



METABOLISMO DEL HIERRO Y DE LA SEROTONINA EN LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Jessica Angela Binetti

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.

TESIS DOCTORAL

Jessica Angela Binetti

**Metabolismo del hierro y de la serotonina en la
enfermedad del hígado graso no alcohólico**

Universitat Rovira i Virgili



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

2022

Jessica Angela Binetti

Metabolismo del hierro y de la serotonina en la enfermedad del hígado graso no alcohólico

Tesis doctoral

Dirigida por Prof. Cristóbal Manuel Richart Jurado

y

Dra. María Teresa Auguet Quintillà

Departamento de Medicina y Cirugía



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2022



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado *“Metabolismo del hierro y de la serotonina en la enfermedad del hígado graso no alcohólico”*, que presenta *Jessica Angela Binetti* para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía de esta universidad.

Tarragona, 8 de junio de 2022

El/los director/es de la tesis doctoral

Firma

Firma

Prof. Cristóbal Manuel Richart Jurado

Dra. María Teresa Auguet Quintillà

A mi FAMILIA

“Sé amable siempre que sea posible.
Siempre es posible”.

Dalai Lama

Quisiera agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer al Profesor Cristóbal Richart Jurado por permitirme realizar la tesis con el Grupo de Estudio de Enfermedades Metabólicas e Insulin Resistencia.

A la Profesora Maria Teresa Auguet Quintillà, tutora de tesis y de residencia médica, por el apoyo incondicional brindado a lo largo de estos años. Su figura ha sido fundamental en mi formación como médico, investigadora y persona.

Al Hospital Joan XXII por haberme concedido la Beca de Investigación mediante la cual tuve la oportunidad de embarcarme en este proyecto.

A Carmen Aguilar por su cercanía y sabios consejos, a Laia Bertrán por su disponibilidad y paciencia en este tiempo, y a todos los compañeros de la *Unitat de Recerca Joan XXIII* que de una manera u otra han estado presentes.

A los compañeros de Medicina Interna y Hospitalización a Domicilio, servicios en los que he desempeñado mi actividad asistencial, por su tesón y apoyo durante estos dos largos años de pandemia. De manera especial quiero agradecer a mis *amigas* Ajla Alibalic y Mercé Sirisi por hacer el camino más ameno y ligero.

A los Amigos de *ayer*, de *hoy* y de *siempre*. Amigos que trascienden el tiempo y el espacio. Ellos saben quienes son.

A mi Familia, que son cimiento y motor que está presente siempre, dar las gracias por todo lo que soy y tengo. A lo largo de los años me han enseñado que nada se logra sin esfuerzo y que el trabajo duro tiene sus frutos. No podría ser más afortunada de tenerlos en mi Vida.

A Marc, por ser mi compañero de viaje y dar sentido a mis días.

Para finalizar, agradecer a todos los pacientes que han participado en los estudios, así como, a los miembros del tribunal y evaluadores externos de la tesis.

Mil gracias a todos.

I.	ABREVIATURAS	5
II.	RESUMEN	11
III.	INTRODUCCIÓN	15
1.	ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (EHGNA)	17
1.1.	<i>Epidemiología de EHGNA y factores asociados</i>	20
1.2.	<i>Historia natural de EHGNA</i>	24
1.3.	<i>Diagnóstico y estadiaje de EHGNA</i>	27
1.4.	<i>Histopatología de la EHGNA</i>	33
1.5.	<i>Manejo de la EHGNA</i>	35
1.6.	<i>Fisiopatogenia de la EHGNA</i>	46
1.6.1.	El hígado como órgano clave en la homeostasis metabólica	46
1.6.2.	“First Hit” y progresión de esteatosis	48
1.6.3.	Progresión de esteatosis a EHNA.....	48
2.	HIERRO Y EHGNA.....	52
2.1.	<i>Metabolismo sistémico y celular del hierro</i>	52
2.2.	<i>Papel de la hepcidina</i>	55
2.3.	<i>EHGNA y hepcidina</i>	56
3.	SEROTONINA Y EHGNA	57
3.1.	<i>Metabolismo de la serotonina</i>	57
3.2.	<i>Papel de la serotonina periférica en la obesidad y en la EHGNA</i>	60
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
V.	PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	67
1.	PACIENTES Y PROCEDIMIENTOS.....	69
2.	METODOLOGÍA DEL LABORATORIO	71
2.1.	<i>Medida de los parámetros antropométricos</i>	71
2.2.	<i>Evaluación histológica</i>	71
2.3.	<i>Determinaciones bioquímicas</i>	72
2.4.	<i>Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real</i>	73
3.	ESTUDIO ESTADÍSTICO	74
VI.	RESULTADOS	77
1.	ESTUDIO 1: HEPCIDINA EN OBESIDAD MÓRBIDA Y EHGNA.....	79
2.	ESTUDIO 2: SEROTONINA EN OBESIDAD MÓRBIDA Y EHGNA.....	86

VII. DISCUSIÓN	93
1. ESTUDIO 1: HEPCIDINA EN OBESIDAD MÓRBIDA Y EHGNA.....	95
2. ESTUDIO 2: SEROTONINA EN OBESIDAD MÓRBIDA Y EHGNA.....	99
VIII. CONCLUSIONES	107
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	111
X. ANEXO.....	139

I. ABREVIATURAS

- 3-HAO:** Ácido 3-hidroxiantranílico
- 5-FU:** 5-Fluorouracilo
- 5-HIAA:** 5-hidroxiindolacético
- 5-HT:** Serotonina
- AAAT:** Arilalquilamina N-acetiltransferasa
- AASLD:** The American association for the Study of Liver Diseases
- ACG:** The American College of Gastroenterology
- AEC:** Antagonistas endocannabinoides
- AG:** Ácidos grasos
- AGA:** The American Gastroenterological Association
- AGL:** ácidos grasos libres
- aGLP-1:** agonistas de glucagon- like peptide- 1
- AGMI:** Ácidos grasos monoinsaturados
- AGNE:** Ácidos grasos no esterificados
- AGPI:** Ácidos grasos poliinsaturados
- AINE:** Antiinflamatorios no esteroideos
- ALT:** Alanina aminotransferasa
- APRI:** *Aspartate aminotransferase to platelet ratio index*
- AMPK:** *Activated protein kinase*
- AST:** Aspartato aminotransferasa
- ARA-II:** antagonistas de los receptores de angiotensina II
- AUDC:** Ácido ursodesoxicólico
- BMPR:** Proteínas morfogénicas óseas
- CC:** Circunferencia cintura
- CHC:** Carcinoma hepatocelular
- CEH:** Células estrelladas hepáticas
- CT:** Colesterol total
- DAG:** Dieta alta en grasas
- DCYTB:** citocromo B duodenal
- DLP:** Dislipemia
- DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2
- DMT1:** Transportador de metales divalentes 1

ABREVIATURAS

EC: Enterocromafín

ECA: Ensayos controlados aleatorios

ECV: Enfermedad cardiovascular

EFCAB4B: *EF-hand calcium binding domain 4B*

EH: Esteatosis hepática

EHGADM: Enfermedad del Hígado Graso Asociada a Disfunción Metabólica

EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

ELF: *Enhanced liver fibrosis*

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

EMA: *European Medicines Agency*

ES: Esteatosis simple

FA: Fosfatasa alcalina

FDA: *Food and Drug Administration*

FDFT1: *Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1 gene*

Fe: Hierro

FLI: Fatty Liver Index

FPN1: Ferroportina-1

FRCV: Factores de riesgo cardiovascular

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GGT: Gamma glutamiltransferasa

GLP-1: glucagon-like peptide-1

HA: Ácido hialurónico

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HDL: *High density lipoprotein*

HFE: Proteína de la hemocromatosis

HIMT: Hidroxiindol-O-metil transferasa

HJV: Hemojuvelina

HGNA: Hígado graso no alcohólico

HN: Hígado normal.

HNF-4 alpha: Hepatocyte nuclear factor *4 alpha*

HOMA2-IR: Modelo homeostático 2-resistencia a la insulina

- HOX1:** Hemoxigenasa inducible 1
- HTA:** Hipertensión arterial
- HTRx:** Receptores de serotonina
- IDPP4:** Inhibidores de la dipeptidil transferasa 4
- IDO:** Indolamina 2,3-dioxigenasa
- IMC:** Índice masa corporal
- iSGLT-2:** Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa-2
- JAK2/STAT3:** Citocinas Janus cinasa/transductor de señal y activador
- KAT:** Quinurenina aminotransferasa
- KMO:** Quinurenina 3-monooxigenasa
- LDL:** *Low density lipoprotein*
- LDN:** Lipogénesis de novo
- Lf:** Lactoferrina
- LSN:** Límite superior de la normalidad.
- MAO:** Monoaminooxidasa
- MRS:** Espectroscopia de resonancia magnética
- NAS:** NAFLD activity score
- NFS:** NAFLD fibrosis score
- NP:** Normopeso
- OM:** Obesidad mórbida
- PC:** Perímetro de cintura
- PNPLA3:** Proteína 3 que contiene el dominio de la fosfolipasa tipo patatina
- PPAR α :** Peroxisome-proliferator-activated receptor α
- PPAR γ :** Peroxisome-proliferator-activated receptor γ
- PPAR δ :** Peroxisome-proliferator-activated receptor δ
- PIIINP:** Propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III
- PTX:** Pentoxifilina
- PUFA:** Omega 3 ácidos grasos poliinsaturados
- QM:** Quilomicrones
- QPRT:** Fosforribosiltransferasa del ácido quinolínico
- RCV:** Riesgo de enfermedad cardiovascular

ABREVIATURAS

RFX: Receptor farnesoide X

RI: Resistencia a la insulina

RM: Resonancia magnética

RT - qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

SERT: Transportador 5-HT

SMAD: Proteínas relacionadas con Sma y Mad

SMet: Síndrome metabólico

SNA: Sistema nervioso autónomo

STf: Saturación transferrina

TC: Tomografía computarizada

TDO: Triptófano-2,3-dioxigenasa

Tf: Transferrina

TfR1: Receptor de transferrina-1

TfR2: Receptor de transferrina-1

TG: Triglicéridos

TIMP-1: Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1

TM6SF2: Transmembrane 6 superfamily 2 human gene

TNF- α : Tumor necrosis factor alfa

TPH1: Triptófano hidroxilasa

Trp: Triptófano

TZD: Tiazolinedionas

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

II. RESUMEN

Trabajo basado en el estudio del metabolismo del hierro y de la serotonina (5-HT), potencialmente implicados en el desarrollo y progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). La EHGNA es un problema de salud de primera magnitud ya que se ha convertido en la causa más frecuente de enfermedad hepática, de la mano de la obesidad y del síndrome metabólico. En la fisiopatología de la EHGNA parece intervenir el metabolismo del hierro, mediante la hepcidina, y el de la 5-HT. El estudio de estas vías moleculares es escasamente conocido, motivo por el que se realizaron dos estudios en mujeres obesas mórbidas con EHGNA. Por un lado, se analizaron los niveles plasmáticos de hepcidina y se mostró que están asociados con la obesidad pero no con la presencia de EHGNA ni con la gravedad de la histología hepática. Por otro, se estudió la asociación entre la expresión hepática de hepcidina y de sus genes reguladores implicados en el metabolismo del hierro y la expresión de los principales genes del metabolismo lipídico hepático y se evidenció una clara relación entre ambos posiblemente por compartir un mecanismo patogénico común. En el segundo estudio, se analizaron los niveles plasmáticos de 5-HT y se observó que están disminuidos en pacientes con obesidad mórbida bajo dieta hipocalórica y que la 5-HT podría tener un efecto protector en la obesidad y en el síndrome metabólico. Además, se investigó la expresión de ARNm hepático y yeyunal de los receptores de serotonina (HTR) y se objetivó que existe una desregulación de los HTR2A y HTR2B hepáticos en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión yeyunal de HTR3 y HTR4 según la presencia de EHGNA. Pese a que se necesitan más estudios, la modulación del metabolismo del hierro y de la 5-HT podría convertirse en un futuro objetivo terapéutico en la obesidad y en la EHGNA.

III. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) a día de hoy es un problema de salud de primera magnitud ya que se ha convertido en una de las principales causas de trasplante hepático y de carcinoma hepatocelular (CHC) a nivel mundial ¹⁻³. La EHGNA suele sospecharse en contexto de otras comorbilidades metabólicas y muchas veces es diagnosticada de forma incidental mediante estudios analíticos o pruebas de imagen no invasivas.

La EHGNA es una entidad clínico- patológica que incluye dos trastornos anatomopatológicos diferentes y que tienen pronósticos distintos: el hígado graso no alcohólico (HGNA) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (*Tabla 1*) ⁴. La esteatosis se define por la acumulación de grasa hepática en forma de triglicéridos (TG), que excede el 5% de la masa hepática y su carácter suele ser benigno y no progresivo. La EHNA incluye la presencia de esteatosis simple, inflamación lobular y lesión hepatocelular con o sin fibrosis, y abarca un espectro de gravedad amplio, incluyendo la fibrosis, la cirrosis y el CHC.

La EHGNA se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa hepática, se asocia a la resistencia a la insulina (RI) y se define por la (1) evidencia de esteatosis hepática (EH), ya sea por imagen o histología, y (2) la ausencia de otras causas secundarias de acumulación de grasa hepática, como el consumo significativo de alcohol, el uso a largo plazo de algún medicamento esteatogénico o trastornos hereditarios monogénicos (*Tabla 2*) ^{5,6}.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Espectro de la EHGNA y enfermedades concurrentes.

Subclasificación	Enfermedades concurrentes más frecuentes ¢
HGNA* •Esteatosis pura •Esteatosis e inflamación lobulillar leve	° EHGA-Enfermedad por hígado graso alcohólico ° Enfermedad por hígado graso inducida por fármacos ° Enfermedad por hígado graso asociada al virus de la hepatitis C (genotipo3)
EHNA •EHNA inicial: fibrosis inexistente o leve (F0-F1) •EHNA fibrosa: fibrosis significativa (≥ F2) o avanzada (≥ F3, con formación de puentes)	° Otras •Hemocromatosis •Hepatitis autoinmune •Enfermedad celíaca •Enfermedad de Wilson •A/hipobetalipoproteinemia lipoatrofia •Hipopituitarismo, hipotiroidismo
Cirrosis (F4)	•Inanición, nutrición parenteral •Errores del metabolismo congénitos (enfermedad de Wolman [déficit de lipasa ácida lisosómica])
Carcinoma hepatocelular[^]	

*También denominada EHGNA primaria y asociada a factores de riesgo metabólicos/ componentes del síndrome metabólico:

1. Perímetro de cintura > 94/> 80 cm en varones/mujeres caucásicos.
2. Presión arterial > 130/85 mmHg o en tratamiento para la hipertensión.
3. Glucosa en ayunas > 100 mg/dl (5,6 mmol/L) o en tratamiento para la diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).
4. Triacilgliceroles en suero > 150 mg/dl (> 1,7 mmol/L).
5. Colesterol HDL < 40/50 mg/dl en varones/mujeres (< 1,0/< 1,3 mmol/L).

¢ También denominada EHGNA secundaria.

Obsérvese que la EHGNA primaria y secundaria pueden coexistir en determinados pacientes. También la EHGNA y la EHGA pueden coexistir en individuos con factores de riesgo metabólicos y hábitos de consumo de alcohol por encima de los límites seguros.

[^] Puede producirse en ausencia de cirrosis y signos histológicos de EHNA.

Tabla 2. Causas de esteatosis hepática secundaria

Esteatosis macrovesicular
- Consumo de alcohol excesivo - Hepatitis C (genotipo 3) - Enfermedad de Wilson - Lipodistrofia - Inanición - Nutrición parenteral - Abetalipoproteinemia - Fármacos esteatogénicos (p. ej.: Amiodarona, Carbamazepina, Glucocorticoides, 5-FU, Irinocetan, Cisplatino, Asparraginasa, Metotrexato, Tamoxifeno)
Esteatosis microvesicular
- Síndrome de Reye - Fármacos esteatogénicos (p. ej.: Ácido acetilsalicílico, Ácido valproico, Amiodarona, Antirretrovirales (Zidovudina y Didanosina), AINE (Ibuprofeno y Naproxeno), Cocaína, Tetraciclina, Vitamina A - Hígado graso agudo del embarazo - Síndrome de HELLP - Errores congénitos del metabolismo (p. ej.: deficiencia de lecitina- colesterol aciltransferasa, enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolan)
Esteatohepatitis
-Fármacos esteatogénicos (p. ej.: Amiodarona, Irinotecán, Metotrexato, Tamoxifeno)
Fosfolipidosis
-Fármacos esteatogénicos (p. ej.: Amiodarona, Fluoxetina, Maleato de perhexilina, Dietilaminoetoxihexestrol)

Algunos autores consideran que la EHGNA es el componente hepático del denominado síndrome metabólico (SMet) que se define por la agrupación de diferentes factores de riesgo vascular y metabólico como la obesidad visceral, la hiperglucemia secundaria a la RI, la dislipidemia y la hipertensión arterial⁷⁻⁹. No obstante, no todos los pacientes con EHGNA son obesos y tienen DM2, lo que sugiere que la EHGNA se comporte también como un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular (ECV) y de enfermedad renal crónica. De tal forma, la relevancia de la EHGNA se debe a que estamos ante una enfermedad con carácter multisistémico que afecta también a los órganos extrahepáticos y justifica que la mayoría de las muertes entre los pacientes

INTRODUCCIÓN

con EHGNA sean atribuidas a la ECV^{10,11}. Todo esto justifica que la EHGNA requiera de acciones específicas para su detección, diagnóstico, seguimiento y tratamiento¹².

Tabla 3. Factores de riesgo asociados con EHGNA

Condiciones comunes con asociación establecida	Otras condiciones asociadas
Obesidad	Hipotiroidismo
Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	Síndrome apnea del sueño
Dislipidemia	Hipopituitarismo
Síndrome metabólico (SMet)	Resección pancreatoduodenal
Síndrome del ovario poliquístico	Psoriasis

Hepatology (2018) 67 (1) 328-357⁶

La *Tabla 3* reúne las condiciones establecidas (obesidad, DM2, HTA y DLP) y emergentes (apnea del sueño, cáncer colorrectal, osteoporosis, psoriasis, endocrinopatías y síndrome de ovario poliquístico, independiente de la obesidad) que están asociadas con la EHGNA.

Desde que en 1880 Ludwig acuñó por primera vez el término de EHGNA/EHNA, muchas han sido las críticas sobre las imprecisiones en la nomenclatura y en la definición, así como el impacto negativo que tiene el término “alcohol” en la nomenclatura^{13,14}. Recientemente, un grupo de hepatólogos propuso cambiar el término de EHGNA por “Enfermedad del Hígado Graso Asociada a Disfunción Metabólica” (EHGADM) ya que reflejaría con más precisión la patogenia de la enfermedad y podría ayudar en la estratificación de los pacientes para su manejo¹⁵. Según el estudio de Yamamura et al., la definición de EHGADM identifica mejor a los pacientes con hígado graso y fibrosis significativa evaluada mediante pruebas no invasivas¹⁶.

1.1. Epidemiología de EHGNA y factores asociados

La incidencia mundial de la EHGNA aumenta de forma paralela a la obesidad y el sobrepeso, la DM2 y el SMet¹. Estudios de países asiáticos recogen una incidencia de EHGNA variable que va del 12 al 19%. En cuanto a países occidentales, los datos en

relación a la incidencia de EHGNA en la población general son escasos con una variación que va del 28-52%⁶. A diferencia de los escasos datos de incidencia de EHGNA, el número de publicaciones que describen la prevalencia en la población general es mayor. Pese a que la prevalencia global no se conoce con exactitud, los datos estiman su prevalencia en un 25%². Las tasas varían según los diferentes países y regiones estudiados, ya que los factores asociados pueden estar influenciados por los hábitos nutricionales y por el contexto étnico de los pacientes¹⁷. Las tasas más altas de EHGNA se registran en América del Sur (31%) y Oriente Medio (32%), seguidas de Asia (27%), Estados Unidos (24%) y Europa (23%), mientras que la EHGNA es menos común en África (14%)^{1,2}. En nuestro medio puede alcanzar un 25-30%¹².

De esta manera, podríamos clasificar los países o regiones en tres grupos según la prevalencia de EHGNA: alta, baja o desconocida¹⁸. El *grupo de alta prevalencia* está representado principalmente por países occidentales donde la población tiene un estilo de vida "urbano" (incluye países como Estados Unidos y Europa, así como a Medio Oriente, América Latina, Australia, Japón y China). La prevalencia de EHGNA en estas poblaciones oscila entre el 20% y 30%, y la prevalencia de EHNA de 3% a 16%. Las tasas de prevalencia aumentan rápidamente en estos países, debido a los hábitos alimenticios incorrectos y estilo de vida sedentario. El grupo de *baja prevalencia* está representado principalmente por países asiáticos y países en desarrollo, cuya población reside en áreas rurales donde la dieta y el estilo de vida tradicional todavía están presentes. La prevalencia de EHGNA en estas áreas es de un 10% aproximadamente. Sin embargo, las personas que residen en áreas urbanas de estos mismos países presentan una prevalencia más alta y equiparable a la de los países occidentales. Probablemente, se deba a la adopción de un estilo de vida sedentario y a la globalización de la dieta occidental. Finalmente, encontramos el *grupo de prevalencia desconocida* que está representado principalmente por países en vías de desarrollo, en especial de África. Es esperable una prevalencia similar al grupo de baja prevalencia por residir la mayor parte de la población en áreas rurales¹⁸.

La prueba *gold standard* para diagnosticar la EHNA sigue siendo, a día de hoy, la biopsia hepática. No obstante, la biopsia no es factible en estudios poblacionales y

INTRODUCCIÓN

por ello el diagnóstico se estima por medios indirectos. La prevalencia de los pacientes a los que se le realiza biopsia hepática con indicación clínica específica es del 59,1%, en cambio si la indicación clínica no es clara puede variar del 6.67 al 29.87% ². El diagnóstico es un reto, ya que los pacientes suelen estar asintomáticos y el rol de un cribado rutinario no está establecido.

La prevalencia global estimada de la EHGNA diagnosticada por imagen es del 25% ², y aumenta significativamente en poblaciones de riesgo con componentes del SMet ¹⁹. Los componentes del SMet son prevalentes en la EHGNA y, además, aumentan el riesgo de desarrollarla. Esta asociación bidireccional entre la EHGNA y los componentes del SMet ha sido fuertemente establecida ^{2,9,11}. La obesidad es el factor de riesgo más común. Se ha descrito que la EHGNA es más frecuente en sujetos obesos y en pacientes con DM2, independientemente del grado de obesidad. La prevalencia aumenta a 57% en sujetos obesos, 70% en sujetos diabéticos y 90% en personas con obesidad mórbida ²⁰. En este contexto, la mayoría (> 95%) de los pacientes con obesidad severa sometidos a cirugía bariátrica tendrán EHGNA ²¹.

Un 10-20% de los pacientes con EHGNA no presentan obesidad. Esta entidad se conoce como *EHGNA magra* y fue descrita inicialmente en poblaciones asiáticas ^{22,23}. Esta entidad no es más benigna que la EHGNA en pacientes obesos y abarca un espectro heterogéneo de enfermedades con diferentes etiologías ². La mayoría de los informes para valorar morbilidad son limitados por el uso de modalidades de imagen en lugar de la biopsia hepática para confirmar el diagnóstico de la EHGNA ²⁴⁻²⁶.

Tabla 4. Causas de EHGNA magra

Causas ambientales
- Dieta alta en fructosa y / o grasa - Enfermedad del hígado graso de doble etiología (obesidad concomitante y consumo excesivo de alcohol)
Fenotipos metabólicamente obesos y de peso normal
Lipodistrofia congénita y adquirida
- Asociadas con la terapia antirretroviral de gran actividad para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
Causas genéticas
- Variantes PNPLA3 - Defectos congénitos del metabolismo (hipobetalipoproteinemia familiar, deficiencia lisosomal de lipasa ácida)
Desórdenes endocrinos
- Síndrome de ovario poliquístico, hipotiroidismo o deficiencia de la hormona del crecimiento
Causas relacionadas con fármacos (amiodarona, metotrexato o tamoxifeno)

Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2018 Jan;15(1):11-20¹

También la DM2 es un factor de riesgo bien documentado y la relación con la EHGNA es bidireccional. Algunos estudios han sugerido que de un tercio a dos tercios de los pacientes diabéticos tienen EHGNA^{27,28}. Además, la prevalencia de EHGNA en individuos con dislipidemia se ha estimado en un 50%^{29,30}.

