sans o amb ES¹³⁴.

Revisarem les diferents vies vinculants entre la microbiota, l'alteració metabòlica i la MFGNA:

1. Els SCFA, el principal producte després de la fermentació d'hidrats de carboni per la microbiota intestinal, són precursors de la lipogènesi i la glucogènesi hepàtica. L'augment d'energia extreta de la dieta, en forma de SCFA o hidrats de carboni, es transforma en esteatosi hepàtica^{136,142}.
2. La disminució del factor d'adipòcits induïts pel dejú (FIAF, proteïna produïda en cèl·lules L intestinals) millora l'activitat de la lipoproteïnlipasa (LPL) i la transcripció de la *carbohydrate-responsive element binding protein* (ChREBP) i SREBP-1, la qual cosa condueix a una major acumulació de greix hepàtic¹⁴³.

3. L'esgotament de colina, per un augment dels metabòlits tòxics (per exemple, la trimetilamina), provoca esteatosi i inflamació a nivell hepàtic¹⁴⁴.
4. La disbiosi intestinal augmenta la producció de lipopolisacàrids (LPS) i citocines proinflamàtores mediades per *Toll like receptor* (TLR4 i TLR9), promovent així la inflamació hepàtica i la fibrosi^{139,140 145,146}.
5. Els canvis en la composició de la microbiota intestinal produeixen radicals lliures d'etanol i oxigen, la qual cosa augmenta la permeabilitat intestinal i el transport de productes proinflamatoris al fetge, augmentant la inflamació hepàtica i la fibrosi¹⁴⁷.

Així, l'augment de l'acumulació de greix hepàtic i la inflamació promoguda per la disbiosi intestinal, afavoreix l'obesitat i la resistència a la insulina, sent ambos factors de risc per la síndrome cardiometabòlica i la MFGNA (**Figura 10**)¹¹¹.

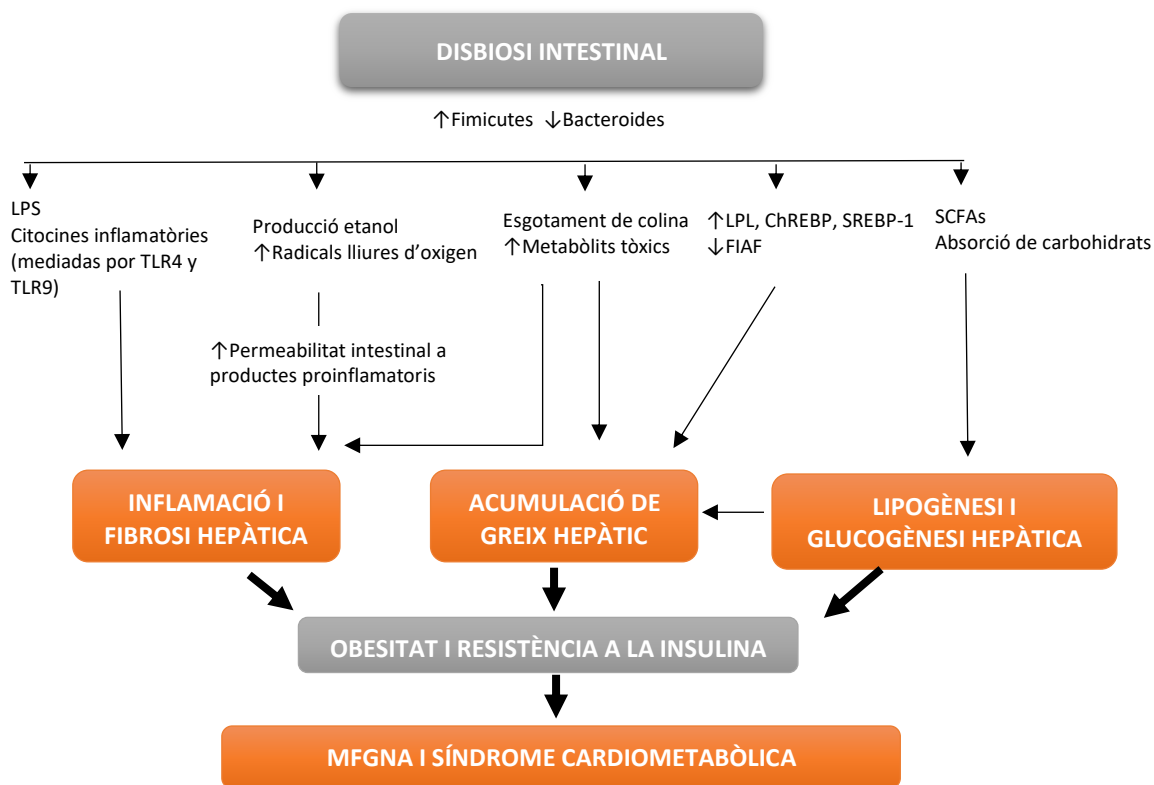


FIGURA 10. Enllaços de disbiosi intestinal en la MFGNA i la síndrome cardiometabòlica⁶⁹.

Mecanisme de fibrogènesi

Els hepatòcits danyats i les cèl·lules immunitàries activades també promouen l'activació de cèl·lules estrellades hepàtiques (HSC).

Durant la reparació/regeneració d'hepatòcits d'un procés normal, els hepatòcits sans ocupen esporàdicament els buits creats per la mort cel·lular. La mort crònica d'hepatòcits o alteració en la regeneració condueix a la substitució alternativa per fibres i matriu extracel·lular, causant importants cicatrius i remodelacions de l'arquitectura normal dels lòbuls hepàtics¹⁴⁸. L'activació de l'HSC és clau en la fibrogènesi hepàtica de qualsevol etiologia, però és bastant específica de l'EHNA que es troba principalment en l'espai perisinusoïdal¹⁰⁶.

1.3 DIAGNÒSTIC I ESTADIATGE DE LA MFGNA

Avaluació clínica de la MFGNA

La majoria dels subjectes amb MFGNA són clínicament asimptomàtics durant l'etapa pre-cirròtica. Poden queixar-se de fatiga i molèsties en l'hipocondri dret. En l'exploració física poden presentar hepatomegàlia i obesitat¹⁴⁹.

A mesura que la malaltia avança, poden ocórrer fenòmens de descompensació hepàtica (per exemple, icterícia, ascites, edema, sagnat gastrointestinal i encefalopatia)¹⁵⁰. Les característiques clíniques es desenvolupen amb la gravetat de la malaltia; per tant, no són crucials pel diagnòstic en fases primerenques de la MFGNA. Cal buscar altres signes o característiques clíniques, relacionades amb la síndrome metabòlica (com la hipertensió, DM2 i l'obesitat abdominal) per guiar el diagnòstic de la MFGNA.

La definició i confirmació diagnòstica de MFGNA és en última instància histològica. No obstant això, en la pràctica clínica s'utilitzen criteris clínics no invasius per simplificar el diagnòstic i el tractament de pacients amb MFGNA¹⁸.

Pel diagnòstic de MFGNA és necessari evidenciar l'existència d'esteatosi hepàtica. Gairebé dos terços de les persones amb obesitat i DM2, i la meitat dels pacients amb hiperlipidèmia i hipertensió tenen esteatosi hepàtica en ecografia abdominal. La presència de característiques de la síndrome metabòlica s'ha associat amb MFGNA més greu, amb una major probabilitat d'EHNA i fibrosi hepàtica^{29,151}.

Sovint, en la pràctica clínica, se sospita la MFGNA quan un pacient amb característiques de síndrome metabòlica té un augment en els nivells d'aminotransferasa sèrica. Però gairebé el 80% dels pacients amb MFGNA no presenten alteracions dels enzims hepàtics²⁹. A més, els nivells d'aminotransferasa disminueixen a mesura que avança la MFGNA i apareix la fibrosi, la qual cosa fa que la bioquímica hepàtica es normalitza en estadis avançats de la malaltia¹⁵¹.

L'**ecografia** es recomana com a mètode de diagnòstic de primera línia per avaluar l'esteatosi^{152,153}, mentre que els biomarcadors de sèrum i els panells de biomarcadors són eines alternatives quan els mètodes d'imatge no estan disponibles en estudis de cribatge a gran escala^{88,151,154,155}.

La MFGNA pot desenvolupar-se en individus sense característiques de la síndrome metabòlica, que normalment tenen una base genètica en la patogènesi de l'esteatosi i la inflamació hepàtica. Actualment, es centra en el polimorfisme d'un sol nucleòtid en PNPLA3 I148M (o rs738409), que està present en aproximadament el 20% de la població. Aquest polimorfisme produeix un defecte en la hidròlisi dels TG i una secreció defectuosa de VLDL, que condueix a l'esteatosi i la inflamació hepàtica. En individus homozigots s'observa un augment de l'esteatosi hepàtica en comparació amb els no portadors d'aquesta variant¹⁵⁶.

Quan se sospita MFGNA, és important descartar causes alternatives d'acumulació de greix hepàtic o disfunció hepàtica. Això implica una història completa i un examen per descartar la ingesta d'alcohol, avaluar medicaments, antecedents familiars i risc d'exposició a etiologies víriques. S'ha de realitzar una exploració bioquímica hepàtica amb serologies d'hepatitis B i C, autoanticossos hepàtics, immunoglobulines, alfa-1-antitripsina, ferritina i concentracions de ceruloplasmina en pacients <50 anys¹⁵¹.

DIAGNÒSTIC HISTOLÒGIC

La prova “*gold standard*” pel diagnòstic de la MFGNA continua sent la **biòpsia hepàtica**, per diferenciar esteatosi simple i EHNA. No obstant això, cal tenir en compte que es tracta d'un mètode invasiu, sotmès a petites complicacions i a errors inter/intraobservador. La MFGNA requereix la presència de greix en >5% dels hepatòcits, havent descartat causes secundàries d'esteatosi. A l'EHNA, també hi ha d'haver danys hepatocitaris (balonització, cossos d'apoptosi, necrosi lítica) i inflamació lobulillar (típicament fibrosi sinusoidal de la zona 3).

Després del diagnòstic, es pot avaluar la gravetat de la MFGNA. Encara que alguns biomarcadors poden quantificar l'esteatosi hepàtica amb una precisió variable, la quantitat absoluta d'esteatosi no és important des del punt de vista pronòstic de la malaltia⁶⁶. De fet, en estadis avançats de la MFGNA (cirrosi), l'esteatosi desapareix. Aquest fet es creu que és la principal causa subjacent de la majoria dels casos de cirrosi criptogènica¹⁵⁷.

Posteriorment, cal quantificar l'activitat i la fibrosi a través dels sistemes de classificació histològica: **NASH-CRN** (nord-americà, més utilitzat en estudis terapèutics) i **SAF** (score europeu que avalua l'esteatosi, l'activitat inflamatòria i la fibrosi)¹⁸.

La quantificació del grau de fibrosi és la característica més important, ja que diversos estudis l'han relacionat amb la mortalitat per causa hepàtica i la mortalitat per qualsevol causa en pacients amb MFGNA, independentment de la presència i gravetat d'altres trets histològics^{65,66}.

Taula 3. NASH-CRN: Classificació Activitat MFGNA¹⁸

Esteatosi (%)	Inflamació lobulillar	Balonització
0: 5 <	0: No	0: No
1: 5 - 32	1: < 2 focus	1: Suau
2: 33 - 66	2: 2 – 4 focus	2: Abundant
3: > 66	3: > 4 focus	

Taula 4. Classificació CRN Fibrosis Stagin: Estudi del grau de fibrosi¹⁸

Estadi	Grau de fibrosi
0	Sense fibrosi
1a	Fibrosi perisinusoïdal lleu (zona 3)
1b	Fibrosi perisinusoïdal moderada (zona 3)
1c	Fibrosi/portal periportal exclusivament
2	Zona de fibrosi 3 + periportal/portal
3	Ponts de fibrosi
4	Cirrosi

DIAGNÒSTIC NO INVASIU DE MFGNA

Mètodes serològics

Fatty liver index (FLI): és el panell biomarcador més utilitzat. Inclou IMC, circumferència de cintura, GGT i TG¹⁵². La puntuació varia de 0 a 100. Els pacients amb FLI ≥ 60 tenen molta probabilitat de tenir MFGNA, mentre que els que tenen FLI < 30 estan exclosos d'aquest diagnòstic¹⁸. FLI distingeix malament l'esteatosi moderada-severa de l'esteatosi lleu¹⁵⁸.

Hepatic steatosis index (HSI): panell de biomarcadors, on es registren l'IMC, la diabetis i la relació ALT/AST. HSI < 30 descarta MFGNA i els valors > 36 diagnostiquen MFGNA. Com a inconvenients, la precisió disminueix en nens obesos i, com la FLI, no distingeix entre esteatosi moderada-severa i lleu¹⁵².

La limitació clau de la FLI i l'HSI és l'ús d'un estàndard de referència subòptim, tots dos diagnostiquen el fetge gras a través de l'ecografia; i això pot ser dependent de l'operador e insensible per la esteatosi lleu¹⁵⁷.

NAFLD liver fat score (NFS): Inclou la presència de síndrome metabòlica, DM2, insulina sèrica en dejú, AST i relació AST/ALT. Té bona precisió pel diagnòstic del fetge gras (AUROC 0.86–0.87), que es defineix com un contingut de greix hepàtic $\geq 5.56\%$ (utilitzant l'espectroscòpia de ressonància magnètica de protons com a estàndard de referència)¹⁵⁷. No obstant això, la inclusió del nivell d'insulina sèrica limita el seu ús clínic, ja que no es tracta d'una prova rutinària.

StatoTest: s'utilitza per a la detecció d'esteatosi. Utilitza 9 paràmetres bioquímics (alfa-2-macroglobulina, apolipoproteïna A1, haptoglobina, bilirubina, GGT, ALT, glucosa, TG i colesterol), IMC, gènere i edat. Presenta un AUROC de 0.8 per identificar $>5\%$ de contingut de greix hepàtic en pacients amb malaltia hepàtica crònica provada per biòpsia¹⁵⁷. No obstant això, no pot distingir entre els diferents graus d'esteatosi i té un cost elevat i una disponibilitat limitada¹⁵⁷. També es necessiten més estudis per validar el seu ús per diferenciar pacients amb MFGNA de pacients sans¹⁵².

Puntuació de cribratge NAFLD: és el model de puntuació més fàcil per identificar MFGNA amb els següents paràmetres: edat, glucosa, IMC, TG, ALT/AST i àcid úric¹⁵². En un estudi de 48.489 pacients, utilitzant l'estàndard d'ecografia, es van identificar valors de tall de 32 per als homes i 29 per a dones, amb un AUROC de 0.82 i 0.86 respectivament¹⁵⁹.

Un altre sistema de puntuació és el **NAFLD Ridge Score**, que inclou nivells d'ALT, HDL, TG, HbA1c, recompte de glòbuls blancs i la presència d'hipertensió. Aconsegueix un AUROC de 0.79-0.8 amb l'estàndard d'or subòptim de l'espectroscòpia de ressonància magnètica de protons¹⁵⁹. No permet avaluar canvis en el greix hepàtic al llarg del temps i està limitat en el camp de la recerca¹⁵⁷.

En resum, hi ha diferents panells de biomarcadors validats i capaços de determinar la presència d'esteatosi amb alta especificitat, encara que sense capacitat per determinar la gravetat i que es basen en estàndards d'or subòptims (ecografia i espectroscòpia de ressonància magnètica de protons), i pocs panells són validats per grups independents¹⁵². Entre ells, destacar el HSI i el FLI, validats independentment¹⁶⁰. Aquests panells de biomarcadors poden ser útils en el cribratge MFGNA en poblacions de risc, com DM2 o obesos^{28,161}.

Mètodes de processament d'imatges

Ecografia: és el mètode diagnòstic de primera línia per avaluar la esteatosi, mostrant un fetge hiperecogènic¹⁵². És una tècnica no invasiva, lliure de radiació, fàcilment disponible i barata. Una metaanàlisi recent va mostrar que, en comparació amb la histologia, tenia una sensibilitat combinada del 85% i una especificitat del 94% per a l'esteatosi moderada a severa¹⁶². En canvi, no van detectar esteatosi per sota del 20%¹⁶³ i tenia un mal rendiment en la esteatosi de l'obesitat mòrbida¹⁵⁸. A més, l'avaluació es veu afectada en casos de fibrosi severa, on s'incrementa l'ecogenicitat hepàtica¹⁶⁴, i en la variabilitat interobservador.

Per superar aquestes limitacions, s'han desenvolupat tècniques d'ecografia més avançades. El **paràmetre d'atenuació controlada (CAP)** utilitza ultrasons amb el-lastografia controlada per vibracions per mesurar el grau d'atenuació de l'ecografia per greix hepàtic¹⁵¹. Els resultats es mesuren en dB/m, en un rang de 100-400 dB/m. Hi ha dues sondes, M i XL, depenent de les diferents estructures corporals dels pacients¹⁵⁷. Així, el CAP pot detectar graus més lleus d'esteatosi en comparació amb l'ecografia convencional i continua tenint una bona correlació amb les biòpsies hepàtiques¹⁶⁵.

Per detectar la MFGNA en estadis incipients s'han utilitzat tècniques quantitatives com la **relació d'intensitat ecogràfica hepàtica/renal combinada amb ultrasò (US)** i la **taxa d'atenuació del eco hepàtic** per ultrasons, per avaluar l'esteatosi quantitativament¹⁶⁴. Ambdues mesures mostren un rendiment lleugerament millor que l'ecografia convencional per avaluar l'esteatosi hepàtica amb un 95% de sensibilitat, un 100% d'especificitat, però un VPN que segueix sent baix (un 72% per US amb relació hepàtica/renal i un 67% per a la taxa d'atenuació hepàtica per US)^{164,166}.

Tomografia axial computeritzada (TAC): De la mateixa manera que l'ecografia, la TAC està àmpliament disponible, és fàcil de realitzar i precisa per detectar esteatosi

moderada-severa. Però tampoc és fiable per detectar nivells baixos d'esteatosi hepàtica. A més, presenta radiació ionitzant i això fa que no sigui adequat per al seguiment longitudinal de pacients amb MFGNA¹⁵¹.

Ressonància magnètica (RM): La ressonància magnètica (imatge i espectroscòpia) té una alta capacitat diagnòstica i permet quantificar amb precisió el greix intrahepàtic, fins i tot en fases lleus d'esteatosi hepàtica.

S'han desenvolupat diferents mètodes amb una precisió superior a la ressonància magnètica convencional, que determina l'esteatosi mitjançant l'estimació del percentatge de greix hepàtic: fracció de protons visibles per ressonància magnètica lligada al greix en relació amb tots els protons visibles de ressonància magnètica hepàtica¹⁶⁷. Aquesta tecnologia és més precisa que la CAP per detectar tots els graus d'esteatosi en pacients amb MFGNA (AUROC 0.99)¹⁶⁸. No obstant això, l'**espectrometria de ressonància magnètica (RMS)** sol prendre mostres d'una porció hepàtica i la **RM-PDF** té una menor precisió diagnòstica de l'esteatosi si hi ha fibrosi o esteatosi moderada/severa¹⁶⁷. Són molt útils per a estudis terapèutics i assajos²⁸.

En resum, es recomana l'ús de l'ecografia com a mètode diagnòstic de primera línia per avaluar l'esteatosi, mentre que els biomarcadors de sèrum i els panells de biomarcadors són eines alternatives quan les eines d'imatge no estan disponibles en estudis de cribratge a gran escala¹⁶⁷. Es necessiten estudis futurs per desenvolupar panells de biomarcadors no invasius per identificar MFGNA, ja que els existents es validen a través de poblacions relativament petites o amb criteris d'or subòptims.

La RM-PDF funciona excel·lentment per diagnosticar MFGNA i també és una bona eina per detectar amb precisió els canvis en el contingut de greix durant la progressió de la malaltia¹⁶⁹. Però és una tècnica costosa, que requereix molt de temps, i depenent del dispositiu, dificultant l'aplicació generalitzada.

Es necessiten eines més eficaces, factibles i fàcils de realitzar per diagnosticar MFGNA, especialment per a l'esteatosi incipient¹⁵².

DIAGNÒSTIC NO INVASIU DE EHNA

Actualment no hi ha cap mètode disponible, fiable i no invasiu per identificar la progressió de l'esteatosi a l'EHNA. El risc d'EHNA augmenta amb el nombre de factors de risc metabòlics, que es poden utilitzar per identificar individus d'alt risc¹⁵².

La patogènesi de la lesió hepàtica en EHNA és complexa i implica nombroses alteracions hormonals, cel·lulars i moleculars. Aquesta complexitat ha portat a la investigació de múltiples biomarcadors que reflecteixen les vies de malaltia subjacents, incloent l'apoptosi hepatocel·lular, la inflamació, l'estrès oxidatiu i la senyalització anormal de les adipocines¹⁵⁷.

Els nivells d'AST sèrica segueix sent el paràmetre sanguini més utilitzat per a l'avaluació de la malaltia hepàtica crònica, inclosa l'EHNA; no obstant això, els nivells d'ALT aïllats són poc predictius de EHNA i es correlacionen millor amb els nivells de TG hepàtics^{170,171}.

Biomarcadors

Citoqueratina 18 (CK18): és una proteïna de filament intermedi, que s'escindeix durant el període de mort cel·lular. Inclou CK18 M30 i CK18 M65. Una metaanàlisi de 25 estudis va concloure que M30 i M65 havien agrupat AUROC de 0.82 i 0.80, mentre que la sensibilitat i l'especificitat agrupades eren el 75% i el 77%, i el 71% i el 77%, respectivament,¹⁷². Altres estudis van trobar que la combinació de síndrome metabòlica, ALT i CK18 en una població amb obesitat mòrbida podria aconseguir un AUROC de 0.88; en comparació amb un AUROC de 0.74 si s'utilitza només CK18¹⁷³; de la mateixa manera, que la triple combinació d'adiponectina, CK18 i IL-6 va aconseguir un AUROC de 0.90, una especificitat del 85.7% i una sensibilitat del 84.5%¹⁷⁴. No obstant això, els resultats s'han de verificar en estudis futurs.

També hi ha estudis que han examinat la diferència de precisió de CK18 en les diferents etapes de fibrosi de la EHNA, semblant ser capaços de predir la gravetat¹⁷⁵.

Marcadors d'inflamació: CXCL10 és una citocina proinflamàtòria implicada en la diabetis i l'obesitat, que sembla diferenciar amb precisió entre EHNA i l'esteatosi simple. **TNF- α** i **IL-8**, marcadors inflamatoris comuns, combinats amb **piroglutamat** mostren una sensibilitat del 91% i una especificitat del 87%¹⁷⁶.

Adipocitocines i altres hormones: el Factor de creixement de fibroblast 21 (FGF21), secretat pel fetge, és un altre biomarcador potencial per a EHNA. Un estudi va informar que l'FGF21 tenia un AUROC de 0.62, i els dos punts de tall de 126 i 578 pg/mL tenien una sensibilitat i especificitat > 90% per diagnosticar EHNA, però el VPP i el VPN de FGF21 eren moderats (0.59-0.78) i baixos (0.49-0.60), respectivament¹⁷⁷. Per millorar VPP i VPN, FGF21 es va combinar amb CK18, que va millorar VPP al 82% i VPN al 74%¹⁵².

Es va demostrar que **l'adiponectina** va disminuir en pacients amb EHNA¹⁷⁸, amb un AUROC de 0.71 per diagnosticar EHNA¹⁷⁴. Però si es combina amb CK 18 M65 i IL-8 l'AUROC augmenta fins a 0.90¹⁷⁴. Altres adipocitocines, com la **leptina** i la **resistina**, poden ser marcadors potencials per diagnosticar EHNA, però es necessiten més estudis de validació¹⁵².

Ferro sèric: és una proteïna comuna associada als radicals d'oxigen, que contribueix a la necroinflamació i la fibrosi. El Ferro sèric va ser més alt en pacients amb EHNA que en aquells que tenien només esteatosi simple^{179,180}.

Panells de biomarcadors

Degut a la modesta precisió dels marcadors de forma individual pel diagnòstic d' EHNA s'han estudiat combinacions de marcadors per augmentar la seva utilitat diagnòstica¹⁵⁷.

"NASH Test": Combina 13 paràmetres per classificar els pacients en EHNA, EHNA límit i no EHNA. Un estudi amb 257 va aconseguir un AUROC de 0.79 per a EHNA, 0.69 per al límit EHNA i 0.77-0.83 per a no EHNA ¹⁸¹.

"NASH ClinLipMet score": combina AST, insulina en dejú i el genotip PNPLA3 en rs738409, a més de factors basats en la síndrome metabòlica, aconseguint un AUROC

de 0.87 i una sensibilitat del 75%. Però es limita a la investigació a causa de l'alt cost de determinar PNPLA3 i la insulina en dejú¹⁵².

Hi ha altres panells de biomarcadors, limitats per petites mostres d'estudi i mancats de validació d'un grup independent¹⁵².

Mètodes d'imatge per a EHNA

És difícil utilitzar tècniques d'imatge rutinària per distingir entre l'EHNA i l'esteatosi simple. La presència d'inflamació associada a l'esteatosi identifica aquells pacients amb MFGNA amb més risc de fibrosi i progressió de la malaltia. La presència de fibrosi és un signe indirecte d'inflamació.

Amb les tècniques habituals d'imatge (ecografia, TAC, RM, elastografia) l'esteatosi simple no es pot distingir de l'esteatohepatitis²⁸. Hi ha algunes tècniques d'imatge com l'ecografia amb contrastos especials, la ressonància magnètica de la imatge amb la tècnica DeMILI i la tomografia per emissió de positrons (PET), que en estudis preliminars suggereixen una possible utilitat per detectar la inflamació en pacients amb EHNA².

La RM multiparamètrica utilitza ressonància magnètica convencional combinada amb dues o més tècniques quantitatives (T1, T2 i PDFF) per intentar avaluar la inflamació hepàtica i la fibrosi, sent un mètode no invasiu. **LiverMultiScan (LIF)** és una tècnica de ressonància magnètica paramètrica que ha demostrat una alta precisió diagnòstica, en comparació amb la histologia, en la detecció de fibrosi i inflamació¹⁸². Aquesta tècnica no es veu afectada per l'adipositat central i pot diferenciar quines parts del fetge es veuen afectades. Les puntuacions de LIF >1.4 diagnosticarien EHNA amb una sensibilitat del 91% i especificitat del 52%¹⁸²; no obstant això, encara no han estat validades en grans cohorts ni s'ha analitzat el cost-benefici de la tècnica¹⁶⁷.

Nous biomarcadors

Molts biomarcadors potencials per a EHNA estan en estudi¹⁵².

MicroARN circulants: Perfils d'expressió de miARN específics s'associen amb la MFGNA. Un metaanàlisi va mostrar que miR-34a tenia un AUROC moderat de 0.78¹⁸³; que MiR-122 tenia un AUROC agrupat de 0.64-0.70 per diferenciar EHNA i esteatosi simple¹⁸⁴; en aquest sentit, Auguet et al.¹⁸² van demostrar una correlació positiva entre miR122 circulants, la inflamació lobulillar i la inflamació hepatocel·lular amb un AUROC de 0.76 per distingir EHNA i ES¹⁸⁵. S'ha obtingut un AUROC més alt de 0.83 amb la combinació de miR-122, -192 i -21 amb CK18-Asp396 per diagnosticar EHNA, mentre que el tall òptim va donar una sensibilitat i especificitat moderades¹⁸⁶.

Compostos orgànics volàtils a l'alè: estan estretament relacionats amb l'estrès oxidatiu, la inflamació i la malaltia hepàtica¹⁵². L'anàlisi de tres compostos exhalats (1-propanol, 3-metil-butanonitril i n-tridecano) sembla tenir un AUROC de 0.77, VPP del 81% i VPV del 82% per diferenciar EHNA i no EHNA¹⁸⁷.

Hi ha altres estudis centrats en marcadors lipídics, proteòmics, metabòlics i microbiomes, però que necessiten majors estudis per validar el seu ús¹⁵².

En resum, CK18 és un biomarcador popular per a EHNA, però la seva precisió varia en els estudis actuals, amb una precisió modesta. Els panells de biomarcadors tenen bons resultats en el diagnòstic de EHNA, però la majoria no es validen en grups separats. Els mètodes d'imatge i els biomarcadors genètics tenen una alta precisió per al diagnòstic d'EHNA, però per a la pràctica clínica són mètodes complexos i cars¹⁵². Per tant, es necessiten més estudis i, en l'actualitat, la biòpsia hepàtica continua sent el "*gold standard*" per al diagnòstic d'EHNA, la qual cosa comporta un problema per al maneig de pacients amb MFGNA (realitzar biòpsies en sèrie al llarg del temps és molt car i inacceptable per a la majoria de metges i pacients)¹⁵¹.

DIAGNÒSTIC NO INVASIU DE FIBROSI RELACIONADA AMB LA MFGNA

L'etapa de fibrosi augmenta la mortalitat global en individus amb MFGNA. Un estudi de Hagström H et al¹⁸⁸ va mostrar que la presència d'EHNA no augmenta el risc de mortalitat específica per fetge o mortalitat global, verificada per biòpsia. La fibrosi de les etapes 2, 3 i 4 va augmentar el risc de mortalitat global en 1.6, 3.04 i 6.53 en comparació amb la fibrosi de l'etapa 0 i 1¹⁸⁸. Per tant, és urgent identificar la fibrosi incipient mitjançant mètodes no invasius efectius.

A més, el diagnòstic i la posada en escena de la fibrosi hepàtica són essencials per detectar aquells pacients amb MFGNA, que es presenten amb fibrosi avançada o cirrosi i que han de ser gestionats per un servei de gastroenterologia o hepatologia, avaluant complicacions relacionades amb el fetge: ecografies semestrals +/- sèrum alfa-fetoproteïna per al control de CH i gastroendoscòpia, per identificar i tractar les varius esofàgiques¹⁵².

Biomarcadors patentats de fibrosi

Aquests biomarcadors són el pèptid N amino terminal del procolàgen III (PIIINP), la proteïna precursora C3 (PRO-C3), l'àcid hialurònic (AH) i els inhibidors tissulars de les metaloproteinases de la matriu tipus I (TIMP1).

El **PIIINP**, un marcador comú de fibrogènesi, funciona bé per diagnosticar fibrosi significativa (F2) amb un AUROC de 0.81¹⁸⁹. El **PRO-C3**, és un tipus de PIIINP, que ha demostrat un AUROC de 0.75-0.83 pel diagnòstic de fibrosi avançada (F3) i 0.76 per a la cirrosi (F4)^{190,191}.

El **AH** és un element essencial en la matriu extracel·lular i té un AUROC de 0.87, 0.89 i 0.92 per F2, F3 i cirrosi, respectivament¹⁹².

El **TIMP1**, reflecteix la remodelació de la matriu tissular i té un AUROC de 0.74 per diagnosticar F2¹⁸⁹.

Per millorar la precisió d'ells, es van combinar entre ells i/o associar altres variables:

"**ELF test**": combina AH, PIIINP, TIMP-1 i l'edat¹⁸⁹. Utilitzant un punt de tall de 9.8, aquesta prova identifica F3 amb un VPP del 72% i una VPN del 97%¹⁹³.

Un altre model, que inclou PRO-C3, edat, plaquetes i DM 2 aconseguix un AUROC de 0.86 a 0.87 i una VPN de 0.97 per identificar F3¹⁹⁰.

No obstant això, es necessiten estudis futurs per validar aquests biomarcadors en un grup independent superior¹⁵².

Biomarcadors no patentats de fibrosi o panells de biomarcadors

APRI: Índex de relació AST/plaquetes. Inicialment es va desenvolupar per avaluar la gravetat en l'hepatitis crònica C, però en un metaanàlisi recent va mostrar un AUROC de 0.7 per a la fibrosi significativa i de 0.75 per a la fibrosi avançada i la cirrosi en la MFGNA¹⁶⁶. Com desavantatge de baixa especificitat per a la fibrosi avançada²⁹.

FIB-4: inclou l'edat, recompte de plaquetes, ALT i AST per avaluar la gravetat de la fibrosi. Va ser dissenyat per avaluar la fibrosi en pacients amb VHC i VIH¹⁵², però té un AUROC de 0.75 per al diagnòstic de fibrosi significativa, un 0.8 per fibrosi avançada i un 0.85 per cirrosi, en pacients amb MFGNA¹⁶⁶.

Hi ha diferents llindars basats en l'edat per excloure la fibrosi avançada. El punt de tall per a F3 és > 2.67 , sent precís per diagnosticar-lo per sobre del llindar i descartar-ho per sota del llindar; però té un mal rendiment diagnòstic per el rang de puntuació intermig. A més, és inexacte per als menors de 35 anys²⁹. Per millorar l'especificitat i reduir la taxa de falsos positius, es va recomanar un punt de tall baix de 2 per a pacients d'edat avançada > 65 anys, amb una sensibilitat del 77% i una especificitat del 70%. A més, un estudi japonès recent de 1050 pacients amb MFGNA, confirmat per biòpsia, va recomanar punts de tall d'1.88 i 2.67 pels subjectes de 60-69 anys i de 1.95 i 2.67 per a ≥ 70 anys¹⁹⁴.

Les directrius clíniques recomanen el seu ús en pacients amb baix o alt risc de fibrosi avançada o cirrosi¹⁵².

Puntuació de fibrosi MFGNA (NFS): El panell de biomarcadors més comú, inclouent l'edat, IMC, hiperglucèmia, relació AST/ALT, recompte de plaquetes i l'albumina sèrica. Hi ha diferents llindars basats en l'edat per excloure la fibrosi avançada. Té un AUROC de 0.72 per a cirrosi significativa, 0.73 per a la fibrosi avançada i 0.83 per a la cirrosi. Per sota del punt de tall de ≤ 1.455 descarta l'afectació amb una sensibilitat del 75% i una especificitat del 93%, amb un VPP del 63% i un VPN del 96%. En canvi, per sobre de $\geq 0,676$ fa diagnòstics de fibrosi avançada amb una sensibilitat del 19% i una especificitat del 100%, amb VPP del 100% i una VPN del 89%²⁹.

D'aquesta manera, es pot utilitzar per identificar aquells pacients amb baix o alt risc de fibrosi avançada o cirrosi segons les directrius clíniques¹⁵². Mal rendiment pel rang de puntuació intermitja¹⁵¹.

Puntuació BARD: Avalua la gravetat de la fibrosi a través d'una puntuació fàcil que inclou IMC, AST, ALT i DM2. Té un AUROC de 0.64 per a fibrosi significativa, 0.73 per a fibrosi avançada i 0.70 per a cirrosi. Té una baixa especificitat per al diagnòstic de fibrosi i cirrosi significativa i està influenciada per la interpretació de l'IMC de diferents grups ètnics¹⁵².

Aquests índexs no són estrictament necessaris per al diagnòstic (tenen capacitat subòptima per diagnosticar l'esteatosi i/o la inflamació), però són útils per estimar el grau de fibrosi. Els índexs NFS i FIB-4 (amb punts de tall adequats a l'edat) són els més

validats en MFGNA. Ambdues són útils per descartar la presència de fibrosi avançada (alt valor predictiu negatiu), especialment en poblacions de menor prevalença, com la població general. Per tant, poden ser una solució per al cribratge de MFGNA en poblacions amb baix risc de fibrosi avançada, en entorns ambulatoris o hospitalaris¹⁸.

Nous biomarcadors

Metilació de l'ADN sèric : es va postular que el promotor de PPAR γ en plasma va tenir un bon rendiment per diagnosticar la fibrosi avançada, amb un AUROC de 0.91 i un valor de tall de 0.81, que va proporcionar un VPP del 91% i un VPN del 87%¹⁹⁵. D'aquesta manera, això seria superior al rendiment diagnòstic de NFS, però es necessita la validació de més grups independents¹⁵².

Mètodes de processament d'imatges

El-lastografia de transició (FibroScan): Basada en la reducció de l'elasticitat secundària a la deposició de teixit fibròtic en el parènquima hepàtic a mesura que avança la fibrosi. Proporciona una mesura de rigidesa hepàtica mitjançant ecografia d'eco polsat, amb un rang d'1.5 a 75 kPa. Un major valor d'ona de tall indica una major rigidesa hepàtica. La tècnica ha estat validada per diverses etiologies de la malaltia hepàtica crònica, incloent la MFGNA^{151,152}.

És molt útil per descartar fibrosi significativa i per confirmar la cirrosi, però és menys fiable per a etapes intermèdies. Inicialment, la sonda M va mostrar una aplicabilitat del 80%, presentant exploracions fallides especialment en pacients obesos. No obstant això, l'experiència de l'escàner i l'ús de la sonda XL en pacients obesos ha augmentat la seva aplicabilitat fins al 95-98%.

Perquè els resultats siguin fiables, es requereixen almenys 10 mesures de les quals > del 60% són vàlides amb baixa variabilitat, mesurades per un IQR <0.3¹⁸. Els punts de tall < 8-8.5 kPa serveixen per descartar la fibrosi avançada (F3), amb la sonda M. Però per confirmar la presència de fibrosi avançada, s'han proposat punts de tall elevats, > 18-20 kPa¹⁹⁶, amb alta especificitat i VPP¹⁵⁷.

Els nous models de FibroScan incorporen la capacitat de mesurar i quantificar l'esteatosi (utilitzant el Paràmetre d'Atenuació Controlada, **CAP**). Una metaanàlisi recent proposa un punt de tall de 250 dB/m² per identificar pacients amb esteatosi¹⁹⁷. Es pot utilitzar especialment en poblacions d'alta prevalença, com l'obesitat o els diabètics²⁸.

El-lastografia d'ones cisalles (SWE): Un nou mètode integrat d'ecografia convencional que proporciona un mapa de color en temps real en 2D basat en l'elasticitat hepàtica. Aquesta tècnica s'ha de realitzar en apnea i la regió del mapa de colors ha d'estar lliure de grans vasos i almenys 15 mm per sota de la càpsula. Sembla tenir un alt rendiment diagnòstic de fibrosi en pacients amb hepatitis crònica¹⁹⁸. En pacients amb MFGNA, hi ha un AUROC de 0.86 per a fibrosi significativa, un 0.89 per a la fibrosi avançada i un 0.88 per a la cirrosi. Les mesures no es veuen afectades per l'obesitat ni per la presència d'ascites¹⁵². Hi ha resultats que van demostrar que era millor que FibroScan, però la seva precisió es veu afectada per la variació interobservador i la ingesta d'aliments. Per tant, es recomana radiòlegs experimentats i un dejú d'almenys 2h¹⁹⁹.

ARFI: Es una altra tècnica d'imatge basada en ultrasons, que es basa en la velocitat de propagació d'ones per avaluar la rigidesa dels teixits. La tècnica utilitza una sonda d'ultrasons estàndard i no es basa en cap compressió externa, la qual cosa redueix la dependència de l'operador. L'ARFI és precís a l'hora d'avaluar la fibrosi de rang moderat-sever en pacients amb malaltia hepàtica crònica. Malauradament, en pacients amb MFGNA, l'esteatosi i la inflamació associada poden causar interferències i donar imprecisions²⁰⁰.

El-lastografia per ressonància magnètica (MRE): mètode no invasiu, que mesura la rigidesa hepàtica mitjançant l'ús de contrast de fases modificades. Pot avaluar tot el fetge amb una alta taxa d'èxit, demostrant superioritat sobre tècniques basades en ultrasons en l'avaluació de la fibrosi en la MFGNA. No està afectada per l'esteatosi i es pot aplicar en pacients amb obesitat, ascites o interposició intestinal entre el fetge i la paret abdominal anterior.

Disposa d'un AUROC de 0.87 per al diagnòstic de fibrosi significativa, 0.90 per a fibrosi avançada i 0.91 per a cirrosi²⁰¹. Hi ha dos models: 2D-MRE (freqüència d'ona tallada 60Hz) i 3D-MRE (freqüència de tall d'ona 40Hz); aquest últim amb millors resultats. No obstant això, és una tècnica d'alt cost i restringida a centres especialitzats, la qual cosa la fa en gran part inadequada per a l'ús generalitzat. Un altre inconvenient és que no es pot utilitzar en pacients amb sobrecàrrega hepàtica de ferro^{151,152}.

En definitiva, els panells de biomarcadors són barats, factibles, reproduïbles i disposen de bons VPN per al diagnòstic de la fibrosi; no obstant això, estan limitats pels seus baixos VPP. MRE mostra una excel·lent precisió a l'hora d'avaluar la gravetat de la fibrosi, però el seu ús es limita a alguns estudis farmacològics, a causa del seu elevat cost i falta de disponibilitat en la pràctica clínica. L'elastografia transitòria juntament amb els panells de biomarcadors s'utilitza àmpliament per avaluar la fibrosi, tot i que la seva eficàcia ha de ser avaluada per grups més independents.

Així, es recomana la combinació de biomarcadors de sèrum amb mètodes d'imatge per avaluar la fibrosi, que poden reduir les biòpsies hepàtiques diagnòstiques innecessàries¹⁵².

MÈTODES DISGNÒSTICS PER AVALUAR EL PROGRÉS I SEGUIMENT DE LA MFGNA AMB EL TRACTAMENT

Seguiment de la progressió de la malaltia

La MFGNA augmenta significativament el risc de morbiditat, mortalitat i trasplantament de malalties hepàtriques²³. La fibrosi, però no la esteatosi simple o l'EHNA, van augmentar el risc de mortalitat en pacients amb MFGNA¹⁵². El període de progressió de la fibrosi en casos d'esteatosi hepàtica dura una mitjana de 14.3 anys i 7.1 anys en els casos de EHNA²⁰². A més, la majoria dels pacients amb MFGNA estan asimptomàtics fins a una etapa cirròtica i la biòpsia repetida no és pràctica. Per tant, cal aplicar biomarcadors efectius no invasius per controlar la progressió de la malaltia¹⁵². Hi ha estudis que avaluen aquests biomarcadors, però es necessiten més estudis per

determinar quins biomarcadors no invasius són més efectius a l'hora d'avaluar la progressió de l'EHNA a la fibrosi¹⁵².

Seguiment de les respostes al tractament

L'Administració d'Aliments i Fàrmacs (FDA) recomana confirmar la millora histològica, quan es millora l'EHNA, sense empitjorar la fibrosi, o quan la fibrosi millora, sense empitjorar l'EHNA²⁰³. No obstant això, la necessitat d'una biòpsia repetida dificulta el desenvolupament de fàrmacs; per tant, cal investigar substituïts no invasius per reemplaçar la biòpsia. En general, la ressonància magnètica multiparamètrica s'ha utilitzat per avaluar el contingut de greix hepàtic en assajos clínics de EHNA²⁰⁴, però requereix més estudis per considerar-lo l'estàndard d'or¹⁵². Els panells biomarcadors poden ser les eines no invasives ideals per avaluar la resposta durant el procés de tractament, però han de ser exactes, disponibles, barats i senzills¹⁵².

En conclusió, en els últims anys s'han desenvolupat mètodes no invasius per avaluar MFGNA, a partir de biomarcadors de sèrum, imatges i fins i tot òmiques. L'ecografia i la ressonància magnètica multiparamètrica tenen una precisió relativament alta per diagnosticar MFGNA; l'ecografia té una gran acceptació clínica per la seva àmplia disponibilitat i baix cost.

Actualment, no hi ha biomarcadors no invasius validats per al diagnòstic d'EHNA.

L'el·lastografia transicional està aprovada per la FDA per avaluar la gravetat de la fibrosi i podria millorar el seu rendiment diagnòstic si es combina amb panells biomarcadors. També cal investigar la rendibilitat de les avaluacions no invasives per diagnosticar MFGNA, controlar la progressió de la malaltia i controlar les respostes al tractament¹⁵².

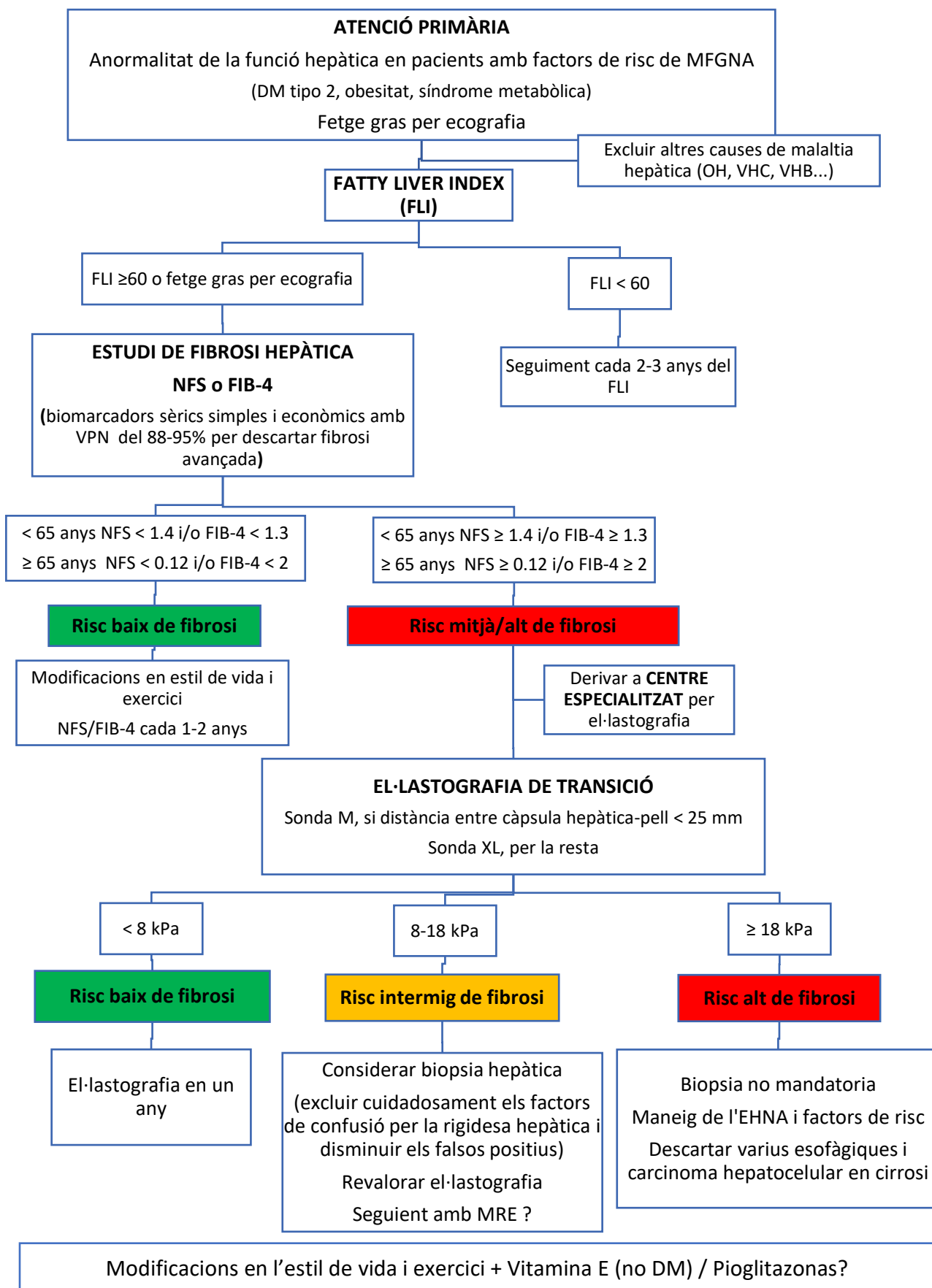


FIGURA 11. Algorisme per la detecció i avaluació de la MFGNA ^{152,205}

1.4. TRACTAMENT DE LA MFGNA

La fisiopatologia de la MFGNA/EHNA és complexa i el seu coneixement és incomplet; en contrast amb l'hepatitis vírica o alcohòlica, on hi ha un agent extern clarament identificable. La MFGNA és una malaltia intrínseca, amb una interacció molt complexa i multidireccional de processos metabòlics, inflamatoris i fibrogènics. Involucrant diversos mediadors i teixits, a més de l'hepàtic (adipós, muscular, intestinal i fins i tot el sistema cardiovascular). A nivell hepàtic, els hepatòcits (especialment els seus orgànuls intracel·lulars, com les mitocòndries) juguen un paper important, juntament amb les cèl·lules estrellades i altres cèl·lules immunitàries en la seva patogènesi²⁰⁶.

Atès que la fisiopatologia és complexa, que es dona en una població heterogènia i el diagnòstic/seguiment de la teràpia són difícils de realitzar, l'àrea de desenvolupament de fàrmacs és bastant difícil. Alguns medicaments, actualment homologats per a altres indicacions, han demostrat eficàcia i es poden utilitzar; però s'esperen resultats de nous tractaments dirigits a l'EHNA²⁰⁶.

Els pacients amb EHNA, i especialment els que presenten fibrosi, tenen un major risc de progressió de la malaltia hepàtica, alhora que augmenten el risc cardiovascular i de neoplàsies sòlides²⁰⁷. És en aquesta població on s'indicaria el tractament farmacològic.

La MFGNA confereix un risc dos vegades major de patir malalties cardiovasculars^{66,67}. Per això tots els pacients amb EHNA han de tenir un estudi de factors de risc cardiovascular²⁸ amb un perfil de lipoproteïnes (colesterol total, TG, cHDL, cLDL, ApoB), un perfil glucèmic (glucosa, insulina i índex HOMA) i determinació de la pressió arterial i un electrocardiograma. A nivell terapèutic seran essencials tres eines²⁸:

- a) Modificació de l'alimentació i l'estil de vida.
- b) Tractament de la hiperlipidèmia aterogènica, segons els criteris i recomanacions de la població general d'acord amb les directrius europees²⁰⁸. Les estatines semblen ser segures i tenen baixa toxicitat hepàtica.
- c) Tractament de la hipertensió arterial, seguint les recomanacions de la població general²⁰⁸.

1.4.1. Alimentació, activitat física i exercici en la gestió de l'EHNA

La primera línia consisteix en una intervenció sobre l'estil de vida promovent una dieta mediterrània, un abandonament de l'estil de vida sedentari i un augment de l'activitat física i un exercici aeròbic moderat amb l'objectiu d'induir una pèrdua de pes que garanteixi la millora de la malaltia hepàtica.

La pèrdua de pes està directament i proporcionalment relacionada amb la millora de les lesions histològiques en pacients amb MFGNA, independentment del tipus d'intervenció realitzada, ja sigui canvi d'estil de vida o cirurgia bariàtrica. La pèrdua de pes igual o superior al 10% indueix altes taxes de millora (>80%), no només de comorbiditats sinó de totes les lesions histològiques de la MFGNA²⁸. La pèrdua de pes entre un 7-10% en pacients amb pocs factors de risc també millora les alteracions metabòliques i redueix

significativament l'esteatosi, la inflamació i la balonització²⁰⁹. Però tot i que les directrius clíniques reconeixen la pèrdua de pes com una bona opció en la gestió de l'esteatosi, una revisió narrativa recent, va mostrar que la dificultat clau per a l'EHNA no era aconseguir la pèrdua de pes sinó mantenir-la²¹⁰. Els beneficis en la modificació de l'estil de vida amb la dieta i l'exercici a llarg termini en la progressió de l'EHNA no s'han reportat en cap publicació fins ara²¹¹.

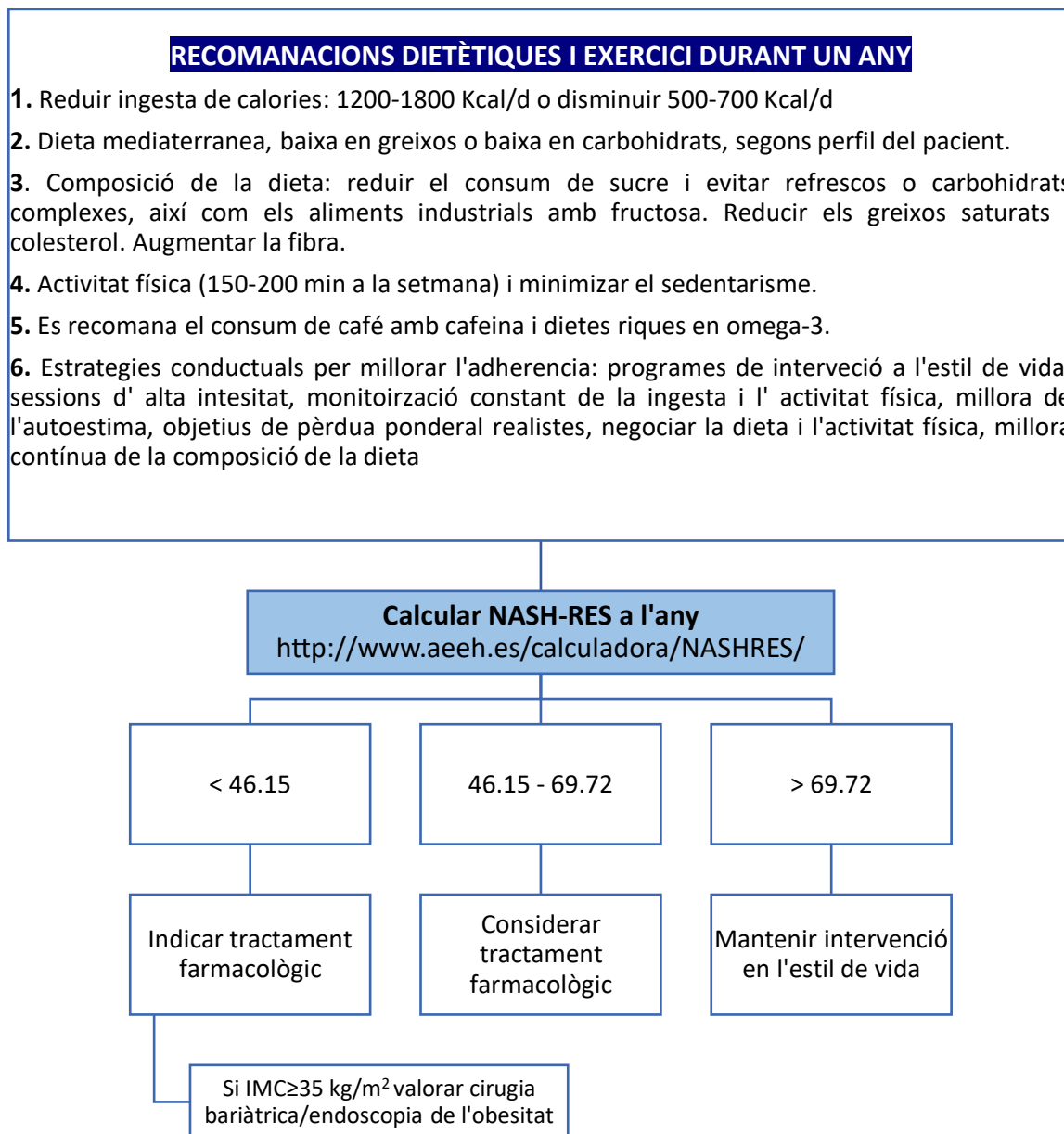


FIGURA 12. Algorisme de gestió d'EHNA mitjançant intervenció d'estil de vida i valoració de indicació de tractament farmacològic²⁸.

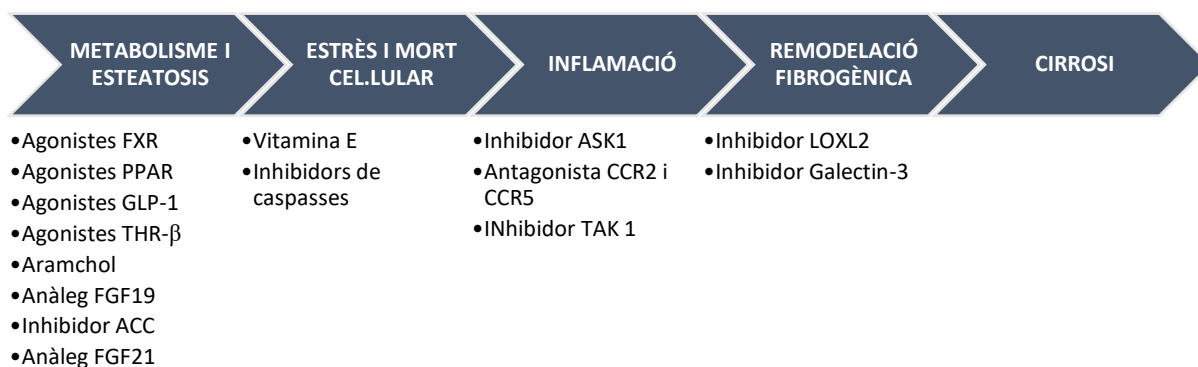
1.4.2. Teràpia farmacològica

El desenvolupament de teràpies contra la MFGNA és un ampli camp de recerca en l'actualitat. Diversos fàrmacs han estat provats sense indicació específica per a EHNA, però que tenen un benefici potencial en funció de la seva manera d'actuar²⁰⁶.

La teràpia amb fàrmacs, tal com s'indica en l'associació americana per a l'estudi de la malaltia hepàtica (AASLD), s'hauria de limitar als casos de EHNA²¹², comprovades amb biòpsies. Es poden fer excepcions per a assajos clínics en fase inicial que intentin detectar signes d'eficàcia d'un fàrmac basat en paràmetres no invasius, però en general, la teràpia farmacològica per MFGNA no s'ha d'iniciar sense una biòpsia hepàtica que confirmi EHNA i fibrosi. A mesura que avanci la recerca de biomarcadors no invasius, és probable que aquest principi canviï en un futur proper²⁰⁶.

El tractament farmacològic s'ha de limitar a pacients amb esteatohepatitis i fibrosi, o en aquells casos sotmesos a dieta i exercici físic sense resposta terapèutica després d'un any²¹³. No s'indica el tractament farmacològic en esteatosi simple²⁸.

A grans trets, els fàrmacs es poden classificar segons el seu mecanisme d'acció:



1.4.2.1. Metabolisme i esteatosi

a) AGONISTES FXR

En pacients amb EHNA, els nivells d'expressió hepàtica del receptor Farnesoid X (FXR: receptor d'àcid biliar nuclear expressat principalment a fetge i mucosa de l'intestí prim²¹⁴) es regulen negativament i es correlacionen inversament amb la gravetat de la malaltia²¹⁵. Així, els agonistes de FXR són fàrmacs raonables per al tractament de EHNA²¹⁴.

Aquests fàrmacs regulen el metabolisme lipídic i glucèmic, disminuint la síntesi de TG, la formació de VLDL, la síntesi d'àcids biliars i la gluconeogènesi hepàtica²⁰⁷. A més a més, exerceixen una acció antiinflamatòria hepàtica: disminueix NFκB²¹⁶ i redueix l'expressió de citocines proinflamatòries als macròfags, reduint la resposta inflamatòria de cèl·lules immunes²¹⁷.

L'àcid obeticolílic (OCA). Els resultats de l'estudi FLINT²¹⁸ van ser força positius, ja que tots els aspectes valorats en la puntuació d'activitat MFGNA (balonització hepatocel·lular, inflamació lobulillar i esteatosi), així com la fibrosi, van millorar en el grup que prenia OCA enfront el placebo. Malgrat això, es va evidenciar prurit i augment del colesterol total i del cLDL en els pacients tractats amb OCA. Aquestes troballes necessitaran una avaluació addicional durant els assaigs en fase III, que estan actualment en curs, en pacients amb EHNA-fibrosi (REGENERAT) i en pacients amb EHNA-cirrosi compensada (REVERSA).

A més de l'OCA, diversos agonistes de FXR, com **LJN452** i **GS9674**, estan sent investigats en assajos clínics, actualment ²¹⁴.

(b) AGONISTES DE PPAR

Els receptors activats per proliferadors peroxisòmics (PPAR) actuen com a factors de transcripció i regulen l'homeòstasi energètica, la resposta inflamatòria i el metabolisme lipídic i glucídic^{205,207}. Hi ha tres isotipus: PPAR α , PPAR δ i PPAR γ .

Elafibranor, amb el seu metabòlit actiu (**GFT1007**), és un agonista dual dels receptors PPAR α i PPAR δ amb major activitat PPAR α però sense activitat en PPAR γ ²¹⁹. És excretat principalment pel tracte biliar, sent reabsorbit gran part d'ell en la circulació enterohepàtica²²⁰.

Existeixen diferents estudis en la MFGNA. En l'assaig GOLDEN Study 2b²²¹, malgrat algunes limitacions metodològiques de l'estudi, es va demostrar que elafibranor de 120 mg/dia durant un any indueix la resolució EHNA sense empitjorar la fibrosi. Va ser ben tolerat tot i que es va observar un lleuger augment de les xifres de creatinina (reversibles després de la suspensió del fàrmac)²⁰⁷.

Actualment, l'elafibranor s'està provant en un assaig de fase III (RESOLVE-IT)²¹⁴.

Tiazolidinediones (Pioglitazona, per exemple) són agonistes de PPAR γ , que han demostrat ser eficaços en la millora de les manifestacions histològiques d'EHNA, sobretot en pacients amb DM2²¹⁴.

L'assaig de fase III (PIVENS) compara la pioglitazona, la vitamina E i el placebo per al tractament de pacients no diabètics amb EHNA. En comparació amb el placebo, la vitamina E compleix l'objectiu principal de millorar la puntuació de l'activitat de MFGNA en 2 o més punts, sense empitjorar la fibrosi, mentre que la pioglitazona no va assolir importància estadística. Donada la doble comparació amb la vitamina E i la pioglitazona, un valor de $p=0.025$ es va considerar significatiu en aquest estudi. Ni la vitamina E ni la pioglitazona van millorar la fibrosi sobre placebo²²².

No obstant això, els beneficis de la pioglitazona s'han de valorar en front els seus efectes secundaris, com la retenció de líquids, l'augment de pes, el càncer de bufeta i la fractura osteoporòtica²¹⁴. Un altre aspecte a tenir en compte, es que els efectes beneficiosos de la pioglitazona no es mantenen en el temps, ja que amb la suspensió del tractament apareix un augment dels valors sèrics de ALT i reparació de l'EHNA²²³.

La versió més recent de les directrius de l'AASLD suggereix que, atès que la pioglitazona sembla millorar la histologia hepàtica per a pacients amb i sense DM2, pot ser una opció viable per al tractament de l'EHNA, però només després que s'hagin revisat els riscos i beneficis per als pacients²²⁴. A més, abans d'iniciar el tractament d'un pacient diabètic, s'ha de considerar una biòpsia hepàtica per documentar l'EHNA²¹².

S'estan desenvolupant altres fàrmacs PPAR, com el **lanifibranor** (agonista PPAR α / γ) actualment en fase IIb, així com el **saroglitazar** (agonista dual PPAR) i el **seladelpar** (agonista PPAR)²⁰⁶.

c) AGONISTES GLP-1R

El pèptid semblant al glucagó tipus 1 (GLP-1) és una hormona intestinal amb un caràcter d'incertina que es secreta després de la ingesta d'aliments rics en sucres i greixos, produint una resposta pancreàtica, augmentant la síntesi d'insulina e inhibint la síntesi de glucagó²⁰⁷.