Por otro lado, la prevalencia de EHGNA puede variar según la edad, el sexo y la etnia. De hecho, tanto la prevalencia de EHGNA como el estadio de la enfermedad hepática parecen aumentar con la edad^{6,18,31}. Pese a que la prevalencia en niños (2.6- 9.6%) es menor, aumenta rápidamente, en especial en niños con obesidad (10 -80%)³². Aunque controvertido, el sexo masculino se ha considerado un factor de riesgo para EHGNA, siendo la prevalencia dos veces mayor en hombres que en mujeres^{22,33,34}. Probablemente, se relacione con la tendencia a la obesidad visceral¹⁸ en los primeros, y que el estrógeno se comporte como un factor protector de la EHGNA en las mujeres³⁵. La relación a la etnia, la prevalencia de EHGNA ha evolucionado a lo largo de los años. Informes iniciales sugirieron que, en comparación con las personas blancas no hispanas, los hispanos tenían una prevalencia significativamente más

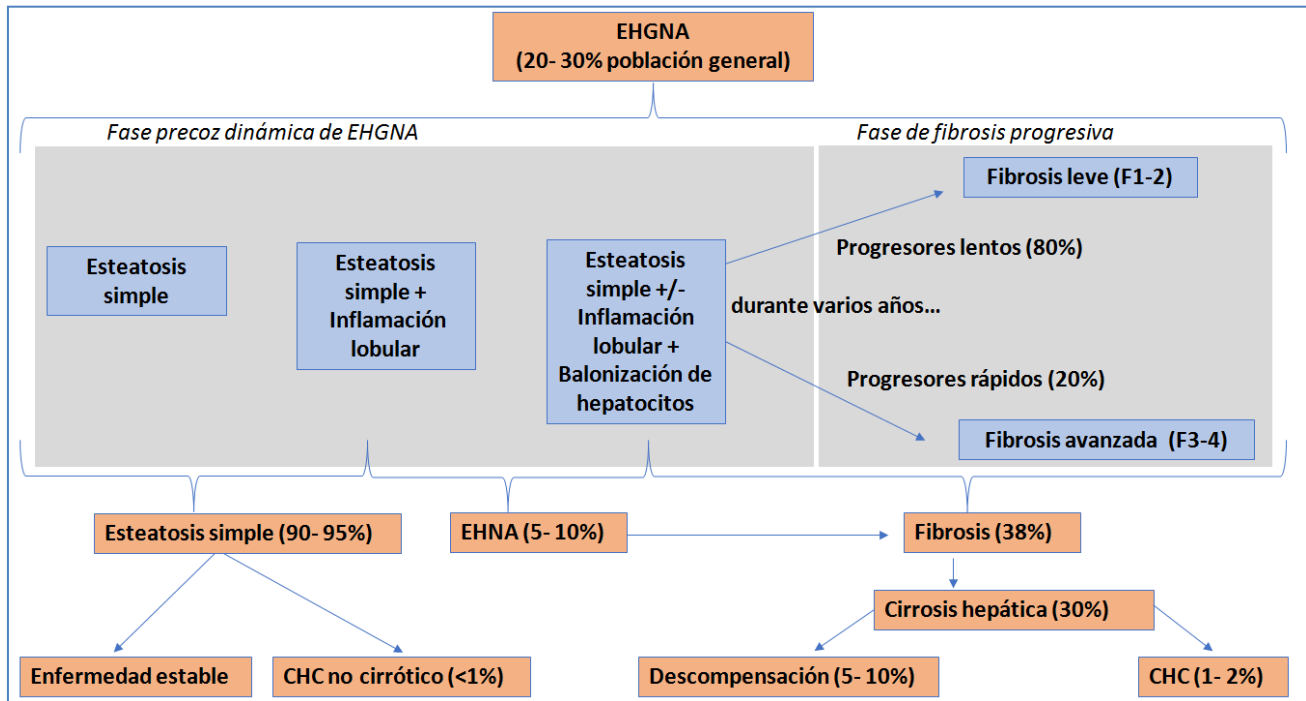
INTRODUCCIÓN

elevada de EHGNA, mientras que los individuos de raza negra no hispanos tenían una prevalencia significativamente menor de EHGNA ³⁶. Datos recientes sugieren que las diferencias étnicas en relación a EHGNA pueden explicarse por la variación genética relacionada con la proteína 3 que contiene el dominio de la fosfolipasa tipo patatina (PNPLA-3) ³⁷.

El tabaquismo también es un factor de riesgo asociado con la EHGNA. Hamabe et al. demostró en un estudio retrospectivo de 10 años que fumar era un factor de riesgo independiente para la EHGNA ³⁸. De la misma manera, en un estudio de cohortes con adultos coreanos sin EHGNA al inicio del estudio, se pudo asociar de forma positiva el tabaquismo (paquetes/año y nicotina urinaria) con el riesgo de incidencia de EHGNA ³⁹. Finalmente, en el estudio de Ou et al. se demostró que el tabaquismo está estrechamente relacionado con el desarrollo de fibrosis hepática avanzada en los pacientes con EHGNA ⁴⁰.

1.2. Historia natural de EHGNA

En las últimas dos décadas, varios estudios han intentado describir la progresión de la EHGNA ⁶. Se sabe que el pronóstico dependerá del subtipo histológico hallado en la biopsia hepática. Los pacientes con ES suelen tener un curso relativamente benigno y menor riesgo de progresión. Por el contrario, aquellos pacientes con componentes de fibrosis e inflamación, correspondiéndose a EHNA, suelen progresar a cirrosis hepática, hepatocarcinoma e insuficiencia hepática, y potencialmente requerir trasplante hepático ⁴¹ (*Figura 1*).



Adaptado de *Metabolism: Clinical and Experimental* (2016) ⁴² y

Nature reviews. Gastroenterology & hepatology (2013) ⁴³.

Figura 1. Epidemiología e historia natural de EHGNA

Esta progresión no es lineal y probablemente es más dinámica de lo que se pensaba anteriormente; la tasa de progresión de la fibrosis en ES se estima en 14 años y la tasa de progresión de la fibrosis en EHNA se estima en 7 años ^{1,44}. Si bien es cierto que la mortalidad en pacientes con EHGNA es mayor que en poblaciones control emparejadas sin EHGNA ⁴⁵, los datos publicados en los últimos años sugieren que el riesgo de mortalidad crece exponencialmente a medida que aumenta la etapa de fibrosis ^{44,46} independientemente de que la causa sea hepática o debido a todas las causas ⁴⁷. Rafiq et al. confirmó que los pacientes con EHNA tienen mayor mortalidad de origen hepático que aquellos sin EHNA, y la DM2 y la edad avanzada son también predictores de mortalidad independientes ⁴⁸.

Los factores de riesgo de progresión de EHGNA a fibrosis hepática no se conocen totalmente y existen datos contradictorios debido a estudios heterogéneos y la existencia de factores confusores ⁴⁹. Se observaron tasas de progresión más altas en

INTRODUCCIÓN

pacientes obesos o con DM2 ^{44,45,50}. También se ha descrito la implicación de la edad, el sexo masculino, la etnia caucásica, la DM2 y el aumento de las enzimas hepáticas. El riesgo de progresión también es mayor en mujeres posmenopáusicas y en aquéllas con menopausia precoz ^{51,52}.

Se ha demostrado un componente de agregación familiar en la EHGNA ^{53,54}, siendo compartida la susceptibilidad genética para el desarrollo de esteatosis y fibrosis ⁵⁵. Los *loci* genéticos que son factores de riesgo de EHNA se pueden distinguir en función de si predisponen a la inflamación o a la fibrosis. El genotipo PNPLA3 I148M es un factor de riesgo genético muy caracterizado tanto para la presencia de EHNA como para la severidad de la fibrosis ⁵⁶. Otros polimorfismos descritos son la *transmembrane 6 superfamily 2 human gene (TM6SF2)* ⁵⁷, la *farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1)* y el *EF-hand calcium binding domain 4B (EFCAB4B)* ³⁷.

En el futuro cercano, las pruebas genéticas y genómicas junto a los antecedentes familiares del paciente proporcionarán pistas sobre la progresión de la enfermedad. Un estudio reciente encontró que los pacientes con EHGNA con antecedentes familiares de diabetes tienen un mayor riesgo de progresar a EHGNA ³⁷. La causa más común de muerte en pacientes con EHGNA es la enfermedad cardiovascular (ECV), independientemente de otras comorbilidades de origen metabólico ^{46,58,59}.

1.3. Diagnóstico y estadiaje de EHGNA

La EHGNA es una enfermedad fundamentalmente asintomática por lo que el diagnóstico debe **sospecharse** en pacientes sin consumo significativo de alcohol que presentan algún factor de riesgo metabólico como la obesidad y la DM2, y que pueden presentar elevación persistente y moderada de transaminasas de causa no aclarada o hepatomegalia aislada ⁶⁰.

El **diagnóstico** de la EHGNA según la *American association for the Study of Liver Diseases (AASLD)*, la *American College of Gastroenterology (ACG)* y la *American Gastroenterological Association (AGA)* ⁶ requiere todo lo siguiente:

- a) Demostración de la esteatosis hepática mediante pruebas de imagen o histología compatible.
- b) Exclusión del consumo significativo de alcohol.
- c) Exclusión de otras causas de esteatosis hepática (ver *Tabla 2*).
- d) Ausencia de enfermedad hepática crónica coexistente.

Las **pruebas de laboratorio**, como las enzimas hepáticas y la ferritina, a menudo son anormales en la EHGNA. Sin embargo, estas anomalías no son necesarias ni suficientes para el diagnóstico, ya que pueden ser normales en pacientes con EHGNA y pueden ser anormales también en otras entidades. En primera instancia, se debe realizar una historia clínica exhaustiva para **descartar otras posibles causas de patología hepática**, como el consumo significativo de alcohol, la inanición, el consumo de determinados medicamentos y la esteatosis hepática relacionada con el embarazo. Se debe realizar el estudio de hepatopatía, para descartar hepatitis viral crónica, hepatitis autoinmune y otras enfermedades metabólicas tratables (*Figura 2*). Esto es de gran importancia, ya que otras enfermedades hepáticas pueden coexistir con la EHGNA. Se suele observar elevación de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) y una relación AST / ALT menor de 1 que sugiere EHGNA ⁶¹. Existen diversos paneles de biomarcadores validados que determinan la presencia de esteatosis con alta especificidad, como el *Hepatic Steatosis Index* ⁶² y el *Fatty Liver Index (FLI)* ⁶³, validados

INTRODUCCIÓN

independientemente ⁶⁴. Estos paneles pueden ser útiles en el cribado de la población general de EHGNA y en pacientes de riesgo con DM2 y obesidad ⁵.

En relación a las **pruebas de imagen**, la ecografía, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) permiten observar la acumulación de grasa hepática. Si el paciente no se ha sometido a ninguna prueba de imagen, la primera prueba a realizar es la ecografía dada su asequibilidad y bajo coste. Tanto la TC como la RM pueden identificar la esteatosis pero no pueden diferenciar entre ES y EHNA ^{65,66}. La espectroscopia de resonancia magnética (MRS) tiene la ventaja de ser cuantitativa en lugar de cualitativa o semicuantitativa, pero no está ampliamente disponible ⁶⁷. Una de las dificultades para determinar la sensibilidad y especificidad de la TC y la RM para el diagnóstico de ES es que no todos los pacientes se someten a confirmación mediante biopsia hepática.

Si bien la **biopsia hepática** es el *gold standard* para diagnosticar la EHGNA y evaluar la fibrosis, en muchos casos se puede hacer un diagnóstico presuntivo basado en la historia clínica y en las pruebas complementarias, por lo que su necesidad y utilidad es controvertida ^{6,68}. Por otro lado, realizar una biopsia hepática en todos los pacientes con EHGNA no es factible, rentable ni está exento de complicaciones mayores ⁶⁹. Además, el error de muestreo, la variabilidad interobservador e intraobservador limitan su utilidad ^{70,71}. Se recomienda la biopsia hepática en pacientes que tienen un mayor riesgo de EHNA y / o fibrosis avanzada, y cuando los puntajes/métodos de imagen no invasivos dan resultados discordantes o no se pueden diagnosticar las enfermedades hepáticas coexistentes ⁶. Los pacientes de alto riesgo incluyen aquéllos con enfermedad metabólica, aminotransferasas elevadas, en particular cuando ALT es superior a AST, mayor edad (> 60 años) y etnia hispana ⁶.

Las **pruebas no invasivas para predecir la fibrosis** pueden ayudar a identificar a las personas de bajo riesgo y limitar el número de pacientes que se someten a una biopsia hepática ^{6,72}.

Los **métodos no invasivos** para la predicción de fibrosis pueden ser serológicos y de imagen:

○ **Métodos serológicos**

Los marcadores serológicos de la fibrosis hepática pueden dividirse en marcadores **indirectos** que reflejan alteraciones en la función hepática pero no en el recambio de colágeno (p. Ej., relación AST / ALT y niveles de plaquetas) y marcadores **directos** que están relacionados biológicamente con la fibrogénesis y el recambio de la matriz extracelular. Estos incluyen paneles como el APRI, FIB- 4, *NAFLD Fibrosis Score (NFS)*, ELF Test y Fibro Test, entre otros (ver *Tabla 5*).

Tabla 5. Pruebas y scores no invasivos para predecir la gravedad de la fibrosis en la EHGNA

Tipo de prueba	Prueba	Fórmula
Paneles simples	APRI	$APRI = \frac{AST \text{ (IU/L)}}{AST \text{ LSN (IU/L)}} / \frac{\text{recuento plaquetas (} \times 10^9 \text{/L)}}{100}$
	NFS. Predice fibrosis avanzada (F3-F4)	$NFS = -1.675 + 0.037 \times \text{edad (años)} + 0.094 \times \text{IMC (kg/m}^2\text{)} + 1.13 \times \text{GBA o DM2 (sí = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{recuento plaquetas (} \times 10^9 \text{/L)} - 0.66 \times \text{albúmina (g/dL)}$
	FIB-4 score. Predice fibrosis avanzada (F3-F4)	$FIB-4 \text{ score} = \text{edad (años)} \times \frac{AST \text{ (IU/L)}}{\text{recuento plaquetas (} \times 10^9 \text{/L)}} \times \sqrt{ALT \text{ (IU/L)}}$
Paneles comerciales con marcadores de fibrosis	ELF test. Predice fibrosis avanzada (F3-F4)	$ELF \text{ score} = -7.412 + [\ln(HA) \times 0.681] + [\ln(PIIINP) \times 0.775] + [\ln(TIMP-1) \times 0.494]$
	FibroTest. Excluye fibrosis avanzada (F3-F4)	Algoritmo patentado que incluye bilirrubina total, GGT, $\alpha 2$ -macroglobulina, apolipoproteína A1 y haptoglobina, corregido por edad y sexo
Técnica radiológica	FibroScan. Predicts advanced fibrosis (F3-F4)	La elastografía transitoria se basa en los ultrasonidos y mide la velocidad de una onda de corte elástica que se propaga a través del hígado para evaluar la rigidez del hígado. Una mayor adiposidad puede limitar la precisión de la prueba.

Los *pruebas simples* como *Nonalcoholic fatty liver disease activity score (NAS)* y *FIB-4 score* se basan en los resultados de análisis de sangre y antropometría disponibles de forma rutinaria. Por otro lado, las pruebas comerciales se basan en la medición de índices no estandarizados (ácido hialurónico [HA], propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III [PIIINP] e inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 [TIMP-1]), y el FibroScan que requiere un equipo especializado. ALT, alanino aminotransferasa, APRI, *aspartate aminotransferase to platelet ratio index*; AST, aspartato aminotransferasa; ELF, *enhanced liver fibrosis*; FIB-4, fibrosis-4; GGT, gammaglutamil transferasa; GBA, glucosa basal alterada; LSN, límite superior de la normalidad

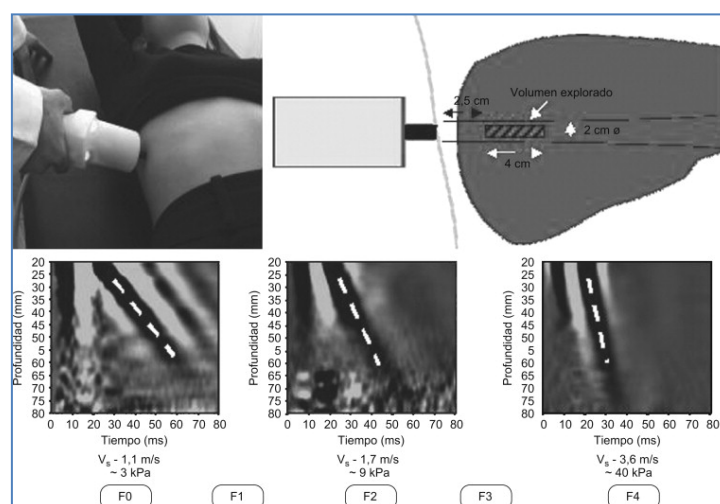
El *NFS* y el *FIB-4* son test validados en la EHGNA, capaces de predecir la mortalidad global, cardiovascular y de causa hepática. Los paneles simples de fibrosis tienen un alto valor predictivo negativo para el diagnóstico de fibrosis avanzada, teniendo una

INTRODUCCIÓN

menor utilidad en estadios iniciales de fibrosis ^{73,74}. El *ELF Test* es un panel comercial de marcadores que se enfoca en el recambio de la matriz ⁷⁵ y tiene una precisión similar o ligeramente mejor que la de la puntuación de *NFS*. Se ha demostrado que el *ELF Test* y el *NFS* tienen alta capacidad predictiva de la fibrosis y de la mortalidad a largo plazo ^{76,77}.

○ *Métodos de imagen*

Entre las técnicas no invasivas de imagen más utilizados encontramos el FibroScan o elastografía transitoria. El FibroScan está constituido por una sonda emisora y receptora de la onda mecánica y de ultrasonidos, así como de un ordenador. La onda mecánica se propaga en el tejido hepático y evalúa un volumen de parénquima 100 veces superior al de la biopsia y el valor obtenido es proporcional al grado de fibrosis hepática ⁷⁸. Se ha de considerar que la medición de rigidez hepática puede ser inexacta en pacientes con sobrepeso y obesidad ⁶⁶, que se intenta obviar con el uso de sondas XL ⁷⁹. A día de hoy, están emergiendo otras pruebas no invasivas prometedoras como la elastografía percutánea con radiación acústica de la fuerza de impulso ⁸⁰ y la elastografía por resonancia magnética ⁸¹.



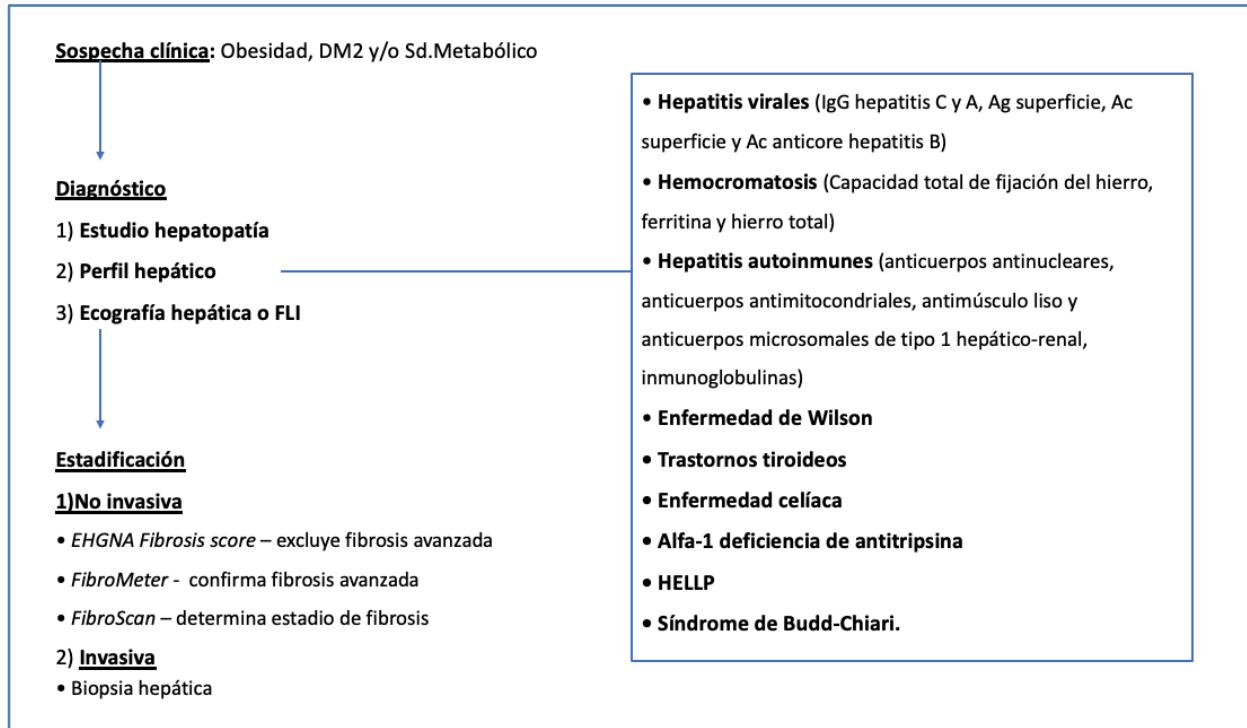
Gastroenterología y Hepatología (2009) ⁷⁸

Figura 2. Determinación de la rigidez hepática con el Fibroscan®

Las guías clínicas the *American Association for the Study of Liver Diseases* no recomiendan el **cribaje** sistemático de la EHGNA en la población general dada la incertidumbre existente en cuanto a las pruebas diagnósticas a realizar, como tratar la EHGNA si se detecta y si son coste-efectivas⁶. En última instancia, la detección de la EHNA probablemente será rentable cuando haya medicamentos disponibles con una eficacia razonable y efectos adversos escasos⁷¹.

Se han propuesto varios algoritmos para la **evaluación y estratificación del riesgo de progresión de la EHGNA** en la práctica clínica habitual. Todos aplican secuencialmente una o más pruebas no invasivas en un intento de controlar la tasa de falsos positivos y reservar el uso de la biopsia hepática para aquellos pacientes que tengan más probabilidades de padecer una enfermedad subyacente significativa. En general, los pacientes de bajo riesgo serán tratados de forma conservadora en atención primaria con consejos sobre el estilo de vida y modificación de los factores de riesgo. En contraposición, los pacientes de alto riesgo requerirán derivación a la consulta especializada y valorar la realización de biopsia hepática para establecer el estadio de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN



Adaptado de *World Journal of Gastroenterology* (2014) ⁶¹ y
Journal of hepatology (2016) ⁴

Figura 3. Algoritmo diagnóstico y estadificación EHGNA

1.4. Histopatología de la EHGNA

Históricamente, la terminología y los conceptos de las características histopatológicas de la EHGNA se derivaron de la enfermedad hepática alcohólica. Por lo tanto, el hígado graso alcohólico (HGA) es análogo a la ES, la hepatitis alcohólica a la EHNA y la cirrosis alcohólica a la etapa cirrótica de la EHNA ¹⁴.

Entre las clasificaciones patológicas de EHGNA más relevantes, debemos destacar la de Matteoni, de Brunt y del Comité de Patología de **NASH** Clinical Research Network (**CRN**). En la clasificación de 1999 de Matteoni et al. se distinguió entre EHNA y no EHNA, mediante la clasificación de los tipos histológicos 1 y 2 de EHGNA como "no EHNA" y los tipos 3 y 4 como "EHNA" ⁸². Por otro lado, Brunt et al. propusieron un sistema de clasificación y estadificación semicuantitativa para la EHNA. Para esto, definieron la esteatosis, la inflamación y la degeneración balonzante, y la estadificación se basó en el grado de fibrosis ⁸³. La clasificación de Brunt et al. sólo es aplicable a EHNA y no a todo el espectro de EHGNA. Más tarde, el comité de patología del **grupo NASH CRN** desarrolló y validó un sistema de puntuación histológica para la EHGNA que se basaba en la clasificación de Brunt ⁸⁴ (*Tabla 6*).

El **NAFLD Activity Score (NAS)** fue diseñado por los patólogos del Comité NASH de los Institutos Nacionales de Salud para ayudar a caracterizar las lesiones histológicas y permitir el análisis estadístico en ensayos clínicos. EL NAS puede aplicarse a pacientes adultos y pediátricos. Esta clasificación es el sumatorio de las puntuaciones de esteatosis (0-3), inflamación lobulillar (0-3) y degeneración balonzante (0-2). Un NAS de 5 o más se correlaciona con "EHNA", de menos de 3 se correlaciona con "no EHNA", y 3 o 4 es "incierto" para el diagnóstico de EHNA. La fibrosis se puntúa por separado para dar un estadio de fibrosis entre 0 y 4 (*Tabla 6*). La mejoría en la gravedad histológica va acompañada de una disminución en el NAS ⁸⁴. Recientemente, se propuso un refinamiento de este sistema de puntuación, llamado **SAF Score**. Esta clasificación separa el grado de esteatosis (S) del grado de actividad

INTRODUCCIÓN

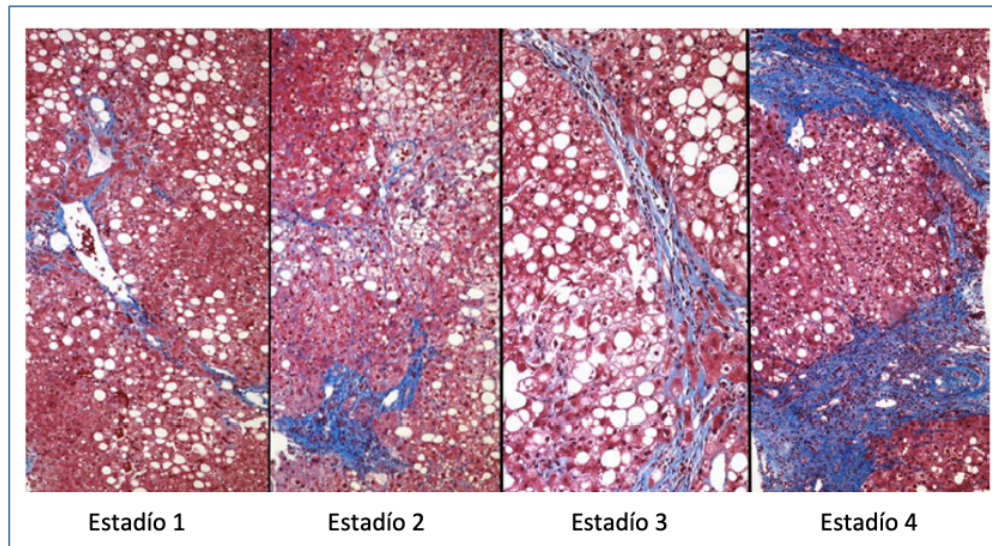
necroinflamatoria (A) y, por lo tanto, proporciona en mayor detalle la actividad de la enfermedad y ayuda a distinguir la ES de la EHNA ⁸⁵.

En resumen, el espectro histológico de la EHGNA se caracteriza por la esteatosis, la inflamación lobulillar, el abombamiento de los hepatocitos, la fibrosis y otras características que pueden estar presentes o no, como los cuerpos de Mallory-Denk y la inflamación portal. A medida que la fibrosis progresa a cirrosis, es posible que la esteatosis y la inflamación no se identifiquen de manera confiable, resultando en un diagnóstico de cirrosis "criptogénica" ⁸⁶. El sistema de clasificación y estadificación del Comité de Patología de *NASH* Clinical Research Network (*CRN*) se basa en el uso de hematoxilina y eosina y la tinción tricrómica de Masson ⁸⁷.