GLP-1 ha demostrat efectes sobre diferents objectius²⁰⁷: a) afavoreix el creixement, diferenciació i regeneració de la cèl·lula beta pancreàtica, alhora que inhibeix l'apoptosi. b) a l'estómac, redueix la secreció àcida i alenteix el seu buidatge. c) en el cervell, disminueix la gana i augmenta la neuroprotecció. d) disminueix la producció hepàtica de glucosa. e) millora la sensibilitat a la insulina perifèrica. f) mostra efectes cardioprotectors augmentant la despesa cardíaca.

Els anàlegs GLP-1 han aconseguit mostrar una reducció dels valors enzims hepàtics i l'estrès oxidatiu, millorant el patró histològic. Al seu torn, s'ha demostrat una acció cel·lular hepàtica directa, disminuint la lipogènesi i augmentant l'oxidació dels àcids grassos²²⁵.

Liraglutida és un anàleg GLP-1 de llarga durada, aprovat per al control glucèmic en pacients amb sobrepès i DM2. Els pèptids endògens GLP-1 es degraden en pocs minuts, mentre que la liraglutida es metabolitza molt més lentament.

L'estudi LEAN²²⁶, en fase II, es va demostrar que la injecció subcutània d'1.8 mg/24h millora l'EHNA, alhora que millora els factors de risc metabòlic, clau en la MFGNA, mostrant efectes secundaris mínims (principalment gastrointestinals)^{206,207,227}. S'espera que els assajos de fase III confirmin aquestes dades²²⁷.

Semaglutida, un altre agonista del receptor GLP-1, amb una única administració setmanal, es troba actualment en un assaig clínic de fase II²¹⁴.

(d) ARAMCHOL

Aramchol és un àcid mixt sintètic (àcid gras-àcid biliar), que inhibeix l'acció de l'enzim *stearoyl coenzyme A desaturasa 1* (SCD1), que s'encarrega de catalitzar la producció de greixos monoinsaturats a partir d'àcids grassos del fetge i altres teixits²²⁸.

En els subjectes obesos amb esteatohepatitis, s'ha detectat un augment de l'activitat enzim SCD1 en comparació amb les persones obesos amb fetge gras²⁰⁷.

Un assaig clínic de fase II²²⁹ va mostrar que el tractament amb aramchol va reduir significativament el contingut de lípids hepàtics en pacients amb esteatosi simple, en dosis altes i avaluat amb ressonància magnètica²⁰⁷. No obstant això, no es van observar millores en els enzims hepàtics, el metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina. S'està duent a terme un assaig multicèntric internacional de fase III (ARMOR) amb aramchol en pacients amb EHNA no cirròtica confirmada amb biòpsia²¹⁴.

(e) FACTOR DE CREIXEMENT ANALÒGIC 19

El factor de creixement 19 (FGF19) té accions sobre els àcids biliars a través del complex receptor FGF 4/ β -klotho i també exerceix efecte sobre el metabolisme lipídic i de la glucosa. No obstant això, a través de la via II-6/STAT3 té efectes cancerígens²³⁰. **NGM282** és un anàleg de la FGF19 dissenyat recentment, sense cap efecte sobre la via STAT3, i per tant el més probable és que no tingui cap efecte cancerigen. Aquest anàleg va

demostrar una reducció significativa del contingut de greix hepàtic en un estudi de fase II, que va incloure 82 pacients amb EHNA²³¹.

(f) AGONISTES THR-β

S'ha demostrat un hipotiroïdisme intrahepàtic en l'EHNA, limitant l'exposició a T3 (un factor important per a la diferenciació cel·lular) i contribuint a la seva fisiopatologia⁹⁶. El THR-β és un receptor de tiroxina, expressat predominantment en el fetge, i la seva activació millora el metabolisme del colesterol hepàtic²⁰⁶.

Resmetirom (MGL-196) ha mostrat reduir el colesterol i els TG hepàtics en ratolins amb MFGNA induïda amb dieta²³¹.

Un assaig de fase IIa (MAESTRO-NASH) mostra una reducció del 40% del greix hepàtic amb una baixa incidència de reaccions adverses²³². Els resultats de l'assaig de fase III són molt esperats²¹⁴.

VK2809 ha mostrat augmentar notablement l'oxidació hepàtica dels àcids grassos lliures i reduir l'acumulació de greix hepàtic en models preclínic en rosegadors²³³. Les dades d'un assaig clínic de fase II que va avaluar l'eficàcia i la seguretat de VK2809 en pacients amb MFGNA i hiperlipidèmia estan pendents de publicació²¹⁴.

(g) INHIBIDORS D'ACC

ACC és un enzim clau en el procés de la lipogènesi *de novo*; per tant, la inhibició d'ACC sembla una estratègia viable per tractar EHNA, ja que suprimeix la lipogènesi *de novo* i promou la β-oxidació mitocondrial d'àcids grassos lliures.

Un assaig clínic de fase II va demostrar que **GS-0976** (potent inhibidor d'ACC) a una dosi elevada durant 12 setmanes va reduir significativament l'esteatosi hepàtica i els marcadors de fibrosi, demostrats amb biòpsia²³⁴. Una limitació d'aquest tractament és l'augment de TG sèrics. Es necessiten assaigs clínics a llarg termini²¹⁴.

(h) ANALÒGIC DE LA FGF21

La FGF21 és una hormona pèptid produïda pel fetge i altres òrgans, que regula el consum de glucosa, l'homeòstasi de glucosa i la despesa energètica.

El **BMS986036** en estudis recents²³⁵, ha mostrat efectes beneficiosos sobre el contingut de greix hepàtic, avaluat per la RM-PDF, i la reducció de biomarcadors de lesió hepàtica i fibrosi²⁰⁶.

(i) INHIBIDORS DPP-4

Latagliptina i **lavildaglipina** han estat avaluades en pacients prediabètics i diabètics amb MFGNA^{236,237} i no han demostrat millores en front de placebo. Per tant, no es recomana el seu ús en EHNA.

(j) METFORMINA

La metformina millora la resistència a la insulina, un mecanisme fisiopatològic clau en EHNA²⁰⁶. Es va demostrar una disminució dels nivells ALT, però sense resposta histològica en pacients amb MFGNA²³⁸. Les directrius pràctiques actuals no recomanen

el seu ús en el tractament específic de EHNA; no obstant això, atès que un gran nombre de pacients amb MFGNA o EHNA tenen DM2, la metformina podria ser una teràpia adjuvant potencialment útil en aquests pacients²³⁹.

(k) INHIBIDORS DE SODI/GLUCOSA COTRANSPORTADOR 2 (SGLT2)

Un petit assaig clínic de 50 pacients amb DM2²⁴⁰, aleatoritzat amb **empaglifozina** versus placebo, va millorar el contingut de greix hepàtic i nivells plasmàtics dels enzims hepàtics; no obstant això, de moment no hi ha assajos amb avaluacions histològiques i la seva utilitat en EHNA no s'ha establert²⁰⁶.

(l) HIPOLIPEMIANTS

Els **Fibrats** (agonistes de la isoforma PPAR, que s'expressa principalment en hepatòcits) no va mostrar cap benefici en assaigs petits²⁴¹.

Zetimiba (inhibidor de l'absorció de colesterol) no va mostrar cap benefici sobre el contingut de greix hepàtic avaluat per la imatge²⁴².

Les **estatives** són segures per a pacients amb malaltia hepàtica i s'han de prescriure a tots els pacients d'alt risc d'acord amb les directrius clíniques²⁴³. Algunes evidències suggereixen que fins i tot poden tractar EHNA de forma independent²⁴⁴.

1.4.2.2. Estrès, mort cel·lular i inflamació

(a) VITAMINA E

La vitamina E és un antioxidant que evita la lesió hepàtica bloquejant vies apoptòtiques intrínseques i protegint contra l'estrès oxidatiu²²⁴.

L'assaig PIVENS va mostrar millorar la histologia de EHNA en pacients no diabètics ni cirròtics. ²²², on està acceptat el seu ús.

Actualment les directrius de l'AASLD no recomanen la vitamina E com a tractament per a l'EHNA en pacients diabètics, MFGNA sense biòpsia hepàtica, cirrosi associada a EHNA o cirrosi criptogènica²¹². També cal destacar que hi ha algunes preocupacions que l'ús a llarg termini es pot associar a una major incidència d'ictus hemorràgic i a un major risc de càncer de pròstata²²².

b) CENICRIVIROC

Cenicriviroc és un antagonista dual dels receptors CCR2 i CCR5, que estan involucrats en la migració i infiltració de monòcits proinflamatoris al fetge, promovent el dany hepàtic mitjançant l'activació de cèl·lules de kuffer²⁴⁵.

En l'assaig clínic fase IIb (CENTAUR) s'ha millorat la fibrosi hepàtica enfront del placebo en tractament durant un any, a més de reduir els nivells de marcadors d'inflamació com l'IL-1, l'IL-6 i la PCR, amb un excel·lent perfil de seguretat²⁴⁶. Aquest estudi va donar lloc a la implementació d'un assaig de fase III (AURORA), pendent de resultats preliminars²⁴⁷.

(c) CASPASSES

Les caspases són enzims que juguen un paper central en l'apoptosi i la inflamació, tenint un paper essencial en la patogènesi de la MFGNA.

Emricasan. El compost es troba actualment en fase II, per avaluar la millora de la histologia hepàtica, però ja s'ha observat una disminució significativa en pacients tractats enfront dels tractats amb placebo²⁴⁸.

(d) ASK1

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) és una proteïna implicada en l'apoptosi en condicions d'estrès oxidatiu²⁰⁷. ASK1 està hiperactivat en el fetge de pacients amb EHNA^{249,250}.

Selonsertib. En un assaig clínic de fase II es va associar amb una reducció d'almenys un grau de fibrosi hepàtica en comparació amb els pacients tractats amb placebo²⁵¹.

Dos assajos de fase III fonamentals (STELLAR-3, amb pacients amb fibrosi de grau F3, i STELLAR-4, amb pacients amb cirrosi compensada per EHNA) no van aconseguir el criteri de valoració principal²¹⁴. Selonsertib continuarà sent utilitzat en els assaigs de teràpia combinada de fase II²²⁷.

CFLAR i TNFAIP han demostrat que milloren la EHNA en models preclínic i són dianes terapèutiques prometedores en futures investigacions^{252,253}.

(e) TAK1

És un regulador fonamental en la transducció de la senyalització immunitària innata. L'estrès metabòlic pot sobreactivar el TAK1, promovent encara més els trastorns metabòlics i l'esteatohepatitis²⁵⁴⁻²⁵⁷. L'eliminació total de TAK1 també promou l'hepatosteatosi i la inflamació en ratolins^{258,259}; per tant, s'ha de mantenir la funció catalítica normal de TAK1 en la regulació del metabolisme lipídic, l'oxidació i l'autofàgia cel·lular²¹⁴.

La **cilindromatosis** (CYLD) sembla ser efectiva per suprimir la progressió d'EHNA i actualment és una prometedora diana terapèutica²⁵⁶. No obstant això, requereix futurs assajos clínics.

1.4.2.3. Barrera intestinal

ORLISTAT

Orlistat és un inhibidor gastrointestinal de lipasa que afavoreix la reducció de pes, disminueix el flux d'àcids grassos lliures al fetge i millora la sensibilitat a la insulina sense produir efectes adversos hepatotòxics²⁰⁷.

En un assaig clínic realitzat el 2006²⁶⁰ va mostrar una millora en l'esteatosi hepàtica, avaluada per ecografia, però a causa del seu perfil de seguretat i l'absència de valor afegit més enllà de la pèrdua de pes, el seu ús ha estat limitat en el context de la MFGNA²⁰⁷.

1.4.2.4. Lloc d'acció: fibrogènesi hepàtica

La fibrosi hepàtica és un dels principals objectius del tractament de la MFGNA, tant per prevenir la seva aparició com per poder revertir-la si fos necessari.

Simtuzumab, que és un anticòs monoclonal contra la *lysyl oxidase like 2* (LOXL2), un enzim profibròtica (activa TGF- β) abundant en hepatòcits. Estudis *in vitro* han demostrat

l'eficàcia del simtuzumab en la reducció i regressió de la fibrosi hepàtica²⁶¹. Un assaig clínic aleatoritzat de fase II de selosertib amb simtuzumab versus simtuzumab va demostrar que només selosertib podria reduir la fibrosi hepàtica en pacients amb EHNA, mentre que el simtuzumab no va tenir cap efecte en la histologia hepàtica²⁵¹

1.4.2.5. Altres mecanismes d'actuació

Àcids grassos omega-3

L'EHNA s'associa amb una disminució d'àcids grassos poliinsaturats^{262,263}.

L'administració d'àcids grassos omega-3 produeix una clara millora en els nivells plasmàtics de TG i optimitza la sensibilitat perifèrica a la insulina, alhora que redueix els efectes proinflamatoris a través de diferents mecanismes d'acció²⁰⁷.

En un assaig clínic de Sanyal et al.²⁶⁴ no va trobar diferències significatives entre els grups en l'objectiu primari o secundari. El 2016, una metaanàlisi d'assajos, placebo controlats i aleatoritzats, va concloure que els àcids grassos poliinsaturats omega-3 en MFGNA eren eficaços per disminuir el nombre d'ALT, colesterol i sobretot TG, amb un augment del colesterol HDL; cap millora en la fibrosi hepàtica (avaluada pels nivells sèrics de col·lagen tipus IV)²⁶⁵.

Per tant, es necessiten més estudis que donin suport a l'eficàcia de la teràpia per alentir la progressió de la MFGNA. Tot i que no és probable que siguin perjudicials, actualment no s'han de prescriure com a tractament per a la MFGNA²⁰⁶.

1.4.3. Teràpia quirúrgica i endoscòpica

La teràpia quirúrgica i endoscòpica de l'EHNA està reservada a pacients que no perden pes a través de la intervenció de l'estil de vida o després de l'ús de fàrmacs promotors de la pèrdua de pes com la liraglutida.

En pacients amb obesitat mòrbida els percentatges de fibrosi hepàtica avançada (15%) i esteatohepatitis (25%) són elevats²⁶⁶.

La cirurgia bariàtrica ha demostrat efectes beneficiosos sobre l'EHNA i la fibrosi, a més de tenir efectes sobre la DM2, la resistència a la insulina o la pressió arterial alta. Fins i tot pot augmentar la secreció de GLP-1, associada a la sensibilitat a la insulina, de manera que el seu efecte beneficiós va més enllà de la pèrdua de pes o millora de la síndrome metabòlica²⁶⁷⁻²⁶⁹

L'esteatosi i l'EHNA reverteixen després de la cirurgia bariàtrica^{270,271}.

Una revisió sistemàtica de 29 estudis en què van participar pacients obesos amb cirurgia bariàtrica va demostrar disminuir l'esteatosi, la inflamació, la balonització i la fibrosi després de la intervenció, així com una millora significativa dels valors ALT, AST i GGT²⁷². No obstant això, cal tenir en compte que es tracta d'estudis de reduïda grandària i amb gran heterogeneïtat de la població i que caldrien assajos clínics amb una grandària de mostra adequada per confirmar aquestes millores^{205,207}.

Actualment no hi ha dades robustes per recomanar un tipus de cirurgia bariàtrica en pacients amb MFGNA, i s'han de triar en funció de la seva complexitat, valorant el seu risc-benefici i l'extensió de l'exclusió gastrointestinal²⁰⁷

La teràpia endoscòpica ha estat mal avaluada en pacients amb MFGNA. Un estudi del 2012 compara el globus gàstric (més dieta i exercici) amb la dieta i l'exercici en 18 pacients amb obesitat durant 6 mesos. Els pacients amb globus intragàstrics van experimentar una major pèrdua de pes i una major reducció en la puntuació²⁷³. Malgrat aquestes dades encoratjadores, cal avaluar aquest tipus d'intervencions en cohorts més grans amb major seguiment²⁰⁷.

1.4.4. Trasplantament de fetge

Com es va esmentar anteriorment, l'epidèmia d'obesitat i l'augment concomitant de la diabetis i la síndrome metabòlica han augmentat la prevalença de la MFGNA, sent actualment la segona indicació de trasplantament hepàtic (TH) i la primera indicació del trasplantament hepato-renal combinat als Estats Units (no hi ha dades similars publicades a Espanya)^{274,275}.

A causa de l'alta associació d'EHNA amb DM2, obesitat, HTA, malaltia cardiovascular i morbiditat peritransplantament, es recomana un estudi exhaustiu del risc cardiovascular de pacients candidats a trasplantament de fetge (**Figura 13**)²⁸.

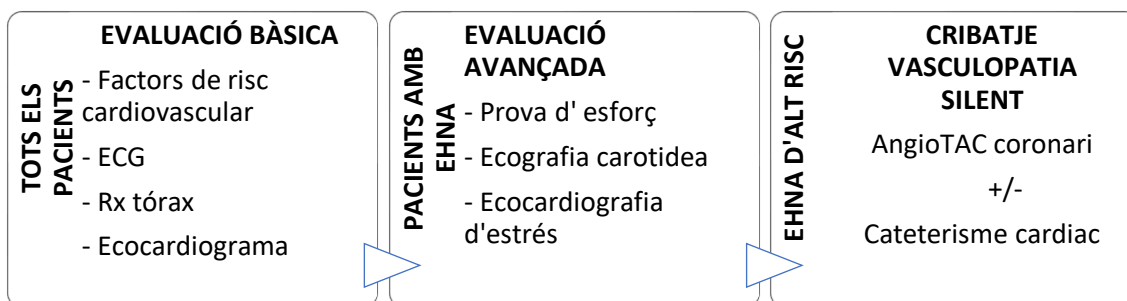


FIGURA 13. Proposta d'esquema d'avaluació cardiològica pre-trasplantament²⁸.

Els factors de risc cardiovascular s'han de controlar abans del trasplantament i la presència de vasculopatia clínicament significativa s'ha de tractar i estabilitzar abans del trasplantament²⁷⁶.

Els pacients amb obesitat mòrbida presenten més complicacions infeccioses i postquirúrgiques després del TH, per aquest motiu s'ha de considerar la cirurgia bariàtrica, però no hi ha consens sobre quin és el millor moment per a això. Així, la indicació d'HT i el tipus de cirurgia bariàtrica en individus obesos amb IMC >35 i DM s'ha d'individualitzar²⁷⁷.

La supervivència post-HT és similar als pacients transplantats per altres indicacions, però la mortalitat per causes cardiovasculars i sèpsia son més freqüent²⁸ en pacients amb MFGNA.

2. NEUROTENSINA

2.1. Què és? La seva expressió en condicions fisiològiques

La neurotensina (NT) és un tridecapèptid endògen (N-Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-C), dividit en dues parts, un fragment inactiu (del 1r-7è aminoàcid) i un fragment actiu (de l'aminoàcid 8è-13è).

NT exerceix la seva acció fisiològica mitjançant la unió a tres tipus de receptors NT (RNT): RNT1, RNT2 i RNT3²¹⁶.

En condicions fisiològiques, NT es troba en el sistema nerviós central i el tracte gastrointestinal^{4,278}. Té un paper important en el metabolisme dels nutrients, particularment en la degradació dels greixos de l'intestí prim²⁷⁹ i també com a neuromodulador, regulant l'efecte anorexigen²⁸⁰, mantenint l'homeòstasi del dolor i la temperatura²⁸¹ i controlant l'activitat física²⁸². A més, modula els processos d'aprenentatge i memòria²⁸³ a través dels seus receptors en àrees del cervell associades a aquestes funcions.

La NT és secretada a l'intestí prim proximal per cèl·lules enteroendocrines (cèl·lules N) i és responsable de diversos nutrients, inclosos els greixos i la glucosa, per mantindre el metabolisme d'aquests nutrients i l'homeòstasi energètica²⁷⁹. La NT es pot alliberar quan la glucosa luminal és alta, a través de les vies SGLT1 i GLUT2; mentre que l'estimulació del greix condueix a la secreció de NT a través de diferents vies:

- 1) Via dependent del receptor CCK1 en l'intestí proximal i que afecta directament a l'intestí prim distal²⁸⁴
- 2) Inhibició de mTOR mediada per AMPK.

Una vegada que NT s'allibera a la circulació es pot unir a RNT, que es distribueixen àmpliament en òrgans centrals i perifèrics. Produeix una modulació de la funció cerebral, millora l'absorció de greix, indueix la secreció d'àcids biliars i pancreàtics²⁸⁵ i la motilitat jejuni-ileal^{286,287}. A través d'aquests mecanismes la NT juga un paper en el control d'aliments i energia en el cos⁴.

A nivell cognitiu, NT actua a través del seu receptor (NTR1) per modular la funció cerebral en diverses regions del cervell, particularment en l'hipotàlam i àrees cognitives del cervell com l'escorça entorrinal i l'hipocamp. Durant la regulació de l'efecte anorexigen, NT treballa conjuntament amb la leptina per controlar la ingesta d'aliments digerits, ja que les neurones NT estan co-localitzades amb receptors leptina (LepR) en l'hipotàlem lateral. A més, la NT alliberada per neurones de l'hipotàlem, pot modular l'alliberament de dopamina (DA) a través del RNT1, que estan localitzats a l'àrea mesolímbica, donant lloc a la regulació del centre de sacietat. En els processos d'aprenentatge i memòria, NT indueix la transmissió del glutamat en les àrees cognitives del cervell, resultant en una millora de la plasticitat sinàptica, un procés essencial en la funció cognitiva⁴.

La vida mitjana de NT en la circulació i el cervell és de 2 a 6 min i 15 min, respectivament²⁷⁹.

2.2. Neurotensina i Obesitat

L'obesitat s'associa amb inflamació perifèrica, resistència a la insulina i alts nivells d'estrès oxidatiu^{288,289}. A més, l'obesitat pot conduir a la neurodegeneració i la disrupció dels processos d'aprenentatge i memòria^{299,301,302}.

Alguns estudis en humans i models animals suggereixen un vincle entre NT i l'obesitat. S'han observat nivells més baixos de NT a plasma en subjectes amb obesitat mòrbida en comparació amb controls amb pes normal⁸. També s'ha demostrat que els nivells de NT augmenten després de la col·locació de la banda gàstrica i les cirurgies de bypass^{8,292}, fet que suggereix que la regulació de la secreció de NT està alterada en l'obesitat²⁹³.

Un estudi clínic va demostrar que la proneurotensina plasmàtica (pro-NT), molècula precursora de la NT amb major estabilitat molecular, s'allibera en quantitats equimolars similars a la NT circulant, en condicions fisiològiques²⁹⁴. Aquest estudi va trobar que la pro-NT es va convertir en NT activa²⁹⁵.

Es va observar un alt nivell de pro-NT en pacients obesos i amb resistència a la insulina. La pro-NT es va convertir en NT i va estimular l'absorció de greixos al unir-se als receptors intestinals de NT i també va estimular el nervi vago, que a la vegada activa l'hipotàlem, i dona una sensació de sacietat^{7,279,296}. A més, en l'estudi de Melander et al. van trobar que les altes concentracions plasmàtiques de pro-NT es van associar amb el desenvolupament de DM2, malalties cardiovasculars, càncer de mama i mortalitat cardiovascular.

En conjunt, tots aquests resultats suggereixen que en l'obesitat hi ha una reducció dels nivells de NT cerebral i un augment dels nivells plasmàtics de pro-NT. Així, és possible que es produeixi "resistència a NT" en l'obesitat²⁹⁵.

En resum, una major ingesta de greixos en condicions obeses pot promoure l'alliberament de NT per millorar l'absorció de greixos, la qual cosa condueix a una acumulació de greix en els òrgans viscerals i al desenvolupament de l'obesitat. A més, una dieta alta en greixos a llarg termini resulta en la disrupció de la senyalització central de NT i l'esgotament ional de la leptina. De tal manera que hi ha una disminució de l'efecte anorèxic que condueix a l'obesitat. A més, l'acumulació d'alts nivells de greix, en associació amb una alteració en la senyalització NT, pot afectar la plasticitat sinàptica i posteriorment provocar un declivi cognitiu^{309,312,313}.

Cada vegada hi ha més consciència que el NT té un paper important en l'absorció de greixos en òrgans viscerals i en la regulació de la funció cerebral en condicions fisiològiques. Els canvis en els nivells de NT es van observar en diverses condicions patològiques, concretament en les associades a l'obesitat i el declivi cognitiu. L'obesitat en si mateixa pot conduir al declivi cognitiu. L'administració de NT exògena influeix en l'efecte anorèxic a nivell de l'hipotàlem, probablement mitjançant la senyalització de leptina, i s'associa amb la modulació de l'aprenentatge i la memòria mitjançant una activació del sistema glutamatèrgic en àrees cognitives cerebrals.

No obstant això, el mecanisme subjacent i l'efecte de la NT sobre la cognició en condicions obeses encara no són clars. Els estudis futurs estan obligats a aclarir aquestes troballes preliminars²⁹⁵.

2.3. Neurotensina i la MFGNA

Després de l'estudi de Li et al.²⁷⁹ es va demostrar, en subjectes humans, que nivells plasmàtics més alts de pro-NT es van associar amb l'obesitat i la resistència a la insulina, a més de duplicar el risc de desenvolupar obesitat més tard en subjectes no obesos. Així es va demostrar una relació directa entre NT i l'augment de l'absorció intestinal del greix i l'obesitat, i es va postular que la NT podria ser un marcador pronòstic de l'obesitat futura i una diana potencial per al tractament de malalties relacionades amb l'obesitat.

Per tal d'augmentar el coneixement de la MFGNA i la seva associació amb l'obesitat i les seves complicacions metabòliques, es realitza el següent estudi per analitzar els nivells plasmàtics de NT en pacients amb MFGNA associada a l'obesitat severa, no existint cap altra publicació fins la data del nostre primer estudi que relacioni NT i MFGNA.

IV. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Com que els nivells plasmàtics de NT s'han associat amb la presència d'obesitat i la síndrome metabòlica, la NT pot associar-se a la presència de MFGNA i ser un possible biomarcador d'EHNA.

Tenint en compte aquesta hipòtesi, els objectius del nostre primer estudi²⁹⁹ van ser els següents:

- Determinar els nivells plasmàtics de NT en relació amb l'obesitat.
- Determinar nivells plasmàtics de NT en pacients amb obesitat i fetge normal, esteatosi simple i EHNA.
- Investigar si els nivells plasmàtics de NT podrien ser un biomarcador d'EHNA.

Després dels resultats del nostre primer estudi i de la literatura publicada posteriorment, es va decidir realitzar un segon estudi³⁰⁰, els objectius del qual van ser els següents:

- Determinar els nivells plasmàtics de pro-NT en pacients amb MFGNA associada a obesitat severa.
- Analitzar la seva possible relació amb l'expressió gènica hepàtica dels principals gens del metabolisme lipídic hepàtic.

V. MATERIAL I MÈTODES

Subjectes

Tots dos estudis van ser aprovats pel Comitè d'Ètica investigadora de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (CEIm; 23c/2015). Tots els participants van donar el seu consentiment informar per escrit. La població del primer estudi²⁹⁹ van ser 71 dones: 20 controls amb pes normal (IMC <25 kg/m²) i 51 dones amb obesitat mòrbida (OM; IMC > 40 kg/m²). En el segon estudi³⁰⁰ es van incloure 74 dones: 18 controls i 56 dones amb OM. Es van incloure alguns pacients més que en el primer estudi, encara que la gran majoria eren els mateixos pacients, per respondre al càlcul de la mostra.

Vam realitzar tots dos estudis només en dones per evitar interferències de factors de confusió, com el gènere.

Les biòpsies hepàtiques es van obtenir de dones amb OM durant la cirurgia bariàtrica laparoscòpica programada. Totes les biòpsies es van utilitzar amb finalitats diagnòstiques clíniques.

La MFGNA es va diagnosticar utilitzant els següents criteris:

- Patologia hepàtica
- La ingesta < 10 grams d'etanol al dia.

Els criteris d'exclusió per a pacients amb OM van ser:

- Ús concurrent de fàrmacs causants d'esteatosi hepàtica
- Pacients que prenen medicaments que redueixen lipídics, inclosos agonistes de PPAR α o PPAR γ .
- Pacients diabètics que reben insulina o prenen medicaments susceptibles d'influir en els nivells d'insulina endògena.
- Pacients menopàusiques i postmenopàusiques o que prenen tractament anticonceptiu.
- Pacients amb malaltia aguda, evidència actual de malalties inflamatòries o infeccions agudes o cròniques o malalties malignes terminals.

En el primer estudi, vam trobar 16 dones amb OM que tenien DM2, un diagnòstic basat en directrius de l'Associació Americana de Diabetis. El 42% de les dones amb MFGNA tenien DM2. Quatre d'elles seguien un tractament dietètic i dotze estaven prenent medicaments antidiabètics. A més, 13 dones tenien dislipèmia i 7 d'elles van rebre teràpia hipolipemiant.

En el nostre segon estudi; en la cohort de subjectes amb obesitat, 17 dones tenien DM2. El 23% de les dones amb MFGNA tenien DM2. A més, 15 dones tenien dislipèmia i el 60% van rebre tractament hipolipemiant. La HTA va estar present en 27 dones, de les quals el 78% va rebre tractament antihipertensiu.

Estudi histològic de les biòpsies hepàtiques

Les mostres hepàtiques es van tenyir amb hematoxilina i eosina, i el tricrom de Manson, i van ser valorades per hepatòlegs experimentats utilitzant mètodes prèviament descrits^{316,317}. Es van avaluar les mostres hepàtiques en funció de la presència i el grau d'esteatosi macrovesicular per ES; i segons la inflamació portal i lobular, la fibrosi (intensitat i ubicació), la balonització hepatocel·lular i la hialina de Mallory, per identificar mostres d'EHNA.

Mostres amb menys d'un 5% d'esteatosi macrovesicular sense la presència d'inflamació es va definir com el fetge normal.

Els pacients amb OM es van subclassificar en els següents grups en funció de la seva patologia hepàtica: histologia hepàtica normal (HN, n=18³¹⁴; n=20³⁰⁰), ES (n=15²⁹⁹; n=17³⁰⁰) i EHNA (n=18²⁹⁹; n=19³⁰⁰). Cap dels pacients amb EHNA de la nostra cohort presentava fibrosi o cirrosi.

Anàlisi bioquímic

Els paràmetres bioquímics es van analitzar utilitzant un analitzador automàtic convencional després de 12 hores de dejuni. Es va estimar la resistència a la insulina mitjançant l'avaluació de l'homeòstasi de resistència a la insulina model 2 (HOMA2-IR).

Els nivells plasmàtics de NT es van determinar amb un immunoassaig multiplex utilitzant el kit MILLIPIX MAP Human Neuropeptide Magnetic Bead Panel (MilliporeSigma, Burlington, Massachusetts) i l'instrument Bio-Plex 200 en el centre de ciències òmiques (Universitat Rovira i Virgili), segons les instruccions del fabricant³⁰³.

Els nivells plasmàtics de pro-NT es van mesurar utilitzant l'assaig esfingotest® pro-NT (SphingoTec GmbH, Hennigsdorf, Alemanya). Es tracta d'un immunoassaig de quimioluminescència en sandwich que utilitza dos anticossos monoclonals dirigits contra pro-NT (traçador i de captura). L'assaig es va calibrar utilitzant dilucions de pro-NT. Mostres / calibradors (50 µl) en plaques de 96 pous recobertes de poliestirè blanc (Greiner Bio-One International AG, Àustria). Després d'afegir mAb anti-pro-NT marcat (200 µL), les plaques van ser incubades durant 20 hores a 22 °C, sense agitar. El traçador no lligat es va retirar mitjançant una solució de rentat (350 µl per pou, quatre vegades), i la quimioluminescència restant es va mesurar durant 1 segon per pou, utilitzant el lector de luminescència de placa de microtímetres Center LB 960 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Alemanya). Els nivells pro-NT van ser determinat per una corba de calibratge de cinc punts (5.9 - 482 pmol/L). Els calibradors i les mostres es van processar per duplicats amb un coeficient de variació requerit <15% entre duplicats. S'ha notificat el valor mitjà dels duplicats per a cada mostra. La sensibilitat analítica (límit de detecció) va ser de <3 pmol/L, i el rang mesurable va ser de 5.9 - 482 pmol/L.

Expressió gènica hepàtica

Les mostres hepàtiques recollides durant la cirurgia bariàtrica es van conservar a RNAlater (Qiagen, Hilden, Alemanya) a 4°C i després es van processar i emmagatzemar a 80°C. L'ARN total es va extreure dels teixits mitjançant l'ús del mini kit RNeasy (Qiagen, Barcelona, Espanya). La transcripció inversa a cDNA es va realitzar amb el kit d'RNA a

cDNA d'alta capacitat (Applied Biosystems, Madrid, Espanya). La PCR quantitativa en temps real es va realitzar amb l'assaig TaqMan predissenyat per Applied Biosystems per a la detecció de SREBP1c, SREBP2, ABCG1c, ABCA1, ACC1, CPT1A, CROT, PPARY, PPAR δ , PPAR α , FAS, LXR α , FXR i FABP. L'expressió de cada gen es va calcular en relació amb l'expressió de l'ARN 18s. Totes les reaccions es van fer per duplicat en plaques de 96 pous mitjançant el sistema de PCR en temps real ràpid 7900HT (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA).

Anàlisi estadístic

En el primer estudi, tots els valors reportats s'expressen com a mitjana \pm desviació estàndard (DE) o mediana (percentil 25th – percentil 75th), depenent de la variable. Les diferències entre grups d'estudi es van calcular mitjançant la prova T de Student o l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA). La força d'associació entre variables es va calcular utilitzant el mètode de Pearson (variables paramètriques) i la prova de correlació Q de Spearman (variables no paramètriques). $P < 0.05$ es va considerar estadísticament significatiu.

Acceptant un risc de 0,05 i un risc de < 0.2 en un contrast bilateral, es van necessitar 20 participants per grup per detectar una diferència de 0.2 unitats. Es va suposar que la desviació estàndard comuna (DE) era de 0.3.

En el segon estudi, les dades es van analitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS / PC + for Windows (versió 23.0; SPSS, Chicago, IL, EUA). La prova de Kolmogorov-Smirnov es va utilitzar per avaluar la distribució de variables. Les variables contínues es van reportar com a mitjana (DE) i les variables no contínues amb la mediana i l'interval (percentil 25th – percentil 75th). Les diferents anàlisis comparatives es van realitzar mitjançant una prova no paramètrica de Mann-Whitney U o prova de Kruskal-Wallis, segons la presència de dos o més grups.

La força de l'associació entre variables es va calcular mitjançant el mètode de Spearman. Els valors $p < 0.05$ van ser considerats estadísticament significatius.

VI. RESULTATS

VI.1. Nivells plasmàtics de neurotensina baixos en dones amb MFGNA²⁹⁹

Característiques basals dels subjectes

Les característiques generals i determinacions bioquímiques de la població estudiada es mostren a la **Taula 5**:

	Pes normal (n=20)	Obesitat mòrbida (n=51)	
		Fetge normal (n=18)	MFGNA (n=33)
Edat (anys)	43.50 ± 6.54	44.54 ± 10.02	48.04 ± 9.65
Pes (Kg)	57.27 ± 8.48 ^a	117.74 ± 15.67	120.86 ± 17.57
Circumferència de cintura (cm)	73.33 ± 8.45 ^a	130.08 ± 17.81	131.35 ± 10.08
IMC (Kg/m ²)	22.35 ± 2.00 ^a	47.15 ± 5.99	48.47 ± 7.56
Glucosa (mg/dl)	92.17 ± 11.68 ^a	90.58 ± 18.11	123.69 v 27.70 ^b
Insulina (mIU/l)	8.50 ± 5.11 ^a	12.87 ± 8.18	21.55 ± 24.53
HbA1c (%)	4.69 ± 0.27 ^a	5.02 ± 0.70	6.01 ± 1.62 ^b
HOMA2-IR	1.14 ± 0.69 ^a	1.51 ± 1.05	2.88 ± 2.00
TG (mg/dl)	90.32 ± 55.06 ^a	135.74 ± 64.18	192.79 ± 98.37 ^b
Colesterol (mg/dl)	197.59 ± 30.21 ^a	166.60 ± 29.64	182.34 ± 34.39
cHDL (mg/dl)	61.61 ± 15.26 ^a	48.52 ± 13.45	38.87 ± 7.86 ^b
cLDL (mg/dl)	114.46 ± 28.85	89.61 ± 25.27	107.61 ± 28.87 ^b
AST (U/L)	19.38 ± 4.87 ^a	22.69 ± 7.18	44.10 ± 32.12 ^b
ALT (U/L)	16.12 ± 5.16 ^a	22.78 ± 11.05	45.31 ± 27.63 ^b
GGT (U/L)	15.76 ± 9.21 ^a	22.39 ± 21.51	33.47 ± 21.59
FA (U/L)	55.71 ± 14.67 ^a	60.33 ± 11.50	70.41 ± 15.66 ^b

Taula 5. Les dades es mostren com a mitjana ± DE. La resistència a la insulina s'estima amb HOMA2-IR. ^a Diferències significatives entre els controls de pes normals i els pacients amb MFGNA i OM (p<0.05). ^b Diferències significatives entre pacients amb fetge normal i OM, i pacients amb MFGNA i OM (p< 0.05)

En primer lloc, vam classificar els pacients assignant-los a dos grups en funció del seu IMC: dones amb pes normal (IMC <25 kg/m²; n=20) i dones amb OM (IMC > 40 kg/m²;

n=51). Els dos grups eren comparables en termes d'edat ($p=0.175$). No és sorprenent que les anàlisis bioquímiques indiquessin que els pacients amb OM tenien nivells significativament més alts de glucosa en dejú, insulina, hemoglobina glicosilada (HbA1c), HOMA2-IR, TG i colesterol total ($p<0.05$) que les dones amb pes normal. El colesterol lligat a la lipoproteïna d'alta densitat (cHDL) era significativament més baix en pacients amb OM que en el grup de pes normal ($p<0.001$).

A continuació, vam classificar els pacients amb OM segons la seva patologia hepàtica, dividint-los en HN ($n=18$) o MFGNA ($n=33$). Vam trobar que els nivells de glucosa, HbA1c, TG i cHDL eren significativament més alts en pacients amb MFGNA que en pacients amb HN ($p<0.05$). A més, cHDL va ser significativament més baix en dones amb OM i MFGNA ($p=0.008$). Pel que fa als enzims hepàtics, l'AST, l'ALT i la fosfatasa alcalina (FA) van ser més alts en pacients amb MFGNA ($p<0.05$).

Nivells plasmàtics de NT

Els nivells plasmàtics de NT es van quantificar en dones de pes normal i en dones amb OM, amb o sense MFGNA. El resultat principal va ser que els nivells plasmàtics de NT van ser significativament més baixos en dones amb OM i MFGNA (3.62 ± 0.85 ng/ml) que en dones amb OM sense MFGNA (11.65 ± 1.95 ng/ml) i en subjectes amb pes normal (13.68 ± 2.58 ng/ml) ($p=0.001$ i $p=0.001$, respectivament, **Figura 14**). No obstant això, els nostres resultats van indicar que no hi havia diferències significatives entre dones amb pes normal i pacients amb OM sense MFGNA ($p=0.535$).

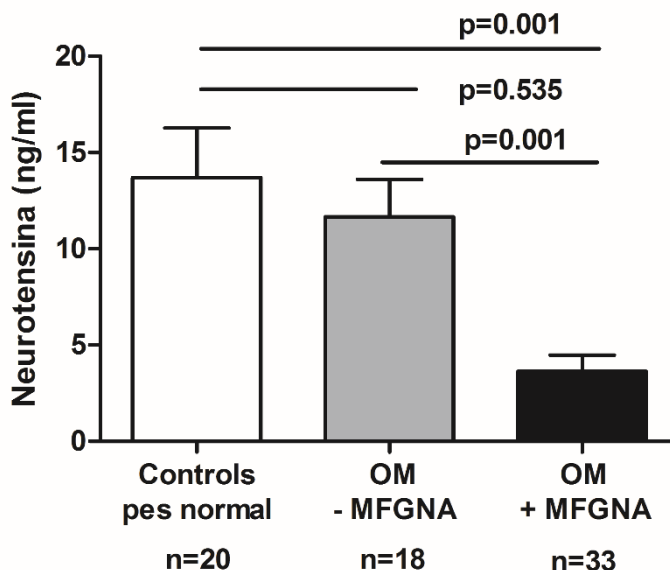


FIGURA 14. Nivells plasmàtics de NT en controls amb pes normal, en pacients amb OM sense MFGNA i en dones amb OM i MFGNA. Els resultats es mostren com a mitjana \pm DE. $P<0.05$ es considera estadísticament significativa.

A més, com que el 65% de les dones amb OM van ser diagnosticades de MFGNA a través de la histologia hepàtica, els nivells plasmàtics de NT van ser significativament més baixos en tota la cohort OM (6.45 ± 1.02 ng/ml) que en dones amb pes normal ($p=0.017$).

No hi va haver diferències significatives entre els nivells plasmàtics de NT en dones amb OM i MFGNA/sense DM2 (2.32 ± 1.18 ng/ml) i en dones amb OM i MFGNA/amb DM2 (5.38 ± 3.12 ng/ml) ($p=0.178$).

Pel que fa al tractament, no hi va haver diferència en els nivells plasmàtics de NT entre els pacients amb MFGNA que prenen medicaments antidiabètics orals (5.86 ± 2.53 ng/ml) i els que no el prenen (2.64 ± 2.22 ng/ml) ($p=0.242$). També pel que fa als fàrmacs hipolipemians, no hem trobat diferències significatives amb el tractament (4.96 ± 1.98 ng/ml) o sense ell (2.74 ± 2.35 ng/ml) ($p=0.458$). La distribució de fàrmacs es mostra a la **taula 6**:

	Obesitat mòrbida (n=51)	
	Fetge normal (n=18)	MFGNA (n=33)
Antidiabètics orals (n=12)		
Metformina	2	8
Metformina + Glimpiride	-	2
Hipolipemians (n=7)		
Estatines		
Simvastatina	1	2
Pravastatina	-	1
Fluvastatina	-	1
Fibrats		
Gemfibrozil	-	2

Taula 6. No hi va haver diferències estadísticament significatives entre els nivells de NT en pacients amb MFGNA que prenen antidiabètics orals ($p= 0.242$) o els que prenen hipolipemians ($p=0.458$).

Per estudiar el possible efecte de NT en el grau de MFGNA, vam classificar les dones amb OM segons la seva patologia hepàtica. No vam trobar diferències en els nivells plasmàtics de NT entre dones amb ES (4.45 ± 1.74 ng/ml) i dones amb EHNA (2.92 ± 0.59 ng/ml, $p=0.415$, **Figura 15**)

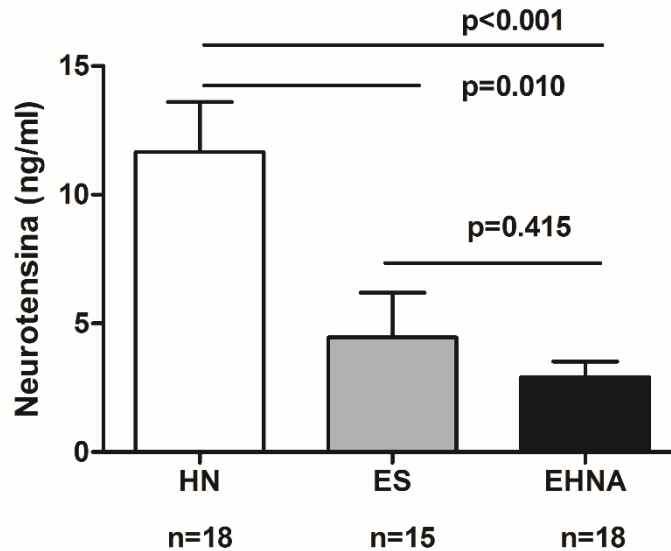


FIGURA 15. Nivells de NT en dones amb OM i subdividides segons la histopatologia hepàtica (HN, ES o EHNA). Els resultats es mostren com a mitjana \pm DE. $p < 0.05$ es considera estadísticament significativa.

Correlació entre els nivells plasmàtics de NT i els valors bioquímics

Vam trobar que els nivells plasmàtics de NT estaven inversament correlacionats amb la glucosa ($r = -0.531$, $p < 0.001$), insulina ($r = -0.391$, $p = 0.002$), HOMA2-IR ($r = -0.496$, $p < 0.001$) i TG ($r = -0.277$, $p = 0.023$); i que es correlacionaven positivament amb cHDL ($r = 0.275$, $p = 0.025$).

V.II. Nivells circulants de pro-neurotensina i la seva relació amb EHNA i el metabolisme dels lípids hepàtics³⁰⁰

Característiques basals dels subjectes

Les característiques generals i determinacions bioquímiques de la població estudiada es mostren a la **taula 7**.

	Pes normal (n=18)	Obesitat mòrbida (n=56)			
		Fetge normal (n=20)	MFGNA (n=36)	ES (n=17)	EHNA (n=19)
Edat (anys)	43.50 ± 6.73	44.54 ± 10.02	48 ± 9.79	46.19 ± 10.78	49.63 ± 8.78
Pes (Kg)	54.2 (51 - 65.43) ^a	115.5 (41.54 - 50.79)	119.5 (109 - 129.75)	120 (109.80 - 134)	119 (107 - 123)
Circumferència de cintura (cm)	71.5 (68.5 - 82.5) ^a	125.25 (115 - 144)	130 (124 - 136.5)	133 (124 - 137)	129 (122.75 - 133)
IMC (Kg/m²)	21.97 (20.79 - 24.08) ^a	46.41 (41.53 - 50.79)	46.5 (44.03 - 51.69)	46.87 (43.03 - 56.09)	46.2 (44.26 - 48.59)
Glucosa (mg/dl)	90 (84.5 - 98.50) ^a	83 (76 - 95)	116 (103 - 152) ^b	115.5 (101.5 - 139.25) ^c	116 (103 - 152) ^d
Insulina (mIU/l)	7.8 (4.90-10.06) ^a	11 (7.31 - 14.03)	16.31 (10.69 - 24.26) ^b	17.6 (10.60 - 25.4)	15.24 (10.78 - 22.50) ^d
HbA1c (%)	5 (4.6 - 5.3) ^a	5 (4.6 - 5.3)	5.5 (5 - 6.5) ^b	5.8 (5 - 6.2) ^c	5.1 (4.9 - 6.6)
HOMA2-IR	1.05 (0.60 - 1.30) ^a	1.15 (0.90 - 1.65)	2.3 (1.45 - 3.4) ^b	2.65 (1.30 - 3.45)	2 (1.50 - 3.20) ^d
TG (mg/dl)	85 (52.5 - 169.25) ^a	124 (75 - 167)	162 (122.50 - 239) ^b	168 (109.37- 243.75)	160 (124 - 239)
Colesterol (mg/dl)	197.59 ± 30.21 ^a	166.60 ± 29.64	181.14 ± 34.12	177.25 ± 36.29	184.42 ± 32.81
cHDL (mg/dl)	64 (49.75 - 73) ^a	48 (40 - 57)	38.10 (35.75 - 43.25) ^b	36.5 (29 - 41.05) ^c	41 (36.75 - 44) ^d
cLDL (mg/dl)	114.46 ± 28.85	89.61 ± 25.27	107.01 ± 29.12 ^b	105.49 ± 30.69	108.53 ± 28.38 ^d
AST (U/L)	19.5 (15.25 - 22.50) ^a	21 (18.25 - 26.25)	32 (24.75 - 54) ^b	31.5 (25.25 - 54) ^c	36.5 (20.50 - 52.50) ^d
ALT (U/L)	15 (11.50-20.50) ^a	18.5 (16 - 27.25)	35 (27 - 53) ^b	33 (27.50-51.25) ^c	37 (24 - 62) ^d

GGT (U/L)	11 (9 - 21)	17 (10.50 - 26)	27.5 (15.75 – 43) ^b	30 (16 – 41)	25 (15 - 66)
FA (U/L)	55.71 ± 14.67 ^a	60.33 ± 11.49	70.80 ± 15.71 ^b	68.87 ± 15.58 ^c	72.51 ± 16.07 ^d
Pro-NT (pmol /L)	113.9 (85.21 – 147.93)	81.53 (50.76 – 108.39)	108.07 (73.75 – 149.40) ^b	112.59 (50.94 – 151.16)	102.02 (83.37-148.7) ^d

Taula 7. Les dades es mostren com la mitjana ± DE o mediana (25 - 75), depenent de la variable. La resistència a la insulina s'estima amb HOMA2-IR. ^a Diferència significativa entre els controls de pes normals i els pacients amb OM (p<0.05). ^b Diferències significatives entre pacients amb fetge normal i MFGNA (p<0.05). ^c Diferències significatives entre pacients amb fetge normal i ES (p<0.05). ^d Diferències significatives entre pacients amb fetge normal i EHNA (p< 0.05).

En primer lloc, vam classificar els pacients assignant-los a dos grups en funció del seu IMC: dones amb pes normal (IMC <25 kg/m²; n=18) i dones amb OM (IMC> 40 kg/m²; n=56). Els dos grups eren comparables en termes d'edat (p=0.079).

Els anàlisis bioquímics van indicar que els pacients amb OM tenien nivells significativament més alts de glucosa en dejú, insulina, HOMA2-IR, Hb1Ac, TG i colesterol total (p<0.05) que les dones amb pes normal. La cHDL va ser significativament més baixa en pacients amb OM que en el grup de pes normal (p<0.001). Els nivells d'AST, ALT i FA van ser significativament més alts en pacients amb OM en comparació amb els que tenien un pes normal.

A continuació, vam classificar els pacients amb OM segons la seva patologia hepàtica, dividint-los com a HN (n=20) o MFGNA (n=36). Es va trobar que els nivells de glucosa, insulina, HOMA2-IR, Hb1Ac, cLDL i TG eren significativament més alts en pacients amb MFGNA que en pacients amb HN (p<0.05). A més, cHDL va ser significativament més baixa en dones amb OM i MFGNA (p=0.005). Pel que fa als enzims hepàtics, L'AST, ALT i FA van ser més altes en pacients amb MFGNA (p <0.05).

Nivells circulants de pro-NT en la població estudiada

Els nivells pro-NT en dones amb OM eren similars als de pes normal (**Figura 16A**). No es van detectar diferències significatives en els nivells de plasma de pro-NT en pacients amb OM i MFGNA amb OM2 o sense DM2 (p=0.11).

El resultat principal va ser que els nivells plasmàtics pro-NT van ser significativament més alts en OM amb MFGNA (108.07 ng/ml (73.75 – 149.40)) que en OM sense MFGNA (81.53 ng/ml (50.75 – 108.39)), p=0.045 (**Figura 16B**).

Posteriorment, per estudiar el possible efecte de la pro-NT en el grau de la MFGNA, es va classificar el grup de dones amb OM en HN, ES i EHNA. Vam trobar que hi havia diferències significatives entre els grups HN i MFGNA (p=0.03). No obstant això, no hem trobat diferències entre els grups ES i EHNA (**Figura 16C**). Tampoc s'ha trobat una

correlació significativa entre els nivells pro-NT i la inflamació portal, lobulillar o la balonització.

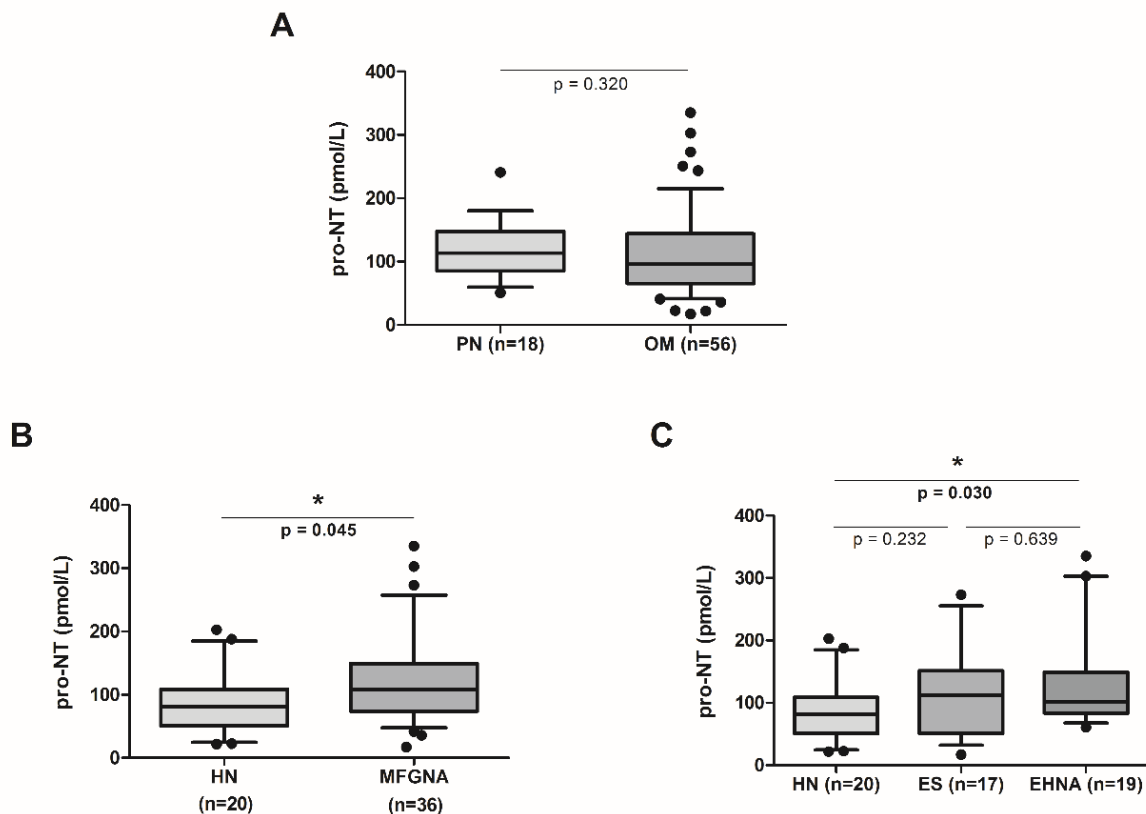


FIGURA 16. A) Nivells plasmàtics de pro-NT entre les dones amb pes normal (PN) i OM. **B)** Nivells plasmàtics de pro-NT en dones amb OM amb HN i MFGNA. **C)** Nivells plasmàtics de pro-NT entre diferents nivells de gravetat de MFGNA (HN, ES, EHNA). * $p < 0.05$ es considera estadísticament significativa. PN: pes normal.

Pel que fa al tractament, no hi va haver diferències significatives en els nivells plasmàtics de pro-NT entre els pacients amb MFGNA amb o sense medicament antidiabètic ($p=0.14$). Així mateix, pel que fa als fàrmacs hipolipemians, no hem trobat diferències significatives amb o sense tractament ($p=0.20$).

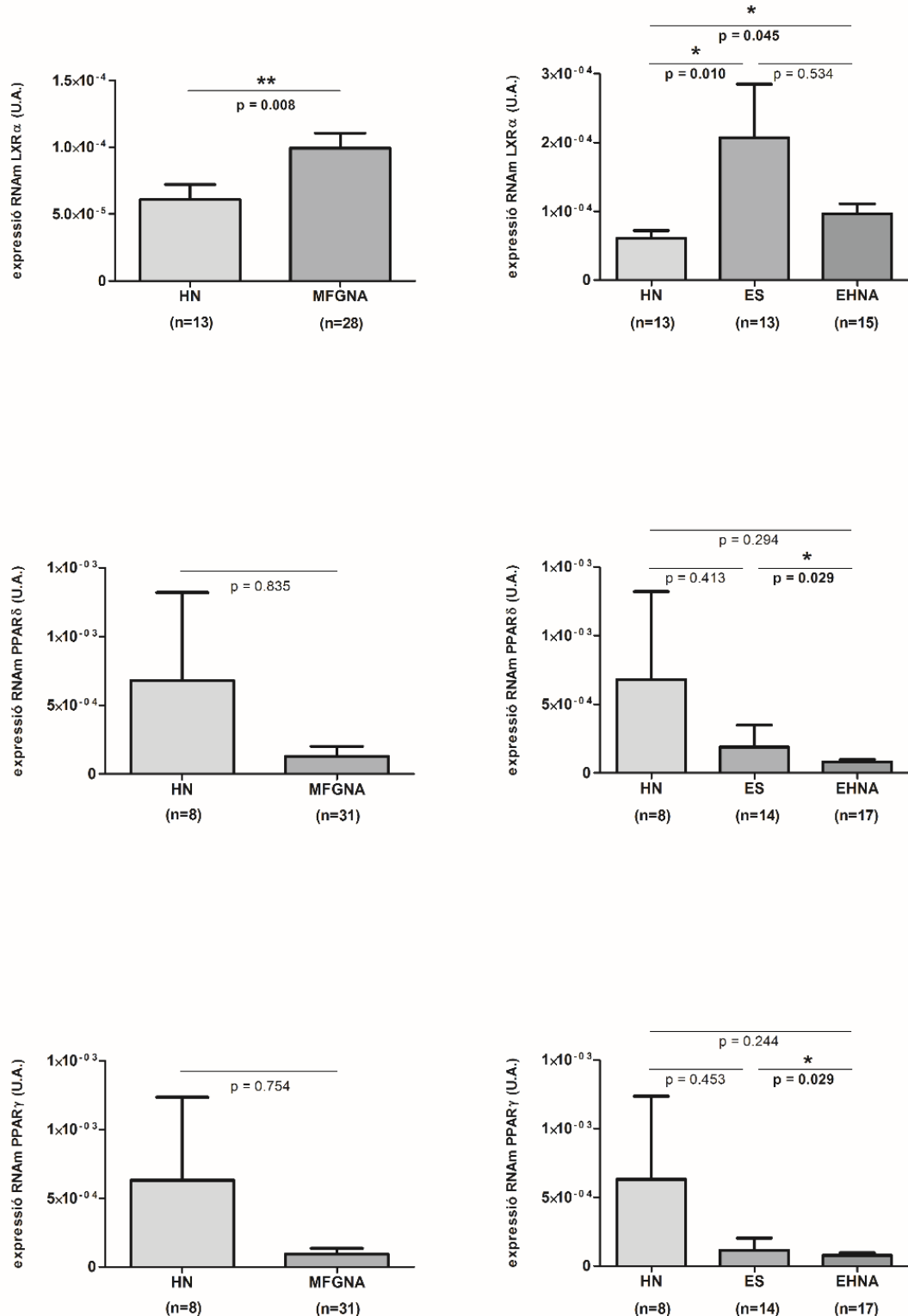
Expressió hepàtica dels principals gens relacionats amb el metabolisme dels lípids hepàtics

Atès que s'ha descrit relació de la pro-NT amb una major absorció de lípids a nivell intestinal, hem volgut analitzar si hi ha alguna associació, en aquest sentit, entre els nivells plasmàtics de pro-NT i l'expressió gènica dels principals gens del metabolisme lipídic hepàtic.

Es van analitzar els següents gens d'acord amb la presència o no de MFGNA i la subclassificació histològica del fetge: *Sterol regulatory element-binding* (SREBP1c i SREBP2), *ATP-binding cassette sub-family G member 1* (ABCG1c), *ATP binding cassette subfamily A member 1* (ABCA1), *acetyl-CoA carboxylase 1* (ACC1), *carnitine palmitoyltransferase 1A* (CPT1A), *carnitine O-octanoyltransferase* (CROT), *peroxisome-*

proliferator-activated receptor (PPAR γ , PPAR α , PPAR δ), fatty acid synthase (FAS), liver X receptor b (LXRb), farnesoid X receptor (FXR) i fatty acid-binding proteins (FABP).

Únicament es van trobar diferències significatives en l'expressió d aquets gens, tal com mostra la **figura 17**.



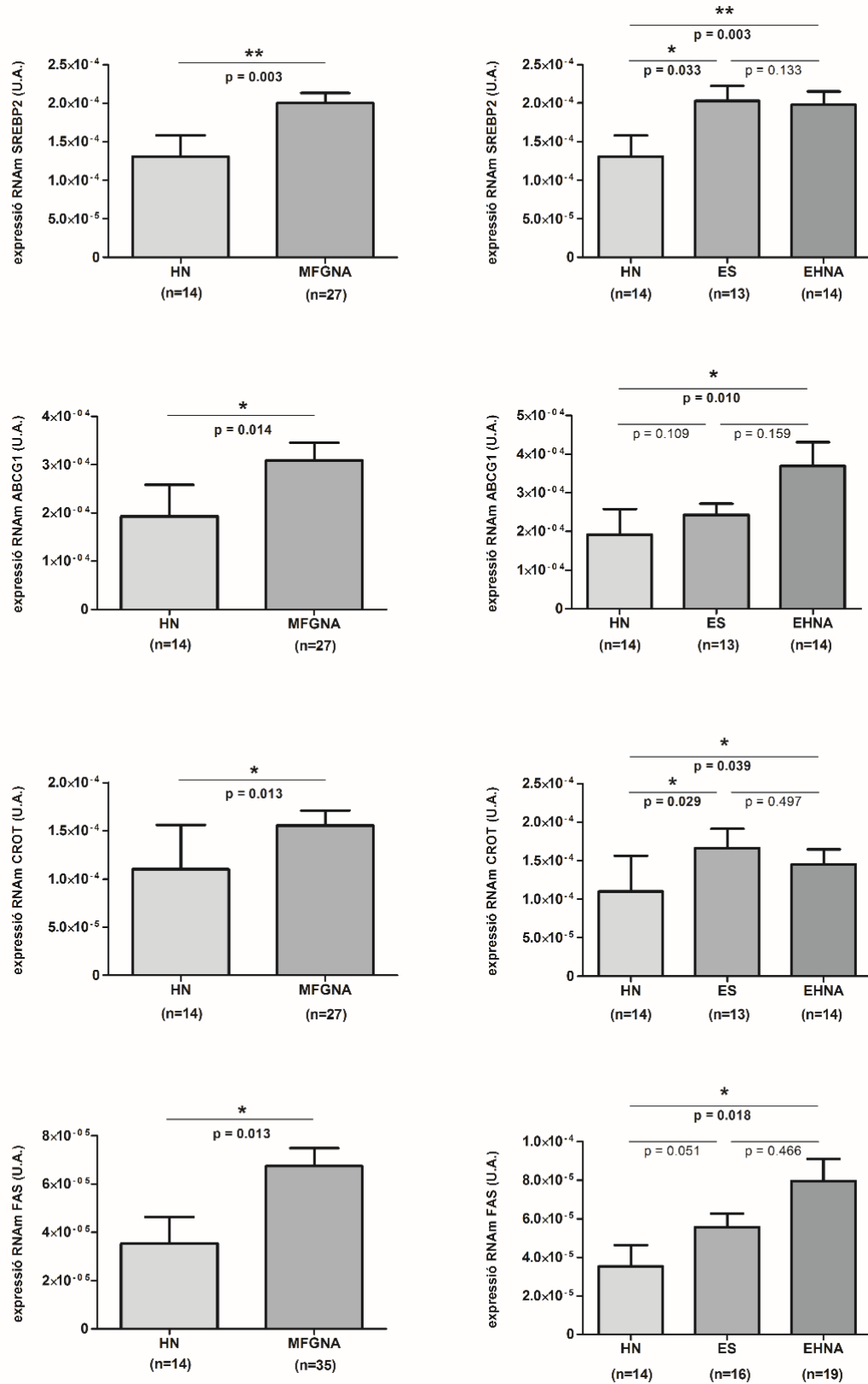


Figura 17. Diferències en l'expressió hepàtica de ARNm de SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXRα, PPARγ i PPARδ entre els grups d'HN vs. MFGNA i entre els grups HN, ES i EHNA. * p < 0.05 es considera estadísticament significativa.