Tabla 6. Score histológico

Grado esteatosis	Inflamación lobulillar	Hepatocitos balonzantes
0: <5%	0: Ninguno	0: Ninguno
1: 5-33%	1: <2 focos	1: Leve
2: 34-66%	2: 2-4 focos	2: Moderado
3: >66%	3: >4 focos	
NAFLD activity score (NAS)		
0-2 no EHNA		
3-4 incierto para EHNA		
5-8 EHNA		
Estadificación de la fibrosis		
Estadio 1:		
1A. Fibrosis perisinusoidal leve de la zona 3		
2B. Fibrosis perisinusoidal moderada de la zona 3		
1C. Fibrosis portal		
Estadio 2: fibrosis perisinusoidal y portal / periportal		
Estadio 3: fibrosis puente		
Estadio 4: cirrosis		

De Clin Liver Dis. 2016 ⁸⁵



De *Hepatology* (2018) ⁷¹

Figura 4. Etapas de la fibrosis en EHGNA según el sistema de estadificación NASH CRN (tinciones tricrómicas de Masson). Estadio 1: fibrosis perisinusoidal centrolobulillar. Las fibras de colágeno teñidas de azul delinear los sinusoides que rodean la vena central. Estadio 2: fibrosis perisinusoidal centrolobulillar y fibrosis periportal. Las fibras de colágeno se depositan alrededor de los sinusoides en la parte superior del campo, mientras que el colágeno más denso se expande el tracto portal en la parte inferior del campo. Estadio 3: fibrosis en puente. Un tabique vascularizado de tejido fibroso secciona el parénquima hepático. Estadio 4: cirrosis. Los nódulos de los hepatocitos están rodeados por tabiques fibrosos de tamaño variable

1.5. Manejo de la EHGNA

Actualmente no existen tratamientos farmacológicos aprobados para tratar específicamente la EHGNA. Debido a esto, el enfoque primario se centra en la adopción de hábitos higiénico- dietéticos saludables con modificación del estilo de vida y fármacos, que en conjunto mejoren la RI ^{6,88,89}. En procesos avanzados, se puede optar por técnicas endoscópicas y quirúrgicas, y finalmente el manejo de las complicaciones de la cirrosis ^{5,90}. Las intervenciones para el tratamiento de EHGNA se resumen en la *Figura 5*.

Según Aller R, et al. *Gastroenterol Hepatol*. 2018, en todos los pacientes se deben instaurar modificaciones del estilo de vida y calcular el NASH- RES al año ⁵.

INTRODUCCIÓN

El NASH-RES fue un modelo desarrollado y validado en una cohorte de 263 pacientes, con biopsias pareadas, que fueron tratados con cambios en el estilo de vida durante 1 año. Dicho modelo, incluye las siguientes variables: edad en años, un NAS ≥ 5 , presencia de DM2, porcentaje de pérdida de peso y valores normales de ALT (< 19 U/L – mujer y < 30 U/L – hombre) al año del tratamiento ⁹¹. La introducción de este sistema de puntuación para predecir la resolución de la EHNA en la práctica clínica podría evitar la realización de biopsias hepáticas innecesarias. Si la puntuación del NASH-RES es > 69.72 se recomienda mantener estas modificaciones en el estilo de vida y continuar con actitud expectante, si la puntuación obtenida se encuentra entre 46,15 – 69,72 se deberá considerar el tratamiento farmacológico, y si la puntuación es menor de 46,15 se debe indicar terapia farmacológica y valorar las técnicas quirúrgicas o endoscópicas si el IMC > 35 kg/m^2 ⁵.

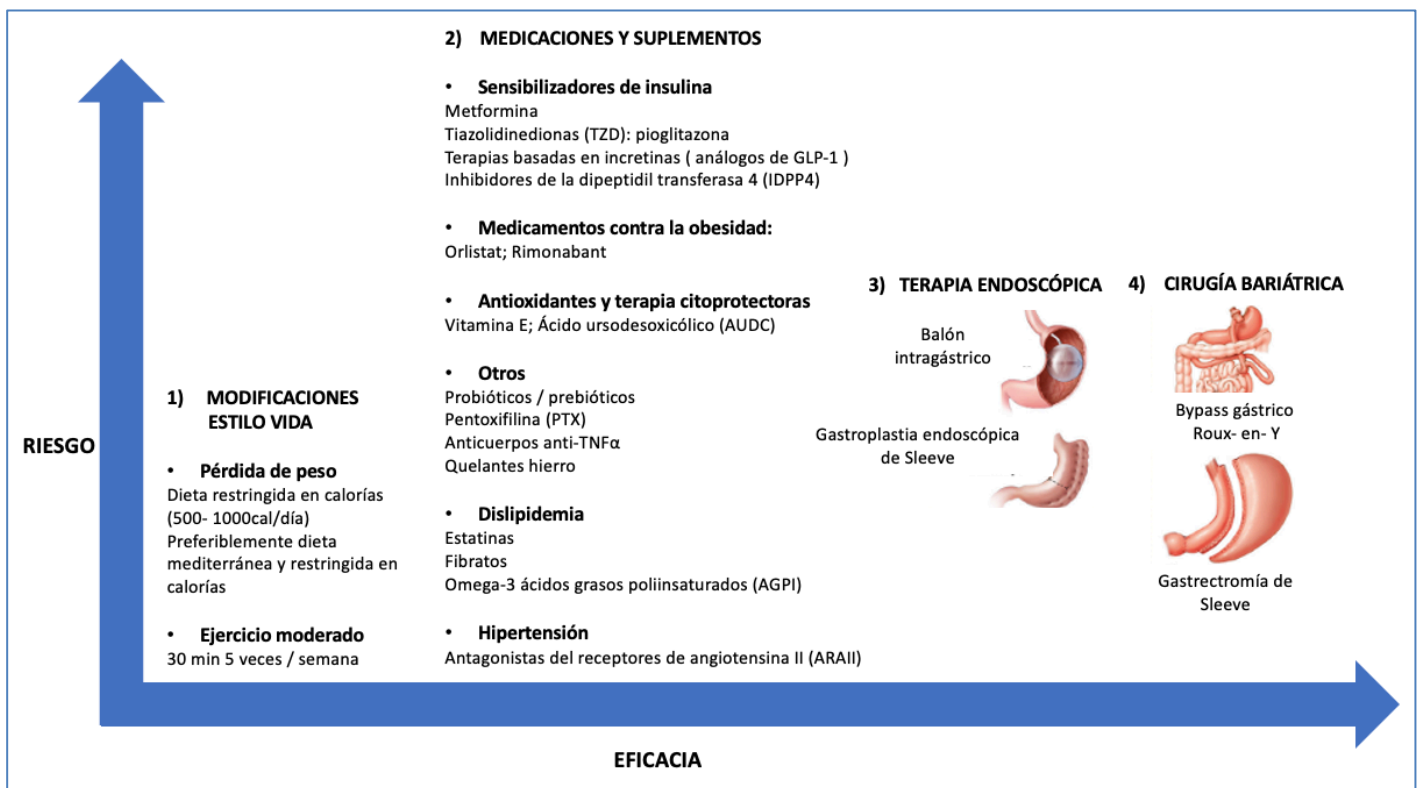


Figura 5. Tratamiento de la EHNA.

a) Modificación del estilo de vida

Los pacientes diagnosticados de EHGNA deben seguir una serie de medidas generales. Se recomienda la abstinencia al alcohol dada la asociación existente entre el consumo elevado y la progresión de la enfermedad ⁹². Asimismo, se recomienda la vacunación del virus de la hepatitis A y hepatitis B de los pacientes no inmunizados así como del neumococo y de la influenza. La **pérdida de peso** es una de las medidas principales en todos los pacientes con EHGNA que tienen sobrepeso (índice de masa corporal [IMC] > 25 kg / m) u obesidad (IMC > 30 kg/m) ya que existe evidencia de la mejoría de la biología e histología hepática, así como de los niveles séricos de insulina y calidad de vida de los mismos ^{88,93-95}

La modificación del estilo de vida se llevará a cabo mediante la **dieta mediterránea hipocalórica** y el **ejercicio físico** ⁹⁶, teniendo como objetivo la reducción de 5-7% del peso corporal. En el metanálisis de Musso et al. se demostró que la reducción $\geq 5\%$ del peso corporal se asoció con la mejoría de la esteatosis y $\geq 7\%$ con la mejoría del NAS ⁹⁷. Si los niveles de ALT no se normalizan tras alcanzar el objetivo, se recomienda la reducción adicional de peso. En el caso de pacientes con EHNA o fibrosis avanzada que no alcanzan el objetivo tras 6-12 meses de medidas de modificación del estilo de vida se deben contemplar otras opciones que revisaremos más adelante.

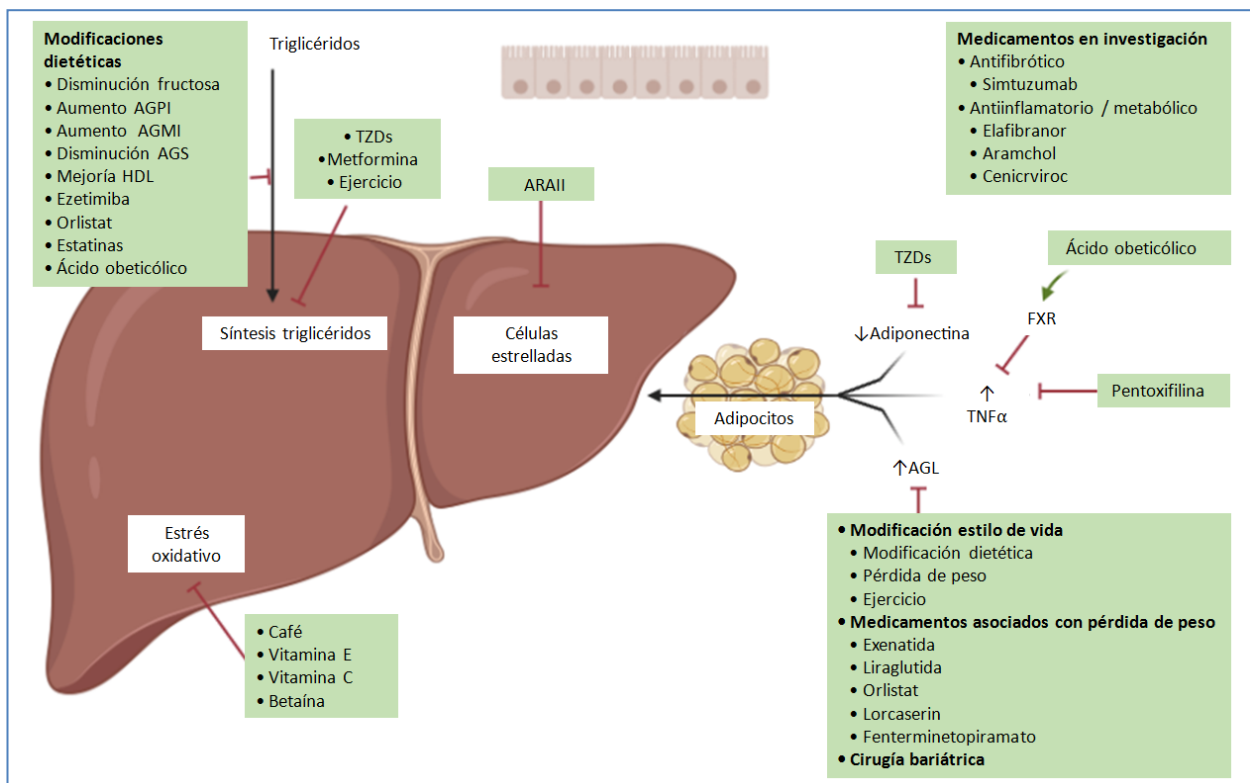
Se desconoce el **ejercicio óptimo** para tratar la EHGNA. No obstante, se ha demostrado que el ejercicio aeróbico mejora la sensibilidad a la insulina ⁹⁸. Asimismo, se ha visto que el ejercicio moderado y de resistencia mejoran los niveles de las enzimas hepáticas y reducen la grasa hepática independientemente de la pérdida de peso ⁹⁰.

La presencia de múltiples **factores de riesgo cardiovascular** (FRCV) en los pacientes con EHGNA hace que el riesgo de enfermedad cardiovascular (RCV) esté aumentado. La pérdida de peso y el aumento de la actividad física son pilares fundamentales del tratamiento de los pacientes con EHGNA, independientemente de la histología hepática subyacente ⁹⁹.

INTRODUCCIÓN

b) Medicaciones y suplementos dirigidos al hígado

El objetivo del tratamiento farmacológico se centra en la mejora de la esteatohepatitis y en la regresión de la fibrosis con un excelente perfil de seguridad. Por ello, el tratamiento farmacológico está indicado en pacientes con esteatohepatitis y fibrosis en estadio 2, o en aquellos casos sometidos a dieta y ejercicio físico sin respuesta terapéutica en un año¹⁰⁰. El tratamiento farmacológico no está indicado en pacientes con ES. En la *Figura 6* se resumen las diversas dianas del tratamiento en la EHNA.



Adaptado de Zakim and Boyer's Hepatology¹⁰¹

Figura 6. Dianas del tratamiento de EHNA. ARAII, antagonistas del receptores de angiotensina II; AGL, ácidos grasos libres; RFX, receptor farnesoide X; HDL, *high density lipoprotein*; ACGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; TNF- α , tumor necrosis factor alfa; TZDs, tiazolinedionas.

- **Sensibilizadores de insulina**

Para los pacientes con EHNA y DM2, además de la terapia inicial con **metformina** que no se ha descrito que mejore la histología hepática ¹⁰², la **pioglitazona** y la **liraglutida** son opciones razonables. La **metformina** es una biguanida cuya acción principal está mediada por la activación de AMPK que reduce la glucosa periférica, reduce la gluconeogénesis y lipogénesis hepática, y aumenta la beta oxidación de los ácidos grasos libres (AGL) ¹⁰³.

Las **tiazolinedionas** son agonistas del *peroxisome-proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ), un factor transcriptor abundante en el tejido adiposo. La pioglitazona mejora la fibrosis, así como la inflamación y la esteatosis ^{104(p20),105-108}. Según Lutchman et al. para alcanzar un beneficio clínicamente importante se debería realizar tratamiento a largo plazo dado que las mejorías observadas revertirían una vez suspendido el fármaco ¹⁰⁹. No se recomienda la **pioglitazona** en pacientes con EHNA sin DM2 debido a sus efectos adversos potenciales como son el aumento de peso, las alteraciones del metabolismo óseo y la insuficiencia cardíaca ^{6(p218)}.

Los **agonistas de glucagon- like peptide- 1 (aGLP- 1)** son incretinas secretadas por las células L ileales dependientes de la presencia de alimentos en el intestino delgado. Los aGLP- 1 aumentan la sensibilidad de insulina, inhiben el vaciamiento gástrico y disminuyen la ingesta mediante el aumento de la sensación de saciedad a nivel cerebral. Deben ser considerados en pacientes con DM2 y EHNA ya que se han asociado con la mejoría de las enzimas hepáticas y de la esteatosis ¹¹⁰. En estudios posteriores, se ha evidenciado que la **liraglutida** podría mejorar la EHNA demostrado por biopsia hepática ¹¹⁰.

Los **inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa-2 (iSGLT-2)** son una nueva clase de fármacos orales aprobados para el tratamiento de la DM2. Al reducir la capacidad renal para reabsorber la glucosa filtrada, los iSGLT-2 aumentan la glucosuria renal y la

INTRODUCCIÓN

diuresis osmótica, mejorando así el control de la glucosa, favoreciendo la pérdida de peso y la disminución de la presión arterial ¹¹¹.

Los grandes ensayos controlados aleatorios (ECA) han demostrado de manera consistente que estos fármacos también ejercen efectos favorables a largo plazo sobre el riesgo de eventos cardiovasculares importantes, incluido el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca y el deterioro de la nefropatía, en personas con DM2 ^{30,112-114}. Dados los beneficios previamente citados, varios estudios de cohortes observacionales y ECA han examinado recientemente los posibles efectos de esta nueva clase de medicamentos hipoglucemiantes en personas con DM2 y EHGNA ^{115,116}.

En la revisión de Mantovani et al., sobre la eficacia de los iSGLT2 para tratar específicamente la EHGNA, se observó la mejoría de los niveles séricos de enzimas hepáticas y el contenido de grasa hepática en las técnicas de imagen basadas en resonancia magnética ¹¹⁷.

Entre una variedad de iSGLT2, la dapaglifozina ha entrado en ensayos de fase 3 como el *Dapagliflozin Efficacy and Action in NASH (DEAN)*. Los estudios controlados a largo plazo deben confirmar si la mejora de EHGNA con iSGLT2 también evita su progresión a EHNA y, en último lugar a fibrosis y cirrosis.

- **Medicamentos contra la obesidad**

En sujetos que no han alcanzado su peso objetivo mediante la intervención en el estilo de vida ¹¹⁸ y tienen un $IMC \geq 30 \text{ kg / m}^2$ o IMC de 27-29.9 kg / m^2 con comorbilidades relacionadas se debe considerar el tratamiento farmacológico ¹¹⁹. La decisión de iniciar farmacoterapia debe ser individualizada, tras una evaluación cuidadosa de los riesgos y beneficios. Los medicamentos contra la obesidad aprobados que se han investigado en pacientes con EHGNA incluyen Orlistat y Liraglutide ¹²⁰.

El **Orlistat** es un inhibidor de la lipasa pancreática que disminuye la absorción de grasas a nivel intestinal. Hasta la fecha se han desarrollado estudios alentadores, como el ECA de Zelber- Sagi et al., en el que se evidenció como el Orlistat disminuyó la ALT y los signos de ES a nivel ecográfico de pacientes con EHGNA ¹²¹. En una serie de casos de

pacientes con obesidad y EHNA sometidos a biopsias de hígado emparejadas, Orlistat redujo el IMC, así como la ALT y favoreció la mejoría histológica hepática de pacientes con EHGNA en diversos estadios (esteatosis en 10, inflamación en 11 y fibrosis en 10)^{122(p20)}. No obstante, hay estudios como el de Harrison et al. que sugieren que los cambios en la histología hepática son secundarios a la pérdida de peso y no por el fármaco en sí¹²³. El metanálisis de Wang et al. evaluó la eficacia y la seguridad de Orlistat en el tratamiento de la EHGNA y EHNA. Estos hallazgos demostraron mejoría del IMC, de las pruebas de función hepática y SMet pero no de la fibrosis hepática¹²⁴.

El **liraglutide** es un aGLP-1 (ver sensibilizadores insulina) que parece disminuir la RI y la lipotoxicidad en los órganos principales que contribuyen la patogénesis de EHNA¹²⁵. Pese a que ningún otro aGLP-1 está aprobado actualmente para el tratamiento de la obesidad, los resultados de estudios recientes en cuanto a la pérdida de peso y mejoría de la histología hepática parecen ser esperanzadores¹²⁶⁻¹²⁹.

Existen otros medicamentos contra la obesidad que no se han investigado directamente para la EHGNA como la **Lorcaserina**, la **Fentermina / Topiramato** y **Naltrexona / Bupropión**. Se debe destacar que en 2013, se retira la autorización para la comercialización de **Lorcaserina** por la *European Medicines Agency* (EMA) y en 2020 por la *Food and Drug Administration Administración* (FDA) debido a los datos de ensayos clínicos que mostraban una mayor incidencia de neoplasias^{130,131}.

La combinación de **fentermina-topiramato** (liberación extendida) es una opción para hombres o mujeres posmenopáusicas con obesidad sin HTA o enfermedad cardíaca coronaria, particularmente aquellos que no toleran el Orlistat o Liraglutide. Esta combinación estimula la liberación sináptica de serotonina, noradrenalina y dopamina, y potencia la acción del GABA¹³². Según una revisión sistemática reciente, la fentermina/topiramato parece reducir el peso corporal de una forma más sólida que otros agentes contra la obesidad¹³³. Si bien está autorizada por FDA, la EMA negó su autorización en Europea debido a los efectos de la fentermina a nivel cardiaco a largo plazo, así como la depresión, la ansiedad y el deterioro cognitivo debido al topiramato^{134(p2)}.

INTRODUCCIÓN

La combinación de **Naltrexona / Bupropión** produce una pérdida de peso similar a Orlistat, pero tiene más efectos secundarios y contraindicaciones. La seguridad cardiovascular de esta combinación en pacientes con obesidad sigue siendo incierta ¹³⁵. A día de hoy, está autorizada por la EMA para otros usos pero no para la pérdida de peso. Un estudio de fase 4 multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar el efecto de Naltrexona / Bupropión en la aparición de eventos cardiovasculares en sujetos con sobrepeso y obesidad se completará en 2022 ¹³².

Los **iSGLT2** y los **ligandos de receptor Farnesoide X** se ha visto que son eficaces en la reducción de peso, pero a día de hoy aún no se han aprobado para la obesidad y se cree que podrían ser eficaces también para la EHGNA ¹²⁰. Los ligandos de RXF, son receptores nucleares, cuya activación reduce la síntesis de ácidos biliares, la gluconeogénesis hepática y la lipogénesis de novo ¹³⁶. En el estudio de Neuschwander-Tetri et al. se observó un efecto favorable en la histología hepática (esteatosis, inflamación y fibrosis) junto con una mejoría en las pruebas de función hepática y pérdida de peso ¹³⁷. Se esperan los resultados concluyentes de un estudio fase 3 que evalúa el efecto del ácido obeticólico en pacientes con EHNA que está a punto de terminar en 2022 (NCT02548351).

- **Terapias antioxidantes y citoprotectoras**

La **vitamina E** se recomienda en periodos cortos de tiempo y en pacientes con enfermedad evolucionada, pero no en cirróticos ni en diabéticos, dado el aumento del riesgo cardiovascular, la asociación con tumores como el cáncer de próstata y riesgo de ictus hemorrágico ⁶.

Se disponen datos limitados sobre la eficacia del **ácido ursodesoxicólico (AUDC)** en la EHGNA ¹³⁸. En el metanálisis de Wu et al., el AUDC en monoterapia no mejoró la EHNA en los pacientes estudiados ¹³⁹. Las pautas de la AASLD no recomiendan el AUDC para el tratamiento de pacientes con EHGNA o EHNA ⁶.

En el estudio doble ciego de fase 2 de Traussnigg et al., el **ácido norursodesoxicólico** a dosis elevadas redujo de forma significativa la ALT sérica en pacientes con EHGNA en relación al placebo ¹⁴⁰. En un subconjunto de pacientes, se observó mediante espectroscopia por resonancia magnética reducción de la fracción de grasa hepática en los pacientes tratados con el ácido norursodesoxicólico. A largo plazo, deberá incluirse la evaluación histológica para valorar la eficacia clínica en pacientes con EHGNA o EHNA.

- **Otros fármacos**

Los pacientes con EHGNA exhiben sobrecrecimiento bacteriano intestinal, mayor permeabilidad intestinal y mayor pérdida paracelular de antígenos lumbales intestinales, factores que promueven el desarrollo de EHNA. Por tanto, los **probióticos** podrían ser una opción terapéutica en los pacientes con EHNA ^{141,142}. En un ECA, se observó mejora en las enzimas hepáticas en pacientes con EHGNA en tratamiento con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* comparado con placebo ¹⁴³. En otro estudio, los pacientes aleatorizados a una combinación de *Bifidobacterium longum* con fructooligosacáridos más modificación del estilo de vida (dieta y ejercicio) o modificación del estilo de vida solo durante 24 semanas ¹⁴⁴, mostraron una disminución significativa de la ES, TNF- α , AST y NAS en el grupo de tratamiento combinado. Por lo tanto, los probióticos también podrían ser parte de una terapia combinada para pacientes con EHGNA.

Se han realizado estudios bien diseñados con **pentoxifilina** (PTX) que es inhibidor de TNF- α capaz de reducir el estrés oxidativo de los radicales libres y que posee propiedades antifibróticas ¹⁴⁵. En algunos ensayos, la PTX mostró una mejoría de la ES, la inflamación lobulillar y la degeneración balonzante en comparación con el valor inicial, pero la mejoría no fue clínicamente significativa en comparación con el placebo ^{146(p20)}. En dos ECA más recientes con pocos pacientes incluidos que evaluaron la función de la PTX se demostró un efecto beneficioso al mejorar las enzimas hepáticas y la histología en pacientes con EHGNA ^{147,148}. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar su papel en el tratamiento de EHGNA / EHNA.

INTRODUCCIÓN

Los **antagonistas de endocannabinoides (AEC)**, como el **Rimonabant** que actúan a nivel del hipotálamo, fueron eficaces en la pérdida de peso de los pacientes obesos en muchos ensayos clínicos, pero provocaron efectos adversos psiquiátricos como depresión, ansiedad y aumento de las tendencias suicidas que llevaron a su discontinuación ¹⁴⁹. El descubrimiento de receptores endocannabinoides en tejidos periféricos, favoreció el desarrollo de antagonistas que no atraviesan la barrera hematoencefálica, y por tanto, no favorecen los efectos perjudiciales a nivel central ^{150(p202)}. Muchos estudios revisados por Cinar et al. destacan los hepatocitos, el tejido adiposo, el músculo esquelético y las células β pancreáticas como objetivos periféricos potenciales para los AEC-1.

Diversos estudios habían sugerido que los receptores AEC-1 del hígado podrían ser un objetivo excelente para prevenir EHNA. Sin embargo, en el trabajo de Wang et al. se demostró que los receptores endocannabinoides-1 apenas eran detectables en hepatocitos humanos con EHGNA/EHNA y que su eliminación no proporcionó beneficios metabólicos contra la EHNA ¹⁵¹. Este resultado contradice estudios previos que afirman que las muestras hepáticas de pacientes con EHGNA tienen un aumento de 34,2 veces en la expresión de receptores endocannabinoides -1 en comparación con los controles ¹⁵². Es posible que estos receptores hepáticos en pacientes con EHGNA, estén regulados por factores desconocidos como el grado de fibrosis hepática o la microbiota intestinal. Ante estos resultados discordantes, se ha planteado que los AEC-1 dirigidos al tejido adiposo puedan ser una opción plausible en el tratamiento de EHGNA. **Nimacimab**, un anticuerpo dirigido a receptores periféricos endocannabinoides -1, ha completado un estudio de fase Ib para el tratamiento de EHGNA. Todavía hay esperanza de que los AEC-1 traten la obesidad y la EHGNA ¹⁵³.

En pacientes con EHGNA se suele observar **sobrecarga de hierro** con hiperferritinemia y depósito de hierro hepático. En estudios con terapias de depleción controlada de hierro mediante flebotomías se observó que podrían favorecer la sensibilidad a la insulina, disminuir los niveles de ALT y mejorar la histología hepática ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. No obstante, estos estudios están limitados por la falta de evaluación histológica de

seguimiento. Se necesitarían ECA adicionales para recomendar la flebotomía como una modalidad estándar en el tratamiento de la EHGNA.

c) *Dislipemia e hipertensión arterial*

Como se mencionó anteriormente, la ECV es la causa más común de muerte en pacientes con EHGNA ^{46,58,59}, por lo que si con la modificación de la dieta y estilo de vida no se logran objetivos, se deberá optimizar el tratamiento de la dislipemia y de la hipertensión arterial siguiendo las recomendaciones establecidas en las guías clínicas⁹⁹. Para reducir el perfil de RCV de los pacientes, se podrán iniciar estatinas, fibratos y ácidos grasos poliinsaturados omega- 3 ¹⁵⁷. Los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA-II) son antihipertensivos bien caracterizados con un perfil de seguridad alto. En estudios con hepatocitos humanos, los ARAII y en concreto el Telmisartán, parecen inhibir la proliferación de células estrelladas y con ello la inflamación y la fibrosis ^{119,158}. Pese a estudios prometedores, no se ha obtenido evidencia suficiente para demostrar la eficacia de los ARAII en el manejo de la fibrosis de los pacientes con EHGNA ^{159,160}. Actualmente, el tratamiento ARA-II solo puede recomendarse formalmente en pacientes con EHGNA con una indicación establecida de terapia antihipertensiva.

d) *Opciones endoscópicas y quirúrgicas*

Los pacientes con EHNA o fibrosis avanzada (pero sin cirrosis descompensada) que no logren los objetivos de pérdida de peso tras 6 meses de intervención en el estilo de vida serán derivados a cirugía bariátrica si presentan un IMC ≥ 40 kg/m² o ≥ 35 kg/m² si asocian ciertas comorbilidades ¹⁶¹. Mediante la mejoría de la obesidad y la diabetes, la cirugía bariátrica reduce la grasa hepática y es probable que también reduzca la progresión de la EHNA según los datos prospectivos existentes que han mostrado una mejora de todas las lesiones histológicas de la EHNA, incluida la fibrosis ⁴. De esta forma, los beneficios de la cirugía bariátrica deberán sopesarse con los riesgos de las complicaciones peri y postoperatorias ⁴.

INTRODUCCIÓN

e) Manejo de las complicaciones de la cirrosis y el hígado trasplante

El tratamiento de la cirrosis por la EHGNA es similar al de la cirrosis por otras causas. Las medidas incluyen el tratamiento de la hipertensión portal, el cribaje de carcinoma hepatocelular y la evaluación para trasplante de hígado en pacientes con cirrosis descompensada.

1.6. Fisiopatogenia de la EHGNA

La patogenia de la EHGNA es multifactorial y pese a los enormes progresos no se ha dilucidado por completo. La teoría más apoyada implica la RI como el mecanismo clave que conduce a la ES y quizás también a la EHNA. En presencia de RI, existe un aumento en la llegada de ácidos grasos libres (AGL) al hígado procedentes de la dieta y de la liberación de los adipocitos ¹⁶². Además de la RI, se requieren daños adicionales, para la manifestación de los componentes necroinflamatorios de la EHNA como la alteración del metabolismo del hierro hepático, de las hormonas intestinales, el déficit de antioxidantes y las bacterias intestinales entre otros.

1.6.1. El hígado como órgano clave en la homeostasis metabólica

Numerosos procesos fisiopatológicos tienen lugar en el hígado como: (1) la filtración y regulación del volumen sanguíneo; (2) el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, grasas, hormonas y sustancias químicas extrañas; (3) la formación de la bilis; (4) el almacenamiento de vitaminas y el hierro; y (5) la formación de factores de coagulación ¹⁶³.

El hígado es especialmente importante para mantener la homeostasis de glucosa en sangre ¹⁶³. Al aumentar la glicemia postprandial, las células β pancreáticas secretan insulina. La insulina a nivel hepático favorecerá: 1) la reducción de la producción de

glucosa hepática mediante la disminución de la gluconeogénesis y la glucogenólisis, y 2) la conversión de la glucosa absorbida a nivel intestinal en glucógeno por los hepatocitos. Sin embargo, cuando la glicemia desciende y la disponibilidad de nutrientes es limitada, el hígado favorece la glucogenólisis y la activación de la gluconeogénesis por acción del glucagón y los glucocorticoides ¹⁶⁴.

En condiciones de alimentación, los AG de la dieta se absorben del intestino delgado, se ensamblan en TG y se incorporan en quilomicrones (QM). Estos se secretan a los vasos linfáticos y entran al plasma como QM ricos en TG, donde principalmente entregan sus AG al tejido adiposo (para almacenamiento) y músculo (para obtener energía) por la acción de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima asociada al endotelio que cataliza la hidrólisis de QM rico en triglicéridos liberando AG. Después de la deslipidación de los QM por lipólisis intravascular, se transforman en partículas remanentes de QM, que son captadas por el hígado después de una posterior hidrólisis por la lipasa hepática intravascular. Además, en el contexto de un exceso de carbohidratos, los AG también se producen nuevamente dentro del hígado a través de la lipogénesis de novo (LDN). En ayunas, los AG se liberan del tejido adiposo blanco y regresan al hígado a través de los ácidos grasos no esterificados del plasma ¹⁶⁵.

La concentración de triglicéridos (TG) hepáticos en condiciones fisiológicas es escasa debido a que el hígado no suele ser órgano de almacenamiento de grasas. Las funciones específicas que realiza el hígado en relación al metabolismo de las grasas son las siguientes: (1) oxidación de ácidos grasos (AG) como suministro de energía; (2) síntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y la mayoría de las lipoproteínas; (3) síntesis de grasas a partir de proteínas y carbohidratos ¹⁶³. De modo que, existe un tráfico considerable de TG y AG hacia y desde el hígado en respuesta a la alimentación y al ayuno ¹⁶⁵.

INTRODUCCIÓN

1.6.2. “First Hit” y progresión de esteatosis

La **hipótesis de “two hits”** propuesta en 1998 por Day et al. proporcionó una guía para la posible progresión de la EHGNA ¹⁶⁶. El “insulto primario” se explicaba por la acumulación de TG y AGL en hepatocitos ¹⁶⁷. El componente clave de este primer golpe eran la RI y la hiperinsulinemia posterior. Estos cambios favorecían la sensibilidad al “insulto secundario”, que implicaba el daño de hepatocitos debido a las citoquinas proinflamatorias, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica. Todo esto favorecería el ambiente proinflamatorio y el desarrollo de la EHNA. Este paradigma sugería que en el “primer golpe”, la acumulación TG, predisponía a un daño hepático adicional en la patogénesis de EHNA.

Sin embargo, esta hipótesis recientemente ha sido reemplazada por un modelo más complejo. Se ha visto que la ES es una condición heterogénea y que la acumulación de TG hepáticos parece ser un síntoma benigno de la ES. Pese a que los TG son el abastecimiento principal de los lípidos en los hepatocitos, otros metabolitos como los AGL y derivados pueden ser los verdaderos agentes lipotóxicos que contribuyen al desarrollo de EHNA; y la acción de las lipasas metabólicas contribuyen a la patogénesis y la progresión de EHGNA ¹⁶⁸. La hipótesis clásica de “*doble hit*” ha sido modificada por la hipótesis de “*multiple hits*” para explicar el desarrollo de EHGNA y la progresión de ES a EHNA ¹⁶⁹.

En la EHGNA, los AGL que alcanzan el hígado provienen de tres fuentes principales: 60% de la circulación sistémica como ácidos grasos no esterificados (AGNE), 15% de la sangre portal como lipoproteínas de quilomicrones ensambladas de la dieta, y 25% de la síntesis de novo / lipogénesis hepática ¹⁶².

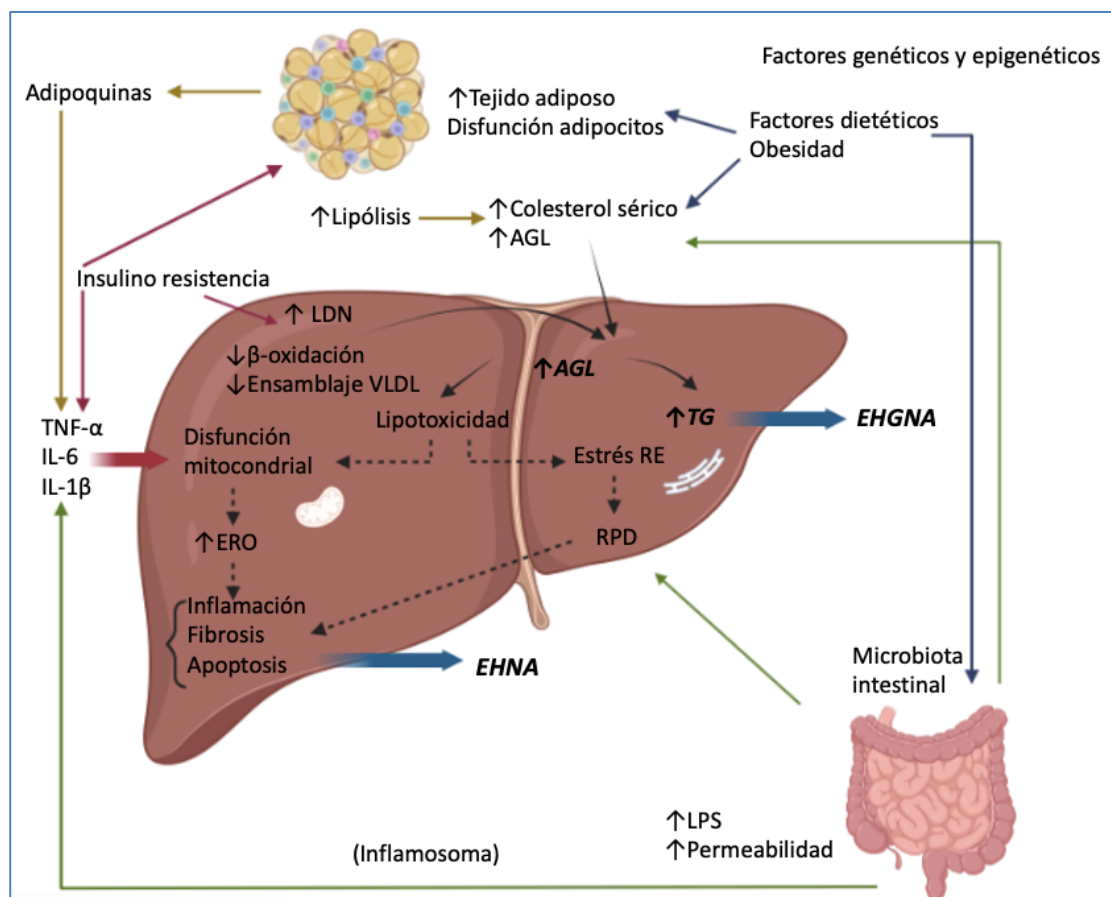
1.6.3. Progresión de esteatosis a EHNA

La evidencia de que múltiples intermediarios lipídicos son citotóxicos, combinados con los numerosos factores que podrían aumentar o reducir la vulnerabilidad a cada

uno de estos restos tóxicos, sugiere que la EHNA puede ser la manifestación común de diversos procesos patológicos^{3,170}. Como se ha comentado, según el modelo "two hits hypothesis", el hígado debería someterse a dos insultos para que se desarrolle el espectro completo de la EHGNA. El primer insulto conduce a la esteatosis, que sensibiliza al hígado a un segundo insulto que conduce a la inflamación, la muerte celular y finalmente a la fibrosis.

En la **hipótesis de "multiple hits"** el desequilibrio del metabolismo de los lípidos y la RI se consideran como el "primer golpe", lo que lleva al desarrollo de la ES. Después del desarrollo de la ES, el hígado se vuelve más vulnerable a diversos insultos que pueden actuar simultáneamente. Entre los procesos implicados encontramos: la liberación de adipocitocinas, el aumento de la permeabilidad intestinal y la microbiota, la inflamación y la lipotoxicidad, la desregulación de la homeostasis de metabolismo glucolipídico, la disfunción mitocondrial, factores genéticos y epigenéticos, la sobrecarga del hierro, que acaban provocando la EHNA y cirrosis^{42,169}. En la misma línea, se ha visto que los niveles circulantes de algunas citocinas proinflamatorias parecen estar directamente relacionados con EHGNA¹⁷¹⁻¹⁷⁵. En la *Figura 7* se recogen las vías más representativas en la patogenia de la EHGNA y la interrelación existente entre las mismas.

INTRODUCCIÓN



Adaptado de *Metabolism: Clinical and Experimental* (2016) ⁴²

Figura 7. Hipótesis de *Multiple Hits* para el desarrollo de EHGNA. Abreviaturas: AGL, ácidos grasos libres; LDN, lipogénesis de novo; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-6, interleucina 6; TG, triglicéridos; ERO, especies reactivas de oxígeno; RE, retículo endoplásmico; RPD, respuesta a proteínas desplegadas; LPS, lipopolisacáridos; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica. Los factores dietéticos y ambientales, junto con la obesidad, conducen a niveles séricos elevados de AGL y colesterol, desarrollo de la RI, proliferación y disfunción de los adipocitos y cambios en el microbioma intestinal. La RI actúa sobre el tejido adiposo, induce la lipólisis y la liberación de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, que contribuyen a mantener el estado RI. En el hígado, la RI amplifica a LDN. El aumento del flujo hepático de AGL derivado de los procesos anteriores y de una actividad alterada del microbioma intestinal conduce a dos situaciones diferentes: síntesis y acumulación de TG y niveles 'tóxicos' de ácidos grasos, colesterol libre y otros metabolitos lipídicos que causan disfunción mitocondrial con estrés oxidativo y producción de ERO y estrés del RE con activación de RPD, todo lo cual lleva a la inflamación hepática. Además, la permeabilidad del intestino delgado puede aumentar con la elevación de los niveles circulantes de moléculas que contribuyen a la activación del inflamasoma y el estrés del RE, como LPS, y a la liberación de citocinas proinflamatorias. Los factores genéticos o las modificaciones epigenéticas afectan el contenido de grasa de los hepatocitos, los procesos enzimáticos y el ambiente inflamatorio del hígado, lo que influye en el riesgo de progresión a EHNA o persistencia en una etapa estable de la EHGNA.

Durante la última década, varios trabajos han evidenciado que la disbiosis del microbioma intestinal representa un factor importante que contribuye a la aparición de EHGNA y su progresión a EHNA. Los mecanismos que asocian la disbiosis con EHGNA incluyen cambios en los mediadores derivados de la microbiota, desregulación de la barrera endotelial intestinal, translocación de mediadores de disbiosis e inflamación hepática. Los cambios en los AGCC, los ácidos biliares, los componentes bacterianos, la colina y el etanol son el resultado de una microbiota intestinal desregulada¹⁷⁶.

Finalmente, los estudios en gemelos han demostrado un fuerte componente hereditario (aproximadamente el 50 por ciento) tanto en el contenido de grasa hepática como en la fibrosis hepática⁵³. Variantes genéticas, especialmente en forma de polimorfismo de un único nucleótido, influyen en el flujo de AGL hepáticos, estrés oxidativo, respuesta a la producción y actividad de endotoxinas y citocinas, y son determinantes del desarrollo y la progresión de la EHGNA¹⁷⁷. Se han descrito al menos cuatro variantes genéticas asociadas con el desarrollo y la progresión de la EHGNA^{178,179}. Entre ellos debemos destacar, la proteína 3 que contiene el dominio de la fosfolipasa similar a la patatina (PNPLA3), también conocida como adiponutrina⁴³ y la variante del gen transmembrana 6 superfamilia 2 (TM6SF2) también está posiblemente implicado en la patogénesis de EHGNA¹⁸⁰.

Dada la complejidad de la patogenia de la EHGNA y que existen datos controvertidos en algunos aspectos de misma, en la presente tesis se pretende evaluar dos mecanismos potencialmente involucrados: el metabolismo del hierro y de la serotonina.

INTRODUCCIÓN

2. Hierro y EHGNA

2.1. Metabolismo sistémico y celular del hierro

El **hierro** (Fe) es un micronutriente que desempeña un papel fundamental en el transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina y al facilitar reacciones bioquímicas como la síntesis de ADN y la fosforilación oxidativa¹⁸¹⁻¹⁸³. En individuos sanos, el **contenido** medio de hierro corporal total varía de 3 a 4 g aproximadamente, y se encuentra **distribuido** en tres compartimentos: (1) el hierro funcional que forma parte de la hemoglobina de los eritrocitos (65%), de la mioglobina y de los citocromos de las mitocondrias y otras enzimas (1%), (2) el hierro de depósito que se acumula en forma de ferritina (15- 30%), y (3) finalmente el hierro circulante unido a la transferrina (Tf) (0.1%)¹⁸⁴.

El metabolismo del hierro está controlado por dos sistemas reguladores: uno que funciona a nivel sistémico y está controlado por la hepcidina, y otro a nivel celular que está controlado por las proteínas reguladoras del Fe¹⁸³.

El hierro inorgánico de la dieta se absorbe en el borde en cepillo de los enterocitos duodenales a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1) tras ser reducido por la citocromo B duodenal (DCYTB). Dado que los niveles excesivos de Fe pueden ser tóxicos, su absorción se limita a 1 o 2 mg al día. El hierro hemo es liberado intracelularmente por la hemoxigenasa inducible 1 (HOX1). Luego, el hierro citosólico puede exportarse a la circulación mediante la ferroportina basolateral exportadora de hierro. La exportación del hierro enterocítico a través de la ferroportina requiere hefestina que oxida el Fe (II) a Fe (III)¹⁸³.

El Fe (III) circula en el plasma unido a la transferrina (Tf) en una forma soluble para el suministro de hierro a las células (a través del receptor de transferrina, TfR1) y limita la generación de radicales tóxicos. En los seres humanos, la Tf normalmente está

saturada con hierro en un 30%. Una saturación de transferrina (STf) <16% indica deficiencia de hierro, mientras que una STF >45% es un signo de sobrecarga de hierro. Cuando la STf excede el 60 %, el hierro no unido a la Tf comienza a acumularse en la circulación y a dañar las células del parénquima. Por lo tanto, el sistema homeostático tiene que mantener la STf en niveles fisiológicos, respondiendo a las señales de las vías que consumen hierro (como la eritropoyesis) y enviando señales a las células que suministran hierro al torrente sanguíneo.

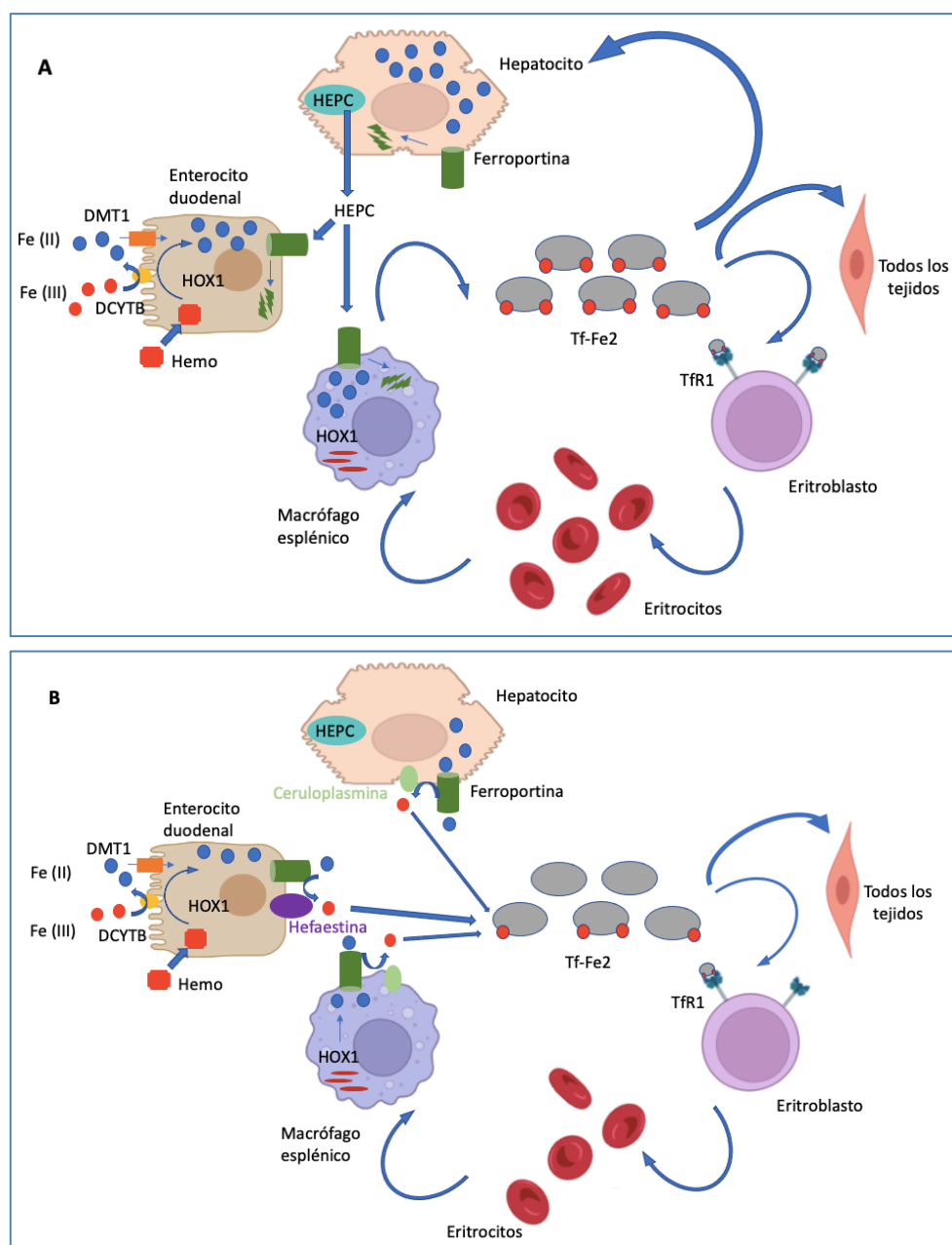
El hígado es el sitio principal de depósito de hierro y la evaluación de la concentración de ferritina sérica es una medida indirecta del almacenamiento de hierro. Los niveles bajos de ferritina sérica indican reservas agotadas, mientras que los niveles elevados pueden indicar una sobrecarga de hierro. Las condiciones inflamatorias (procesos infecciosos o neoplásicos y trastornos hepáticos) también pueden aumentar la ferritina sérica. La mayor parte del hierro que se necesita al día (alrededor de 25 mg al día) se obtiene a través del reciclaje de eritrocitos senescentes que son fagocitados por los macrófagos. La TfR1 media la adquisición de hierro eritroide y su expresión es paralela a la maduración de los progenitores eritroides.

El mantenimiento de la homeostasis del hierro a nivel celular y a nivel sistémico se logra mediante la regulación de su absorción, así como a su correcta utilización y almacenamiento. Estas medidas aseguran la disponibilidad de los suministros de hierro y previenen su toxicidad. A diferencia del metabolismo sistémico del hierro, el tráfico celular también implica su excreción regulada.

El DMT1 en la membrana apical de los enterocitos toma el hierro de la luz duodenal tras la reducción del Fe (III) a Fe (II) a través de DCYTB. La ferroportina y hefestina facilitan la oxidación de Fe (II) a Fe (III) en la membrana basolateral. La Tf cargada de hierro diférrico (Tf-Fe₂), suministra hierro a las células mediante el TfR1 y su endocitosis posterior. TfR1 se expresa en gran medida en los eritroblastos sintetizadores de hemoglobina. Los hepatocitos detectan la STF/reservas de hierro y liberan la hepcidina. El hierro de los glóbulos rojos es reciclado por los macrófagos a través de la ferroportina y la ceruloplasmina ferroxidasa. En situaciones de sobrecarga

INTRODUCCIÓN

de hierro (*figura 8A*), niveles altos de hepcidina inhiben la exportación de hierro mediada por ferroportina al desencadenar la internalización y degradación del complejo para reducir la saturación STF. En situaciones de deficiencia de hierro (*figura 8B*), la ferroportina libera hierro a la circulación. El hemo derivado de la hemoglobina se cataboliza en los macrófagos por la HOX1 y la expresión de hepcidina es baja.

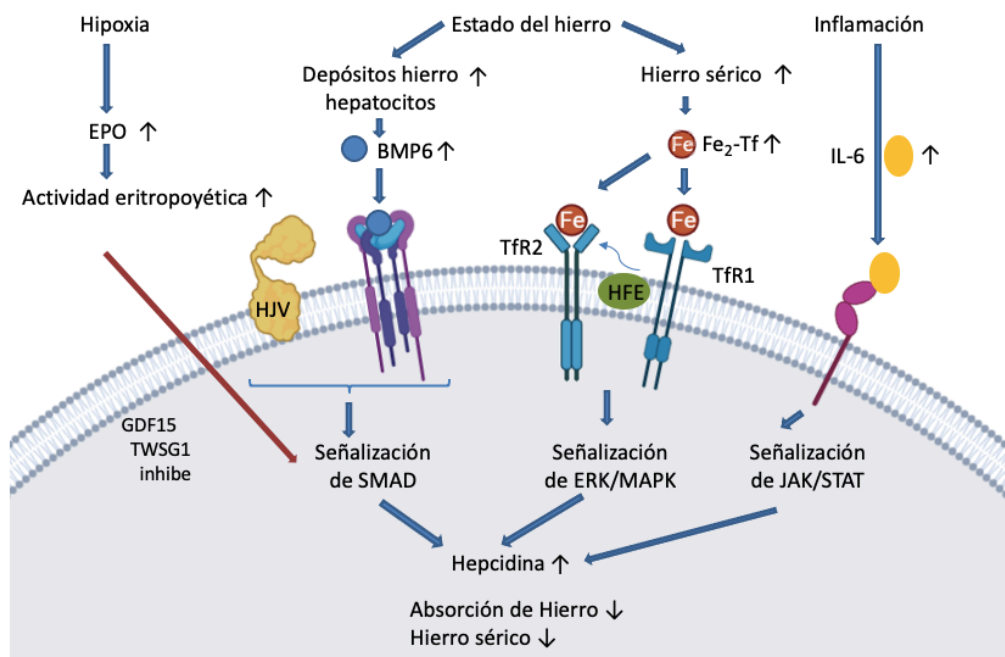


Adaptado de *Cell* (2010) ¹⁸³

Figura 8. Metabolismo sistémico del hierro. A) Sobrecarga de hierro. B) Déficit de hierro.

2.2. Papel de la hepcidina

La hepcidina es un reactivo de fase aguda con actividad antimicrobiana intrínseca^{185,186} que desempeña un papel importante como regulador negativo de la absorción de hierro intestinal y la liberación de hierro de los macrófagos^{187,188}. La hepcidina se sintetiza principalmente en los hepatocitos¹⁸⁹ y en menor medida en el tejido adiposo y en los macrófagos¹⁹⁰. También se ha detectado en el suero y en la orina¹⁹¹. El aclaramiento de hepcidina se produce a través del riñón o por codegradación con la ferroportina.