Correlacions dels nivells plasmàtics de pro-NT amb els paràmetres bioquímics del metabolisme lipídic i amb l'expressió hepàtica dels principals gens del metabolisme lipídic hepàtic.

En primer lloc, com vam trobar nivells de pro-NT diferencials segons la presència de la MFGNA, vam intentar determinar si hi havia una relació entre els nivells circulants de pro-NT i la inflamació lobulillar o la presència de balonització hepàtica, però no vam poder trobar cap correlació significativa ((rho=0.190; p=0.157) i (rho=0.173; p=0.199), respectivament).

Després, donat que es va descriure una relació entre la pro-NT i l'absorció de lípids a nivell intestinal, també vam intentar determinar si hi ha algun tipus d'associació, en aquest sentit, entre els nivells plasmàtics de pro-NT i els paràmetres metabòlics lipídics i amb expressió d'ARNm dels principals gens relacionats amb el metabolisme dels lípids hepàtics.

Pel que fa als paràmetres bioquímics, que representen el metabolisme dels lípids, hem trobat una correlació positiva entre els nivells pro-NT i els nivells de cLDL (**Figura 18**).

Quan analitzem l'associació amb l'expressió hepàtica de gens del metabolisme lipídic hepàtic (SREBP1, SREBP2, ABCG1, ABCA1, ACC1, CPT1A, CROT, PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , FAS, LXR α , FXR, LXRb, CD36, IL-6, CYP7A, FABP, LCN2 i RBP4), no hem trobat cap correlació.

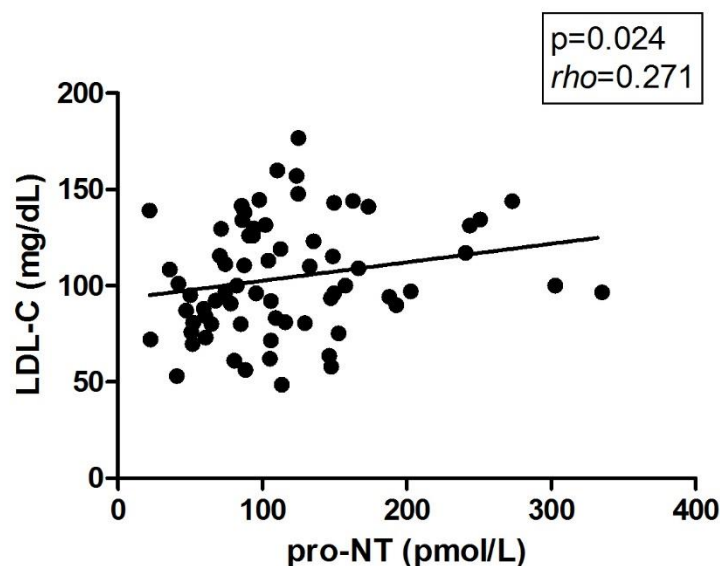


FIGURA 18. Correlació entre els nivells plasmàtics de pro-NT i cLDL. * $p<0.05$ es considera estadísticament significativa.

VII. DISCUSIÓ

Els principals resultats del nostre primer estudi²⁹⁹ indiquen que els nivells plasmàtics de NT van ser més baixos en dones amb OM i MFGNA. No hi havia diferència entre dones amb pes normal i pacients amb OM sense MFGNA. Per tant, la presència de MFGNA, però no d'obesitat, es va associar amb nivells plasmàtics baixos de NT.

En el moment de l'estudi, s'havia fet escassa investigació sobre l'associació entre els nivells circulants de NT i l'obesitat. Per tant, es desconeixia el paper de la NT en l'obesitat i els resultats bibliogràfics que havien eren controvertits.

D'acord amb els nostres resultats, Weiss et al. van trobar que els nivells de NT eren més baixos en subjectes amb OM que en controls primis i que els nivells de NT van augmentar després de la cirurgia bariàtrica; no obstant això, no van estudiar l'associació amb MFGNA⁸. Christ-Chain et al. va demostrar, en el seu estudi, que la pro-NT circulant s'incrementava després d'un bypass gàstric bariàtric en pacients amb obesitat severa; suggerint que la regulació de la secreció de NT està alterada en l'obesitat humana⁹. Després del bypass gàstric, hi ha una disminució persistent de l'apetit que es correlaciona amb un augment dels nivells de pèptids, la qual cosa suggereix que la NT pot ajudar a explicar els efectes persistents d'aquesta cirurgia sobre la sacietat.

Per contra, en un estudi del 2016 es va trobar un augment de les concentracions en plasma de la pro-NT en subjectes obesos i amb resistència a la insulina, però no es va estudiar la presència de MFGNA⁵. Li et al. va suggerir que NT pot jugar un paper en la deposició de greixos en models animals. Van demostrar que els ratolins deficientes en NT havien reduït l'absorció de greix intestinal i es podien protegir contra l'esteatosi hepàtica associada a un alt consum de greix⁵.

Les discrepàncies entre les seves dades i les nostres es podrien explicar en les diferències de sexe de la mostra i/o a la variabilitat d'analitzar els nivells sanguinis de la NT (inestable) i la pro-NT (estable)¹³.

A més, els estudis de Li et al.²⁷⁹ han revelat que en el tracte gastrointestinal, el pèptid YY (PYY) i el pèptid similar al glucagó-1 (GLP-1) són coexpressats i coecretats juntament amb NT en resposta a una àmplia gamma d'estímuls, inclosos els àcids biliars. També van demostrar que NT actua de manera sinèrgica amb GLP-1 i PYY quan s'administra perifèricament. Per tant, és important reconèixer la NT dependent de l'estímul i la seva possible absència en condicions patològiques³⁰⁴.

Després del nostre primer estudi, Barchetta et al.³⁰⁵ van demostrar que els subjectes amb MFGNA, provat amb biòpsia, tenien nivells plasmàtics de pro-NT significativament més elevats que els que no tenien MFGNA. A més, es va demostrar que els nivells circulants de pro-NT es correlacionaven positivament amb la presència i gravetat de la MFGNA. En pacients amb OM, també es va informar que els nivells circulants de pro-NT es correlacionen positivament amb la presència i gravetat de MFGNA, basat en els paràmetres de la puntuació de l'activitat de la MFGNA i l'evidència histològica

d'inflamació del teixit adipós visceral que condueix a una inflamació sistèmica de baix grau, un augment d'àcids grassos circulants, la resistència a la insulina i una deposició aberrant de greix a nivell hepàtic¹¹. Aquests autors suggereixen que la NT podria ser parcialment responsable de la patogènesi de MFGNA/EHNA mitjançant l'augment de l'absorció de greix intestinal i la inducció a condicions proinflamatòries en el teixit adipós¹².

La següent taula resumeix els estudis amb les relacions entre els nivells plasmàtics de NT/pro-NT en pacients amb MFGNA/EHNA¹².

Referència	Mostra	Resultats
Bachetta et al. 2018 ³⁰⁵	28 subjectes amb obesitat sense MFGNA; 32 subjectes amb obesitat i MFGNA	Obesitat amb MFGNA vs Obesitat sense MFGNA, ↑ Pro-NT en plasma; Pro-NT en plasma es correlaciona positivament amb MFGNA, en presència i gravetat
Bachetta et al. 2018 ¹¹	40 subjectes amb OM	Pro-NT en plasma es correlaciona positivament amb MFGNA, en presència i gravetat; i la inflamació en teixit adipós visceral
Auguet et al. 2018 ²⁹⁹	20 subjectes amb pes normal; 18 OM sense MFGNA; 33 OM amb MFGNA	OM amb MFGNA vs. Pes normal, ↓NT en plasma; OM amb MFGNA vs. OM sense MFGNA, ↓NT en plasma; No hi ha diferències amb la NT sèrica entre EHNA i ES

Taula 8. Estudis publicats de la relació plasmàtics de NT/pro-NT en pacients amb MFGNA/EHNA.

Així doncs, en el nostre primer estudi mostrem que els nivells de NT eren més baixos en dones amb MFGNA i OM i després d'analitzar la discrepància de resultats entre el nostre estudi i els publicats posteriorment, ens vam proposar reavaluar el paper del pèptid NT en la patogènesi de la MFGNA (analitzant els nivells pro-NT en lloc de la NT, donada la seva inestabilitat) en una cohort de dones amb MFGNA associada a l'obesitat i, al mateix temps, investigar la seva relació amb el metabolisme lipídic.

Els resultats més rellevants obtinguts en aquest segon estudi³⁰⁰ indiquen que les dones amb MFGNA associades a OM tenien nivells més elevats de pro-NT que les dones amb OM sense MFGNA. A més, els nivells van ser majors en pacients amb EHNA que en els del grup HN. També es va evidenciar una correlació positiva amb els nivells de cLDL; encara que, no hi havia cap associació amb l'expressió hepàtica de mRNA dels gens hepàtics relacionats amb el metabolisme lipídic.

D'una banda, cal destacar que en aquest estudi, no hem trobat diferències estadísticament significatives entre els nivells de pro-NT en dones amb HN i amb OM, de forma similars als estudis anteriors³⁰⁶. I per un altre costat, els pacients amb MFGNA tenien nivells més alts de pro-NT que els pacients amb OM en absència de MFGNA. Per tant, la presència de MFGNA, però no d'obesitat, es va associar amb nivells més elevats de pro-NT plasmàtica.

Aquests resultats són similars als de Barchetta et al.^{11,304} i contradiuen els nostres resultats anteriors que van reportar nivells baixos de NT en dones amb OM i MFGNA²⁹⁹.

Això es podria explicar per la molècula analitzada, ja que en el nostre estudi anterior²⁹⁹ vam analitzar per primera vegada els nivells de NT en MFGNA. Com alguns autors van suggerir més tard, pro-NT (un fragment precursor de NT), és una molècula més estable¹², que podria explicar aquestes discrepàncies.

També en el present estudi, vam analitzar els nivells pro-NT segons la classificació histològica hepàtica i vam trobar diferències significatives entre els grups HN i EHNA. No obstant això, no hem trobat diferències rellevants entre ES i EHNA, tal com s'informa en l'estudi de Barchetta et al.³⁰⁶. Això probablement es deu a característiques diferencials entre poblacions, com ara l'edat, el sexe i l'IMC.

A més, no hem pogut trobar cap associació entre els nivells pro-NT i la presència d'inflamació lobulillar o balonització hepàtica, segons es desprenen en un estudi recent de Dongiovanni et al.³⁰⁷. Aquests autors també van descriure una interessant associació entre diverses variants genètiques de NT amb fibrosi avançada i hepatocarcinoma en pacients amb MFGNA, que probablement afecta l'activitat de la proteïna NT.

Amb tota aquesta evidència, alguns autors van considerar que la pro-NT és un pèptid implicat en la patogènesi de la MFGNA/EHNA mitjançant una major absorció de lípids intestinals i inducció de condicions proinflamatòries en el teixit adipòs¹².

Finalment, vam voler determinar si la pro-NT estava relacionada amb el metabolisme lipídic, ja que la NT pot augmentar l'absorció intestinal dels lípids¹¹. En aquest sentit, vam trobar una correlació positiva amb els nivells de cLDL. Els nostres resultats van ser coherents amb els de Barchetta et al., on també descrivien una correlació positiva entre els nivells de LDL i de pro-NT¹¹. Però aquesta associació pot resultar difícil d'explicar, ja que els nostres pacients amb OM, que presentaven nivells més baixos de pro-NT, també mostraven nivells més reduïts de cLDL davant els casos control; això es pot deure a diferents fets. Primer, els nostres pacients obesos no tenien dislipèmia severa, únicament 15 d'ells presentaven dislipèmia lleu i 9 dels quals estaven sota tractament amb estatines. En segon lloc, els nostres pacients amb OM es van sotmetre a una dieta hipocalòrica molt estricta durant tres mesos abans de la cirurgia, mentrestant que els nostres casos controls van mantenir una dieta normal.

Curiosament, en els pacients amb OM, a mesura que progressa la MFGNA, els nivells de pro-NT augmenten; aquest fet promou l'absorció de lípids intestinals i es desencadena l'augment de cLDL circulant³⁰⁸.

A continuació, vam analitzar l'expressió hepàtica d'alguns gens relacionats amb el metabolisme lipídic. Així, vam trobar diferències en l'expressió de SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR α , PPAR γ i PPAR δ en la nostra cohort de pacients amb OM amb o sense MFGNA.

En aquest sentit, els nostres pacients amb MFGNA van mostrar un augment en els nivells d'expressió de SREBP2 i ABCG1, gens implicats en la secreció de lipoproteïnes, i CROT i FAS, que estan relacionats amb l'oxidació lipídica i l'acumulació de lípids hepàtics¹⁸². D'altra banda, els nostres pacients amb MFGNA havien reduït els nivells de PPAR δ i PPAR γ , relacionats amb una major sensibilitat a la insulina³¹⁰.

Quan vam avaluar la possible relació dels nivells pro-NT amb l'expressió hepàtica d'aquests gens relacionats amb el metabolisme lipídic, no vam poder demostrar cap associació. En aquest sentit, en l'estudi de Barchetta et al., els nivells de plasma de pro-NT es van associar amb alts nivells de TG després d'ajustar-se als múltiples factors de confusió³²⁶.

És important esmentar que, en tots dos estudis, la nostra població estudiada va permetre establir una relació clara entre els nivells plasmàtics de pro-NT/NT i les dones amb OM i MFGNA, sense la interferència de factors de confusió, com el sexe o l'edat, però que ens porta a la limitació de que aquests resultats no es poden extrapolar a homes, dones d'altres edats o individus amb sobrepès o HN.

Alguns pacients de la nostra mostra estaven tractats amb antidiabètics orals o fàrmacs hipolipemians. Aquests fàrmacs tenen impactes potencials en el transport bilis que es va demostrar que afectaven la secreció d'altres pèptids intestinals³¹¹. Per tant, en tots dos estudis, vam estudiar l'efecte d'aquestes teràpies en els nivells plasmàtics de NT/pro-NT i no vam trobar diferències estadísticament significatives entre els pacients que estaven en teràpia i els que no.

Així, en resum, el nostre estudi va confirmar que els nivells pro-NT són elevats en MFGNA/EHNA i s'associen a nivells de cLDL. Per tant, encara que es necessiten més estudis per confirmar el paper del pro-NT en la progressió de MFGNA i avaluar aquesta molècula com a possible diana terapèutica d'EHNA, sembla estar relacionada amb el desenvolupament d'aquesta malaltia tan prevalent.

VIII. CONCLUSIÓ

En la present tesi doctoral, composta pels dos estudis on s'ha analitzat el rol de la neurotensina en la malaltia per fetge gras no alcohòlic, es pot concloure que:

- En primer lloc, el metabolisme de la neurotensina sembla estar alterat en la MFGNA en dones amb obesitat mòrbida.
- Per un costat, la concentració circulant de neurotensina podria disminuir en dones amb obesitat mòrbida i MFGNA respecte a dones amb obesitat mòrbida que no presentessin MFGNA o dones amb pes normal; per tant, sembla que la presència de MFGNA s'associa amb alteració dels nivells plasmàtics de neurotensina, però no l'obesitat.
- Per un altre costat, els nivells de pro-neurotensina (precursor estable de la neurotensina) semblen estar incrementats en presència de diabetis mellitus tipus 2, i també quan es presenta MFGNA, concretament en l'esteatohepatitis no alcohòlica, en dones amb obesitat mòrbida.
- Finalment, existeix una associació positiva entre els nivells de pro-neurotensina i els de cLDL, el que reforça el fet de que la neurotensina té un paper fonamental en el metabolisme lipídic. Per tant, podria arribar a proposar-se com a possible diana terapèutica per a EHNA, tot i que serien necessaris més estudis en aquest sentit.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/hep.28431
2. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388-1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004
3. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(2):163-177. doi:10.1016/j.beem.2013.02.005
4. Saiyasit N, Sripetchwandee J, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Potential roles of neurotensin on cognition in conditions of obese-insulin resistance. *Neuropeptides*. 2018;72(September):12-22. doi:10.1016/j.npep.2018.09.002
5. Li J, Song J, Zaytseva YY, et al. An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity. *Nature*. 2016;533(7603):411-415. doi:10.1038/nature17662
6. Schroeder LE, Leininger GM. Role of central neurotensin in regulating feeding: Implications for the development and treatment of body weight disorders. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2018;1864(3):900-916. doi:10.1016/j.bbdis.2017.12.036
7. Melander O, Maisel AS, Almgren P, et al. Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2012;308(14):1469-1475. doi:10.1001/jama.2012.12998
8. Weiss H, Labeck B, Klocker J, et al. Effects of adjustable gastric banding on altered gut neuropeptide levels in morbidly obese patients. *Obes Surg*. 2001;11(6):735-739. doi:10.1381/09608920160558687
9. Christ-Crain M, Stoeckli R, Ernst A, et al. Effect of gastric bypass and gastric banding on proneurotensin levels in morbidly obese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3544-3547. doi:10.1210/jc.2006-0256
10. Barchetta I, Cimini FA, Leonetti F, et al. Increased Plasma Proneurotensin Levels Identify NAFLD in Adults with and Without Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(6):2253-2260. doi:10.1210/jc.2017-02751
11. Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, et al. Neurotensin is a lipid-induced gastrointestinal peptide associated with visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Nutrients*. 2018;10(4). doi:10.3390/nu10040526
12. Okubo H, Kushiyama A, Nakatsu Y, et al. Roles of gut-derived secretory factors in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and their possible clinical applications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):1-18. doi:10.3390/ijms19103064
13. Ernst A, Hellmich S, Bergmann A. Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation. *Peptides*. 2006;27(7):1787-1793. doi:10.1016/j.peptides.2006.01.021
14. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: A case-control study. *Hepatology*. 2000;32(4 I):689-692. doi:10.1053/jhep.2000.17894

15. Ayata G, Gordon FD, Lewis WD, et al. Cryptogenic cirrhosis: Clinicopathologic findings at and after liver transplantation. *Hum Pathol.* 2002;33(11):1098-1104. doi:10.1053/hupa.2002.129419
16. Angulo P. Medical progress: Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1221-1231. doi:10.1056/NEJMra011775
17. Pais R, Barritt AS, Calmus Y, et al. NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J Hepatol.* 2016;65(6):1245-1257. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.033
18. Caballeria L, Augustin S, Broquetas T, et al. Recomendaciones para la detección, diagnóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico en atención primaria y hospitalaria. *Med Clin (Barc).* 2019;153(4):169-177. doi:10.1016/j.medcli.2019.01.030
19. SUZUKI M, MURASHIMA M, HOERR SL. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Nutr Diet.* 2007;64(3):157-163. doi:10.2307/2136890
20. Camhi SM, Bray GA, Bouchard C, et al. The relationship of waist circumference and BMI to visceral, subcutaneous, and total body fat: Sex and race differences. *Obesity.* 2011;19(2):402-408. doi:10.1038/oby.2010.248
21. Mongraw-Chaffin M, Golden SH, Allison MA, et al. The sex and race specific relationship between anthropometry and body fat composition determined from computed tomography: Evidence from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *PLoS One.* 2015;10(10):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0139559
22. World Rankings: Obesity Rates by Country (July 2017). <https://renewbariatrics.com/obesity-rank-by-countries/>. Accessed December 10, 2019.
23. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology.* 2019;69(6):2672-2682. doi:10.1002/hep.30251
24. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol.* 2019;70(3):531-544. doi:10.1016/j.jhep.2018.10.033
25. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11-20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109
26. Samji NS, Verma R, Satapathy SK. Magnitude of NonAlcoholic Fatty Liver Disease: Western Perspective. *J Clin Exp Hepatol.* 2019;9(4):497-505. doi:10.1016/j.jceh.2019.05.001
27. Danford CJ, Yao Z, Jiang ZG. Non-alcoholic fatty liver disease: A narrative review of genetics. *J Biomed Res.* 2018;32(6):389-400. doi:10.7555/JBR.32.20180045
28. Aller R, Fernández-Rodríguez C, Io Iacono O, et al. Consensus document. Management of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Clinical practice guideline. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;41(5):328-349. doi:10.1016/j.gastrohep.2017.12.003
29. Kupčová V, Fedelešová M, Bulas J, Kozmonová P, Turecký L. Overview of the Pathogenesis, Genetic, and Non-Invasive Clinical, Biochemical, and Scoring Methods in the Assessment of NAFLD. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(19):3570. doi:10.3390/ijerph16193570
30. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in

- lean individuals in the United States. *Med (United States)*. 2012;91(6):319-327. doi:10.1097/MD.0b013e3182779d49
31. Kumar R, Mohan S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Lean Subjects: Characteristics and Implications. *J Clin Transl Hepatol*. 2017;XX(X):1-8. doi:10.14218/jcth.2016.00068
 32. Wei JL, Leung JC-F, Loong TC-W, et al. Prevalence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Patients: A Population Study Using Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(9):1306-1314; quiz 1315. doi:10.1038/ajg.2015.235
 33. Wang AY, Dhaliwal J, Mouzaki M. Lean non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr*. 2019;38(3):975-981. doi:10.1016/j.clnu.2018.08.008
 34. Hu X, Huang Y, Bao Z, et al. Prevalence and factors associated with nonalcoholic fatty liver disease in Shanghai work-units. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:123. doi:10.1186/1471-230X-12-123
 35. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, et al. Nonalcoholic steatofibrosis independently predicts mortality in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Commun*. 2017;1(5):421-428. doi:10.1002/hep4.1054
 36. Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*. 2015;62(6):1723-1730. doi:10.1002/hep.28123
 37. Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-1259. doi:10.1016/S0140-6736(17)32154-2
 38. Golabi P, Otgonsuren M, De Avila L, Sayiner M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic syndrome increase the risk of mortality in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Med (United States)*. 2018;97(13):18-23. doi:10.1097/MD.00000000000010214
 39. Younossi ZM, Otgonsuren M, Venkatesan C, Mishra A. In patients with non-alcoholic fatty liver disease, metabolically abnormal individuals are at a higher risk for mortality while metabolically normal individuals are not. *Metabolism*. 2013;62(3):352-360. doi:10.1016/j.metabol.2012.08.005
 40. Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*. 2002;35(6):1485-1493. doi:10.1053/jhep.2002.33324
 41. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;49(4):608-612. doi:10.1016/j.jhep.2008.06.018
 42. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002;123(1):134-140. doi:10.1053/gast.2002.34168
 43. Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2005;42(2):218-224. doi:10.1016/j.jhep.2004.10.005
 44. Nair S, Mason A, Eason J, Loss G, Perrillo RP. Is obesity an independent risk

- factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis? *Hepatology*. 2002;36(1):150-155. doi:10.1053/jhep.2002.33713
45. Hassan MM, Curley SA, Li D, et al. Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2010;116(8):1938-1946. doi:10.1002/cncr.24982
 46. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TAR, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010;51(6):1972-1978. doi:10.1002/hep.23527
 47. Pais R, Lebray P, Rousseau G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcohol-associated cirrhosis awaiting liver transplants. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(5):992-999.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.10.011
 48. Caballería L, Pera G, Auladell MA, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(1):24-32. doi:10.1097/MEG.0b013e32832fcd0
 49. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: The Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012;55(1):88-93. doi:10.1007/s00125-011-2336-9
 50. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):205-214. doi:10.1016/j.cld.2015.10.001
 51. Coppel KJ, Miller JC, Gray AR, Schultz M, Mann JI, Parnell WR. Obesity and the extent of liver damage among adult New Zealanders: findings from a national survey. *Obes Sci Pract*. 2015;1(2):67-77. doi:10.1002/osp4.13
 52. Camhi SM, Bray GA, Bouchard C, et al. The relationship of waist circumference and BMI to visceral, subcutaneous, and total body fat: Sex and race differences. *Obesity*. 2011;19(2):402-408. doi:10.1038/oby.2010.248
 53. Eguchi Y, Hideyuki •, Masafumi H•, et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the in Japan: a multicenter large retrospective study Alkaline phosphatase GGT Gamma-glutamyl transferase ChE Cholinesterase FPG Fasting plasma glucose. *J Gastroenterol*. 2012;47:586-595. doi:10.1007/s00535-012-0533-z
 54. Frith J, Day CP, Henderson E, Burt AD, Newton JL. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Older People. *Gerontology*. 2009;55(6):607-613. doi:10.1159/000235677
 55. Summart U, Thinkhamrop B, Chamadol N, Khuntikeo N, Songthamwat M, Kim CS. Gender differences in the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Northeast of Thailand: A population-based cross-sectional study. *F1000Research*. 2017;6:1630. doi:10.12688/f1000research.12417.2
 56. Dongiovanni P, Anstee Q, Valenti L. Genetic Predisposition in NAFLD and NASH: Impact on Severity of Liver Disease and Response to Treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5219-5238. doi:10.2174/13816128113199990381
 57. Ekstedt M, Nasr P, Kechagias S. Natural History of NAFLD/NASH. 1901. doi:10.1007/s11901-017-0378-2
 58. Jun M. Farmacología y terapéutica en la enfermedad del hígado graso no

- alcohólico. 2019;203:1-9.
59. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1). doi:10.1002/hep.20973
 60. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, et al. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: Interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology*. 2011;53(6):1874-1882. doi:10.1002/hep.24266
 61. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-133. doi:10.1002/hep.29466
 62. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-285. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x
 63. Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-1565. doi:10.1002/hep.29085
 64. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(7):411-428. doi:10.1038/s41575-019-0145-7
 65. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-397.e10. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.043
 66. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61(5):1547-1554. doi:10.1002/hep.27368
 67. Spahillari A, Mukamal K, Defilippi C, et al. The association of lean and fat mass with all-cause mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study HHS Public Access. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(11):1039-1047. doi:10.1016/j.numecd.2016.06.011
 68. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2015;239(1):192-202. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001
 69. Hallsworth K, Hollingsworth KG, Thoma C, et al. Cardiac structure and function are altered in adults with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2013;58(4):757-762. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.015
 70. Byrne CD, Targher G. NAFLD : una enfermedad multisistémica. 2019:1-14.
 71. Targher G, Valbusa F, Bonapace S, et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with an Increased Incidence of Atrial Fibrillation in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2013;8(2):e57183. doi:10.1371/journal.pone.0057183
 72. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Implications for liver transplantation. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sabidi.urv.cat/pubmed/?term=29272073>. Accessed December 12, 2019.
 73. Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study. *Gastroenterology*. 2018;155(2):443-457.e17. doi:10.1053/j.gastro.2018.04.034

74. Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, et al. Hepatocellular cancer: The impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. doi:10.1016/j.jhep.2013.10.003
75. Baffy G. Hepatocellular carcinoma in obesity: Finding a needle in the haystack? In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1061. Springer New York LLC; 2018:63-77. doi:10.1007/978-981-10-8684-7_6
76. Mantovani A, Targher G. Type 2 diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: Spotlight on nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Transl Med*. 2017;5(13). doi:10.21037/atm.2017.04.41
77. Margini C, Dufour JF. The story of HCC in NAFLD: From epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. *Liver Int*. 2016;36(3):317-324. doi:10.1111/liv.13031
78. Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(4):748-755.e3. doi:10.1016/j.cgh.2018.05.057
79. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in US Veterans is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. doi:10.1016/j.cgh.2015.07.019
80. Stefan N, Häring HU, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(4):313-324. doi:10.1016/S2213-8587(18)30154-2
81. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, et al. Geroscience: Linking aging to chronic disease. *Cell*. 2014;159(4):709-713. doi:10.1016/j.cell.2014.10.039
82. Kalinkovich A, Livshits G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev*. 2017;35:200-221. doi:10.1016/j.arr.2016.09.008
83. Stefan N, Schick F, Häring H-U. Causes, Characteristics, and Consequences of Metabolically Unhealthy Normal Weight in Humans. *Cell Metab*. 2017;26(2):292-300. doi:10.1016/j.cmet.2017.07.008
84. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644-656. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.008
85. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;402:113-119. doi:10.1016/j.mce.2014.11.029
86. Watt MJ, Miotto PM, De Nardo W, Montgomery MK. The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocr Rev*. 2019;40(5):1367-1393. doi:10.1210/er.2019-00034
87. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
88. Yilmaz Y, Ulukaya E. Toward a Biochemical Diagnosis of NASH: Insights From Pathophysiology For Distinguishing Simple Steatosis From Steatohepatitis. *Curr Med Chem*. 2011;18(5):725-732. doi:10.2174/092986711794480122
89. R. Moschen A, Wieser V, Tilg H. Adiponectin: Key Player in the Adipose Tissue-Liver Crosstalk. *Curr Med Chem*. 2012;19(32):5467-5473.