Adaptado de *Cell* (2010)¹⁸³

Figura 9. Regulación de la expresión de hepcidina. La expresión de la hepcidina según la disponibilidad de hierro está regulada por los niveles de Tf-2 y de la BMP6 y afecta a las proteínas de membrana HFE, HJV y TfR2. Las condiciones inflamatorias aumentan la expresión de hepcidina mediante la IL-6, que activa la JAK2/STAT3.

La expresión hepática de la hepcidina está regulada por una combinación de factores como las concentraciones de hierro, la inflamación, los procesos infecciosos, la eritropoyesis y las hormonas sexuales. Los reguladores *upstream* incluyen la hemojuvelina (HJV), la proteína de la hemocromatosis (HFE) y los receptores de transferrina 1 y 2 (TfR1/TfR2)¹⁹². La expresión de hepcidina también se ve reforzada

INTRODUCCIÓN

por el aumento de las reservas de hierro a través del receptor de proteínas morfogénicas óseas (BMPR) y las proteínas relacionadas con Sma y Mad (SMAD) (vía HJV/BMPR/SMAD) y también a través de la vía de señalización de citocinas Janus cinasa/transductor de señal y activador (JAK2/STAT3) cuando existe inflamación ¹⁸³.

En resumen, los niveles séricos de hepcidina se correlacionan directamente con la ferritina sérica en personas sanas, están elevados en procesos inflamatorios e infecciosos, y están disminuidos en la anemia por deficiencia de hierro y en situaciones de hipoxia ^{193,194}. En la *Figura 9* se describen los principales factores que contribuyen a la desregulación del hierro, que incluyen determinantes genéticos y factores adquiridos.

2.3. EHGNA y hepcidina

El hígado es un órgano importante para el almacenamiento de hierro y el metabolismo de los lípidos y, por lo tanto, es un sitio importante para la interacción entre estas dos vías metabólicas ¹⁹⁵. La sobrecarga de hierro se ha asociado con un aumento de la fibrosis y la progresión de la EHGNA y la EHNA ^{196,197}.

En los últimos años, el papel de la HEPC como biomarcador no invasivo para la EHGNA ha generado interés ya que algunos estudios han demostrado un aumento variable en sus niveles séricos y correlación variable con inflamación hepática y gravedad histológica ^{174,198-200}. Sin embargo, el papel que desempeña en la patogenia de la EHGNA sigue siendo controvertido ²⁰¹⁻²⁰⁴. Algunos estudios han demostrado que el metabolismo de los lípidos podría estar involucrado en la síntesis de hepcidina ²⁰¹ y que los adipocitos podrían servir como una fuente adicional de hepcidina en sujetos con obesidad mórbida ¹⁹⁰. Sin embargo, quedaría por demostrar la asociación entre la expresión hepática de los genes principales involucrados en el metabolismo del hierro y la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos.

3. Serotonina y EHGNA

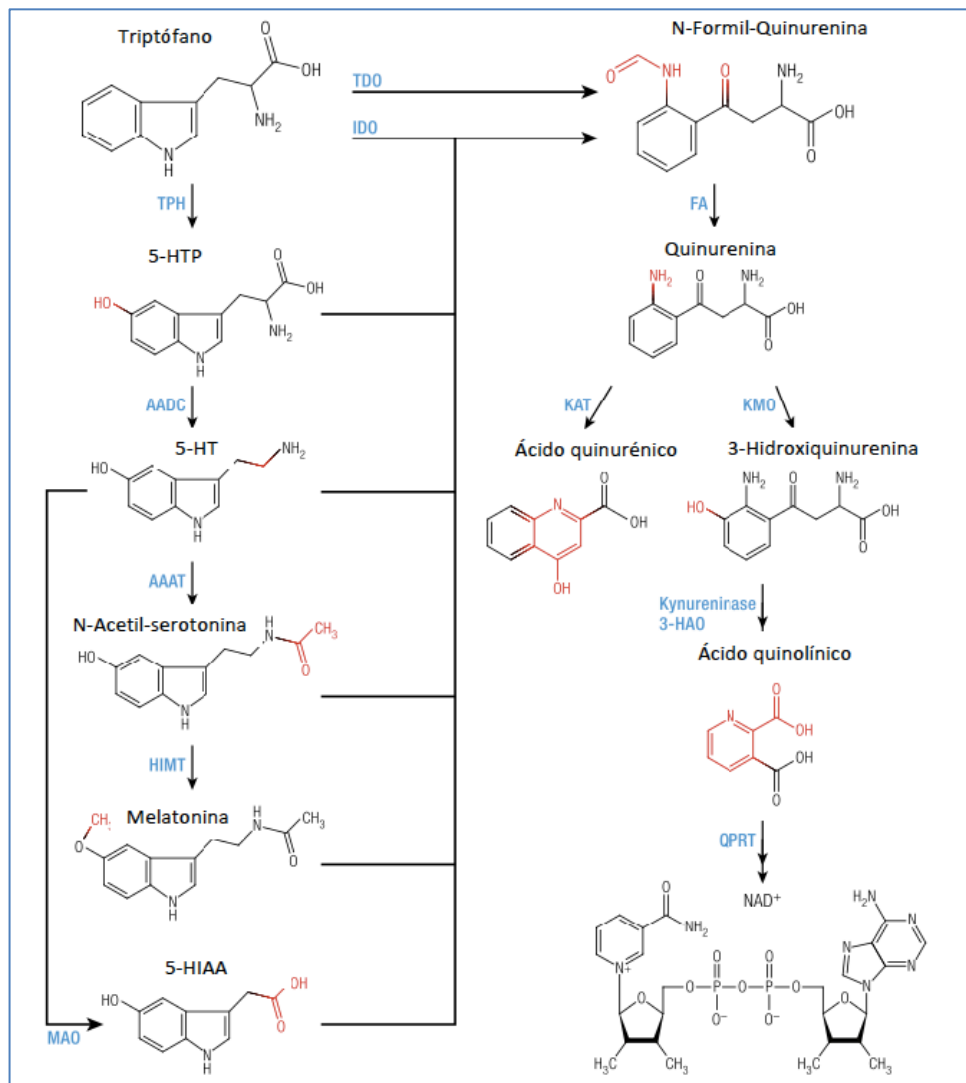
3.1. Metabolismo de la serotonina

La serotonina (5 hidroxitriptamina, 5HT) es un neurotransmisor monoamínico producto de la hidroxilación (TPH-OH) y posterior descarboxilación del aminoácido L-triptófano (TPH), que actúa como neuromodulador general del organismo.

La 5-HT regula las funciones centrales y periféricas. Los mecanismos de acción central y periférico de la 5-HT funcionan por separado, ya que la 5-HT no puede atravesar la barrera hematoencefálica ²⁰⁵. Por lo tanto, la 5-HT desempeña un papel no sólo como neurotransmisor neuronal que controla el estado de ánimo, el sueño y la ansiedad, sino también como una molécula reguladora relevante en el tracto gastrointestinal y a nivel de otros órganos ²⁰⁶.

El 95% de la 5-HT periférica se produce en el tracto gastrointestinal por las células enterocromafines. La biosíntesis de 5-HT es un proceso de velocidad limitada llevado a cabo por la isoforma de triptófano hidroxilasa- 1 (TPH1) en las células de la enterocromafines del intestino, que responden a estímulos mecánicos, al estado glucémico y a productos de digestión microbiana ²⁰⁶. La liberación de 5-HT se produce hacia la luz intestinal y compartimento intersticial. Los enterocitos son capaces de recaptar e internalizar la 5-HT, mediante el transportador 5-HT (SERT). Por otro lado, se ha de destacar que existe otra isoforma de triptófano hidroxilasa- 2 (TPH2) que actúa a nivel sistema nervioso entérico y central y es responsable de la producción del 5% de la 5-HT.

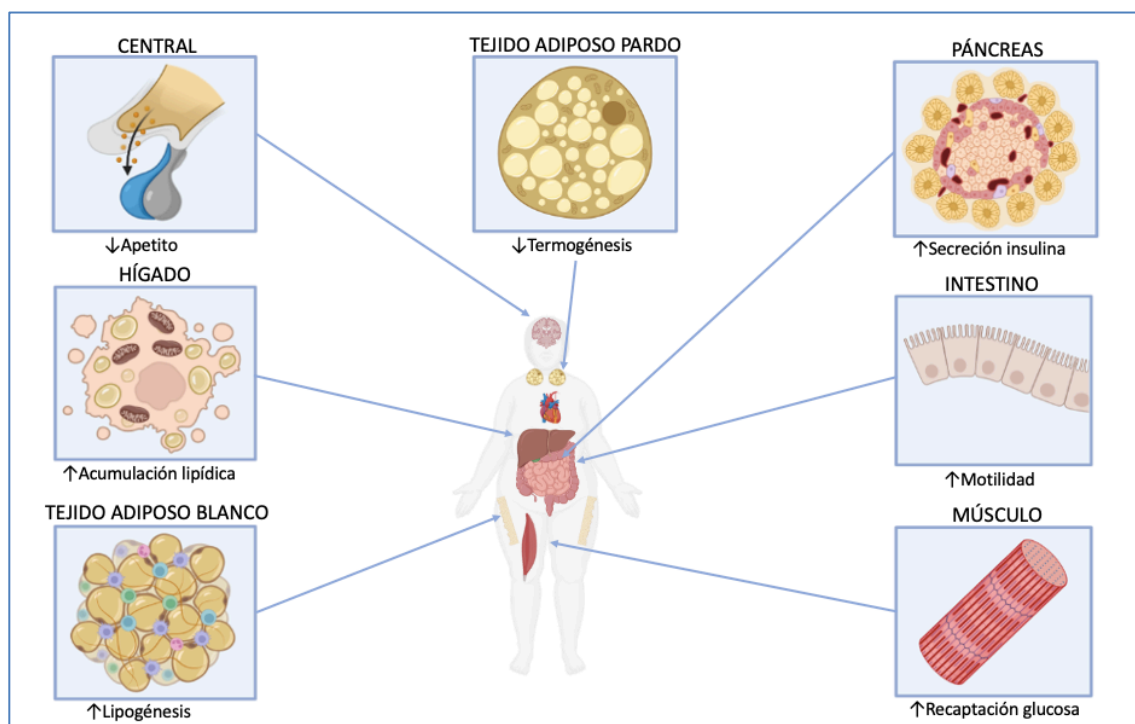
INTRODUCCIÓN



Adaptado de *Endocrine reviews* (2019) ²⁰⁷

Figura 10. Enzimas clave que regulan el metabolismo del triptófano (Trp). **Panel izquierdo:** el Trp es metabolizado por la TPH a 5-HTP y posteriormente metabolizado a 5-HT por la aminoácido descarboxilasa (AADC). La 5-HT se puede metabolizar a 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por la monoaminoxidasa (MAO) o en N-acetil-serotonina por la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AAAT). La N-acetil-serotonina se metaboliza posteriormente en melatonina por la hidroxindol-O-metil transferasa (HIMT). **Panel derecho:** el Trp también es un sustrato para que la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) produzca N-formil-quinurenina, que puede convertirse en quinurenina mediante la formamidasa (FA). La indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) también puede metabolizar el Trp en N-formil-quinurenina junto con cualquier otra molécula que contenga un resto de indol. La quinurenina aminotransferasa (KAT) y la quinurenina 3-monooxigenasa (KMO) forman ácido quinurénico y 3-hidroxiquinurenina, respectivamente, a partir de la quinurenina. La quinurenina se descompone por la quinureninasa y la dioxigenasa del ácido 3-hidroxiindolacético (3-HAO) para formar ácido quinolínico, que puede ser metabolizado aún más por la fosforribosiltransferasa del ácido quinolínico (QPRT) para formar precursores de NAD+.

Las acciones fisiológicas de la 5-HT periférica se producen a través de la activación de más de 14 subtipos de receptores de serotonina (HTRx) de siete familias²⁰⁸ localizadas en diferentes tipos de células, como enterocitos²⁰⁹, neuronas entéricas²¹⁰ o células inmunes²¹¹. Los receptores HTR son receptores acoplados a proteína G, excepto el receptor 3 de serotonina (HTR3), que es un canal iónico regulado por ligandos^{212,213}. Una vez liberada en el torrente sanguíneo, la mayor parte de la 5-HT es secuestrada en las plaquetas y se distribuye a diferentes partes del organismo²¹⁴. El resto de la 5-HT pasa por la circulación sistémica y llega a los tejidos periféricos en forma libre. Los niveles de 5-HT libres en la circulación sistémica son muy bajos porque la mayoría de ellos se metabolizan en el hígado y en los pulmones²⁰⁵. La 5-HT derivada del intestino modula diferentes acciones, como los reflejos motores y secretores entéricos²⁰⁸, la agregación plaquetaria²¹⁵ y las respuestas inmunitarias²¹¹, entre otras. La desregulación de los niveles de 5-HT se ha implicado en la patogenia del síndrome del intestino irritable²¹⁶, algunas enfermedades cardiovasculares y en la osteoporosis²¹⁷.



Adaptado de *Endocrine reviews* (2019)²⁰⁷

Figura 11. Funciones metabólicas de la 5-HT en diferentes tejidos.

INTRODUCCIÓN

La 5-HT a nivel central reduce el apetito, con una disminución secundaria de la ingesta de nutrientes. A nivel periférico, aumenta la motilidad intestinal facilitando la absorción de nutrientes tras la ingesta. En los islotes pancreáticos favorece la secreción de insulina, lo que mejora el almacenamiento de nutrientes en diferentes tejidos. La 5-HT promueve la lipogénesis de novo en el tejido adiposo blanco y en el hígado, y favorece la absorción de glucosa en el músculo esquelético. A nivel del tejido adiposo pardo inhibe termogénesis (*Figura 11*).

3.2. Papel de la serotonina periférica en la obesidad y en la EHGNA

La 5-HT periférica es un importante regulador del metabolismo energético y desempeña diversas funciones en múltiples tejidos ^{218–220}. Se sabe que la 5-HT promueve la gluconeogénesis y la acumulación de lípidos en los hepatocitos *in vitro*, como se muestra en la *Figura 12* ²²¹. El hepatocito es incapaz de producir 5-HT; sin embargo, los colangiocitos y las células estrelladas hepáticas (CEH) producen 5-HT en el hígado ²²². Las neuronas intrahepáticas que contienen 5-HT y los receptores de 5-HT se distribuyen en el sistema nervioso autónomo, en las ramas de la arteria hepática, la vena porta, el conducto biliar y el tejido conectivo de los tabiques interlobulares ²²³. Por lo tanto, las señales neuronales del SNA, así como la 5-HT circulante del intestino, regulan la biología hepática y las funciones metabólicas, como el flujo sanguíneo hepático y la regeneración de hepatocitos ²²⁴.

En respuesta al ayuno, los niveles de 5-HT aumentan considerablemente debido a la sobreexpresión de TPH1. Los niveles altos de 5-HT promueven la lipólisis en los adipocitos que generan sustratos para la gluconeogénesis hepática ²²⁰. Además, los niveles elevados de 5-HT modulan el metabolismo de la glucosa, mejorando la secreción de insulina pancreática, lo que da lugar a la RI que promueve la esteatosis hepática ^{225,226}. Recientemente, un estudio *in vitro* e *in vivo* ha demostrado que la 5-HT puede potenciar la carcinogénesis hepática mediante la activación de la vía de señalización Notch ²²⁷. Además, la inhibición de la señalización del receptor de serotonina hepático 2A (HTR2A) *in vivo*, al bloquear la síntesis de 5-HT, mejora la esteatosis hepática ²²⁵, así como la hiperglucemia y la dislipidemia ²²⁸.

La señalización de 5-HT se ha estudiado recientemente en biopsias de la mucosa intestinal humana y se ha informado que el HTR3 y el HTR4 podrían actuar como receptores de función motora y sensitiva gastrointestinal ^{229,230}. Por tanto, estos receptores podrían intervenir en el metabolismo hepático mediante el eje hígado-intestino.

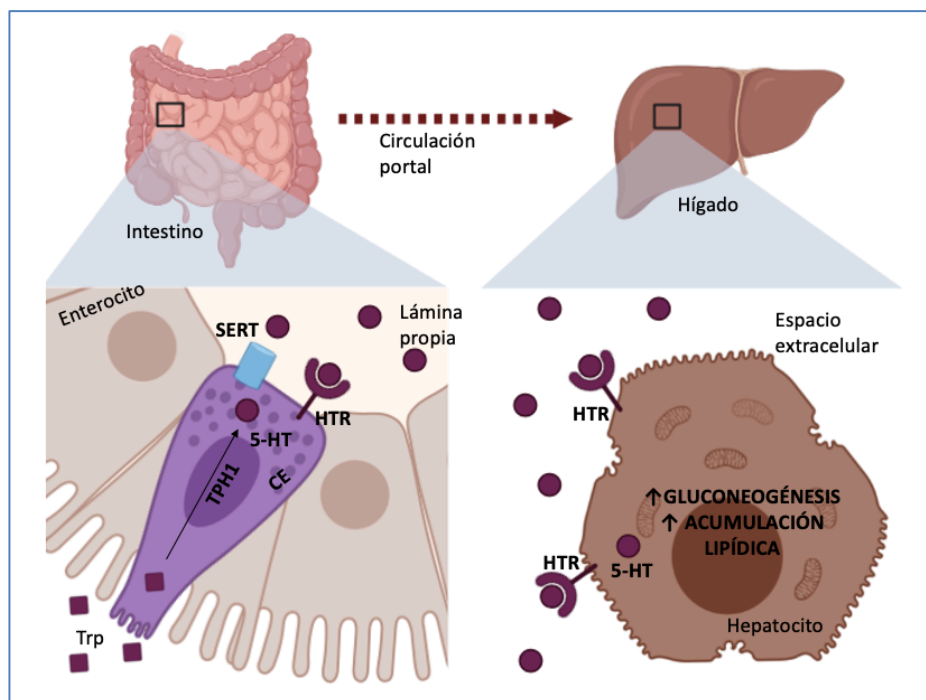


Figura 12. Mecanismo de acción de la serotonina derivada del intestino y de los hepatocitos. La enzima TPH1 sintetiza 5-HT en células enterocromafines a partir de triptófano capturado de la mucosa intestinal. Esta 5-HT se libera y viaja a través de la circulación de la vena porta hasta el hígado, donde es capturada por los hepatocitos mediante los HTR y promueve la acumulación de lípidos y la gluconeogénesis. Estos procesos parecen estar relacionados con la progresión de esteatosis hepática. 5-HT, serotonina; SERT, transportador de serotonina; TPH1, triptófano hidroxilasa; HTR, receptor 5-HT; Trp, triptófano.

En cuanto a la obesidad, el papel de la 5-HT es controvertido ^{231,232}. Se sabe que la 5-HT periférica inhibe el proceso de termogénesis adaptativa, al inactivar la lipasa sensible a hormonas y al reducir la expresión de la proteína desacopladora 1 ^{218,219}. Por otro lado, se han informado niveles elevados de 5-HT en humanos con obesidad ²³² y en roedores con dieta alta en grasas (HFD) ²³³. Esto puede deberse a que, en

INTRODUCCIÓN

condiciones de obesidad, existe una mayor densidad de células enterocromafines y una mayor expresión de TPH1 ²³². Por tanto, la función de la 5-HT en la obesidad aún no está clara.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Sabemos que:

- La EHGNA es la enfermedad hepática más frecuente en el mundo occidental.
- La EHGNA es una entidad con un espectro histológico amplio que puede progresar de ES a EHNA y, posteriormente, a fibrosis hepática, cirrosis y CHC.
- La cirrosis relacionada con la EHNA y el CHC se han convertido en uno de los principales problemas de salud y la principal indicación de trasplante de hepático en países occidentales.
- La mayoría de los pacientes con EHGNA permanecen asintomáticos hasta que desarrollan cirrosis hepática.
- No existe una prueba específica que pueda predecir la progresión de la ES a la EHNA.
- La biopsia hepática es una prueba de diagnóstico invasiva, siendo, a día de hoy, el *gold standard* para determinar la estadificación y clasificación de la EHGNA.
- La relevancia de la EHGNA no se limita a la morbimortalidad hepática, sino que se trata de una enfermedad multisistémica que afecta otros tejidos y está relacionada con complicaciones metabólicas.
- Hasta la actualidad, no se han aprobado tratamientos específicos para tratar la EHNA. La modificación del estilo de vida, destinada a perder peso, el tratamiento de la obesidad, de la DM2 o incluso la administración de fármacos antidepresivos en casos seleccionados de EHGNA podrían ser útiles en el tratamiento.
- La fisiopatología de EHGNA es multifactorial y no del todo conocida.

Teniendo en cuenta que:

- La hepcidina parece tener un papel regulador en la progresión de la EHGNA.
- El metabolismo de los lípidos parece estar implicado en la patogénesis de la EHGNA y puede estar relacionado con la síntesis de hepcidina.
- El papel de la 5-HT liberada por las células enterocromafines del tracto gastrointestinal a la circulación sistémica está relacionada con la obesidad y la DM2, factores de riesgo de la EHGNA.
- El papel de la 5-HT sérica, sus receptores hepáticos e intestinales en la patogenia de EHGNA es poco conocida.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar algunas de las vías moleculares posiblemente implicadas en el desarrollo y progresión de la EHGNA, como son el metabolismo del hierro y de la serotonina, para identificar futuros objetivos terapéuticos y preventivos.

Objetivos secundarios:

Estudio 1. Hecidina en obesidad mórbida y EHGNA:

1. Evaluar la relación existente entre los niveles plasmáticos de hepcidina y la presencia de EHGNA en una cohorte de mujeres obesas mórbidas con EHGNA.
2. Investigar la asociación entre la expresión hepática de los principales genes implicados en el metabolismo del hierro, la expresión de los principales genes del metabolismo lipídico hepático y su posible relación con la progresión de EHGNA.

Estudio 2. Serotonina en obesidad mórbida y EHGNA

1. Dilucidar el papel de la 5-HT en la obesidad y en los grados histológicos de EHGNA.
2. Investigar si los niveles circulantes de 5-HT están relacionados con la abundancia de ARNm hepático y yeyunal de los receptores de serotonina (HTR) en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida y EHGNA.

V. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes y procedimientos

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Centro (Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, 23c / 2015), y todas las mujeres incluidas fueron informadas de su participación y firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión en la investigación médica.

En los dos estudios presentados se analizaron mujeres caucásicas de descendencia europea residentes en la provincia de Tarragona. Estas mujeres se dividieron en 2 grupos: un primer grupo control de mujeres con un IMC comprendido entre 18 y 25 Kg/m², y un segundo grupo de mujeres que presentaban obesidad mórbida con un IMC > 40 Kg/m². En el primer estudio, se incluyeron 69 mujeres con obesidad mórbida y 49 mujeres control de peso normal. En el segundo estudio, se incluyeron 58 con obesidad mórbida y 26 con peso normal.

Las mujeres con obesidad mórbida se habían sometido a una dieta hipocalórica (VLCD) los 3 meses previos a la cirugía bariátrica y las mujeres con normopeso realizaban una dieta libre, sin variaciones en los últimos meses previos al estudio ²³⁴

En este momento, debemos realizar diversas consideraciones. La VLCD tiene especial relevancia en el segundo estudio. La VLCD se basa en administrar hasta 800 kcal / día durante un período previo a la cirugía bariátrica para disminuir el riesgo de complicaciones y aumentar las posibilidades de éxito a largo plazo. Los pacientes obesos sometidos a VLCD perdieron un peso medio de $7,65 \pm 2,66$ kg, previo a la cirugía. Por otro lado, como los hombres y las mujeres difieren sustancialmente en cuanto a composición corporal, desequilibrio energético, hormonas y metabolismo de lípidos y glucosa ²³⁵, y también parece existir dimorfismo sexual en EHGNA ²³⁶, incluimos sólo mujeres en nuestro estudio para evitar la interferencia de género.

La biopsia hepática se indicó en las pacientes con obesidad mórbida si se demostraba la existencia de criterios clínicos y bioquímicos en análisis sucesivos de

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

una posible enfermedad hepática o en caso de observarse alteraciones macroscópicas a nivel hepático durante la realización de la cirugía bariátrica laparoscópica. De tal forma, la biopsia hepática se realizó durante la cirugía laparoscópica programada, sólo en aquellos pacientes que cumplieran los criterios anteriores, y con el fin de establecer la posible presencia de una enfermedad hepática. En el estudio de la serotonina, se obtuvieron biopsias yeyunales resultado del remanente de la cirugía metabólica programada.

Los criterios de exclusión en ambos estudios fueron los siguientes: (1) sujetos que tenían un consumo de alcohol superior a 10 g / día; (2) pacientes que tenían enfermedades hepáticas, inflamatorias, infecciosas o neoplásicas agudas o crónicas; (3) mujeres que eran menopáusicas, gestantes o que estaban en tratamiento anticonceptivo; (4) mujeres diabéticas en tratamiento con pioglitazona, agonistas del receptor del péptido similar al glucagón - 1 (GLP - 1), inhibidores de la dipeptidil peptidasa - 4 (DPP - 4) o insulina; (5) pacientes tratados con antibióticos en las 4 semanas anteriores o que recibieron colestiramina o ácido ursodesoxicólico. De manera específica, en el estudio de la serotonina también se excluyeron los pacientes en tratamiento antidepresivo (inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina y antidepresivos tricíclicos) y agonistas del receptor de serotonina. En los sujetos que tomaban además otros medicamentos, se tomaron las muestras de sangre por la mañana, justo antes de su administración.

El grupo control de mujeres con normopeso y el grupo problema de mujeres con obesidad mórbida presentaban edades similares sin diferencias estadísticamente significativas.

Tamaño de la muestra

Teniendo en cuenta la presencia de obesidad mórbida y aceptando un riesgo α de 0,05 y un riesgo β inferior a 0,2 en un contraste bilateral, se necesitan mínimo 25 sujetos en el grupo control (normopeso) y 36 en el grupo de estudio con obesidad mórbida para detectar una odds ratio mínima de 0,1. Por otro lado, al considerar la histología

hepática y aceptando un riesgo α de 0,05 y un riesgo β inferior a 0,2 en un contraste bilateral, se necesitan mínimo de 19 sujetos controles (hígado normal) y 41 sujetos con EHGNA para detectar una odds ratio mínima de 0,1. Se ha utilizado la aproximación de Poisson. Mediante el software GRANMO (v7.12).

2. Metodología del laboratorio

Todos los sujetos incluidos fueron sometidos a evaluaciones físicas, antropométricas y bioquímicas. Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes con obesidad mórbida y sujetos control.

2.1. Medida de los parámetros antropométricos

Se analizaron como medidas antropométricas de las pacientes incluidas en los estudios: el IMC (calculado como el peso corporal dividido por la altura al cuadrado (Kg / m²)) y el perímetro de cintura (PC), expresado en centímetros. La altura y el peso se midieron con los sujetos de pie con ropa ligera y sin zapatos. La circunferencia de la cintura del paciente se midió con una cinta suave a medio camino entre la costilla inferior y la cresta ilíaca.

2.2. Evaluación histológica

El diagnóstico de EHGNA fue realizado según los siguientes criterios: 1) histología hepática compatible, 2) ingesta de alcohol < 10 g/día, 3) exclusión de otras causas de enfermedad hepática. Las muestras de tejido hepático fueron teñidas con hematoxilina-eosina y con el tricrómico de Manson, y utilizando una modificación de los métodos de puntuación propuestos por Brunt et al.⁸⁶ y Kleiner et al.⁸⁴ fueron interpretadas por una anatomopatóloga experimentada.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

De acuerdo con la histología hepática y su IMC, las pacientes fueron clasificadas en 3 grupos:

- Grupo 1. Mujeres con obesidad mórbida e histología de HN, n = 23 y 22 respectivamente.
- Grupo 2. Mujeres con obesidad mórbida e histología hepática de ES, n = 22 y 21 respectivamente.
- Grupo 3. Mujeres con obesidad mórbida e histología hepática de EHNA, 24 y 15 respectivamente

La esteatosis simple (ES) se calificó de la siguiente manera: Grado 1 o ES leve: más del 5% y menos del 33% de los hepatocitos afectados; Grado 2 o ES moderado: 33% a 66% de los hepatocitos afectados; o Grado 3 o ES grave: más del 66% de los hepatocitos afectados. Además, los criterios mínimos para el diagnóstico de EHNA incluyeron la presencia de balonización celular e inflamación lobular o fibrosis perisinusoidal / pericelular en la zona 3 del acino hepático.

2.3. Determinaciones bioquímicas

Los parámetros bioquímicos se analizaron mediante un analizador automático convencional después de 12 h de ayuno. Se incluyeron las siguientes determinaciones séricas: glucosa en ayunas en mg/dl, insulina basal en mU/l, hemoglobina glicosilada en % (HbA1c), colesterol total (CT), LDLc, HDLc en mg/dl, TG en mg/dl y transaminasas: AST, ALT, Gamma glutamiltransferasa (GGT) y Fosfatasa alcalina (FA) todas ellas expresadas en U/l. Los parámetros del perfil férrico (incluyendo ferritina, transferrina, saturación de transferrina y niveles de hierro), se analizaron en el primer estudio. La resistencia a la insulina se estimó utilizando la evaluación del modelo homeostático 2-resistencia a la insulina (HOMA2-IR) ²³⁷.

La extracción de sangre, que se obtuvo del grupo con obesidad mórbida o del grupo control, fue realizada por enfermeras especializadas a través de un sistema BD Vacutainer® después del ayuno nocturno. Las muestras de sangre venosa se

centrifugaron en 30 min en hielo después de la recolección a 3500 rpm a 4 ° C durante 15 min. Las alícuotas de suero se almacenaron a -80 ° C.

Las concentraciones plasmáticas de hepcidina, se midieron mediante un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA) (Catálogo No: EIA-5782, DRG Diagnostics, Marburg, Alemania), de acuerdo con el Instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de 0.153 ng / mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron entre 5 y 15%.

Las concentraciones plasmáticas de 5-HT se analizaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ref. BA E - 8900, Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Alemania). Las citocinas como IL - 1, IL - 6, IL - 8, TNF - α y adiponectina se determinaron mediante inmunoensayos sándwich multiplex, el MILLIPLEX MAP Panel 1 de cuentas magnéticas de adipocina humana (HADK1MAG - 61K, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.), Panel de células T de alta sensibilidad humana MILLIPLEX MAP USA) y el instrumento Bio - Plex 200 en el Centro de Ciencias Ómicas (Universitat Rovira i Virgili) según las instrucciones del fabricante.

Todas las moléculas se midieron en muestras de suero.

2.4. Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Las muestras de hígado y yeyuno recogidas durante la cirugía bariátrica se conservaron en RNAlater (Qiagen, Hilden, Alemania) a 4 ° C y luego se procesaron y almacenaron a -80 ° C. El ARN total se extrajo de ambos tejidos utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Barcelona, España) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La transcripción inversa a ADNc se realizó con el kit de ARN a ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Madrid, España).

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT - qPCR) se realizó con el ensayo TaqMan prediseñado por Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.) para la detección de hepcidina (HAMP, Hs00221783_m1), ferroportina 1 (FPN1, Hs00205888_m1), hemojuvelina (HJV, Hs00377108), receptor de transferrina 1 (TfR1, Hs00951083_m1), receptor de transferrina 2 (TfR2, Hs01056398_m1), LXRA (Hs00173195_m1), SREBP1c (Hs01088691_m1), ACC1 (Hs00167385_m1), FAS (Hs00188012_m1), PPAR α (Hs00947538_m1), CPT1a (Hs00912671_m1), CROT (Hs00221733_m1), SREBP2 (Hs01081784_m1), ABCA1 (Hs01059118_m1), ABCG1 (Hs00245154_m1) y ARN ribosómico 18S (4333760T) que se utilizó como gen de limpieza.

Para la detección de HTR2A, HTR2B y HTR3 en el hígado y HTR3 y HTR4 en el yeyuno, los niveles de ARNm de cada gen se calcularon en relación con la expresión de ARN 18S para genes hepáticos y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para genes en el yeyuno, utilizando el grupo de control (hígado normal (HN)) como calibrador.

Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos utilizando el sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT (Applied Biosystems, Madrid, España).

3. Estudio estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 23.0 para Windows (IBM Corporation, Nueva York, NY, EE. UU.). Todos los valores fueron probados para normalidad usando la prueba de Kolmogorov Smirnov. Los datos se presentan como mediana (percentil 25-percentil 75) cuando nos encontramos ante una distribución no paramétrica de las variables, o como media y desviación estándar de la muestra cuando las variables presentan una distribución paramétrica. Las diferencias entre los grupos de estudio se calcularon mediante una prueba no paramétrica: prueba U de MannWhitney y análisis de Kruskal-Wallis. La fuerza de asociación entre las variables de estudio fue analizada por las pruebas de Spearman. Se consideró que los valores de $p < 0,05$ mostraban resultados estadísticamente significativos.

Para la elaboración de las gráficas se utilizó el software GraphPad Prism 5 para Windows (versión 5.03) y el análisis estadístico de la abundancia relativa de genes analizados se realizó mediante la prueba de Wilcoxon.

VI. RESULTADOS

1. ESTUDIO 1: Hepcidina en obesidad mórbida y EHGNA

Características basales de los sujetos

Las principales características de la cohorte de estudio, incluidos los parámetros antropométricos y bioquímicos (enzimas hepáticas y metabolismo de glucosa, lípidos y hierro) se pueden observar en la *Tabla 7*. La cohorte de 118 mujeres se clasificó según el IMC y la histología hepática en: peso normal (n = 49), obesidad mórbida con histología hepática normal (HN, n = 23) y obesidad mórbida con EHGNA (n = 46). En cuanto a la edad y las medidas antropométricas (peso, IMC y circunferencia de la cintura [CC]), no hubo diferencias significativas entre HN y EHGNA en el grupo de obesidad mórbida.

Los análisis bioquímicos indicaron que la insulina y los triglicéridos fueron significativamente menores en las mujeres de peso normal que en las mujeres con obesidad e HN y EHGNA. Pese a que el HOMA2-IR y la hemoglobina glicosilada (HbA1c) no fueron significativamente diferentes entre las mujeres de peso normal y las mujeres con obesidad mórbida con histología normal, los niveles de glucosa fueron significativamente más bajos en las mujeres de peso normal en comparación con las mujeres con obesidad mórbida y EHGNA.

Cuando analizamos el grupo de pacientes con obesidad mórbida según la histología hepática, observamos que los parámetros bioquímicos como la insulina, los triglicéridos, la glucosa, el HOMA2-IR y la HbA1c fueron significativamente mayores en pacientes con EHGNA que en sujetos con HN. Además, los niveles circulantes de HDLc fueron significativamente más altos en mujeres con normopeso que en los subgrupos con obesidad (HN y EHGNA), y significativamente más bajos en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA que en aquéllas con histología normal.

RESULTADOS

Tabla 7. Características clínicas de la cohorte de estudio clasificadas según el IMC y las características histopatológicas.

Variables	Normopeso	Obesidad mórbida	
	Med (25 th -75 th) (n=49)	HN Med (25 th -75 th) (n=23)	EHGNA Med (25 th -75 th) (n=46)
Edad (años)	43.9 (34.6-52.2)	45.1 (40.3-58.8)	48.3 (44.6-54.8)
Peso (Kg)	59.0 (52.2-64.0)	120.0 (112.0-131.0) *	120.0 (112.5-129.3) *
IMC (Kg/m ²)	23.1 (21.6-24.2)	47.5 (42.0-52.7) *	46.8 (44.2-51.4) *
CC (cm)	74.0 (69.5-79.5)	134.0 (121.8-149.3)*	133.0 (125.0-139.0) *
Glucosa (mg/dL)	82.5 (69.0-91.0)	84.0 (76.8-96.8)	116.0 (102.0-152.0) **
Insulina (mUI/L)	6.0 (4.2-9.9)	9.7 (7.9-13.1) *	17.3 (9.3-25.4) **
HOMA2-IR	0.7 (0.5-1.3)	1.2 (1.0-1.6)	2.6 (1.4-3.5) **
Colesterol total (mg/dL)	180.0(169.9-202.9)	163.2 (143.8-204.0)	178.9 (152.3-206.9)
HDL-C (mg/dL)	60.6 (50.8-65.3)	43.9 (35.8-54.3)*	38.0 (34.9-43.8) **
LDL-C (mg/dL)	110.3 (93.9-123.0)	87.1 (76.5-127.5)	110.0 (88.8-131.3)
Triglicéridos (mg/dL)	65.5 (53.8-104.5)	121.5 (90.0-166.3) *	153.0 (120.0-198.5) **
AST (U/L)	21.0 (16.5-23.0)	19.0 (17.0-21.0)	39.0 (26.0-56.0) **
ALT (U/L)	17.0 (13.0-23.5)	18.0 (16.0-23.5)	41.0 (29.0-65.0) **
GGT (U/L)	13.0 (10.0-20.0)	16.5 (10.3-22.8)	30.5 (16.0-54.1) *
FA (U/L)	59.0 (48.0-69.0)	60.0 (51.0-74.0)	74.0 (60.3-81.5) **
HbA1c (%)	5.0 (4.6-5.3)	5.2 (4.8-5.7)	5.8 (5.0-6.6) **
Hierro (ug/dL)	79.0 (59.8-104.8)	62.0 (45.3-71.5)	61.0 (36.0-78.5) *
Transferrina (mg/dL)	262.0 (226.0-287.0)	251.0 (231.3-264.8)	244.0 (220.5-264.0)*
STf (%)	18.3 (15.2-26.5)	13.8 (10.8-23.7)	23.1 (12.1-29.6)
Ferritina (ng/mL)	30.0 (19.5-74.2)	49.0 (27.0-73.0)	67.8 (33.5-175.0)**
Hepcidina (ng/mL)	17.5 (5.8-26.7)	26.6 (14.5-44.3)*	23.5 (8.8-40.8)*
PCR (mg/dL)	<0.00001	1.5 (1.0-5.19)*	1.0 (1.0-2.0)*

ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; CC, circunferencia cintura; ES, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; FA, fosfatasa alcalina; GGT, gamma-glutamilttransferasa; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL-C, *high-density lipoprotein cholesterol*; HOMA2-IR, *homeostatic model assessment 2-insulin resistance*; HN, hígado normal; IMC, índice masa corporal; LDL-C, *low-density lipoprotein cholesterol*; STf, saturación de transferrina; PCR, proteína C reactiva. Los datos se expresan como mediana (percentil 25- 75). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante el análisis de la prueba Mann Whitney entre grupos. * Indica diferencias significativas con respecto al normopeso ($p < 0,05$); # indica diferencias significativas con respecto al grupo de obesidad mórbida con histología de HN ($p < 0,05$).

En cuanto a las transaminasas, en la *Tabla 7* se observa que la alanino aminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA) fueron significativamente mayores en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA, que en mujeres con normopeso y obesidad mórbida con histología normal. Sin embargo, los niveles de gamma-glutamilttransferasa (GGT) no fueron significativamente diferentes entre HN y EHGNA en el grupo con obesidad mórbida, aunque sus niveles circulantes fueron significativamente mayores en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA que en mujeres con normopeso. Finalmente, con respecto a los parámetros del metabolismo del hierro, observamos niveles significativamente más altos en el hierro y en la transferrina de mujeres de peso normal que en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA. Sin embargo, los niveles de hepcidina en mujeres con obesidad mórbida con EHGNA y con HN fueron significativamente más altos que en los sujetos de peso normal. También observamos que los niveles de ferritina fueron significativamente mayores en las mujeres con EHGNA y obesidad mórbida que en las mujeres con obesidad mórbida e HN, y en mujeres con peso normal. En relación a la inflamación, los niveles de proteína C reactiva (PCR) fueron significativamente más altos en mujeres con obesidad mórbida con EHGNA e HN que en pacientes con normopeso.

Evaluación de los niveles circulantes de hepcidina según el IMC y la presencia de EHGNA

Primero comparamos los niveles circulantes de hepcidina en nuestra cohorte de mujeres con obesidad mórbida con el grupo control de mujeres con peso normal. Los resultados indicaron que los niveles plasmáticos de hepcidina fueron significativamente mayores en personas con obesidad mórbida que en personas con normopeso (Fig. 13A). Luego, evaluamos los niveles de hepcidina según la presencia de EHGNA en nuestra cohorte de mujeres con obesidad mórbida. Se evidenció que los niveles plasmáticos de hepcidina no fueron significativamente diferentes en mujeres con obesidad mórbida con histología hepática normal y en aquellas con EHGNA, pero fueron significativamente mayores en mujeres con obesidad mórbida con HN que en sujetos de peso normal (*Figura 13B*). Finalmente, analizamos los niveles circulantes de hepcidina en el subgrupo de EHGNA, pero no hubo diferencias significativas entre los

RESULTADOS

grupos con histología de ES y EHNA (obesidad mórbida ES: 22,16 (10,87 ± 39,42);
obesidad mórbida EHNA: 25,00 (6,35 ± 42,07); $p = 0,811$).

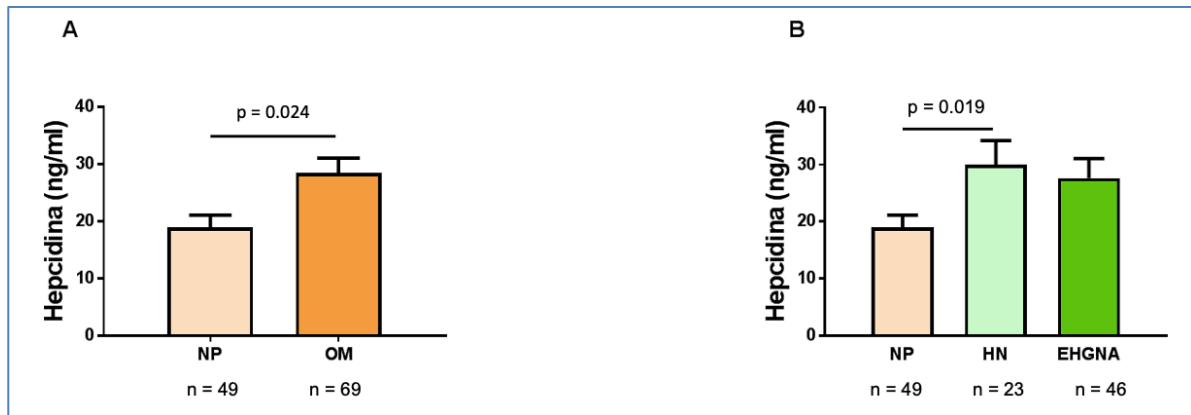


Figura 13. Niveles circulantes de hepcidina. (A) Concentraciones diferenciales de hepcidina circulante entre mujeres con peso normal y mujeres con obesidad mórbida. (B) Niveles circulantes de hepcidina en mujeres de peso normal y en mujeres con OM según la histología hepática en hígado normal y EHGNA. OM, obesidad mórbida; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico. NL; hígado normal. $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Evaluación de la expresión hepática de genes implicados en el metabolismo del hierro

Pese a que son diversos los genes involucrados en el metabolismo del hierro, en nuestro estudio cuantificamos la expresión de ARNm de FPN1, Tfr1, Tfr2 y HJV porque las mutaciones en Tfr2, HJV y FPN1 evitan la respuesta apropiada de hepcidina al hierro, lo que permite una mayor absorción de hierro en la dieta y, de manera secundaria, favorecen la sobrecarga de hierro²³⁸. Observamos que en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA, la expresión de ARNm hepático de hepcidina, FPN1, Tfr1 y Tfr2 fue significativamente mayor que en mujeres con obesidad mórbida e histología hepática normal (*Figura 14*). Al subclasificar a los sujetos con obesidad mórbida y EHGNA, en ES y EHNA, no observamos diferencias significativas en la expresión del ARNm hepático de los genes del metabolismo del hierro estudiados. Sin embargo, la expresión de ARNm hepático de FPN1, HJV, Tfr1 y Tfr2 fue significativamente mayor en mujeres con obesidad mórbida y ES que en aquellas con HN. Además, la expresión

de ARNm hepático de TfR1 y TfR2 también fue significativamente mayor en EHNA que en mujeres con obesidad mórbida con HN (*Figura 15*).

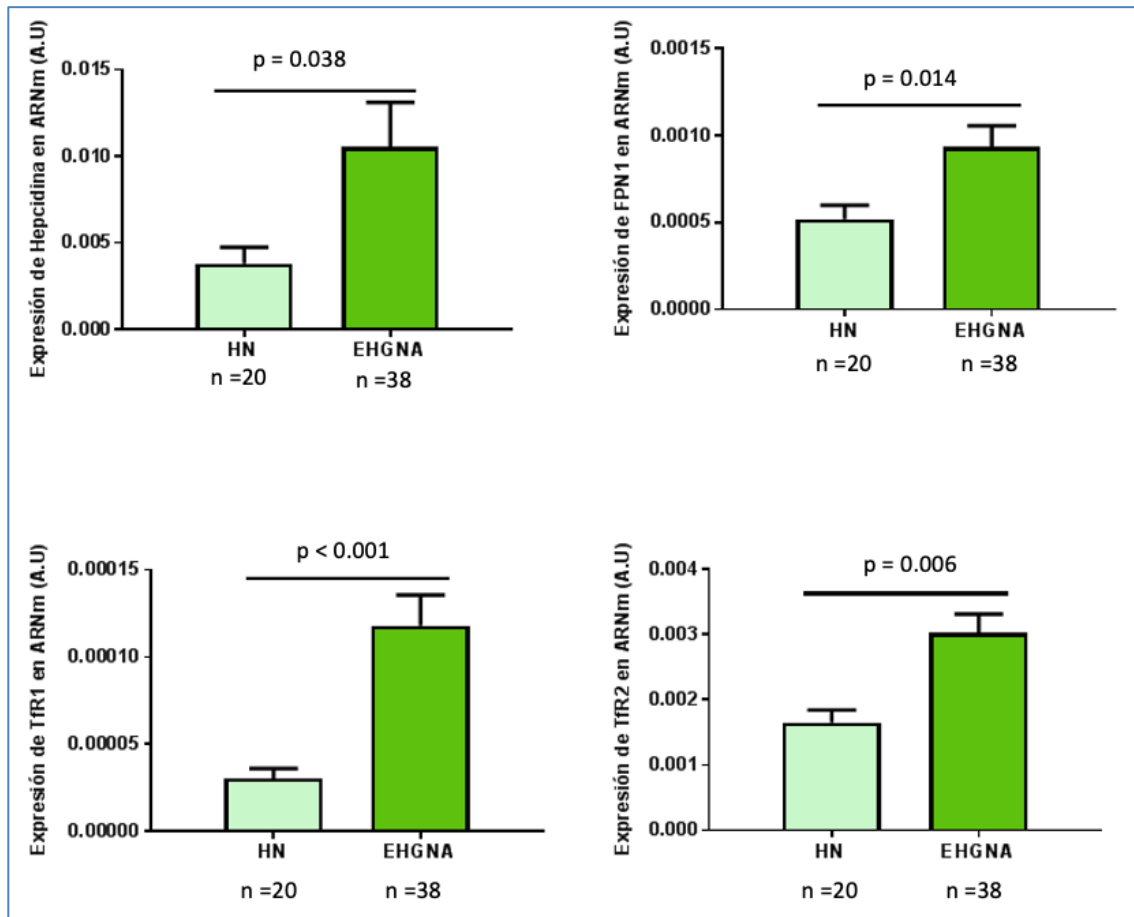


Figura 14. Expresión hepática diferencial de hepcidina y genes relacionados con el metabolismo del hierro entre mujeres con OM con histología hepática normal y mujeres con OM y EHGNA. AU; unidades arbitrarias; OM, obesidad mórbida; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico. HN; hígado normal. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

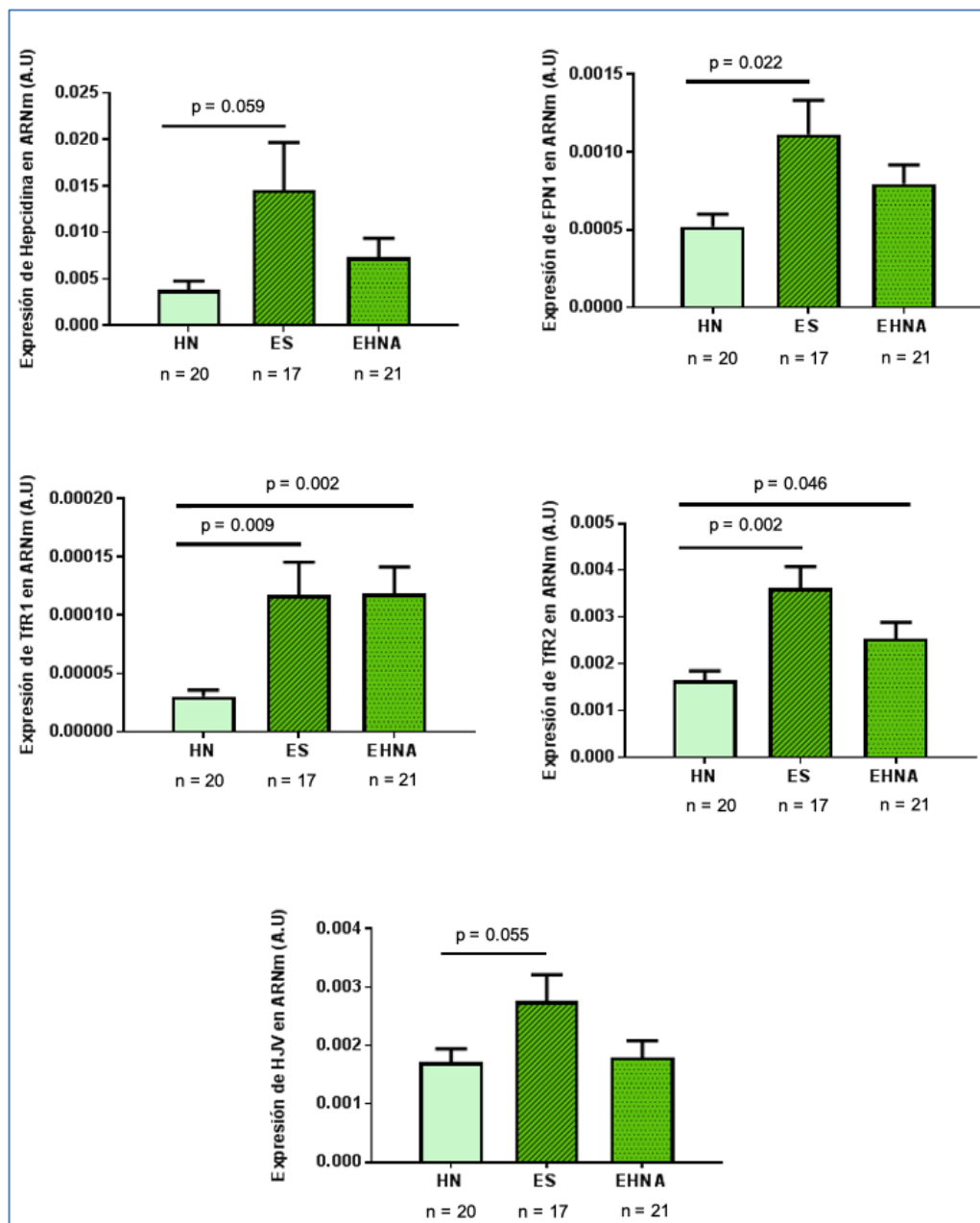


Figura 15. Expresión hepática en mujeres OM según patología hepática en HN, ES y EHNA. AU; unidades arbitrarias; OM, obesidad mórbida; EHNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico. HN; hígado normal; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; ES; esteatosis simple. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Correlaciones de los niveles circulantes de hepcidina con parámetros bioquímicos

Al analizar la asociación de los niveles circulantes de hepcidina con los parámetros bioquímicos estudiados, observamos que la hepcidina plasmática presentó una correlación positiva con la ferritina ($r = 0,708$; $p < 0,001$), la saturación de transferrina ($r = 0,230$; $p = 0,028$) y los niveles de hierro ($r = 0,274$; $p = 0,007$), y negativa con niveles de transferrina ($r = -0,306$; $p = 0,003$). Además, se observó una asociación negativa entre los niveles circulantes de hepcidina y los de HDL-C ($r = -0,198$; $p = 0,038$), mientras que se mostró una asociación positiva con la FA ($r = 0,252$; $p = 0,009$).