- doi:10.2174/092986712803833254
90. Stojavljević S, Gomerčić Palčić M, Virović Jukić L, Smirčić Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(48):18070-18091. doi:10.3748/wjg.v20.i48.18070
 91. Stiglund N, Strand K, Cornillet M, et al. Retained NK cell phenotype and functionality in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Immunol.* 2019;10(JUN). doi:10.3389/fimmu.2019.01255
 92. Lonardo A, Adinolfi LE, Restivo L, et al. Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: An update on survival strategy of a successful pathogen. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7089-7103. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7089
 93. Magee N, Zou A, Zhang Y. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells. *Biomed Res Int.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/5170402
 94. Tiwari-Heckler S, Gan-Schreier H, Stremmel W, Chamulitrat W, Pathil A. Circulating phospholipid patterns in NAFLD patients associated with a combination of metabolic risk factors. *Nutrients.* 2018;10(5). doi:10.3390/nu10050649
 95. Mazidi M, Katsiki N, Mikhailidis DP, Banach M. Link between plasma trans-fatty acid and fatty liver is moderated by adiposity. *Int J Cardiol.* 2018;272:316-322. doi:10.1016/j.ijcard.2018.07.061
 96. Bohinc BN, Michelotti G, Xie G, et al. Repair-related activation of hedgehog signaling in stromal cells promotes intrahepatic hypothyroidism. *Endocrinology.* 2014;155(11):4591-4601. doi:10.1210/en.2014-1302
 97. Singhal G, Kumar G, Chan S, et al. Deficiency of fibroblast growth factor 21 (FGF21) promotes hepatocellular carcinoma (HCC) in mice on a long term obesogenic diet. *Mol Metab.* 2018;13:56-66. doi:10.1016/j.molmet.2018.03.002
 98. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, Marrazzo A, Rinaldi L, Adinolfi LE. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol.* 2017;23(36):6571-6592. doi:10.3748/wjg.v23.i36.6571
 99. Tanaka N, Aoyama T, Kimura S, Gonzalez FJ. Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. *Pharmacol Ther.* 2017;179:142-157. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.011
 100. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343-1351. doi:10.1172/JCI23621
 101. Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, et al. Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC. *EMBO Mol Med.* 2009;1(5):280-287. doi:10.1002/emmm.200900037
 102. Mouzaki M, Allard JP. The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46(6):457-467. doi:10.1097/MCG.0b013e31824cf51e
 103. PK L, S S, Y Z, et al. Saturated Fat Is More Metabolically Harmful for the Human Liver Than Unsaturated Fat or Simple Sugars. *Diabetes Care.* 2018;41(8):1732-1739. doi:10.2337/DC18-0071
 104. Chiu S, Mulligan K, Schwarz JM. Dietary carbohydrates and fatty liver disease: De

- novo lipogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018;21(4):277-282.
doi:10.1097/MCO.0000000000000469
105. Mardinoglu A, Wu H, Bjornson E, et al. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell Metab*. 2018;27(3):559-571.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.01.005
 106. Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, Nagaya T, Komatsu M, Tanaka E. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World J Gastroenterol*. 2019;25(2):163-177. doi:10.3748/wjg.v25.i2.163
 107. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2019;68(2):359-370. doi:10.1136/gutjnl-2018-316307
 108. Zhang L, Nichols RG, Correll J, et al. Persistent Organic Pollutants Modify Gut Microbiota-Host Metabolic Homeostasis in Mice Through Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Environ Health Perspect*. 2015;123(7):679-688. doi:10.1289/ehp.1409055
 109. Targher G, Day CP, Bonora E. *Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Vol 363.; 2010.
 110. Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut*. 2018;67(5):963-972. doi:10.1136/gutjnl-2017-315691
 111. Lim S, Taskinen MR, Borén J. Crosstalk between nonalcoholic fatty liver disease and cardiometabolic syndrome. *Obes Rev*. 2019;20(4):599-611. doi:10.1111/obr.12820
 112. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(6):1889-1895. doi:10.2337/diabetes.51.6.1889
 113. Hamirani YS, Katz R, Nasir K, et al. Association between inflammatory markers and liver fat: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiol*. 5. doi:10.4172/2155-9880.1000344
 114. Jialal I, Kaur H, Devaraj S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(1):39-48. doi:10.1210/jc.2013-3092
 115. Ha T, Liu L, Kelley J, Kao R, Williams D, Li C. Toll-like receptors: new players in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1875-1893. doi:10.1089/ars.2010.3723
 116. Delaunay-Moisan A, Appenzeller-Herzog C. The antioxidant machinery of the endoplasmic reticulum: Protection and signaling. *Free Radic Biol Med*. 2015;83:341-351. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.019
 117. Błachnio-Zabielska AU, Pułka M, Baranowski M, et al. Ceramide metabolism is affected by obesity and diabetes in human adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2012;227(2):550-557. doi:10.1002/jcp.22745
 118. Sattar N, Scherbakova O, Ford I, et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes*. 2004;53(11):2855-2860. doi:10.2337/diabetes.53.11.2855

119. Hanley AJG, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2005;54(11):3140-3147. doi:10.2337/diabetes.54.11.3140
120. Ter Horst KW, Gilijamse PW, Versteeg RI, et al. Hepatic Diacylglycerol-Associated Protein Kinase C ϵ Translocation Links Hepatic Steatosis to Hepatic Insulin Resistance in Humans. *Cell Rep*. 2017;19(10):1997-2004. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.035
121. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology*. 2014;59(2):713-723. doi:10.1002/hep.26672
122. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(39):16381-16385. doi:10.1073/pnas.1113359108
123. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 2016;126(1):12-22. doi:10.1172/JCI77812
124. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab*. 2011;14(5):575-585. doi:10.1016/j.cmet.2011.07.015
125. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. *Hypertension, Diabetes, Atherosclerosis and NASH: Cause or Consequence?*
126. Lee Y, Kim SU, Song K, et al. Sarcopenia is associated with significant liver fibrosis independently of obesity and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Nationwide surveys (KNHANES 2008-2011). *Hepatology*. 2016;63(3):776-786. doi:10.1002/hep.28376
127. Zhang H-J, Zhang X-F, Ma Z-M, et al. Irisin is inversely associated with intrahepatic triglyceride contents in obese adults. *J Hepatol*. 2013;59(3):557-562. doi:10.1016/j.jhep.2013.04.030
128. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-468. doi:10.1038/nature10777
129. Stienstra R, Saudale F, Duval C, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor α activity. *Hepatology*. 2010;51(2):511-522. doi:10.1002/hep.23337
130. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):90-100. doi:10.1038/nrendo.2014.185
131. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Yao Chang Liu, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-1419. doi:10.1016/S0016-5085(99)70506-8
132. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(3):238-246. doi:10.1097/01.mol.0000226115.97436.c0
133. Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. doi:10.1016/j.cell.2010.02.034
134. Lim S, Koo BK, Cho SW, et al. Association of adiponectin and resistin with

- cardiovascular events in Korean patients with type 2 diabetes: the Korean atherosclerosis study (KAS): a 42-month prospective study. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):398-404. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.017
135. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(10):371-379. doi:10.1016/j.tem.2008.08.005
136. Seksik P, Landman C. Understanding Microbiome Data: A Primer for Clinicians. *Dig Dis*. 2015;33:11-16. doi:10.1159/000437034
137. Aragonès G, González-Garc S, Aguilar C, Richart C, Auguet T. Gut Microbiota-Derived Mediators as Potential Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 2019. doi:10.1155/2019/8507583
138. Han R, Ma J, Li H. Mechanistic and therapeutic advances in non-alcoholic fatty liver disease by targeting the gut microbiota. *Front Med*. 2018;12(6):645-657. doi:10.1007/s11684-018-0645-9
139. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(7):412-425. doi:10.1038/nrgastro.2016.85
140. Chassaing B, Gewirtz AT. Gut microbiota, low-grade inflammation, and metabolic syndrome. *Toxicol Pathol*. 2014;42(1):49-53. doi:10.1177/0192623313508481
141. Acharya C, Bajaj JS. Gut Microbiota and Complications of Liver Disease. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.013
142. Rau M, Rehman A, Dittrich M, et al. Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease. *United Eur Gastroenterol J*. 2018;6(10):1496-1507. doi:10.1177/2050640618804444
143. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-15723. doi:10.1073/pnas.0407076101
144. Ye JZ, Li YT, Wu WR, et al. Dynamic alterations in the gut microbiota and metabolome during the development of methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(23):2468-2481. doi:10.3748/wjg.v24.i23.2468
145. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-185. doi:10.1038/nature10809
146. Sharifnia T, Antoun J, Verriere TGC, et al. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(4):G270-G278. doi:10.1152/ajpgi.00304.2014
147. Kapil S, Duseja A, Sharma BK, et al. Small intestinal bacterial overgrowth and toll-like receptor signaling in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(1):213-221. doi:10.1111/jgh.13058
148. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story. *Gut*. 2015;64(5):830-841. doi:10.1136/gutjnl-2014-306842
149. Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(12):2062-2070. doi:10.1016/j.cgh.2015.07.029

150. Sanyal AJ. Putting non-alcoholic fatty liver disease on the radar for primary care physicians: how well are we doing? *BMC Med.* 2018;16(1):148. doi:10.1186/s12916-018-1149-9
151. Jennison E, Patel J, Scorletti E, Byrne CD. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgr Med J.* 2019;95:314-322. doi:10.1136/postgradmedj-2018-136316
152. Zhou JH, She ZG, Li HL, Cai JJ. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. *World J Gastroenterol.* 2019;25(11):1307-1326. doi:10.3748/wjg.v25.i11.1307
153. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2019;156(5):1264-1281.e4. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.036
154. Hu X-Y, Li Y, Li L-Q, et al. Risk factors and biomarkers of non-alcoholic fatty liver disease: an observational cross-sectional population survey. *BMJ Open.* 2018;8(4):e019974. doi:10.1136/bmjopen-2017-019974
155. Sheth H, Bagasrawala S, Shah M, Ansari R, Olithselvan A, Lakdawala M. The HAALT Non-invasive Scoring System for NAFLD in Obesity. *Obes Surg.* 2019;29(8):2562-2570. doi:10.1007/s11695-019-03880-x
156. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461-1465. doi:10.1038/ng.257
157. Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GL-H, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(8):461-478. doi:10.1038/s41575-018-0014-9
158. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(10):1209-1222. doi:10.1111/apt.12963
159. Zhou Y-J, Zhou Y-F, Zheng J-N, et al. NAFL screening score: A basic score identifying ultrasound-diagnosed non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta.* 2017;475:44-50. doi:10.1016/j.cca.2017.09.020
160. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol.* 2010;53(2):372-384. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.008
161. Corey KE, Klebanoff MJ, Tramontano AC, Chung RT, Hur C. Screening for Nonalcoholic Steatohepatitis in Individuals with Type 2 Diabetes: A Cost-Effectiveness Analysis. *Dig Dis Sci.* 2016;61(7):2108-2117. doi:10.1007/s10620-016-4044-2
162. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: A meta-analysis. *Hepatology.* 2011;54(3):1082-1090. doi:10.1002/hep.24452
163. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;67(1):328-357. doi:10.1002/hep.29367
164. Zhang B, Ding F, Chen T, Xia LH, Qian J, Lv GY. Ultrasound hepatic/renal ratio and hepatic attenuation rate for quantifying liver fat content. *World J Gastroenterol.*

- 2014;20(47):17985-17992. doi:10.3748/wjg.v20.i47.17985
165. de Lédinghen V, Vergniol J, Foucher J, Merrouche W, le Bail B. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int.* 2012;32(6):911-918. doi:10.1111/j.1478-3231.2012.02820.x
 166. Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology.* 2017;66(5):1486-1501. doi:10.1002/hep.29302
 167. Jennison E, Patel J, Scorletti E, Byrne CD. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J.* 2019;95(1124):314-322. doi:10.1136/postgradmedj-2018-136316
 168. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2017;152(3):598-607.e2. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.026
 169. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology.* 2016;150(3):626-637.e7. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.048
 170. Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver Int.* 2013;33(9):1398-1405. doi:10.1111/liv.12226
 171. Maximos M, Bril F, Portillo Sanchez P, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2015;61(1):153-160. doi:10.1002/hep.27395
 172. He L, Deng L, Zhang Q, et al. Diagnostic Value of CK-18, FGF-21, and Related Biomarker Panel in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9729107. doi:10.1155/2017/9729107
 173. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32(11-12):1315-1322. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x
 174. Grigorescu M, Crisan D, Radu C, Grigorescu MD, Sparchez Z, Serban A. A novel pathophysiologicalbased panel of biomarkers for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(4):347-353.
 175. Huang J-F, Yeh M-L, Huang C-F, et al. Cytokeratin-18 and uric acid predicts disease severity in Taiwanese nonalcoholic steatohepatitis patients. *PLoS One.* 2017;12(5):e0174394. doi:10.1371/journal.pone.0174394
 176. Qi S, Xu D, Li Q, et al. Metabonomics screening of serum identifies pyroglutamate as a diagnostic biomarker for nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta.* 2017;473:89-95. doi:10.1016/j.cca.2017.08.022
 177. Shen J, Chan HL-Y, Wong GL-H, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol.* 2012;56(6):1363-1370. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.025

178. Tietge UJF, Schmidt HH-J, Schütz T, Dippe P, Lochs H, Pirlich M. Reduced plasma adiponectin in NASH: central obesity as an underestimated causative risk factor. *Hepatology*. 2005;41(2):401; author reply 401-2. doi:10.1002/hep.20546
179. Puljiz Z, Stimac D, Kovac D, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis in patients with elevated alanine aminotransferase activity. *Coll Antropol*. 2010;34 Suppl 1:33-37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402293>. Accessed January 20, 2020.
180. Canbakan B, Senturk H, Tahan V, et al. Clinical, biochemical and histological correlations in a group of non-drinker subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Gastroenterol Belg*. 70(3):277-284. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074737>. Accessed January 20, 2020.
181. Zhou Y, Orešič M, Leivonen M, et al. Noninvasive Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Clinical Markers and Circulating Levels of Lipids and Metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(10):1463-1472.e6. doi:10.1016/j.cgh.2016.05.046
182. Pavlides M, Banerjee R, Tunnicliffe EM, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging for the assessment of non-alcoholic fatty liver disease severity. *Liver Int*. 2017;37(7):1065-1073. doi:10.1111/liv.13284
183. Liu C-H, Ampuero J, Gil-Gómez A, et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2018;69(6):1335-1348. doi:10.1016/j.jhep.2018.08.008
184. Pirola CJ, Gianotti TF, Castaño GO, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: From serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*. 2015;64(5):800-812. doi:10.1136/gutjnl-2014-306996
185. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, et al. Molecular Sciences miR33a/miR33b* and miR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. doi:10.3390/ijms17101620
186. Becker PP, Rau M, Schmitt J, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142661. doi:10.1371/journal.pone.0142661
187. Verdam FJ, Dallinga JW, Driessen A, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: a non-invasive diagnosis by analysis of exhaled breath. *J Hepatol*. 2013;58(3):543-548. doi:10.1016/j.jhep.2012.10.030
188. Hagström H, Nasr P, Ekstedt M, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol*. 2017;67(6):1265-1273. doi:10.1016/j.jhep.2017.07.027
189. Polyzos SA, Slavakis A, Koumerkeridis G, Katsinelos P, Kountouras J. Noninvasive Liver Fibrosis Tests in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An External Validation Cohort. *Horm Metab Res*. 2019;51(2):134-140. doi:10.1055/a-0713-1330
190. Hansen JF, Juul Nielsen M, Nyström K, et al. PRO-C3: a new and more precise collagen marker for liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53(1):83-87. doi:10.1080/00365521.2017.1392596
191. Daniels SJ, Leeming DJ, Eslam M, et al. ADAPT: An Algorithm Incorporating PRO-C3 Accurately Identifies Patients With NAFLD and Advanced Fibrosis. *Hepatology*. 2019;69(3):1075-1086. doi:10.1002/hep.30163

192. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2005;25(4):779-786. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01064.x
193. Miele L, De Michele T, Marrone G, et al. Enhanced liver fibrosis test as a reliable tool for assessing fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease in a clinical setting. *Int J Biol Markers.* 2017;32(4):e397-e402. doi:10.5301/ijbm.5000292
194. Ishiba H, Sumida Y, Tanaka S, et al. The novel cutoff points for the FIB4 index categorized by age increase the diagnostic accuracy in NAFLD: a multi-center study. *J Gastroenterol.* 2018;53(11):1216-1224. doi:10.1007/s00535-018-1474-y
195. Hardy T, Zeybel M, Day CP, et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2017;66(7):1321-1328. doi:10.1136/gutjnl-2016-311526
196. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;65(3):570-578. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.023
197. Kwok R, Tse Y-K, Wong GL-H, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(3):254-269. doi:10.1111/apt.12569
198. Leung VY, Shen J, Wong VW, et al. Quantitative elastography of liver fibrosis and spleen stiffness in chronic hepatitis B carriers: comparison of shear-wave elastography and transient elastography with liver biopsy correlation. *Radiology.* 2013;269(3):910-918. doi:10.1148/radiol.13130128
199. Karagoz E, Ozturker C, Sonmez G. Noninvasive Evaluation of Liver Fibrosis: Supersonic Shear Imaging or Acoustic Radiation Force Impulse Imaging? *Radiology.* 2016;279(3):979-980. doi:10.1148/radiol.2016152532
200. Liu H, Fu J, Hong R, Liu L, Li F. Acoustic Radiation Force Impulse Elastography for the Non-Invasive Evaluation of Hepatic Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients: A Systematic Review & Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(7):e0127782. doi:10.1371/journal.pone.0127782
201. Singh S, Venkatesh SK, Loomba R, et al. Magnetic resonance elastography for staging liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease: a diagnostic accuracy systematic review and individual participant data pooled analysis. *Eur Radiol.* 2016;26(5):1431-1440. doi:10.1007/s00330-015-3949-z
202. 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(4):643-54.e1-9; quiz e39-40. doi:10.1016/j.cgh.2014.04.014
203. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2011;54(1):344-353. doi:10.1002/hep.24376
204. Caussy C, Reeder SB, Sirlin CB, Loomba R. Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDFF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology.* 2018;68(2):763-772. doi:10.1002/hep.29797
205. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease

- in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1264-1281.e4. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.036
206. Francque S, Vonghia L. Pharmacological Treatment for Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Adv Ther*. 2019;36(5):1052-1074. doi:10.1007/s12325-019-00898-6
 207. Ampuero J, Sánchez-Torrijos Y, Aguilera V, Bellido F, Romero-Gómez M. New therapeutic perspectives in non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol*. 2018;41(2):128-142. doi:10.1016/j.gastrohep.2017.07.006
 208. Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2017;70(2):115. doi:10.1016/j.rec.2017.01.002
 209. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(2):367-378.e5. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.005
 210. Corey KE, Rinella ME. Medical and Surgical Treatment Options for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1387-1397. doi:10.1007/s10620-016-4083-8
 211. Povsic M, Oliver L, Jiandani NR, Perry R, Bottomley J. A structured literature review of interventions used in the management of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Pharmacol Res Perspect*. 2019;7(3). doi:10.1002/prp2.485
 212. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-357. doi:10.1002/hep.29367
 213. Ratziu V, Goodman Z, Sanyal A. Current efforts and trends in the treatment of NASH. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S65-75. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.041
 214. Chen Z, Yu Y, Cai J, Li H. Emerging Molecular Targets for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2019;30(12):903-914. doi:10.1016/j.tem.2019.08.006
 215. Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2012;15(5):665-674. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.004
 216. Wang Y-D, Chen W-D, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology*. 2008;48(5):1632-1643. doi:10.1002/hep.22519
 217. Kim SG, Kim BK, Kim K, Fang S. Bile Acid Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor: Therapeutic Target for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea)*. 2016;31(4):500-504. doi:10.3803/EnM.2016.31.4.500
 218. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2015;385(9972):956-965. doi:10.1016/S0140-6736(14)61933-4
 219. Cariou B, Hanf R, Lambert-Porcheron S, et al. Dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist GFT505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes Care*. 2013;36(10):2923-2930. doi:10.2337/dc12-2012
 220. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, et al. Hepatoprotective effects of the dual

- peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2013;58(6):1941-1952. doi:10.1002/hep.26461
221. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1147-1159.e5. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.038
 222. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley K V., et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-1685. doi:10.1056/NEJMoa0907929
 223. Boettcher E, Csako G, Pucino F, Wesley R, Loomba R. Meta-analysis: Pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(1):66-75. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04912.x
 224. Younossi ZM, Loomba R, Rinella ME, et al. Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2018;68(1):361-371. doi:10.1002/hep.29724
 225. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-2157. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054
 226. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10019):679-690. doi:10.1016/S0140-6736(15)00803-X
 227. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(12):1175-1183. doi:10.1001/jama.2020.2298
 228. Rotman Y, Sanyal AJ. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2017;66(1):180-190. doi:10.1136/gutjnl-2016-312431
 229. Safadi R, Konikoff FM, Mahamid M, et al. The fatty acid-bile acid conjugate Aramchol reduces liver fat content in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(12):2085-91.e1. doi:10.1016/j.cgh.2014.04.038
 230. Zhao H, Lv F, Liang G, et al. FGF19 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by modulating the GSK3 β / β -catenin signaling cascade via FGFR4 activation. *Oncotarget*. 2016;7(12):13575-13586. doi:10.18632/oncotarget.6185
 231. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, et al. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10126):1174-1185. doi:10.1016/S0140-6736(18)30474-4
 232. Ogawa Y, Yoneda M, Kobayashi T, et al. Present and emerging pharmacotherapies for non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(1):69-82. doi:10.1080/14656566.2018.1543403
 233. Cable EE, Finn PD, Stebbins JW, et al. Reduction of hepatic steatosis in rats and mice after treatment with a liver-targeted thyroid hormone receptor agonist. *Hepatology*. 2009;49(2):407-417. doi:10.1002/hep.22572
 234. Loomba R, Kayali Z, Nouredin M, et al. GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and

- Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1463-1473.e6. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.027
235. Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Pablo Frias J, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), PEGylated FGF21, in Patients with Obesity and Type 2 Diabetes: Results from a Randomized Phase 2 Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2019;27(1):41-49. doi:10.1002/oby.22344
 236. Cui J, Philo L, Nguyen P, et al. Sitagliptin vs. placebo for non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *J Hepatol*. 2016;65(2):369-376. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.021
 237. Joy TR, McKenzie CA, Tirona RG, et al. Sitagliptin in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, placebo-controlled trial. *World J Gastroenterol*. 2017;23(1):141-150. doi:10.3748/wjg.v23.i1.141
 238. LI Y, LIU L, WANG B, WANG J, CHEN D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Reports*. 2013;1(1):57-64. doi:10.3892/br.2012.18
 239. Malhotra N, Beaton MD. Management of non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol*. 2015;7(30):2962-2967. doi:10.4254/wjh.v7.i30.2962
 240. Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, et al. Effect of empagliflozin on liver fat in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care*. 2018;41(8):1801-1808. doi:10.2337/dc18-0165
 241. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(1):79-104. doi:10.1002/hep.23623
 242. Loomba R, Sirlin CB, Ang B, et al. Ezetimibe for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Assessment by novel magnetic resonance imaging and magnetic resonance elastography in a randomized trial (MOZART trial). *Hepatology*. 2015;61(4):1239-1250. doi:10.1002/hep.27647
 243. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019;140(11):e596-e646. doi:10.1161/CIR.0000000000000678
 244. Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, et al. Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol*. 2015;63(3):705-712. doi:10.1016/j.jhep.2015.05.006
 245. Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. 2013;58(4):1461-1473. doi:10.1002/hep.26429
 246. Ratzu V, Sanyal A, Harrison SA, et al. Cenicriviroc Treatment for Adults with Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis: Final Analysis of the Phase 2b CENTAUR Study. *Hepatology*. January 2020. doi:10.1002/hep.31108
 247. Tacke F. Cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(3):301-311. doi:10.1080/13543784.2018.1442436
 248. Shiffman M, Freilich B, Vuppalanchi R, et al. Randomised clinical trial: emricasan

- versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(1):64-73. doi:10.1111/apt.15030
249. Yu Y, Cai J, She Z, Li H. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Adv Sci.* 2019;6(4). doi:10.1002/advs.201801585
 250. Cai J, Zhang XJ, Li H. Role of Innate Immune Signaling in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(10):712-722. doi:10.1016/j.tem.2018.08.003
 251. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology.* 2018;67(2):549-559. doi:10.1002/hep.29514
 252. Wang PX, Ji YX, Zhang XJ, et al. Targeting CASP8 and FADD-like apoptosis regulator ameliorates nonalcoholic steatohepatitis in mice and nonhuman primates. *Nat Med.* 2017;23(4):439-449. doi:10.1038/nm.4290
 253. Zhang P, Wang PX, Zhao LP, et al. The deubiquitinating enzyme TNFAIP3 mediates inactivation of hepatic ASK1 and ameliorates nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Med.* 2018;24(1):84-94. doi:10.1038/nm.4453
 254. Ji YX, Zhang P, Zhang XJ, et al. The ubiquitin E3 ligase TRAF6 exacerbates pathological cardiac hypertrophy via TAK1-dependent signalling. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/ncomms11267
 255. Wang PX, Zhang XJ, Luo P, et al. Hepatocyte TRAF3 promotes liver steatosis and systemic insulin resistance through targeting TAK1-dependent signalling. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/ncomms10592
 256. Ji YX, Huang Z, Yang X, et al. The deubiquitinating enzyme cylindromatosis mitigates nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Med.* 2018;24(2):213-223. doi:10.1038/nm.4461
 257. Hu J, Zhu XH, Zhang XJ, et al. Targeting TRAF3 signaling protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol.* 2016;64(1):146-159. doi:10.1016/j.jhep.2015.08.021
 258. Inokuchi-Shimizu S, Park EJ, Roh YS, et al. TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2014;124(8):3566-3578. doi:10.1172/JCI74068
 259. Morioka S, Sai K, Omori E, Ikeda Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 regulates hepatic lipid homeostasis through SREBP. *Oncogene.* 2016;35(29):3829-3838. doi:10.1038/onc.2015.453
 260. Zelber-Sagi S, Kessler A, Brazowsky E, et al. A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial of Orlistat for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(5):639-644. doi:10.1016/j.cgh.2006.02.004
 261. Fredrickson P, Boules M, Richelson E. Neurotensin agonists in the regulation of food intake. *Int J Obes.* 2014;38(3):474. doi:10.1038/ijo.2013.129
 262. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2007;46(4):1081-1090. doi:10.1002/hep.21763
 263. Araya J, Rodrigo R, Pettinelli P, Araya AV, Poniachik J, Videla LA. Decreased liver fatty Acid δ -6 and δ -5 desaturase activity in obese patients. *Obesity.* 2010;18(7):1460-1463. doi:10.1038/oby.2009.379
 264. Sanyal AJ, Abdelmalek MF, Suzuki A, Cummings OW, Chojkier M. No significant

- effects of ethyl-eicosapentanoic acid on histologic features of nonalcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial. *Gastroenterology*. 2014;147(2). doi:10.1053/j.gastro.2014.04.046
265. He XX, Wu XL, Chen RP, et al. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2016;11(10). doi:10.1371/journal.pone.0162368
266. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001;121(1):91-100. doi:10.1053/gast.2001.25540
267. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med*. 2012;366(17):1567-1576. doi:10.1056/NEJMoa1200225
268. Ikramuddin S, Korner J, Lee WJ, et al. Roux-en-Y gastric bypass vs intensive medical management for the control of type 2 diabetes, hypertension, and hyperlipidemia: The diabetes surgery study randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2013;309(21):2240-2249. doi:10.1001/jama.2013.5835
269. Peterli R, Wölnerhanssen B, Peters T, et al. Improvement in glucose metabolism after bariatric surgery: Comparison of laparoscopic roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: A prospective randomized trial. *Ann Surg*. 2009;250(2):234-241. doi:10.1097/SLA.0b013e3181ae32e3
270. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, et al. Bariatric surgery reduces features of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Gastroenterology*. 2015;149(2):379-388. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.014
271. Klebanoff MJ, Corey KE, Chhatwal J, Kaplan LM, Chung RT, Hur C. Bariatric surgery for nonalcoholic steatohepatitis: A clinical and cost-effectiveness analysis. *Hepatology*. 2017;65(4):1156-1164. doi:10.1002/hep.28958
272. Bower G, Toma T, Harling L, et al. Bariatric Surgery and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review of Liver Biochemistry and Histology. *Obes Surg*. 2015;25(12):2280-2289. doi:10.1007/s11695-015-1691-x
273. Lee YM, Low HC, Lim LG, et al. Intra-gastric balloon significantly improves nonalcoholic fatty liver disease activity score in obese patients with nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Gastrointest Endosc*. 2012;76(4):756-760. doi:10.1016/j.gie.2012.05.023
274. 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(4):1249-1253. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.061
275. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015;148(3):547-555. doi:10.1053/j.gastro.2014.11.039
276. Malhi H, Allen AM, Watt KD. Nonalcoholic fatty liver: Optimizing pretransplant selection and posttransplant care to maximize survival. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(2):99-106. doi:10.1097/MOT.0000000000000283
277. Heimbach JK, Watt KDS, Poterucha JJ, et al. Combined liver transplantation and gastric sleeve resection for patients with medically complicated obesity and end-stage liver disease. *Am J Transplant*. 2013;13(2):363-368.

- doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04318.x
278. Martin S, Vincent JP, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci*. 2003;23(4):1198-1205. doi:10.1523/jneurosci.23-04-01198.2003
 279. Li J, Song J, Zaytseva YY, et al. An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity. *Nature*. 2016;533:411-415. doi:10.1038/nature17662
 280. Schroeder LE, Leininger GM. Role of central neurotensin in regulating feeding: Implications for the development and treatment of body weight disorders. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2018;1864(3):900-916. doi:10.1016/j.bbdis.2017.12.036
 281. Smith KE, Boules M, Williams K, Fauq AH, Richelson E. The role of NTS2 in the development of tolerance to NT69L in mouse models for hypothermia and thermal analgesia. *Behav Brain Res*. 2011;224(2):344-349. doi:10.1016/j.bbr.2011.06.014
 282. Woodworth HL, Beekly BG, Batchelor HM, et al. Lateral Hypothalamic Neurotensin Neurons Orchestrate Dual Weight Loss Behaviors via Distinct Mechanisms. *Cell Rep*. 2017;21(11):3116-3128. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.068
 283. Xiao S, Shiloach J, Grisshammer R. Construction of recombinant HEK293 cell lines for the expression of the neurotensin receptor NTSR1. In: *G Protein-Coupled Receptor Screening Assays: Methods and Protocols*. Vol 1272. Springer New York; 2015:51-64. doi:10.1007/978-1-4939-2336-6_4
 284. Drewe J, Mihailovic S, D'Amato M, Beglinger C. Regulation of fat-stimulated neurotensin secretion in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1964-1970. doi:10.1210/jc.2007-2238
 285. Gui X, Dobner PR, Carraway RE. Endogenous neurotensin facilitates enterohepatic bile acid circulation by enhancing intestinal uptake in rats. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(6 44-6). doi:10.1152/ajpgi.2001.281.6.g1413
 286. Mustain WC, Rychahou PG, Evers BM. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(1):75-82. doi:10.1097/MED.0b013e3283419052
 287. Blackburn AM, Bloom SR, Long RG, et al. EFFECT OF NEUROTENSIN ON GASTRIC FUNCTION IN MAN. *Lancet*. 1980;315(8176):987-989. doi:10.1016/S0140-6736(80)91434-8
 288. Chunchai T, Samniang B, Sripetchwandee J, et al. Vagus Nerve Stimulation Exerts the Neuroprotective Effects in Obese-Insulin Resistant Rats, Leading to the Improvement of Cognitive Function. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep26866
 289. Guillemot-Legris O, Masquelier J, Everard A, Cani PD, Alhouayek M, Muccioli GG. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1). doi:10.1186/s12974-016-0666-8
 290. Pratchayasakul W, Sa-nguanmoo P, Sivasinprasasn S, et al. Obesity accelerates cognitive decline by aggravating mitochondrial dysfunction, insulin resistance and synaptic dysfunction under estrogen-deprived conditions. *Horm Behav*. 2015;72:68-77. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.04.023
 291. Stranahan AM, Hao S, Dey A, Yu X, Baban B. Blood-brain barrier breakdown

- promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(12):2108-2121. doi:10.1177/0271678X16642233
292. Näslund E, Melin I, Grybäck P, et al. Reduced food intake after jejunoileal bypass: A possible association with prolonged gastric emptying and altered gut hormone patterns. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(1):26-32. doi:10.1093/ajcn/66.1.26
 293. Christ-Crain M, Stoeckli R, Ernst A, et al. Effect of gastric bypass and gastric banding on proneurotensin levels in morbidly obese patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3544-3547. doi:10.1210/jc.2006-0256
 294. Ernst A, Hellmich S, Bergmann A. Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation. *Peptides.* 2006;27(7):1787-1793. doi:10.1016/j.peptides.2006.01.021
 295. Saiyasit N, Sripetchwandee J, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Potential roles of neurotensin on cognition in conditions of obese-insulin resistance. *Neuropeptides.* 2018;72:12-22. doi:10.1016/j.npep.2018.09.002
 296. Ratner C, Skov LJ, Raida Z, et al. Effects of peripheral neurotensin on appetite regulation and its role in gastric bypass surgery. *Endocrinology.* 2016;157(9):3482-3492. doi:10.1210/en.2016-1329
 297. Kothari V, Luo Y, Tornabene T, et al. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2017;1863(2):499-508. doi:10.1016/j.bbadis.2016.10.006
 298. Pintana H, Apaijai N, Kerdphoo S, et al. Hyperglycemia induced the Alzheimer's proteins and promoted loss of synaptic proteins in advanced-age female Goto-Kakizaki (GK) rats. *Neurosci Lett.* 2017;655:41-45. doi:10.1016/j.neulet.2017.06.041
 299. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, et al. Low Circulating Levels of Neurotensin in Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Severe Obesity. *Obesity.* 2018. doi:10.1002/oby.22058
 300. Villar B, Bertran L, Aguilar C, et al. Circulating Levels of Pro-Neurotensin and Its Relationship with Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatic Lipid Metabolism. 2021.
 301. Kleiner DE, Brunt EM, Natta M Van, et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 2005. doi:10.1002/hep.20701
 302. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(9):2467-2474. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x
 303. Butler MG, Nelson TA, Driscoll DJ, Manzardo AM. High plasma neurotensin levels in children with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2015;167(8):1773-1778. doi:10.1002/ajmg.a.37103
 304. Pedro-Botet J, Benaiges D. Neurotensin and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Beyond Obesity. *Obesity.* 2018;26(2):251. doi:10.1002/oby.22100
 305. Barchetta I, Cimini FA, Leonetti F, et al. Increased Plasma Proneurotensin Levels Identify NAFLD in Adults with and Without Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(6):2253-2260. doi:10.1210/jc.2017-02751
 306. Barchetta I, Bertocchini L, Sentinelli F, et al. Circulating pro-neurotensin levels

- predict bodyweight gain and metabolic alterations in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021;31(3):902-910. doi:10.1016/j.numecd.2020.11.025
307. Dongiovanni P, Meroni M, Petta S, et al. Neurotensin up-regulation is associated with advanced fibrosis and hepatocellular carcinoma in patients with MAFLD. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(10). doi:10.1016/j.bbalip.2020.158765
308. Chatrath H, Vuppalanchi R, Chalasani N. Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2012;32(1):22-29. doi:10.1055/s-0032-1306423
309. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán Á. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(27):12228-12232. doi:10.1073/pnas.1005191107
310. Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2010;6(5):657-691. doi:10.2217/fca.10.86
311. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, et al. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0100778

X. ANNEXES

Article

Circulating Levels of Pro-Neurotensin and Its Relationship with Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatic Lipid Metabolism

Beatriz Villar ¹, Laia Bertran ² , Carmen Aguilar ², Jessica Binetti ¹, Salomé Martínez ³, Fàtima Sabench ⁴,
Monica Real ¹, David Riesco ¹, Marta París ⁴, Daniel Del Castillo ⁴, Cristóbal Richart ² and Teresa Auguet ^{1,2,*} 

¹ Servei Medicina Interna, Hospital Universitari Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, 4, 43007 Tarragona, Spain; beatrizvillarnavas@gmail.com (B.V.); jessica.binetti@gmail.com (J.B.); mreal.hj23.ics@gencat.cat (M.R.); driesco.hj23.ics@gencat.cat (D.R.)

² Grup d'Estudi de Malalties Metabòliques associades a Insulino Resistència (GEMMAIR)–AGAUR, Departament de Medicina i Cirurgia, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, 4, 43007 Tarragona, Spain; laia.bertran@urv.cat (L.B.); caguilar.hj23.ics@gencat.cat (C.A.); crichart.hj23.ics@gencat.cat (C.R.)

³ Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari Joan XXIII Tarragona, 4, 43007 Tarragona, Spain; mgonzalez.hj23.ics@gencat.cat

⁴ Servei de Cirurgia, Hospital Sant Joan de Reus, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. Avinguda, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili, 2, 43204 Reus, Spain; fatima.sabench@urv.cat (F.S.); marta.paris@urv.cat (M.P.); danieldelcastillo@urv.cat (D.D.C.)

* Correspondence: tauguet.hj23.ics@gencat.cat; Tel.: +34-977-29-58-33



Citation: Villar, B.; Bertran, L.; Aguilar, C.; Binetti, J.; Martínez, S.; Sabench, F.; Real, M.; Riesco, D.; París, M.; Del Castillo, D.; et al. Circulating Levels of Pro-Neurotensin and Its Relationship with Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatic Lipid Metabolism. *Metabolites* **2021**, *11*, 373. <https://doi.org/10.3390/metabo11060373>

Academic Editor: Manfredi Rizzo

Received: 19 May 2021

Accepted: 7 June 2021

Published: 10 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recent studies suggest a link between pro-neurotensin (pro-NT) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), but the published data are conflicting. Thus, we aimed to analyze pro-NT levels in women with morbid obesity (MO) and NAFLD to investigate if this molecule is involved in NAFLD and liver lipid metabolism. Plasma levels of pro-NT were determined in 56 subjects with MO and 18 with normal weight (NW). All patients with MO were subclassified according to their liver histology into the normal liver (NL, $n = 20$) and NAFLD ($n = 36$) groups. The NAFLD group had 17 subjects with simple steatosis (SS) and 19 with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). We used a chemiluminescence sandwich immunoassay to quantify pro-NT in plasma and RT-qPCR to evaluate the hepatic mRNA levels of several lipid metabolism-related genes. We reported that pro-NT levels were significantly higher in MO with NAFLD than in MO without NAFLD. Additionally, pro-NT levels were higher in NASH patients than in NL. The hepatic expression of lipid metabolism-related genes was found to be altered in NAFLD, as previously reported. Additionally, although pro-NT levels correlated with LDL, there was no association with the main lipid metabolism-related genes. These findings suggest that pro-NT could be related to NAFLD progression.

Keywords: pro-neurotensin; neurotensin; nonalcoholic fatty liver disease; nonalcoholic steatohepatitis; lipid metabolism

1. Introduction

The most common cause of chronic liver disease in adults and children is a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), associated with the global obesity epidemic and metabolic syndrome [1,2]. Due to this clinical magnitude, it has become a priority to improve our knowledge about its pathophysiology to find effective treatments [3]. One molecule related to the pathophysiology of obesity is neurotensin (NT). However, its relationship with NAFLD is uncertain.

NT is a 13 amino acid peptide that is expressed and released in the central nervous system and the gastrointestinal tract, predominantly in specialized enteroendocrine cells of the small intestine [4]. NT is involved in the metabolism of nutrients, such as the metabolism of fats in the small intestine [5]. Moreover, this molecule can also act as a

neuromodulator that regulates the anorectic effect [6]. Increased plasma levels of pro-neurotensin (pro-NT), a stable precursor fragment of NT, are associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus (T2DM), cardiovascular disease, and death [7]. Previous reports from human and animal studies suggest a relationship between obesity and NT. Plasma NT levels have been found to be lower in patients with morbid obesity (MO) than in normal-weight (NW) controls [8]. In addition, after gastric band and bypass surgeries, an increase in NT levels has been observed [9,10]. Postprandial plasma pro-NT levels (relative to neuromedin N levels) have also been shown to be enhanced after gastric bypass surgery, which suggests the regulation of pro-NT secretion is altered in human obesity [11]. Moreover, another study reported that three months after gastric bypass surgery, there was a significant release of NT in some patients, while there were undetectable levels prior to the surgery when patients underwent an oral glucose test [12]. However, subjects with obesity and/or insulin resistance (IR) presented elevated plasma pro-NT levels [5]. In addition, fasting pro-NT levels were reported to be associated with T2DM, cardiovascular disease, and breast cancer without obesity [7]. Additionally, NT-deficient mice showed a significant reduction in intestinal lipid absorption and were protected from progressing to obesity, hepatic steatosis, and IR induced by a high-fat diet [5]. In humans, the same study demonstrated that elevated plasma pro-NT was associated with obesity and IR and increased the risk of developing obesity in the future for NW subjects.

Regarding NAFLD, our research group was the first to analyze circulating levels of NT in women with MO and NAFLD. We found significantly lower levels of NT in patients with MO and NAFLD than in NW subjects or patients with MO without NAFLD [8]. However, Barchetta et al. [13,14] subsequently reported that subjects with NAFLD had elevated plasma pro-NT levels relative to those without NAFLD. Furthermore, these authors demonstrated that circulating levels of pro-NT were positively correlated with the presence and severity of NAFLD. These results, which conflicted with ours, made us reconsider our previous study of NT and its relationship with NAFLD. This contradiction could be due to the variability of analyzing plasma levels of NT [15] or to other unknown reasons.

In the previous study, we found declined levels of NT in NASH [8]. Therefore, we could hypothesize that NT degradation patterns can be altered during NASH. Given the short half-life of NT (2–6 min in humans), it seems that the degradation of the peptide is close to its site of release, the gut. This suggests that NT is a hormone that targets the intestine itself or the liver through gut–liver axis circulation [16]. On the other hand, although it was found that some peptidases, such as endopeptidase 3.4.24.16, which contributes to the NT degradation [17], used to be enhanced in the animal model of obesity [18], the NT degradation pattern in NASH has not been described. Therefore, further studies are needed to clarify this fact.

Given that NT is an unstable peptide, the main objective of the current study was to analyze the plasma pro-NT levels in women with NAFLD and MO, which was the same cohort as the one used in our previous study [8]. Given that NT is an intestinal peptide released after fat ingestion that facilitates lipid absorption [19] and lipid metabolism, it seems to be related to the pathogenesis of NAFLD. Thus, the second objective was to analyze the possible relationship between hepatic mRNA expression of the main genes related to lipid metabolism and pro-NT levels to explore the link between pro-NT and NAFLD pathogenesis.

2. Results

2.1. Baseline Characteristics of the Subjects

The general characteristics and biochemical determinations of the cohort studied are presented in Table 1. First, we classified the subjects based on their body mass index (BMI) in two groups: women with NW ($n = 18$) and women with MO ($n = 56$). These groups were comparable in terms of age ($p = 0.079$). MO patients presented significantly increased levels ($p < 0.05$) of fasting glucose, insulin, homeostasis model assessment of IR (HOMA2-IR), glycated hemoglobin (Hb1Ac), triglycerides (TG), and total cholesterol

than NW women. High-density lipoprotein cholesterol (HDLc) was more significantly decreased in the MO group than in the NW group ($p < 0.001$). The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP) were higher in MO patients compared to those of NW ($p < 0.001$).

Table 1. Anthropometric and biochemical variables of the study classified according to the BMI and the hepatic histopathological classification.

Variables	NW (n = 18)	MO (n = 56)		NAFLD (n = 36)	
		NL (n = 20)	NAFLD (n = 36)	SS (n = 17)	NASH (n = 19)
Age (years)	43.50 ± 6.73	44.54 ± 10.02	48 ± 9.79	46.19 ± 10.78	49.63 ± 8.78
Weight (kg)	54.2 (51–65.43) ^a	115.5 (41.54–50.79)	119.5 (109–129.75)	120 (109.80–134)	119 (107–123)
BMI (kg/m ²)	21.97 (20.79–24.08) ^a	46.41 (41.53–50.79)	46.5 (44.03–51.69)	46.87 (43.03–56.09)	46.2 (44.26–48.59)
WC (cm)	71.5 (68.5–82.5) ^a	125.25 (115–144)	130 (124–136.5)	133 (124–137)	129 (122.75–133)
Glucose (mg/dL)	90 (84.5–98.50) ^a	83 (76–95)	116 (103–152) ^b	115.5 (101.50–139.25) ^c	116 (103–152) ^d
Insulin (mUI/L)	7.8 (4.90–10.06) ^a	11 (7.31–14.03)	16.31 (10.69–24.26) ^b	17.6 (10.60–25.4)	15.24 (10.78–22.50) ^d
HOMA2-IR	1.05 (0.60–1.30) ^a	1.15 (0.90–1.65)	2.3 (1.45–3.4) ^b	2.65 (1.30–3.45)	2 (1.50–3.20) ^d
HbA1c (%)	5 (4.6–5.3) ^a	5 (4.6–5.3)	5.5 (5–6.5) ^b	5.8 (5–6.2) ^c	5.1 (4.9–6.6)
Cholesterol (mg/dL)	197.59 ± 30.21 ^a	166.60 ± 29.64	181.14 ± 34.12	177.25 ± 36.29	184.42 ± 32.81
HDLc (mg/dL)	64 (49.75–73) ^a	48 (40–57)	38.10 (35.75–43.25) ^b	36.5(29–41.05) ^c	41 (36.75–44) ^d
LDLc (mg/dL)	114.46 ± 28.85	89.61 ± 25.27	107.01 ± 29.12 ^b	105.49 ± 30.69	108.53 ± 28.38 ^d
Triglycerides (mg/dL)	85 (52.5–169.25) ^a	124 (75–167)	162 (122.50–239) ^b	168 (109.37–243.75)	160 (124–239)
AST (UI/L)	19.5 (15.25–22.50) ^a	21 (18.25–26.25)	32 (24.75–54) ^b	31.5 (25.25–54) ^c	36.5 (20.50–52.50) ^d
ALT (UI/L)	15 (11.50–20.50) ^a	18.5 (16–27.25)	35 (27–53) ^b	33 (27.50–51.25) ^c	37 (24–62) ^d
GGT (UI/L)	11 (9–21) ^a	17 (10.50–26)	27.5 (15.75–43) ^b	30 (16–41)	25 (15–66)
ALP (UI/L)	55.71 ± 14.67 ^a	60.33 ± 11.49	70.80 ± 15.71 ^b	68.87 ± 15.58 ^c	72.51 ± 16.07 ^d

¹ NW, normal weight; MO, morbid obesity; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; BMI, body mass index; WC, waist circumference; HOMA2-IR, homeostatic model assessment method 2 of insulin resistance; HbA1c, glycosylated hemoglobin; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; ALP, alkaline phosphatase. Data are expressed as the mean ± standard deviation or median (interquartile range), depending on the distribution of the variables. ^a Significant differences between NW subjects and patients with MO ($p < 0.05$). ^b Significant differences between patients with NL and NAFLD ($p < 0.05$). ^c Significant differences between patients with NL and SS ($p < 0.05$). ^d Significant differences between patients with NL and NASH ($p < 0.05$).

Then, we classified MO patients according to their liver histopathological classification as NL ($n = 20$) or NAFLD ($n = 36$). It was found that the levels of glucose, insulin, HOMA2-IR, HbA1c, low-density lipoprotein cholesterol (LDLc), and TG were more significantly increased in NAFLD subjects than in NL subjects ($p < 0.05$). Furthermore, HDLc was significantly decreased in women with MO and NAFLD ($p = 0.005$). Regarding liver enzymes, AST, ALT, and ALP were higher in patients with NAFLD ($p < 0.05$).

2.2. Circulating Levels of Pro-Neurotensin in the Cohort Studied

First, we studied the differential levels of pro-NT between women with MO and women with NW, but we did not find significant differences, as shown in Figure 1A. Then, when we determined whether there were differences in pro-NT levels between diabetic and non-diabetic patients with MO; we found higher levels of pro-NT in diabetic patients, as shown in Figure 1B. Finally, when we studied pro-NT differential levels between diabetic and non-diabetic subjects in the cohort with MO and NAFLD, we found no significant differences ($p = 0.133$).

On the other hand, we also determined whether pro-NT levels were different depending on to the presence or absence of NAFLD. In this analysis, we found significantly higher pro-NT levels in women with MO and NAFLD than in MO women without NAFLD, as shown in Figure 1C. Additionally, to study the possible role of pro-NT in NAFLD progression, the cohort with MO was classified into NL, SS, and NASH. In this sense, we found that there were significant differences between NL and NASH group. However, we did not find differences between NL and SS subjects or between SS and NASH groups, as shown in Figure 1D.

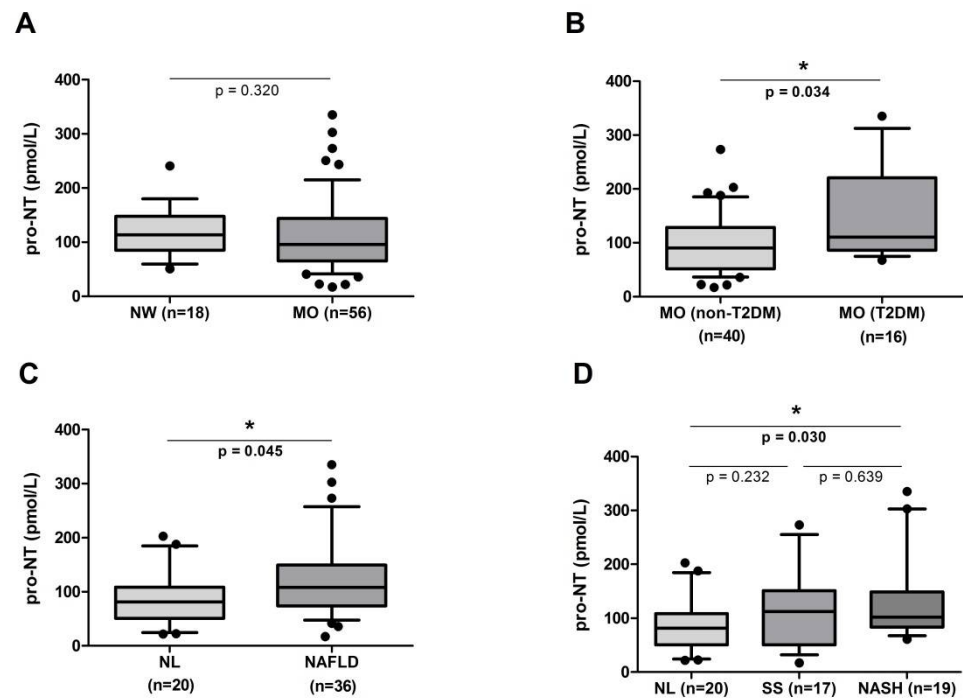


Figure 1. (A) Serum levels of pro-NT in women with NW and women with MO. (B) Serum levels of pro-NT in diabetic women with MO and non-diabetic women with MO. (C) Serum levels of pro-NT in women with MO and NL vs. NAFLD. (D) Serum levels of pro-NT in women with MO and NL vs. SS vs. NASH. NW, normal weight; MO, morbid obesity; NL, normal liver; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis. * $p < 0.05$ is considered statistically significant.

Given that pro-NT levels can be affected by the use of antidiabetic drugs, we aimed to determine whether there were differential levels of pro-NT between those patients with or without antidiabetic medication, but we did not find significant differences in the MO cohort ($p = 0.267$) or in the NAFLD cohort ($p = 0.198$). Regarding dyslipidemia treatment, there were no significant differences in pro-NT plasma levels in those patients with or without lipid-lowering drugs in any cohort of patients: MO cohort ($p = 0.864$), NAFLD cohort ($p = 0.412$).

2.3. Hepatic Expression of the Main Genes Related to the Liver Lipid Metabolism

We analyzed the hepatic expression of the genes involved in the hepatic lipid metabolism (sterol regulatory element-binding (SREBP) 1c, SREBP2, ATP-binding cassette sub-family G member 1 (ABCG1c), ATP binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A), carnitine O-octanoyltransferase (CROT), peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α , PPAR δ , PPAR γ , fatty acid synthase (FAS), liver X receptor α (LXR α), farnesoid X receptor (FXR), and fatty acid-binding proteins (FABP)) in accordance with the presence or absence of NAFLD and the liver histopathological classification, but we only found significant differences in SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR α , PPAR δ , and PPAR γ mRNA expressions, as shown in Figure 2.

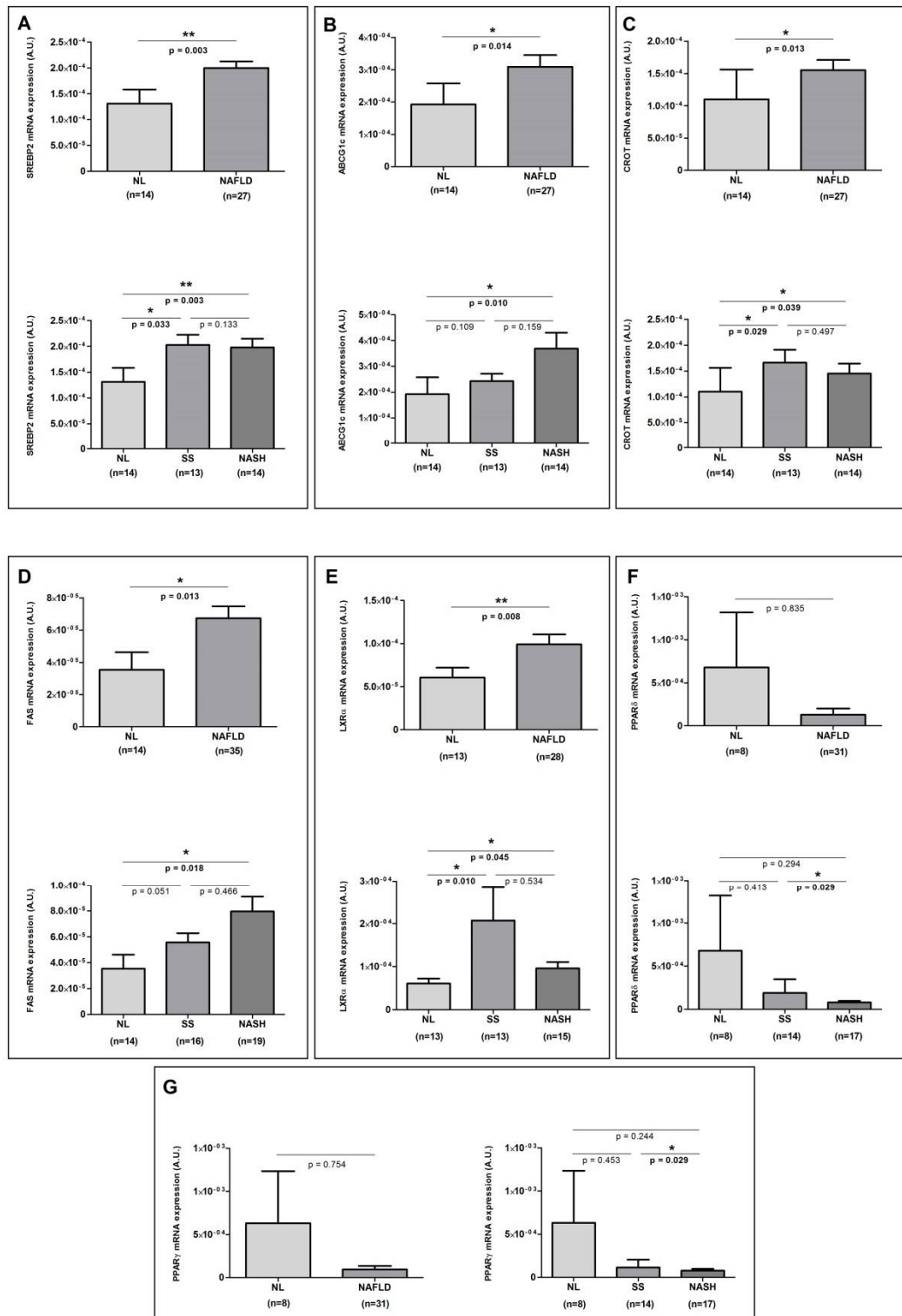


Figure 2. Differential mRNA hepatic expression of SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR α , PPAR δ , and PPAR γ between NL vs. NAFLD groups and between NL, SS, and NASH groups. NL; normal liver; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SREBP2, sterol regulatory element-binding protein 2; ABCG1c, ATP-binding cassette (ABC) transporter 1c; CROT, carnitine O-octanoyltransferase; FAS, fatty acid synthase; LXR α , liver X receptor alpha; PPAR δ , peroxisome proliferator-activated receptor delta and PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma. * $p < 0.05$ is considered statistically significant.

2.4. Correlations of Pro-NT Levels with Biochemical and Clinical Parameters and with the Hepatic Expression of the Main Lipid Metabolism-Related Genes to the Liver

First, as we found differential pro-NT levels according to the presence of NAFLD, we aimed to determine whether there was a relationship between the circulating levels of pro-NT and lobular inflammation or the presence of hepatic ballooning, but we were unable to find any significant correlation ($\rho = 0.190$; $p = 0.157$) and ($\rho = 0.173$; $p = 0.199$), respectively).

Then, given that a relationship was described between pro-NT with the lipid absorption at the intestinal level, we also attempted to determine whether there is any type of association, in this sense, between the plasma levels of pro-NT with lipid metabolic parameters and with mRNA expression of the main genes related to the hepatic lipid metabolism. In regard to the biochemical parameters representing lipid metabolism, we found a positive correlation between pro-NT levels and LDLc levels (Figure 3).

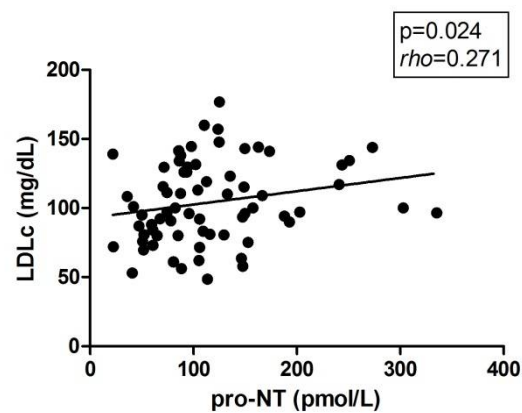


Figure 3. Correlation between plasma pro-NT and LDLc levels. Pro-NT, pro-neurotensin; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol. $p < 0.05$ is considered statistically significant.

Finally, when we analyzed the association of pro-NT levels with the hepatic expression of lipid metabolism-related genes (SREBP1c, SREBP2, ABCG1c, ABCA1, ACC1, CPT1A, CROT, PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , FAS, LXR α , FXR, and FABP), we did not find any significant correlation.

3. Discussion

In this study, we aimed to re-evaluate the role of the neurotensin peptide in NAFLD pathogenesis (analyzing pro-NT levels instead of NT, given its instability) in a cohort of women with NAFLD associated with obesity and, also, to investigate its relationship with lipid metabolism. The most relevant findings indicate that women with NAFLD associated with MO had higher levels of pro-NT than women with MO without NAFLD. Additionally, pro-NT levels were higher in NASH patients than in the normal liver group. Moreover, these pro-NT levels positively correlated with LDLc levels; however, there was no association with the hepatic mRNA expression of hepatic genes related to the lipid metabolism.

On the one hand, we have to point out that in the present study, we did not find significant differences between pro-NT levels in women with NW and women with MO, similarly to previous studies [20]. On the other hand, patients with NAFLD demonstrated higher levels of pro-NT than patients with MO in the absence of NAFLD. Therefore, NAFLD presence, but not obesity, was associated with high plasma levels of pro-NT. These results are similar to the studies of Barchetta et al. [13,14] and contradict our previous results that reported low levels of NT in women with MO and NAFLD [8]. These differences could be due to the molecule analyzed, because in our previous study [8], we analyzed NT levels in NAFLD for the first time. As some authors suggested later, pro-NT, a fragment precursor of NT, is a more stable molecule [15], which could explain these discrepancies.

In the current study, we analyzed pro-NT levels according to the hepatic histological classification, and we found significant differences between NL and NASH groups. However, we did not find relevant differences between SS and NASH as was reported in the study of Barchetta et al. [20]. This is probably due to the differential characteristics between populations, such as age, sex, and BMI.

Additionally, we could not find any association between levels of pro-NT and the presence of lobular inflammation or hepatic ballooning, as was reported in a recent study by Dongiovanni et al. [21]. These authors also described an interesting association between several NT genetic variants with advanced fibrosis and hepatocarcinoma in NAFLD patients, which likely affects NT protein activity.

With all this evidence, some authors considered pro-NT to be a peptide involved in the NAFLD/NASH pathogenesis through increased absorption of intestinal lipids and the induction of proinflammatory conditions in adipose tissue [15].

Finally, we determined whether pro-NT was related to lipid metabolism, given that NT can increase intestinal lipid absorption [13]. The only relationship we found was a positive correlation with LDLc levels. Our results were in agreement with Barchetta et al. study, where they also found a positive correlation between LDLc levels and pro-NT [13]. This association can be explained by different facts. First, our obese patients did not present severe dyslipidemia; only 15 of them presented mild dyslipidemia, and 9 of these patients were under statins treatment. Second, our MO patients underwent a very-low-calorie diet three months prior to the surgery, while our patients with NW followed a normal diet; thus, MO patients had lower levels of LDLc than NW subjects. Finally, in MO patients, as NAFLD progresses, pro-NT levels increase, promoting intestinal lipid absorption and triggering the increase in circulating LDLc [22].

Then, we analyzed the hepatic expression of some genes related to lipid metabolism. Accordingly, we found differential expression of SREBP2, ABCG1c, CROT, FAS, LXR α , PPAR δ , and PPAR γ in our cohort of patients with MO with or without NAFLD. In this sense, our NAFLD patients showed increased expression levels of SREBP2 and ABCG1, genes involved in lipoprotein secretion, and CROT and FAS, which are related to lipid oxidation and hepatic lipid accumulation [23,24]. Meanwhile, our NAFLD patients reported decreased levels of PPAR δ and PPAR γ , which were previously related to an increase in the insulin sensitivity [25]. When we evaluated the possible relationship of pro-NT levels with the hepatic expression of these lipid metabolism-related genes, we were unable to demonstrate any associations. In this sense, in the study of Barchetta et al. [14], plasma pro-NT levels were associated with high TG levels after adjustment for multiple confounders [20].

It is important to mention that although our studied population made it possible to establish a clear relationship between women with MO and NAFLD and the alteration of pro-NT levels, without the interference of confounding factors, such as sex or age, these results cannot be extrapolated to men, women of other ages, or individuals that are overweight or NW. Some patients in our cohort were on oral antidiabetic and lipid-lowering treatments, which are drugs with potential implications on the transport of bile that have been shown to affect the secretion of other intestinal peptides [26]. For this reason, the effect of these treatments on pro-NT levels was studied, but we did not find significant differences between patients with or without these therapies.

4. Materials and Methods

4.1. Subjects

The study was approved by the institutional review board (23c/2015), and all participants gave written informed consent. The study population was 74 Caucasian women: 18 controls with NW (BMI < 25 kg/m²) and 56 women with MO (BMI > 40 kg/m²). We conducted the study only in women to avoid interference from various confounders, such as gender. Liver biopsies were obtained from women with MO during planned laparoscopic bariatric surgery. All biopsies were indicated for clinical diagnostic purposes.

Diagnosis of NAFLD was made by using the following criteria: hepatic pathology and an intake of ethanol less than 10 g per day. The exclusion criteria for patients with MO were: (1) concurrent use of drugs that cause hepatic steatosis; (2) patients that take lipid-lowering medications, including peroxisome PPAR α or PPAR γ agonists; (3) diabetic patients receiving insulin or taking medications that were likely to influence endogenous insulin levels; (4) menopausal and postmenopausal patients or those patients taking contraceptive treatment; and (5) patients with an acute illness or current evidence of inflammatory diseases, acute or chronic infections, or end-stage malignant diseases.

In the cohort of subjects with MO, 16 women had T2DM, a diagnosis based on the guidelines of the American Diabetes Association, of which 88% presented antidiabetic treatment. Regarding women with NAFLD, 14 of them had T2DM. In addition, 15 women of the whole cohort presented dyslipidemia, of which 60% were receiving lipid-lowering treatment. Hypertension was present in 27 women of the whole cohort, of which 78% received antihypertensive treatment.

4.2. Sample Size

Accepting an α risk of 0.05 and a β risk of < 0.2 in a bilateral contrast, 20 participants per group were needed to detect a difference ≥ 0.2 units. It was assumed that the common standard deviation (SD) was 0.3.

4.3. Liver Pathology

Hepatic samples were scored by an experienced hepatopathologist using the methods described elsewhere [27,28]. Depending on their liver pathology, patients with MO were subclassified by using the following classification: NL histology ($n = 20$); SS (micro/macrovesicular steatosis without inflammation or fibrosis, $n = 17$); and NASH ($n = 19$).

4.4. Biochemical Analyses

A complete anthropometrical, biochemical, and physical examination was carried out on each patient. Biochemical parameters were analyzed using a conventional automated analyzer after 12 h fasting. IR was estimated using HOMA2-IR.