Correlaciones de la expresión génica de la hepcidina y de los genes relacionados con el metabolismo del hierro, con la expresión hepática de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y con parámetros bioquímicos implicados en el metabolismo del hierro

Los resultados que se muestran en la *Tabla 8* indican que en nuestra cohorte de mujeres con obesidad mórbida, la expresión del ARNm hepático de hepcidina y los genes relacionados con el metabolismo del hierro estudiados se asociaron positivamente con algunos genes clave implicados en el metabolismo hepático de los lípidos. También observamos que la expresión de hepcidina en el hígado se correlacionó positivamente con FPN1 ($r = 0,529$; $p < 0,001$), TfR2 ($r = 0,551$; $p < 0,001$) y HJV ($r = 0,593$; $p < 0,001$). Además, la expresión de hepcidina hepática no solo se asoció positivamente con sus niveles circulantes ($r = 0,710$; $p < 0,001$), sino también con los niveles plasmáticos de hierro, ferritina y saturación de transferrina (Hierro: $r = 0,389$; $p = 0,014$; Ferritina: $r = 0,525$; $p < 0,001$; Saturación de transferrina: $r = 0,471$; $p = 0,005$). Finalmente, se observó una fuerte asociación negativa entre la expresión hepática de hepcidina y los niveles de transferrina circulante ($r = -0,633$; $p < 0,001$).

RESULTADOS

Tabla 8. Correlaciones de la hepcidina hepática y la expresión de genes relacionados con el metabolismo del hierro con genes implicados en el metabolismo de los lípidos.

Variables	Hepcidin		FPN1		HJV		TfR1		TfR2	
	<i>r</i>	<i>p</i> -Value	<i>r</i>	<i>p</i> -Value	<i>r</i>	<i>p</i> -Value	<i>r</i>	<i>p</i> -Value	<i>r</i>	<i>p</i> -Value
<i>Genes metabolismo lipídico</i>										
LxRα	0.392	0.022	0.521	0.005	0.439	0.011	0.447	0.011	0.434	0.011
SREBP1c	0.380	0.022	0.384	0.019	0.389	0.022	0.175	0.293	0.377	0.022
ACC1	0.021	0.888	0.116	0.513	-0.069	0.781	0.148	0.354	0.034	0.906
FAS	-0.151	0.381	0.108	0.513	-0.102	0.667	0.242	0.164	-0.003	0.982
PPARα	0.414	0.022	0.583	0.005	0.559	0.011	0.374	0.040	0.622	0.005
CPT1α	0.186	0.322	0.276	0.094	0.318	0.057	0.231	0.164	0.461	0.005
CROT	0.156	0.381	0.273	0.094	0.243	0.169	0.317	0.082	0.318	0.057
SREBP2	0.138	0.392	0.173	0.330	0.044	0.839	0.247	0.164	0.261	0.121
ABCA1	0.224	0.240	0.026	0.863	0.010	0.946	0.022	0.881	0.074	0.763
ABCG1	0.245	0.213	0.362	0.026	0.123	0.628	0.433	0.011	0.255	0.121
PNPLA3	0.431	0.022	0.418	0.019	0.397	0.027	0.255	0.164	0.434	0.016

Ferroportin-1 (FPN1); Hemojuvelin (HJV); Transferrin Receptor 1 (TfR1); Transferrin Receptor 2 (TfR2); Liver X receptor alpha (LxRα); Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBP1c); Acetyl Coenzyme A Carboxylase 1 (ACC1); Fas cell surface death receptor (FAS); Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-α); Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1α); Carnitine O-Octanoyltransferase (CROT); Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2); ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1 (ABCA1); ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1 (ABCG1); Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3)

2. ESTUDIO 2: Serotonina en obesidad mórbida y EHGNA

Características basales de los sujetos

Las características basales de los sujetos se muestran en la *Tabla 9* e incluyen los parámetros antropométricos y bioquímicos, expresados como media y desviación estándar o como mediana y percentiles, según la distribución de las variables. Los análisis bioquímicos mostraron que las mujeres con obesidad mórbida tenían niveles significativamente más altos de glucosa en ayunas, insulina, HOMA2-IR, triglicéridos, AST, ALT, GGT y FA ($p < 0.05$) que las mujeres con normopeso. Además, el nivel de HDLc

fue significativamente menor en los pacientes con obesidad mórbida que en los sujetos con normopeso ($p < 0,001$). No hubo diferencias en el resto del perfil lipídico, porque los pacientes con obesidad mórbida estaban tomando fármacos hipolipemiantes. Luego, nuestra cohorte de mujeres con obesidad mórbida fue subclasificada según su histología hepática: primero como histología de hígado normal (HN, $n = 22$) y EHGNA ($n = 36$); en segundo lugar, los pacientes se subclasificaron en grupos de HN, ES ($n = 21$) y EHNA ($n = 15$).

En términos de edad y medidas antropométricas (peso, IMC), no hubo diferencias significativas entre los pacientes con HN, ES y EHNA en el grupo con obesidad mórbida. Los parámetros de laboratorio indicaron que los niveles de glucosa y FA aumentaron en las mujeres con ES en comparación con las mujeres con HN y EHNA con obesidad mórbida. De la misma manera, la ALT disminuyó en el grupo con HN en comparación con las mujeres ES con obesidad mórbida. Finalmente, los niveles de glucosa y ALT aumentaron significativamente en mujeres con EHGNA en comparación con HN.

RESULTADOS

Tabla 9. Variables antropométricas y bioquímicas de la cohorte de estudio clasificadas según el IMC y las características histopatológicas.

Variables	NP (n=26)	OM (n=58)	HN (n=22)	ES (n=21)	EHNA (n=15)
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
CC (cm2)	NA	125.10±11.71	124.08±6.69	130.07±12.39	120.42±13.66
Colesterol (mg/dl)	180.74±14.27	170.41±35.59	168.20±36.25	171.56±31.60	171.30±8.62
LDL-C (mg/dL)	95.60±28.18	136.34±74.74	106.40±36.21	99.78±25.00	95.88±30.27
FA (U/L)	54.78±4.90*	67.84±14.22	63.54±11.54 [§]	75.72±13.76 [#]	61.23±12.76
	Med (25 th -75 th)	Med (25 th -75 th)	Med (25 th -75 th)	Med (25 th -75 th)	Med (25 th -75 th)
Peso (kg)	58.00 (52.75-60.38)*	116.40 (108.00-130.10)	117.50 (110.25-132.00)	116.80 (110.00-130.20)	113.50 (104.00-124.00)
IMC (kg/m ²)	21.63 (20.07-24.04)*	43.90 (40.89-46.85)	43.30 (40.89-47.53)	44.59 (40.84-46.81)	44.95 (41.14-48.83)
Glucosa (mg/dL)	80.00 (73.00-85.00)*	92.00 (80.50-107.00)	85.50 (76.75-93.00) §	102.00 (83.00-153.00)	99.00 (83.00-106.00)
Insulina (mUI/L)	5.66 (4.94-7.89)*	9.42 (5.54-15.80)	9.43 (4.04-17.63)	9.80 (6.94-15.75)	6.57 (5.09-17.48)
HOMA2-IR	0.72 (0.62-1.01)*	1.19 (0.71-2.27)	1.23 (0.46-2.27)	1.32 (0.93-2.28)	0.86 (0.61-2.42)
HbA1c (%)	5.40 (5.20-5.70)	5.60 (5.30-5.98)	5.40 (5.30-5.70)	5.60 (5.30-6.10)	5.60 (5.20-6.33)
HDL-C (mg/dL)	68.00 (59.00-81.00)*	38.50 (33.00-47.00)	39.00 (32.00-46.00)	45.00 (33.75-47.50)	38.00 (33.50-48.50)
TG (mg/dL)	62.00 (49.00-71.00)*	123.00 (86.00-166.00)	105.00 (86.00-141.00)	128.00 (82.25-186.25)	128.00 (83.75-187.50)
AST (U/L)	17.00 (14.00-22.00)*	23.00 (17.00-37.00)	20.00 (16.00-31.50)	27.00 (20.00-43.00)	30.00 (17.00-44.00)
ALT (U/L)	16.00 (12.00-20.00)*	28.50 (18.00-35.00)	21.00 (15.50-30.00) [§]	32.50 (24.25-35.75)	33.00 (16.00-30.50)
GGT (U/L)	13.00 (11.00-17.00)*	22.00 (16.00-31.00)	21.00 (16.00-29.00)	22.00 (16.25-31.75)	26.00 (12.50-30.50)
PAS	120.00 (109.00-122.00)	118.00 (107.00-133.00)	122.50 (99.25-132.75)	121.00 (110.00-140.00)	115.00 (101.50-125.25)
PAD	65.00 (65.00-66.00)	66.00 (59.00-75.50)	70.50 (56.75-79.50)	62.00 (59.00-77.00)	66.00 (59.00-71.50)

OM, obesidad mórbida; NP, normopeso; HN, hígado normal; ES, esteatosis simple; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia cintura; HOMA2-IR, *homeostatic model assessment method insulin resistance*; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL-C, *high density lipoprotein cholesterol*; LDL-C, *low density lipoprotein cholesterol*; TG, triglicéridos; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanino aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; FA, fosfatasa alcalina; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. Los datos de las

variables paramétricas se expresan como la media \pm DE. Los datos de las variables no paramétricas se expresan como medianas (percentiles 25 y 75). * Diferencias significativas entre controles NP y grupo con OM ($p < 0,05$).[§] Diferencias significativas entre pacientes con HN y ES ($p < 0,05$). # Diferencias significativas entre ES y EHNA ($p < 0,05$).

Niveles periféricos de serotonina en la cohorte estudiada

Analizamos los niveles séricos de 5-HT tanto en los controles con normopeso como en los sujetos con obesidad mórbida. Los niveles de 5-HT periférica eran menores en mujeres con obesidad mórbida que en mujeres con normopeso ($p = 0,001$, *Figura 16*). Cuando analizamos los niveles séricos de 5-HT según la histología hepática (HN vs. EHNA), no hallamos diferencias significativas ($p = 0,700$).

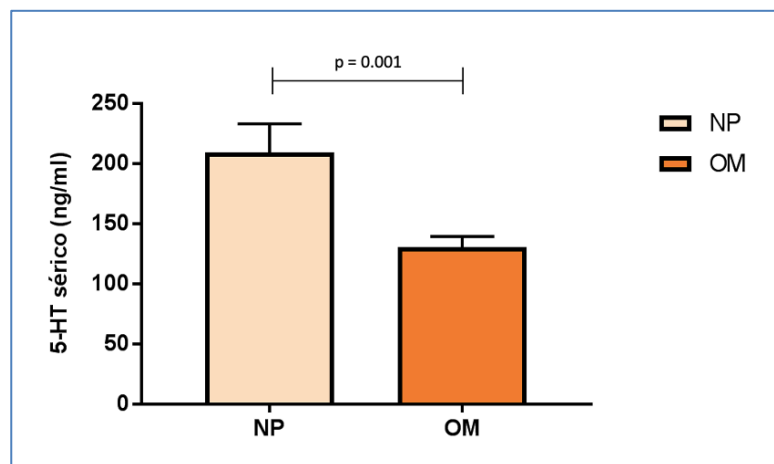


Figure 16. Niveles séricos de 5-HT en mujeres con peso normal y mujeres con obesidad mórbida . NP: peso normal, OM: obesidad mórbida. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Correlaciones de los niveles séricos de serotonina con la presencia de síndrome metabólico

Dado que los niveles periféricos de 5-HT se han relacionado con la obesidad y la DM2, analizamos la asociación entre los niveles periféricos de 5-HT y la presencia de síndrome metabólico en nuestra cohorte. La presencia de síndrome metabólico se definió de acuerdo con Alberti et al.²³⁹. Observamos una correlación negativa entre ellos ($\rho = -0,334$, $p = 0,003$). En este sentido, los niveles periféricos de 5-HT se correlacionaron positivamente con los niveles de HDL-C ($\rho = 0,271$, $p = 0,028$) y

RESULTADOS

negativamente con los triglicéridos ($\rho = -0,251$, $p = 0,04$). Lamentablemente, no se encontró ninguna correlación entre los niveles séricos de 5-HT y la glucosa en ayunas, la presión arterial sistólica (PAS) ni la circunferencia de la cintura (CC) (datos no mostrados).

Evaluación de la expresión génica de HTR2A, HTR2B y HTR3 en el hígado y de HTR3 y HTR4 en el yeyuno de acuerdo a la histología hepática

Se observó que las mujeres con EHGNA tenían niveles relativos de ARNm disminuidos de HTR2A y HTR2B en hígado en comparación con el grupo con HN (Figura 17a, b).

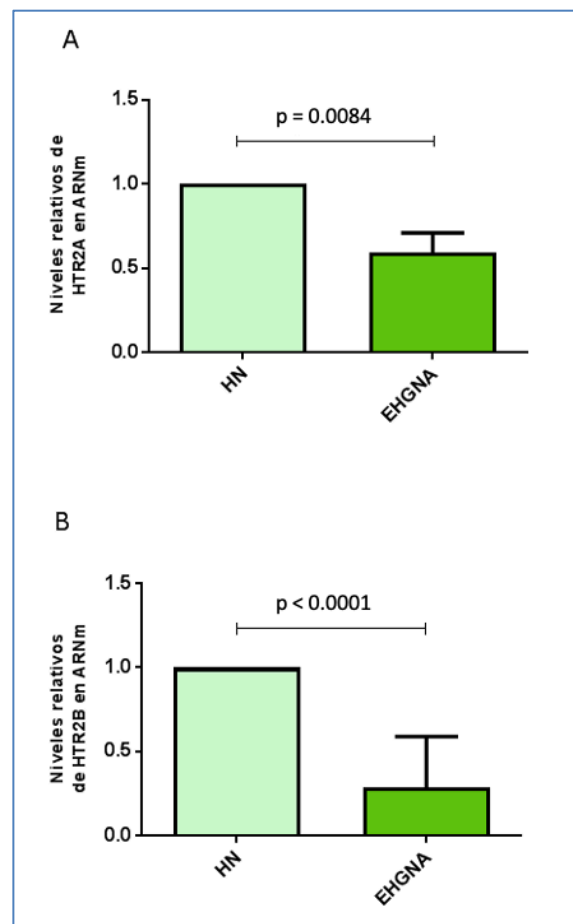


Figura 17. (A) Niveles relativos diferenciales de ARNm de HTR2A y (B) Niveles relativos de ARNm de HTR2B entre mujeres con OM con histología HN y mujeres con OM con EHGNA. La abundancia relativa de ARNm se expresó como incremento de veces de EHGNA con respecto al control ($2^{-\Delta\text{CT EHGNA}}/2^{-\Delta\text{CT HN}}$). OM, obesidad mórbida; HN, hígado normal; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Al subclasificar nuestra cohorte en grupos de HN, ES y EHNA, encontramos que los niveles relativos de ARNm de HTR2A eran más bajos en ES en comparación con HN (*Figura 18a*). No hallamos diferencias significativas entre los grupos con HN y EHNA ($p = 0.0625$) tras la corrección con el método de Tukey. La cohorte obtenida en el grupo con EHNA resultó demasiado pequeño para compararlo. Por otro lado, los niveles relativos de ARNm de HTR2B disminuyeron significativamente en mujeres con ES o EHNA en comparación con el grupo control (*Figura 18b*).

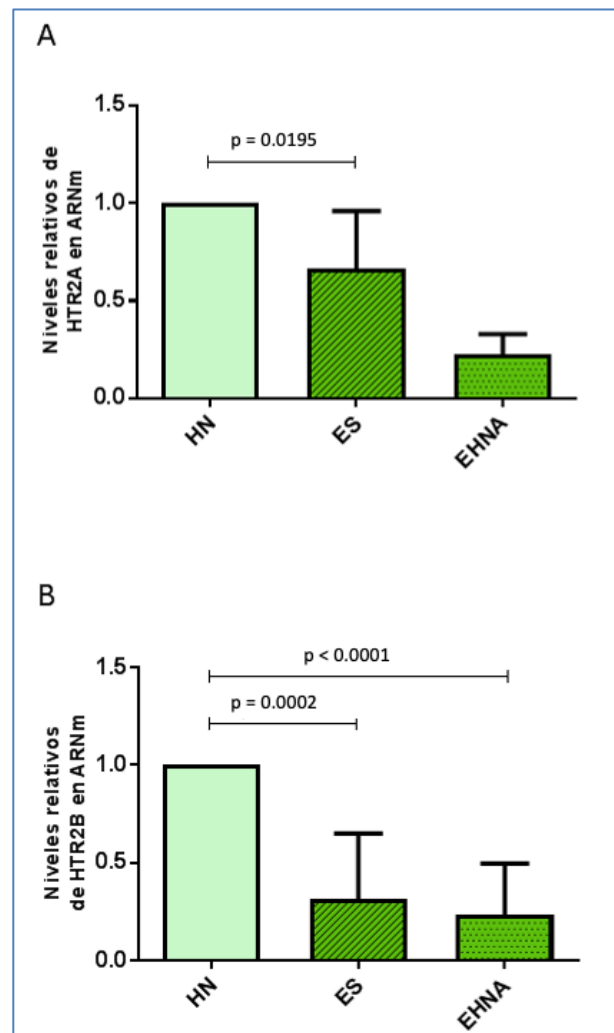


Figura 18. (A) Niveles relativos diferenciales de ARNm de HTR2A y (B) Niveles relativos de ARNm de HTR2B entre mujeres con ES o EHNA en comparación con el grupo de control HN. La abundancia relativa de ARNm se expresó como el incremento de veces en los grupos ES o EHNA con respecto al grupo de control ($2^{-\Delta Ct \text{ ES or EHNA}} / 2^{-\Delta Ct \text{ HN}}$). HN; hígado normal; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; ES, esteatosis simple. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Para incrementar el conocimiento sobre el papel que juegan los receptores intestinales (HTR3 y HTR4) en la patogénesis de HGNA, estudiamos los niveles de ARNm yeyunal en relación a la histología hepática de nuestras pacientes. Sin embargo, no hallamos diferencias significativas en los niveles relativos de ARNm de HTR3 y HTR4 según la histología hepática en mujeres con obesidad mórbida (datos no mostrados).

Correlaciones de la expresión hepática de HTR2A, HTR2B y HTR3 y la expresión yeyunal de HTR3 y HTR4 con los niveles séricos de 5-HT y la presencia de síndrome metabólico

No pudimos encontrar ninguna correlación entre la expresión de HTR2A, HTR2B y HTR3 en el hígado y la expresión yeyunal de HTR3 y HTR4 con los niveles periféricos de 5-HT (datos no mostrados). Tampoco se encontró correlación entre la expresión hepática de HTR2A, HTR2B y HTR3 y la expresión yeyunal de HTR3 y HTR4 con la presencia de síndrome metabólico (datos no mostrados).

Correlaciones de los niveles periféricos de serotonina con citocinas inflamatorias

Los niveles séricos de 5-HT se correlacionaron negativamente con los niveles de interleucina (IL) -1 ($\rho = -0,399$, $p < 0,001$) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ($\rho = -0,287$, $p = 0,011$). Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles de 5-HT y otras interleucinas circulantes (IL-6, IL-8, proteína C reactiva (PCR) y adiponectina

VII. DISCUSIÓN

En la presente tesis se han evaluado dos mecanismos potencialmente involucrados en la compleja fisiopatología de la EHGNA, uno de ellos más conocido: el metabolismo del hierro y el segundo muy novedoso, el de la serotonina. Presentamos la discusión por separado de cada uno de los estudios.

1. ESTUDIO 1: Hecpidina en obesidad mórbida y EHGNA

Dado que el metabolismo de los lípidos y del hierro parecen estar implicados en la patogenia de la EHGNA ^{202,240-242}, que la hepcidina parece tener un papel en la transición de la ES a la EHNA ²⁴³ y que el metabolismo de los lípidos podría estar implicado en la síntesis de hepcidina ^{202,242}, en este primer trabajo pretendimos profundizar en el conocimiento de esta enfermedad explorando la relación entre los niveles plasmáticos de hepcidina y la presencia de EHGNA en pacientes con obesidad mórbida, así como estudiar una posible asociación entre la expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo del hierro y los genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático.

En este trabajo, el primer objetivo fue evaluar la relación entre los niveles plasmáticos de hepcidina y la presencia de EHGNA en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida y EHGNA puesto que a pesar de que la hepcidina se había relacionado con estados de RI, como la DM2, el SMet y la obesidad ^{244,245}, los estudios que habían evaluado la relación entre los niveles circulantes de hepcidina y la presencia o gravedad de la EHGNA eran contradictorios. En este sentido, en nuestro estudio los niveles plasmáticos de hepcidina fueron significativamente mayores en mujeres con obesidad mórbida que en mujeres con peso normal. Sin embargo, los niveles plasmáticos de hepcidina no fueron significativamente diferentes entre las mujeres con obesidad mórbida con histología hepática normal y en aquellas con EHGNA. De esta forma, demostramos que la obesidad pero no la presencia de EHGNA se asociaba con niveles circulantes de hepcidina elevados, tal como habían descrito otros autores ^{204,246-248}. En un metaanálisis, Cheng et al. revisaron la asociación entre la

DISCUSIÓN

obesidad adulta y la homeostasis del hierro y hallaron que los sujetos con obesidad presentaban un aumento de la hemoglobina y de la concentración de ferritina sérica²⁴⁹. Es bien conocido que la hepcidina controla la homeostasis sistémica del hierro. Al respecto, varios estudios han demostrado que la hepcidina circulante y las concentraciones de ferritina aumentan en sujetos obesos con inflamación crónica de bajo grado^{244,250,251}. Del mismo modo, en nuestro estudio, los niveles de hepcidina y de la PCR en mujeres con obesidad mórbida, independientemente de su histología hepática, fueron más elevados que los de los sujetos con peso normal.

En relación a la EHGNA, pese a que algunos autores describieron niveles séricos más elevados de hepcidina en pacientes con EHGNA^{198,200,203,247,252,253}, otros no encontraron ninguna relación^{174,204,246,254}, como ocurrió en nuestro trabajo. Estas discrepancias podrían explicarse por las diferentes características de las cohortes estudiadas y los métodos utilizados. Así, nuestro estudio se realizó en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida, mientras que Senates et al.¹⁹⁸ incluyó una cohorte de pacientes de ambos sexos y con obesidad leve. También cabe señalar que en el estudio de Senates et al. no se proporcionaron los niveles de ferritina del grupo de control. Como estos niveles tienen influencia en los niveles de hepcidina, podría existir un sesgo. Asimismo, el estudio de Demircioglu et al., se centró en niños con sobrepeso / obesidad leve y la EHGNA fue diagnosticada mediante ecografía, sin histología hepática²⁰³. También existe controversia respecto a la relación de la hepcidina y la gravedad histológica de la EHGNA. En este sentido, en un estudio en el que se incluyeron pacientes levemente obesos de ambos sexos con EHNA, se observó que la hepcidina se correlacionaba con la inflamación hepática²⁰⁰. En el trabajo de Ryan et al., se hallaron niveles circulantes de hepcidina más altos en pacientes en estadio F4 (cirrosis) y no así en pacientes con EHNA en estadio F2 y F3 que no se incluyeron en el estudio²⁵⁴. También se han llevado a cabo estudios en pacientes en edad pediátrica con EHGNA como el de Tsutsumi et al., en el cual se observó una correlación negativa entre la inmunotinción de hepcidina hepática y el grado de EHNA en la escala de Brunt²⁵³. Finalmente, en nuestro estudio, no pudimos demostrar ninguna asociación entre los niveles circulantes de hepcidina y la gravedad de la histología de la EHGNA. Hemos de señalar aquí que en nuestro estudio no se incluyeron pacientes con cirrosis.

Es conocido que tanto la obesidad como la EHGNA se asocian con una desregulación del metabolismo lipídico ¹⁶⁸. De hecho, Auguet et al. demostraron que existe una relación entre la desregulación de la vía lipogénica y la gravedad de la esteatosis hepática en pacientes con EHGNA ²⁴¹. En la línea de nuestro trabajo, Barisani et al. y Mitsuyoshi et al. informaron que el metabolismo lipídico podría estar implicado en la síntesis de hepcidina ^{202,242}. Teniendo en cuenta estos resultados, el segundo objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión hepática de hepcidina y de otros genes involucrados en el metabolismo del hierro, e investigar si existía alguna asociación con la expresión génica hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo lipídico hepático. En primer lugar, observamos que en la población de mujeres con obesidad mórbida, la expresión génica hepática de hepcidina fue significativamente mayor en pacientes con EHGNA que en aquellas con histología hepática normal, y el mismo patrón se observó en la expresión de reguladores *upstream* de la hepcidina, como el receptor de transferrina 1 (TfR1) y 2 (TfR2) y la ferroportina 1 (FPN1). Este hallazgo es consistente con estudios previos en los que los niveles hepáticos de estos genes en pacientes con EHGNA eran significativamente más altos que en los controles, lo que sugiere que la actividad de FPN1 no coincide con la cantidad de FPN1 ^{242,255}.

Algunos autores han sugerido que las formas más graves de EHGNA se asocian con una producción insuficiente de hepcidina ^{202,242}. En contraposición, en el estudio de Handa et al. se observó una expresión elevada de hepcidina en pacientes con EHNA y en pacientes con EHGNA que tenían depósito de hierro hepático, mientras que las citocinas proinflamatorias mostraron una expresión elevada sólo en pacientes con EHNA, lo que sugiere un papel regulador de la hepcidina en la transición de ES a EHNA y en la mitigación de las respuestas inflamatorias ²⁴³. En nuestro estudio, no observamos diferencias significativas entre los pacientes con EHGNA con ES de aquéllos con EHNA. En relación a estas discrepancias, se ha de señalar que en el estudio de Handa et al. se incluyeron pacientes con un IMC entre 30 kg/m² y 40 kg/m² y de ambos sexos, mientras que nuestra cohorte estaba formada por pacientes mujeres con obesidad mórbida.

DISCUSIÓN

La sobrecarga de hierro que se observa en algunos pacientes con EHNA podría estar favorecida por mecanismos independientes de la hepcidina. Datos de estudios publicados indican que la IRP-1 (iron regulatory protein-1) y el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) podrían estar aumentados en pacientes con EHNA ²⁵⁶. Asimismo, parece que el BMPER (bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator) ²⁵⁷ y el HNF-4 alpha (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) ²⁵⁸ parecen influir en la absorción de hierro. En estudios con ratones, una dieta rica en grasas por sí sola podría aumentar la absorción de hierro ²⁵⁹ y una dieta rica en fructosa podría reducir los niveles séricos de hierro y favorecer su depósito en el hígado de manera secundaria al aumento de expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo férrico. Estos resultados se acompañaron de un aumento de inflamación hepática y esteatosis secundaria ²⁶⁰. Finalmente, estudios alentadores se han realizado con la inyección intraperitoneal de lactoferrina (Lf) humana recombinante en ratones, que parece reducir la activación de JAK2 y el nivel de expresión de IL-6 al actuar en el eje hepcidina-FPN ²⁶¹. La Lf es un potente antioxidante y glicoproteína de unión al hierro, que podría reducir la progresión de la ES y la muerte hepatocelular al regular la homeostasis del hierro y de los lípidos.