Pro-NT levels were measured using the sphingotest[®] pro-NT assay (SphingoTec GmbH, Hennigsdorf, Germany). This is a chemiluminescence sandwich immunoassay using two monoclonal antibodies directed against pro-NT (tracer and capture antibody). The assay was calibrated using dilutions of native pro-NT. Samples/calibrators (50 μ L) were pipetted into white polystyrene coated 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Austria). After adding labeled anti-pro-NT mAb (200 μ L), the microtiter plates were incubated for 20 h at 22 °C without agitation. Unbound tracer was removed using washing solution (350 μ L per well, four times), and remaining chemiluminescence was measured for 1 s per well using the Centro LB 960 microtiter plate luminescence reader (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany). The pro-NT level was determined using a five-point calibration curve (5.9–482 pmol/L). Calibrators and samples were run in duplicate with a required $< 15\%$ coefficient of variation between the duplicates. The mean value of duplicates of each sample was reported. The analytical sensitivity (limit of detection) was < 3 pmol/L, and the measurable range was 5.9–482 pmol/L.

4.5. Gene Expression in the Liver

Hepatic samples collected during bariatric surgery were conserved in RNeasy lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) at 4 °C and then processed and stored at -80 °C. Total RNA was extracted from tissues by using the RNeasy mini kit (Qiagen, Barcelona, Spain). Reverse transcription to cDNA was performed with the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Real-time quantitative PCR was performed with the TaqMan Assay predesigned by Applied Biosystems for the detection of SREBP1c, SREBP2, ABCG1c, ABCA1, ACC1, CPT1A, CROT, PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , FAS, LXR α , FXR, and FABP. The

expression of each gene was calculated relative to the expression of 18S RNA. All reactions were carried in duplicate in 96-well plates using the 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

4.6. Statistical Analysis

The data were analyzed using the SPSS/PC+ for Windows statistical package (version 23.0; SPSS, Chicago, IL, USA). The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the distribution of variables. Continuous variables were reported as the mean (standard deviation); non-continuous variables were reported as the median and the interquartile range. The different comparative analyses were performed using a nonparametric Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis test, according to the presence of two or more groups. The strength of the association between variables was calculated using Spearman’s method. *p*-values < 0.05 were statistically significant.

5. Conclusions

In conclusion, our study confirmed that pro-NT levels are elevated in NAFLD/NASH and associated with LDLc levels. Therefore, although further studies are necessary to confirm the pro-NT role in NAFLD progression and to evaluate this molecule as a possible NASH therapeutic target, it does seem to be related to the development of this prevalent disease.

Author Contributions: Conceptualization, T.A. and B.V.; methodology, L.B.; software, C.A.; validation, T.A., B.V. and C.R.; formal analysis, B.V.; investigation, B.V., L.B. and T.A.; resources, J.B., S.M., F.S., M.R., M.P., D.R. and D.D.C.; data curation, T.A.; writing—original draft preparation, B.V.; writing—review and editing, T.A. and L.B.; visualization, T.A.; supervision, T.A.; project administration, T.A. and C.R.; funding acquisition, T.A. and C.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Instituto de Salud Carlos III through the project PI16/00498 (to Teresa Auguet) (Co-funded by European Regional Development Fund “A way to make Europe”), by funds from Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris de Recerca (AGAUR 2017 SGR 357 to Cristóbal Richart) and the Grup de Recerca en Medicina Aplicada URV (2016PFR-URV-B2-72 to Cristóbal Richart), and by the Fundació Biociència.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Institut d’Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) CEIm; 23c/2015; 11th May 2015.”

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Younossi, Z.; Anstee, Q.M.; Marietti, M.; Hardy, T.; Henry, L.; Eslam, M.; George, J.; Bugianesi, E. Global Burden of NAFLD and NASH: Trends, Predictions, Risk Factors and Prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 11–20. [[CrossRef](#)]
2. Marchesini, G.; Day, C.P.; Dufour, J.F.; Canbay, A.; Nobili, V.; Ratziu, V.; Tilg, H.; Roden, M.; Gastaldelli, A.; Yki-Jarvinen, H.; et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1388–1402. [[CrossRef](#)]
3. Blüher, M. Adipose Tissue Dysfunction Contributes to Obesity Related Metabolic Diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *27*, 163–177. [[CrossRef](#)]
4. Saiyasit, N.; Sripetchwandee, J.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S.C. Potential Roles of Neurotensin on Cognition in Conditions of Obese-Insulin Resistance. *Neuropeptides* **2018**, *72*, 12–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Li, J.; Song, J.; Zaytseva, Y.Y.; Liu, Y.; Rychahou, P.; Jiang, K.; Starr, M.E.; Kim, J.T.; Harris, J.W.; Yiannikouris, F.B.; et al. An Obligatory Role for Neurotensin in High-Fat-Diet-Induced Obesity. *Nature* **2016**, *533*, 411–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Schroeder, L.E.; Leininger, G.M. Role of Central Neurotensin in Regulating Feeding: Implications for the Development and Treatment of Body Weight Disorders. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 900–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Melander, O.; Maisel, A.S.; Almgren, P.; Manjer, J.; Belting, M.; Hedblad, B.; Engström, G.; Kilger, U.; Nilsson, P.; Bergmann, A.; et al. Plasma Proneurotensin and Incidence of Diabetes, Cardiovascular Disease, Breast Cancer, and Mortality. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2012**, *308*, 1469–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Auguet, T.; Aragonès, G.; Berlanga, A.; Martínez, S.; Sabench, F.; Aguilar, C.; Villar, B.; Sirvent, J.J.; Del Castillo, D.; Richart, C.; et al. Low Circulating Levels of Neurotensin in Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Severe Obesity. *Obesity* **2018**, *26*, 274–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Weiss, H.; Labeck, B.; Klocker, J.; Nehoda, H.; Mittermair, R.; Aigner, F.; Gadenstätter, M.; Schwelberger, H.; Wetscher, G. Effects of Adjustable Gastric Banding on Altered Gut Neuropeptide Levels in Morbidly Obese Patients. *Obes. Surg.* **2001**, *11*, 735–739. [[CrossRef](#)]
10. Näslund, E.; Melin, I.; Grybäck, P.; Hägg, A.; Hellström, P.M.; Jacobsson, H.; Theodorsson, E.; Rössner, S.; Backman, L. Reduced Food Intake after Jejunioleal Bypass: A Possible Association with Prolonged Gastric Emptying and Altered Gut Hormone Patterns. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *66*, 26–32. [[CrossRef](#)]
11. Christ-Crain, M.; Stoeckli, R.; Ernst, A.; Morgenthaler, N.G.; Bilz, S.; Korbonits, M.; Struck, J.; Bergmann, A.; Müller, B.; Keller, U. Effect of Gastric Bypass and Gastric Banding on Proneurotensin Levels in Morbidly Obese Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 3544–3547. [[CrossRef](#)]
12. Holdstock, C.; Zethelius, B.; Sundbom, M.; Karlsson, F.A.; Edén Engström, B. Postprandial Changes in Gut Regulatory Peptides in Gastric Bypass Patients. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, 1640–1646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Barchetta, I.; Cimini, F.A.; Capoccia, D.; Bertocchini, L.; Ceccarelli, V.; Chiappetta, C.; Leonetti, F.; Di Cristofano, C.; Silecchia, G.; Orho-Melander, M.; et al. Neurotensin Is a Lipid-Induced Gastrointestinal Peptide Associated with Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nutrients* **2018**, *10*, 526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Barchetta, I.; Cimini, F.A.; Leonetti, F.; Capoccia, D.; Di Cristofano, C.; Silecchia, G.; Orho-Melander, M.; Melander, O.; Cavallo, M.G. Increased Plasma Proneurotensin Levels Identify NAFLD in Adults with and Without Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *103*, 2253–2260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Okubo, H.; Kushiya, A.; Nakatsu, Y.; Yamamotoya, T.; Matsunaga, Y.; Fujishiro, M.; Sakoda, H.; Ohno, H.; Yoneda, M.; Asano, T. Roles of Gut-Derived Secretory Factors in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Their Possible Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Leeman, S.E.; Carraway, R.E. Neurotensin: Discovery, Isolation, Characterization, Synthesis and Possible Physiological Roles. *Ann. NY Acad. Sci.* **1982**, *400*, 1–16. [[CrossRef](#)]
17. Barelli, H.; Fox-Threlkeld, J.E.T.; Dive, V.; Daniel, E.E.; Vincent, J.P.; Checler, F. Role of Endopeptidase 3.4.24.16 in the Catabolism of Neurotensin, in Vivo, in the Vascularly Perfused Dog Ileum. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112*, 127–132. [[CrossRef](#)]
18. Cavalcanti, D.M.L.P.; Castro, L.M.; Rosa Neto, J.C.; Seelaender, M.; Neves, R.X.; Oliveira, V.; Forti, F.L.; Iwai, L.K.; Gozzo, F.C.; Todiras, M.; et al. Neurolysin Knockout Mice Generation and Initial Phenotype Characterization. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 15426–15440. [[CrossRef](#)]
19. Gui, X.; Dobner, P.R.; Carraway, R.E. Endogenous Neurotensin Facilitates Enterohepatic Bile Acid Circulation by Enhancing Intestinal Uptake in Rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *281*, 1413–1422. [[CrossRef](#)]
20. Barchetta, I.; Bertocchini, L.; Sentinelli, F.; Bailetti, D.; Marini, G.; Cimini, F.A.; Ceccarelli, V.; Struck, J.; Schulte, J.; Loche, S.; et al. Circulating Pro-Neurotensin Levels Predict Bodyweight Gain and Metabolic Alterations in Children. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2021**, *31*, 902–910. [[CrossRef](#)]
21. Dongiovanni, P.; Meroni, M.; Petta, S.; Longo, M.; Alisi, A.; Soardo, G.; Valenti, L.; Miele, L.; Grimaudo, S.; Pennisi, G.; et al. Neurotensin Up-Regulation Is Associated with Advanced Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Patients with MAFLD. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids* **2020**, *1865*, 158765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chatrath, H.; Vuppalachchi, R.; Chalasani, N. Dyslipidemia in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* **2012**, *32*, 022–029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Marquart, T.J.; Allen, R.M.; Ory, D.S.; Baldan, A. MiR-33 Links SREBP-2 Induction to Repression of Sterol Transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12228–12232. [[CrossRef](#)]
24. Auguet, T.; Aragonès, G.; Berlanga, A.; Guiu-Jurado, E.; Martí, A.; Martínez, S.; Sabench, F.; Hernández, M.; Aguilar, C.; Sirvent, J.; et al. MiR33a/MiR33b* and MiR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *IJMS* **2016**, *17*, 1620. [[CrossRef](#)]
25. Azhar, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Future Cardiol.* **2010**, *6*, 657–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Napolitano, A.; Miller, S.; Nicholls, A.W.; Baker, D.; Van Horn, S.; Thomas, E.; Rajpal, D.; Spivak, A.; Brown, J.R.; Nunez, D.J. Novel Gut-Based Pharmacology of Metformin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2005**, *41*, 1313–1321. [[CrossRef](#)]
28. Brunt, E.M.; Janney, C.G.; Di Bisceglie, M.A.; Neuschwander-Tetri, B.; Bacon, B.R. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 2467–2474. [[CrossRef](#)]

Low Circulating Levels of Neurotensin in Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Severe Obesity

Teresa Auguet^{1,2*}, Gemma Aragonès^{1*}, Alba Berlanga¹, Salomé Martínez³, Fàtima Sabench⁴, Carmen Aguilar¹, Beatriz Villar², Joan Josep Sirvent³, Daniel Del Castillo⁴, and Cristóbal Richart^{1,2}

Objective: This study was performed to investigate neurotensin plasma levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with severe obesity.

Methods: The plasma levels of neurotensin in 20 women with normal weight and 51 women with morbid obesity (MO) were measured, and women were subclassified according to their hepatic histology as having MO without NAFLD ($n = 18$) or MO with NAFLD ($n = 33$). The NAFLD group included 15 women with simple steatosis (SS) and 18 women with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). To quantify neurotensin in plasma, a multiplex sandwich immunoassay with a Luminex magnetic bead-based platform was used.

Results: Neurotensin levels were significantly decreased ($P = 0.001$) in women with MO and NAFLD (3.62 ± 0.85 ng/mL), compared with women with MO and normal liver function (11.65 ± 1.95 ng/mL; $P = 0.001$) and women with normal weight (13.68 ± 2.58 ng/mL; $P = 0.001$). There was no difference in levels between women with SS and women with NASH ($P = 0.415$).

Conclusions: Circulating levels of neurotensin were decreased in women with NAFLD associated with MO.

Obesity (2017) 00, 00–00. doi:10.1002/oby.22058

Introduction

Because of the clinical magnitude of the problem of obesity and its metabolic complications, it has now become a priority to find new treatments and improve our understanding of its pathophysiology (1).

Neurotensin is a 13–amino acid peptide expressed in the central nervous system and gastrointestinal tract (2,3). It is involved in many of the digestive regulatory mechanisms of the gut (4). The peripheral secretion of neurotensin is stimulated by food intake, especially by fat, and is known to regulate gastrointestinal motility (5). Neurotensin has various digestive functions: it stimulates biliary and pancreatic secretions and inhibits gastric acid secretion and jejunum-ileum motility (6,7). In this regard, changes in the basal and postprandial plasma levels of neurotensin have been found in patients with gastroesophageal reflux disease (8). Some studies in humans and animal models suggest a link between neurotensin and obesity. Plasma neurotensin levels have been observed

to be lower in subjects with morbid obesity (MO) than in controls with normal weight (9). Moreover, after gastric banding and bypass surgeries, neurotensin levels have been shown to increase (9–11). It also has been shown that the postprandial plasma neurotensin concentration is increased after gastric bypass treatment, suggesting that regulation of neurotensin secretion is disturbed in human obesity (12,13). A recent study showed that both subjects with obesity and subjects with insulin resistance (IR) had increased plasma levels of proneurotensin (14). Fast-ing proneurotensin has also been associated with the development of diabetes, cardiovascular disease, and breast cancer in subjects without obesity (15). However, conflicting data have been published about animal models. Li et al. found that neurotensin-deficient mice had reduced intestinal fat absorption and were protected from obesity and IR associated with high fat consumption (14).

Obesity and metabolic syndrome are associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), and there are few known factors that

¹ Research Group on Metabolic Diseases and Insulin Resistance, Department of Medicine and Surgery, Pere Virgili Institute of Health Research, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain. Correspondence: Cristóbal Richart (crichart.hj23.ics@gencat.cat) ² Internal Medicine Service, Joan XXIII University Hospital Tarragona, Tarragona, Spain ³ Pathological Anatomy Service, Joan XXIII University Hospital Tarragona, Tarragona, Spain ⁴ Surgery Service, Department of Medicine and Surgery, Sant Joan de Reus Hospital, Pere Virgili Institute of Health Research, Rovira i Virgili University, Reus, Spain.

See Commentary, pg. X.

Funding agencies: This study was supported by the Health Research Fund and The European Regional Development Fund (P116/00498, to Teresa Auguet), by funds from the Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR 2009 SGR 959, to Cristóbal Richart) and the Applied Medicine Research Group, Rovira i Virgili University (2010 PFR-URV-B2-14, to Cristóbal Richart), and by the Bioscience Foundation.

Disclosure: The authors declared no conflict of interest.

*Teresa Auguet and Gemma Aragonès contributed equally to this work.

Received: 7 July 2017; **Accepted:** 28 September 2017; **Published online** 00 Month 2017. doi:10.1002/oby.22058

relate both processes. Although the role of neurotensin in obesity has been studied, its role in NAFLD is unknown. In order to improve the knowledge of obesity pathophysiology and its metabolic complications, the aim of the present study was to analyze plasma levels of neurotensin in patients with NAFLD associated with severe obesity and to evaluate their relationship.

Methods

Subjects

The study was approved by the institutional review board (Comité d'Ética d'Investigació Clínica, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona), and all participants gave written informed consent. The study population consisted of 71 women: 20 controls with normal weight (BMI < 25 kg/m²) and 51 women with MO (BMI > 40 kg/m²). Liver biopsies from women with MO were obtained during planned laparoscopic bariatric surgery. All biopsies were used for the purpose of clinical diagnosis. NAFLD was diagnosed by using the following criteria: liver pathology and an intake of less than 10 g of ethanol per day. The exclusion criteria for patients with MO were described elsewhere (16). We conducted the study only in women in order to avoid the interference of several confounding factors, such as gender.

In the cohort of subjects with obesity, 16 women had type 2 diabetes mellitus (DM), a diagnosis based on American Diabetes Association guidelines. Forty-two percent of NAFLD women had type 2 DM. Four of them were following a dietetic treatment, and twelve were taking an antidiabetic medication. In addition, 13 women had dyslipidemia, and 7 of them received lipid-lowering therapy.

Liver pathology

Liver samples were scored by experienced hepatopathologists by using the methods described elsewhere (17,18). Depending on their liver pathology, patients with MO were subclassified by using the following groups: normal liver (NL) histology ($n = 18$), simple steatosis (SS) (micro/macrovacular steatosis without inflammation or fibrosis, $n = 15$), and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) ($n = 18$).

Biochemical analyses

Biochemical parameters were analyzed by using a conventional automated analyzer after 12 hours of fasting. IR was estimated by using the homeostasis model assessment 2 of IR (HOMA2-IR).

Plasma neurotensin levels were determined with a multiplex sandwich immunoassay by using the MILLIPLEX MAP Human Neuro-peptide Magnetic Bead Panel kit (MilliporeSigma, Burlington, Massachusetts) and the Bio-Plex 200 instrument at the Center for Omic Sciences (Rovira i Virgili University), according to the manufacturer's instructions (19).

Statistical analysis

All values reported are expressed as the mean \pm SD. Differences between the study groups were calculated by using Student *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA). The strength of association between variables was calculated by using the Pearson method (parametric variables) and the Spearman ρ -correlation test (nonparametric variables). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Baseline characteristics of subjects

The general characteristics and biochemical measurements of the population studied are shown in Table 1. First, we classified the patients, assigning them to two groups on the basis of their BMI: women with normal weight (BMI < 25 kg/m²; $n = 20$) and women with MO (BMI > 40 kg/m²; $n = 51$). The two groups were comparable in terms of age ($P = 0.175$). As expected, biochemical analyses indicated that patients with MO had significantly higher levels of fasting glucose, insulin, glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), HOMA2-IR, triglycerides, and total cholesterol ($P < 0.05$) than normal-weight women. High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was significantly lower in the patients with MO than in the group with normal weight ($P < 0.001$).

Next, we classified the patients with MO according to their liver pathology, categorizing them as having an NL ($n = 18$) or as having NAFLD ($n = 33$). We found that glucose, HbA_{1c}, triglycerides, and low-density lipoprotein cholesterol levels were significantly higher in patients with NAFLD than in patients with an NL ($P < 0.05$). Also, HDL-C was significantly lower in women with MO and NAFLD ($P = 0.008$). Regarding hepatic enzymes, aspartate transaminase, alanine transaminase, and alkaline phosphatase activity was higher in patients with NAFLD ($P < 0.05$).

Circulating levels of neurotensin in the population studied

We quantified the plasma levels of neurotensin in the women with normal weight and in the women with MO, with and without NAFLD. The main result was that plasma neurotensin levels were significantly lower in the women with MO and NAFLD (3.62 ± 0.85 ng/mL) than in the women with MO without NAFLD (11.65 ± 1.95 ng/mL) and in subjects with normal weight (13.68 ± 2.58 ng/mL) ($P = 0.001$ and $P = 0.001$, Figure 1A). However, our results indicated that there were no significant differences between women with normal weight and patients with MO without NAFLD ($P = 0.535$).

In addition, because 65% of women with MO were diagnosed with NAFLD by using liver histology, plasma levels of neurotensin were significantly lower in the whole cohort with MO (6.45 ± 1.02 ng/mL) than in women with normal weight ($P = 0.017$).

Moreover, we found that there were no significant differences between the plasma levels of neurotensin in women with MO and NAFLD/without type 2 DM ($n = 19$, 2.32 ± 1.18 ng/mL) and in women with MO and NAFLD/with type 2 DM ($n = 14$, 5.38 ± 3.12 ng/mL) ($P = 0.178$).

Regarding treatment, there were no differences in the plasma levels of neurotensin between patients with NAFLD who were taking oral antidiabetic medication (5.86 ± 2.53 ng/mL) and those who were not taking it (2.64 ± 2.22 ng/mL) ($P = 0.242$). Also, with respect to lipid-lowering drugs, we did not find significant differences with (4.96 ± 1.98 ng/mL) or without (2.74 ± 2.35 ng/mL) treatment ($P = 0.458$). The distribution of drugs is shown in Table 2.

In order to study the possible effect of neurotensin on the degree of NAFLD, we classified the women with MO according to their liver pathology. We found that there were no differences in neurotensin plasma levels between women with SS (4.45 ± 1.74 ng/mL) and women with NASH (2.92 ± 0.59 ng/mL, $P = 0.415$, Figure 1B).

TABLE 1 Anthropometric characteristics and biochemical parameters of the women in the study cohort

	Normal weight (N = 20)	Morbid obesity (N = 51)	
		Normal liver (n = 18)	NAFLD (n = 33)
Age (y)	43.50 ± 6.54	44.54 ± 10.02	48.04 ± 9.65
Weight (kg)	57.27 ± 8.48 ^a	117.74 ± 15.67	120.86 ± 17.57
WC (cm)	73.33 ± 8.45 ^a	130.08 ± 17.81	131.35 ± 10.08
BMI (kg/m ²)	22.35 ± 2.00 ^a	47.15 ± 5.99	48.47 ± 7.56
Glucose (mg/dL)	92.17 ± 11.68 ^a	90.58 ± 18.11	123.69 ± 27.70 ^b
Insulin (mIU/L)	8.50 ± 5.11 ^a	12.87 ± 8.18	21.55 ± 24.53
HbA _{1c} (%)	4.69 ± 0.27 ^a	5.02 ± 0.70	6.01 ± 1.62 ^b
HOMA2-IR	1.14 ± 0.69 ^a	1.51 ± 1.05	2.88 ± 2.00
Triglycerides (mg/dL)	90.32 ± 55.06 ^a	135.74 ± 64.18	192.79 ± 98.37 ^b
Cholesterol (mg/dL)	197.59 ± 30.21 ^a	166.60 ± 29.64	182.34 ± 34.39
HDL-C (mg/dL)	61.61 ± 15.26 ^a	48.52 ± 13.45	38.87 ± 7.86 ^b
LDL-C (mg/dL)	114.46 ± 28.85	89.61 ± 25.27	107.61 ± 28.87 ^b
AST (U/L)	19.38 ± 4.87 ^a	22.69 ± 7.18	44.10 ± 32.12 ^b
ALT (U/L)	16.12 ± 5.16 ^a	22.78 ± 11.05	45.31 ± 27.63 ^b
GGT (U/L)	15.76 ± 9.21 ^a	22.39 ± 21.51	33.47 ± 21.59
ALP (U/L)	55.71 ± 14.67 ^a	60.33 ± 11.50	70.41 ± 15.66 ^b

Data expressed as mean ± SD. Insulin resistance estimated by using HOMA2-IR.

^aSignificant differences between controls with normal weight and patients with morbid obesity ($P < 0.05$).

^bSignificant differences between patients with normal liver and morbid obesity and patients with NAFLD and morbid obesity ($P < 0.05$).

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HbA_{1c}, glycosylated hemoglobin; HOMA2-IR, homeostasis model assessment 2 of insulin resistance; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; WC, waist circumference.

Correlations between the levels of neurotensin and biochemical variables

We observed that plasma levels of neurotensin correlated inversely with glucose ($r = -0.531$, $P < 0.001$), insulin ($r = -0.391$, $P = 0.002$), HOMA2-IR ($r = -0.496$, $P < 0.001$), and triglycerides ($r = -0.277$, $P = 0.023$) and that they correlated positively with HDL-C ($r = 0.275$, $P = 0.025$).

Discussion

The main findings of the present study indicate that plasma levels of neurotensin were lower in women with MO and NAFLD. There was no difference between women with normal weight and patients with MO without NAFLD. Thus, the presence of NAFLD, but not obesity, was associated with low neurotensin plasma levels.

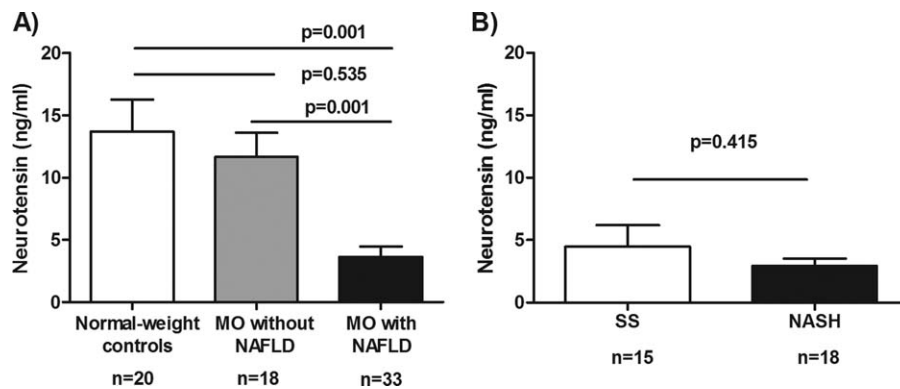


Figure 1 (A) Plasma levels of neurotensin in controls with normal weight, in women with MO without NAFLD, and in women with MO and NAFLD. (B) Plasma levels of neurotensin in women with MO categorized by liver pathology (SS or NASH). Results are shown as the mean ± SD. $P < 0.05$ is considered statistically significant.

TABLE 2 Distribution of drugs used in patients with or without NAFLD

	Morbid obesity (N = 51)	
	Normal liver (N = 18)	NAFLD (N = 33)
Oral antidiabetic drugs (n = 12)		
Metformin	2	8
Metformin + glimepiride	–	2
Lipid-lowering drugs (n = 7)		
Statins		
Simvastatin	1	2
Pravastatin	–	1
Fluvastatin	–	1
Fibrates (gemfibrozil)	–	2

No statistical significance between levels of neurotensin in patients with NAFLD using oral antidiabetics ($P = 0.242$) or in patients with NAFLD using lipid-lowering drugs ($P = 0.458$).

At the present time, few studies have been conducted on the association between circulating neurotensin levels and obesity. Therefore, the role of neurotensin in causing obesity is unknown, and controversial data have been published. In agreement with our findings, Weiss et al. found that neurotensin levels were lower in subjects with MO than in lean controls and that neurotensin levels were increased after bariatric surgery; however, they did not study the association with NAFLD (9). Christ-Chain et al. reported that circulating proneurotensin/neuromedin was increased after gastric bariatric bypass in patients with severe obesity, suggesting that the regulation of neurotensin secretion is disturbed in human obesity (12). Following gastric bypass, there is a persistent decrease in appetite that correlates with the increase in peptide levels, suggesting that neurotensin may help to explain the persistent effects of this surgery on satiety. In contrast, a recent study found increased plasma concentrations of proneurotensin in subjects with obesity and IR, but the presence of NAFLD was not studied (14). Finally, another study showed higher plasma neurotensin levels in Prader-Willi syndrome (PWS) (19). Although PWS is an obesity-related disease, it is characterized by a genetic condition that produces deficient growth hormone secretion and hypogonadism, feeding problems, and decreased gastric motility, leading to early childhood obesity. The results of this work did not specify whether children with PWS had NAFLD. These discrepancies might be partially explained by differences in the patients recruited for the cohort.

The relationship between human plasma levels of neurotensin and NAFLD has not been studied. The present study provides evidence that MO with NAFLD is associated with decreased levels of circulating neurotensin in humans. We found that plasma levels of neurotensin were higher in controls with normal weight and in women with MO and an NL. In this sense, low levels of neurotensin seem to be associated with NAFLD, but these levels did not differ based on the stage of NAFLD, as there were no differences in neurotensin levels between women with MO and SS and women with MO and NASH. In the literature, there is one previous study on the association between neurotensin and hepatic steatosis in animal models (14). Li et al. suggested that neurotensin may play a role in fat

deposition in mice models. They showed that neurotensin-deficient mice had reduced intestinal fat absorption and could be protected against hepatic steatosis associated with high fat consumption. The discrepancies between their data and ours are probably explained by differences between mouse and human lipid metabolism or by the fact that plasma levels of neurotensin might be modified once NAFLD has been established.

In summary, our cohort showed that neurotensin levels were lower in women with NAFLD associated with MO. In the group studied, 65% of women with MO were diagnosed with NAFLD by liver histology. This work excluded the interference of confounding factors such as gender or age. These data cannot be extrapolated to other obesity groups or to women or men with overweight. New studies of men with NAFLD will be conducted. In our study, some patients were under treatment with oral antidiabetics, or lipid-lowering drugs. These drugs have potential impacts on bile transport that were shown to affect the secretion of other gut peptides (20). Therefore, we studied the effect of these therapies on plasma levels of neurotensin, and we did not find any statistically significant differences between patients who were undergoing therapy and those who were not.

Our results indicate that neurotensin levels were decreased in women with NAFLD associated with severe obesity. In this sense, if our data are confirmed, neurotensin could be part of a molecular panel used to diagnose NAFLD and metabolic control after bariatric surgery. ○

© 2017 The Obesity Society

References

1. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:163-177.
2. Kitabgi P, Carraway R, Leeman SE. Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem* 1976; 251:7053-7058.
3. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122: 542-549.
4. Walsh J, Dockray G. *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. New York, New York: Raven Press Ltd.; 1994.
5. Kitabgi P. Prohormone convertases differentially process pro-neurotensin/neuromedin N in tissues and cell lines. *J Mol Med* 2006;84:628-634.
6. Mustain WC, Rychahou PG, Evers BM. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18:75-82.
7. Blackburn AM, Fletcher DR, Bloom SR, et al. Effect of neurotensin on gastric function in man. *Lancet* 1980;1:987-989.
8. Perdakis G, Wilson P, Hinder RA, et al. Gastroesophageal reflux disease is associated with enteric hormone abnormalities. *Am J Surg* 1994;167:186-191; discussion 191-192.
9. Weiss H, Labeck B, Klocker J, et al. Effects of adjustable gastric banding on altered gut neuropeptide levels in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2001;11: 735-739.
10. Näslund E, Melin I, Grybäck P, et al. Reduced food intake after jejunoileal bypass: a possible association with prolonged gastric emptying and altered gut hormone patterns. *Am J Clin Nutr* 1997;66:26-32.
11. Sarson DL, Scopinaro N, Bloom SR. Gut hormone changes after jejunoileal (JIB) or biliopancreatic (BPB) bypass surgery for morbid obesity. *Int J Obes* 1981;5:471-480.
12. Christ-Crain M, Stoeckli R, Ernst A, et al. Effect of gastric bypass and gastric banding on proneurotensin levels in morbidly obese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3544-3547.
13. Holdstock C, Zethelius B, Sundbom M, Karlsson FA, Edén Engström B. Postprandial changes in gut regulatory peptides in gastric bypass patients. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1640-1646.
14. Li J, Song J, Zaytseva YY, et al. An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity. *Nature* 2016;533:411-415.

15. Melander O, Maisel AS, Almgren P, et al. Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA* 2012;308:1469-1475.
16. Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15:22173-22187.
17. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
18. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.
19. Butler MG, Nelson TA, Driscoll DJ, Manzardo AM. High plasma neurotensin levels in children with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2015;167A:1773-1778.
20. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, et al. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2014;9:e100778. doi: 10.1371/journal.pone.0100778