En nuestro estudio, posteriormente, estudiamos la relación entre la expresión de los genes involucrados en el metabolismo del hierro y aquellos relacionados con el metabolismo lipídico hepático. Una de las novedades de este estudio radica en que nuestros resultados mostraron asociaciones positivas entre la expresión hepática de hepcidina, HJV, FPN1, TfR1 y TfR2 con la expresión hepática de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (LXR α y SREBP1c), la oxidación de ácidos grasos (PPAR α), la secreción de lipoproteínas (ABCG1) y la triacilglicerol lipasa, PNPLA3. En este sentido, algunos autores han descrito la regulación postranscripcional de los genes de hepcidina humana por los ácidos grasos en las células HepG2 ²⁶². Además, diferentes modelos experimentales sugirieron que la sobrecarga de hierro parece tener efectos directos sobre el metabolismo de los lípidos hepáticos ^{263,264}. Los resultados descritos por Xiaoli et al., en cultivos celulares y con ratones adultos, podrían coincidir con nuestros resultados. Evidenciaron que la sobreexpresión del SREBP-1a nuclear favoreció la desregulación del metabolismo del

hierro probablemente por el aumento del ARNm de hepcidina hepática al inducir el gen HAMP²⁶⁵. Las formas nucleares de SREBP-1 podrían activarse en ciertas condiciones fisiopatológicas, como en la EHGNA y en el envejecimiento²⁶⁶. Sin embargo, se necesitan más estudios en humanos para aclarar nuestros hallazgos porque la asociación entre la expresión hepática de los principales genes relacionados con el metabolismo férrico y lipídico podría ser casual. Quizás, más bien que una relación directa, podría existir un mecanismo patogénico común que provoque la progresión a EHNA, como el estrés oxidativo o la inflamación²⁴³.

Como limitaciones de este trabajo, debemos mencionar que se trata de un estudio transversal. Por otro lado, no se evaluó la expresión proteica ni pudimos demostrar un vínculo causal entre los genes relacionados con el metabolismo férrico y lipídico en la EHGNA. Sin embargo, nuestra cohorte de estudio de mujeres con obesidad mórbida reveló una relación entre los genes del metabolismo del hierro y los relacionados con el metabolismo de los lípidos en EHGNA, sin la interferencia de género o edad. Debemos señalar que nuestros hallazgos no se pueden extrapolar a hombres u otros grupos de obesidad.

2. ESTUDIO 2: Serotonina en obesidad mórbida y EHGNA

La principal novedad del presente estudio es el análisis de los niveles periféricos de 5-HT en una cohorte bien caracterizada de mujeres con obesidad mórbida y EHGNA en relación con la expresión génica hepática y yeyunal de los receptores de serotonina. Hallamos que los niveles periféricos de 5-HT fueron más bajos en las mujeres con obesidad mórbida en comparación con los sujetos con normopeso. Además, encontramos una expresión disminuida de HTR2B hepático en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA.

En primer lugar, analizamos los niveles periféricos de 5-HT según la presencia de obesidad. Encontramos que los niveles de 5-HT estaban disminuidos en mujeres con obesidad mórbida. En relación a los niveles de 5-HT en la obesidad, la evidencia

DISCUSIÓN

descrita en la literatura es controvertida. Algunos estudios coinciden con nuestros resultados e informan de una asociación negativa entre los niveles de 5-HT y el peso o el IMC ^{231,267}. Según estos autores, la 5-HT circulante interactúa con la leptina en el tejido adiposo y aumenta la sensación de saciedad; por lo tanto, se cree que la 5-HT tiene un papel protector contra la obesidad ²³¹. Sin embargo, otros estudios han informado que los niveles elevados de 5-HT en suero están relacionados con la obesidad en modelos animales ^{233,268}. Estos autores describen que una dieta alta en grasas (DAG) promueve la sobreexpresión de TPH1, lo que aumenta los niveles de 5-HT circulante. Además, en humanos, se ha demostrado que las comidas ricas en carbohidratos y las infusiones de glucosa duodenal mejoran la liberación de 5-HT desde el intestino ^{232,269}. Esta 5-HT llega a tejidos como el hígado, el tejido adiposo o el páncreas y promueve la gluconeogénesis y la lipogénesis, que inducen la obesidad ²⁷⁰.

Las controversias que surgen de estos artículos sobre la obesidad y los niveles circulantes de 5-HT podrían explicarse por diferentes motivos: 1) Cada estudio se llevó a cabo utilizando diferentes métodos de determinación (HPLC, ELISA, fluorimetría ...) ²³¹, lo que crea una importante medida de variabilidad ²⁷¹. También es posible que esta variación se deba a diferencias en la dieta de los individuos incluidos antes de la medición. Los estudios que informaron de niveles más altos de 5-HT en sujetos con obesidad incluyeron una cohorte de estudio que previamente había sido alimentada con una dieta rica en carbohidratos o se le había infundido glucosa ^{232,269}. Lo mismo ocurre en modelos animales en los que se indujo obesidad con una DAG ^{233,268}. En el estudio de Kundi et al., se postula que la dieta enriquecida en fibra administrada a ratones podría disminuir los niveles séricos de 5-HT, mediante desviación de TRP de la vía de síntesis de 5-HT a la vía de producción microbiana de indol (ver *Figura 10*). Por tanto, en este estudio los resultados sugieren que la dieta occidental baja en fibra podría aumentar los niveles séricos de 5-HT y disminuir las vías alternativas (protectoras) para el metabolismo de TRP ²⁷². En contraposición, es importante señalar que nuestra cohorte está formada por mujeres con obesidad mórbida que se sometieron a cirugía bariátrica y estaban en dieta muy baja en calorías durante los tres meses previos a la cirugía. Se ha descrito que la 5-HT disminuye con una dieta baja en calorías ^{267,273}. En este sentido, el tipo de nutrientes contenidos en la dieta podrían

modificar la microbiota intestinal y con ello la actividad de la TPH-1 ^{272,274-276}; 3) También tenemos que considerar que otros estudios, a diferencia del nuestro, se han realizado con una cohorte heterogénea de hombres y mujeres con un rango de edad o IMC diferente ^{231,232,269}.

En segundo lugar, observamos una asociación negativa entre los niveles séricos de 5-HT y la presencia de SMet. En consecuencia, los niveles séricos de 5-HT se correlacionaron positivamente con el HDL-C y negativamente con los triglicéridos. La 5-HT, es una bioamina multifuncional, que se sintetiza en las células enterocromafines. Éstas generan toda la 5-HT con acción periférica. La 5-HT tiene una función local en la modulación de la motilidad gastrointestinal, pero la 5-HT de origen intestinal también se ha involucrado en la regulación de la homeostasis de la glucosa, metabolismo lipídico, densidad ósea y enfermedades asociadas con el síndrome metabólico, como la obesidad y la DM2 ^{277,278} a través de la disbiosis intestinal ^{276,279}. La 5-HT derivada del intestino puede regular al alza la expresión de niveles del factor de crecimiento de fibroblastos- 21(FGF21) hepático y los niveles de FGF21 en plasma, que preceden a la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa y el aumento de peso en ratones alimentados con una dieta rica en grasas ²²⁰. Por consiguiente, nuestros resultados deben ser interpretados con cautela y reafirman la evidencia disponible hasta el momento. Como hemos mencionado, las pacientes con obesidad mórbida de nuestro estudio se habían sometido a una dieta hipocalórica (VLCD) los 3 meses previos a la determinación y las mujeres con PN realizaban una dieta libre, motivo por el cual se postula que los niveles de 5-HT estuvieran más bajos en las pacientes con obesidad mórbida en presencia de SMet.

También analizamos la correlación entre los niveles de 5-HT y los niveles circulantes de citocinas inflamatorias. En este sentido, nuestros resultados han mostrado una correlación negativa entre la 5-HT circulante y los niveles de IL-1 y TNF- α , dos importantes citocinas proinflamatorias. Estos resultados están apoyados por la evidencia de Ritze et al., quienes describieron que los niveles circulantes de 5-HT eran más bajos en sujetos con obesidad mórbida en comparación con el grupo normopeso,

DISCUSIÓN

mientras que los marcadores inflamatorios estaban aumentados ²⁶⁷. Todos estos hallazgos sugieren que la serotonina pudiera tener un papel protector en la obesidad.

Como la disbiosis intestinal puede generar metabolitos alterados derivados del intestino que se han relacionado con EHGNA ^{280,281} y, además, altera la homeostasis intestinal que puede afectar la síntesis de serotonina ²⁸², también quisimos analizar los niveles de 5-HT en relación con la presencia de EHGNA. Hay pruebas de que la 5-HT derivada del intestino llega al hígado y promueve la gluconeogénesis y la lipogénesis, que inducen la ES ²⁸³. Sin embargo, en nuestro trabajo no pudimos encontrar ninguna relación entre estos factores. Un estudio clínico reciente halló que niveles disminuidos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA; un metabolito de 5-HT) se asociaron significativamente con eventos hepáticos en pacientes con EHGNA con predominio fibrosis en estadio 3 ²⁸⁴. Curiosamente, el control de los medicamentos serotoninérgicos no hizo que este metabolito perdiera significancia estadística, lo que sugiere que la serotonina exógena no es la causa de esta asociación.

Una de las novedades del presente trabajo es el análisis de la expresión de receptores de 5-HT hepáticos (HTR2A, HTR2B y HTR3) y yeyunales (HTR3 y HTR4) en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida y EHGNA. Nuestros hallazgos indicaron que la abundancia de ARNm de HTR2A y HTR2B hepático fue significativamente menor en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA que en el grupo control (obesidad mórbida con HN). Existen varios estudios que describen el papel de los receptores de serotonina en la esteatosis hepática, pero todos estos estudios se han evaluado en modelos animales o cultivos celulares. Tsuchida y Friedman informaron que las células estrelladas hepáticas (CEH) implicadas en la progresión de la EHGNA parecen estar activadas por la 5-HT ²⁸⁵. También se ha observado que la inhibición de HTR2A y HTR2B reduce la proliferación, aumenta la apoptosis inducida por 5-HT ²²³ y puede atenuar la esteatosis y la fibrosis ^{286,287}. Se ha demostrado que la inhibición de la señalización de HTR2A *in vivo* mediante el bloqueo de la síntesis de 5-HT mejora la esteatosis hepática ²²⁵. El trabajo de Wang et al. con roedores, evidenció que la inhibición de TPH1 alivió la progresión de EHNA inducida por dieta rica en grasas y sacarosa a través de la activación de la vía HTR2A/PPAR γ 2 ²⁸⁸.

Recientemente, también se ha demostrado que la administración de antagonistas de HTR3^{283, 289} pueden evitar procesos patológicos como el depósito de lípidos en el hígado, atenuando la progresión de la EHGNA. Además, el antagonista de HTR2B parece bloquear la activación mediada por la serotonina de la señalización de Notch y la autofagia, lo que sugiere que HTR2B podría estar implicado en la activación de Notch mediada por 5-HT, promoviendo la esteatosis celular en las células HepG2²²⁷. Sin embargo, Sumara et al. observaron que la activación de HTR2B por la serotonina durante los períodos de ayuno parece regular la producción de glucosa al promover la gluconeogénesis hepática e inhibir la captación de glucosa²²⁰. Además, Cataldo et al. mostró que la activación farmacológica prolongada de HTR2B reduce la secreción de insulina estimulada por glucosa en células MIN6 (línea celular derivada de insulinoma de ratón), probablemente debido a una actividad mitocondrial alterada y a la producción de ATP por mecanismos probablemente dependientes del peroxisoma mejorado niveles del coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por el proliferador (PGC1 α / PPAR γ)²⁹⁰, mejorando la resistencia a la insulina y, en consecuencia, la acumulación de grasa en el hígado²⁹¹.

Dada la evidencia previa de que las especies reactivas de oxígeno (ERO) derivadas de 5-HT desempeñan un papel clave en la patogénesis de la EHNA inducida por la dieta en modelos murinos²⁹², subclasificamos nuestra cohorte de mujeres con obesidad mórbida en grupos de HN, ES y EHNA, según su nivel de daño hepático. Desafortunadamente, en el presente estudio no encontramos ninguna relación entre la expresión de HTR hepática y la presencia de EHNA. Recientemente, Pantano et al. utilizaron datos de secuenciación de ARN para examinar las características moleculares de hígados humanos histológicamente normales y con EHGNA en todos los estadios de fibrosis, y sugirieron que el gen del receptor 5-HTR2B es uno de los 26 genes candidatos principales relacionados con la gravedad de la fibrosis hepática²⁹³.

En el presente estudio, analizamos por primera vez la expresión de HTR yeyunal en mujeres con EHGNA. En un trabajo anterior de nuestro grupo, confirmamos que el eje intestino-hígado es muy importante en la EHGNA²⁸⁰. Como hemos mencionado

DISCUSIÓN

anteriormente, la disbiosis intestinal altera la homeostasis intestinal y puede afectar la síntesis de 5-HT²⁸². Este hecho podría estar relacionado con el funcionalismo del metabolismo hepático²⁷⁸ y el desarrollo de EHGNA²⁸³. La señalización serotoninérgica parece desempeñar un papel destacado en la mucosa duodenal, con altos niveles de expresión de HTR3 y HTR4^{230,294}. Ritze et al. proporcionaron la primera evidencia de una desregulación yeyunal de los marcadores neuroendocrinos a través del sistema de 5-HT en humanos con obesidad grave²⁹⁴. Según estudios previos en ratones²⁹⁵ y en humanos con obesidad²⁹⁴, se ha especulado que la 5-HT podría promover el estado inflamatorio y la EHGNA, ambos presentes en el síndrome metabólico. A pesar de ello, en el presente estudio no hallamos diferencias significativas en los niveles de expresión yeyunal de HTR3 y HTR4 según la presencia de EHGNA.

En modelos de ratones con EHGNA, Ko et al. demostraron que el eje neural intestino-hígado está involucrado en la progresión de EHGNA mediante el control de la expresión de 5-HT, que se asocia con la expresión de proteínas de unión estrecha en intestino delgado, la composición de la microbiota y los AGCC²⁹⁶. Se ha sugerido que la modulación de este eje mediante el Tropisetronn (antagonista de HTR3) podría aliviar los cambios grasos y fibróticos en la EHGNA²⁹⁶. Por otro lado, la disfunción de la barrera intestinal favorecida por el sistema serotoninérgico podría conducir al aumento de la traslocación de LPS, lo que favorecería el desarrollo de EHGNA²⁹⁷. El transportador de recaptación de serotonina (SERT) y la triptófano hidroxilasa1 (TPH1) podrían ser otras dianas farmacológicas para prevenir la EHGNA²⁹⁷.

En este segundo trabajo también debemos considerar algunas limitaciones. Aunque nuestra cohorte permitió establecer una clara relación entre mujeres con obesidad mórbida y EHGNA con una desregulación de la expresión de HTR2B hepática, estos resultados no son extrapolables a sujetos con sobrepeso u otros grados de obesidad. Además, debido a que se han descrito diferencias de sexo en los trastornos metabólicos y la EHGNA, hemos realizado nuestro estudio incluyendo solo mujeres para evitar la interferencia de factores de confusión como el género. Por tanto, los resultados no se pueden extrapolar al género masculino. Además, nuestro estudio carece de un grupo control de pacientes con obesidad mórbida bajo una dieta

estándar para determinar con certeza si los niveles de serotonina en la obesidad están influenciados por la dieta. Otra de las limitaciones de nuestro estudio es el examen de los perfiles de expresión exclusivamente en muestras de yeyuno; por lo que, estos hallazgos pueden no ser representativos de la expresión de HTR intestinal a otros niveles. Finalmente, la determinación de los niveles periféricos de 5-HT probablemente no refleje los niveles de serotonina plaquetaria.

VIII. CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral, compuesta por dos de los estudios en los que se ha analizado el rol de la hepcidina y la serotonina en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), se puede concluir que:

1. Los niveles de hepcidina circulante están asociados con la obesidad pero no con la presencia de EHGNA ni con la gravedad de su histología.
2. La expresión hepática de hepcidina y de sus genes reguladores relacionados con el metabolismo del hierro (receptor de transferrina 1 (TfR1) y 2 (TfR2) y la ferroportina 1 (FPN1) parecen desempeñar un papel en la regulación de las vías del metabolismo de los lípidos en el hígado o quizás compartir un mecanismo patogénico común, lo que podría tener implicaciones en la patogénesis de la EHGNA. Serían necesarios más estudios para confirmar y aclarar estos hallazgos.
3. La expresión hepática de hepcidina, HJV, FPN1, TfR1 y TfR2 se asocia con la expresión hepática de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (LXR α y SREBP1c), la oxidación de ácidos grasos (PPAR α), la secreción de lipoproteínas (ABCG1) y la triacilglicerol lipasa, PNPLA3.
4. Los niveles de serotonina (5-HT) periférica están disminuidos en mujeres con obesidad mórbida bajo una dieta hipocalórica.
5. La correlación negativa entre los niveles de 5-HT y los criterios del síndrome metabólico podrían sugerir un efecto protector sobre la obesidad y/o el síndrome metabólico (SMet).

CONCLUSIONES

6. Existe una desregulación de la expresión de ARNm de HTR2A y HTR2B hepáticos en mujeres con obesidad mórbida y EHGNA, lo que podría sugerir una nueva diana terapéutica.

7. La modulación del metabolismo del hierro y de la serotonina podrían representar un nuevo enfoque terapéutico en la obesidad y la EHGNA.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. 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
2. 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/supinfo
3. Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2063-2072. doi:10.1056/NEJMRA1503519
4. 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
5. Aller R, Fernández-Rodríguez C, 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
6. 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
7. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(9):3490-3497. doi:10.1210/jc.2007-0482
8. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-923. doi:10.1053/jhep.2003.50161
9. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, et al. Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(6). doi:10.1016/j.cgh.2011.03.020
10. Brea A, Puzo J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol*. 2013;167(4):1109-1117. doi:10.1016/j.ijcard.2012.09.085
11. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62(S1):S47-S64. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.012
12. Caballeria L, Augustin S, Broquetas T, et al. Recommendations for the detection, diagnosis and follow-up of patients with non-alcoholic fatty liver disease in

BIBLIOGRAFÍA

- primary and hospital care. *Med Clin (Barc)*. 2019;153(4):169-177. doi:10.1016/j.medcli.2019.01.030
13. Fouad Y, Waked I, Bollipo S, Gomaa A, Ajlouni Y, Attia D. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD.' *Liver Int*. 2020;40(6):1254-1261. doi:10.1111/liv.14478
14. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55(7):434-438.
15. Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312
16. Yamamura S, Eslam M, Kawaguchi T, et al. MAFLD identifies patients with significant hepatic fibrosis better than NAFLD. *Liver Int*. 2020;40(12):3018-3030. doi:10.1111/liv.14675
17. Bambha K, Belt P, Abraham M, Wilson LA, Pabst M, Ferrell L. Ethnicity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2011;55(3):769-780. doi:10.1002/hep.24726
18. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non Alcoholic Fatty Liver: Epidemiology and Natural History. *Rev Recent Clin Trials*. 2015;9(3):126-133. doi:10.2174/1574887109666141216111143
19. Lonardo A, Bellentani S, Argo CK, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis*. 2015;47(12):997-1006. doi:10.1016/j.dld.2015.08.004
20. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5(5):1544-1560. doi:10.3390/nu5051544
21. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, et al. Bariatric surgery and non-alcoholic fatty liver disease: Current and potential future treatments. *Front Endocrinol*. 2014;5:1-6. doi:10.3389/fendo.2014.00164
22. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-1395. doi:10.1002/hep.20466
23. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(6):319-327. doi:10.1097/MD.0b013e3182779d49

24. Conus F, Rabasa-Lhoret R, Péronnet F. Characteristics of metabolically obese normal-weight (MONW) subjects. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(1):4-12. doi:10.1139/H06-092
25. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, et al. Risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease and low visceral adiposity. *J Hepatol*. 2011;54(6):1244-1249. doi:10.1016/j.jhep.2010.09.037
26. Vos B, Moreno C, Nagy N, et al. Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-NAFLD): A major cause of cryptogenic liver disease. *Acta Gastro-Enterol Belg*. 2011;74(3):389-394.
27. Fan N, Zhang L, Xia Z, Peng L, Wang Y, Peng Y. Sex-Specific association between serum uric acid and nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/3805372
28. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*. 2009;29(1):113-119. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01718.x
29. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci*. 2000;45(10):1929-1934. doi:10.1023/A:1005661516165
30. Wu KT, Kuo PL, Su SB, et al. Nonalcoholic fatty liver disease severity is associated with the ratios of total cholesterol and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Lipidol*. 2016;10(2):420-425.e1. doi:10.1016/j.jacl.2015.12.026
31. 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
32. Papandreou D, Rousso I, Mavromichalis I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. *Clin Nutr*. 2007;26(4):409-415. doi:10.1016/j.clnu.2007.02.002
33. Fattahi MR, Niknam R, Safarpour A, Sepehrimanesh M, Lotfi M. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. *Middle East J Dig Dis*. 2016;8(2):131-137. doi:10.15171/mejdd.2016.18
34. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver Int*. 2006;26(7):856-863. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01311.x
35. Gutierrez-Grobe Y, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M, Méndez-

BIBLIOGRAFÍA

- Sánchez N. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. *Ann Hepatol.* 2010;9(4):402-409. doi:10.1016/s1665-2681(19)31616-3
36. Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: An emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1281(1):106-122. doi:10.1111/nyas.12016
37. 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
38. Hamabe A, Uto H, Imamura Y, et al. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. *J Gastroenterol.* 2011;46(6):769-778. doi:10.1007/s00535-011-0376-z
39. Jung HS, Chang Y, Kwon MJ, et al. Smoking and the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Cohort Study. *Am J Gastroenterol.* 2019;114(3):453-463. doi:10.1038/S41395-018-0283-5
40. Ou H, Fu Y, Liao W, Zheng C, Wu X. Association between Smoking and Liver Fibrosis among Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Can J Gastroenterol Hepatol.* Published online 2019. doi:10.1155/2019/6028952
41. Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48(3):97-113. doi:10.3109/10408363.2011.596521
42. 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
43. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):645-655. doi:10.1038/NRGASTRO.2013.182
44. Mcpherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol.* 2015;62(5):1148-1155. doi:10.1016/j.jhep.2014.11.034
45. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129(1):113-121. doi:10.1053/j.gastro.2005.04.014
46. 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. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.043

47. 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
48. Rafiq N, Bai C, Fang Y, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2009;7(2):234-238. doi:10.1016/j.cgh.2008.11.005
49. Negro F. Natural history of NASH and HCC. *Liver Int*. 2020;40(S1):72-76. doi:10.1111/liv.14362
50. Wong VWS, Wong GLH, Choi PCL, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010;59(7):969-974. doi:10.1136/GUT.2009.205088
51. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, et al. Independent Predictors of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(11). doi:10.1016/j.cgh.2009.06.007
52. Klair JS, Yang JD, Abdelmalek MF, et al. A longer duration of estrogen deficiency increases fibrosis risk among postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2016;64(1):85-91. doi:10.1002/hep.28514
53. Loomba R, Schork N, Chen CH, et al. Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1784-1793. doi:10.1053/J.GASTRO.2015.08.011
54. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1585-1592. doi:10.1053/J.GASTRO.2009.01.050
55. Cui J, Heba E, Hernandez C, et al. Magnetic resonance elastography is superior to acoustic radiation force impulse for the Diagnosis of fibrosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease: A prospective study. *Hepatology*. 2016;63(2):453-461. doi:10.1002/hep.28337
56. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(4):1209-1217. doi:10.1002/HEP.23622
57. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*. 2014;5. doi:10.1038/ncomms5309
58. 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 Baltim Md*. 2015;61(5):1547-1554. doi:10.1002/HEP.27368

BIBLIOGRAFÍA

59. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med.* 2010;363(14):1341-1350. doi:10.1056/nejmra0912063
60. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology.* 2009;49(1):306-317. doi:10.1002/hep.22603
61. Schwenger KJP, Allard JP. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1712-1723. doi:10.3748/wjg.v20.i7.1712
62. Meffert PJ, Baumeister SE, Lerch MM, Mayerle J, Kratzer W, Völzke H. Development, external validation, and comparative assessment of a new diagnostic score for hepatic steatosis. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(9):1404-1414. doi:10.1038/ajg.2014.155
63. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6. doi:10.1186/1471-230X-6-33
64. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. In: *Journal of Hepatology.* Vol 53. ; 2010:372-384. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.008
65. Rofsky NM, Fleishaker H. CT and MRI of diffuse liver disease. *Semin Ultrasound CT MRI.* 1995;16(1):16-33. doi:10.1016/0887-2171(95)90012-8
66. Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol.* 2009;51(3):433-445. doi:10.1016/j.jhep.2009.05.023
67. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: Prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2005;288(2 51-2). doi:10.1152/ajpendo.00064.2004
68. Pai RK, Kleiner DE, Hart J, et al. Standardising the interpretation of liver biopsies in non-alcoholic fatty liver disease clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50(10):1100-1111. doi:10.1111/apt.15503
69. Nalbantoglu I, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9026-9037. doi:10.3748/wjg.v20.i27.9026
70. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2005;128(7):1898-1906. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.084

71. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology*. 2018;68(1):349-360. doi:10.1002/hep.29721
72. 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
73. Lombardi R, Buzzetti E, Roccarina D, Tsochatzis EA. Non-invasive assessment of liver fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(39):11044-11052. doi:10.3748/wjg.v21.i39.11044
74. Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol*. 2013;58(5):1007-1019. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.021
75. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology*. 2004;127(6):1704-1713. doi:10.1053/j.gastro.2004.08.052
76. Angulo P, Bugianesi E, Bjornsson ES, et al. Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2013;145(4). doi:10.1053/J.GASTRO.2013.06.057
77. Parkes J, Roderick P, Harris S, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut*. 2010;59(9):1245-1251. doi:10.1136/GUT.2009.203166
78. Carrión JA. Utilidad del Fibroscan® para evaluar la fibrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol*. 2009;32(6):415-423. doi:10.1016/j.gastrohep.2009.01.178
79. Myers RP, Pomier-Layrargues G, Kirsch R, et al. Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology*. 2012;55(1):199-208. doi:10.1002/HEP.24624
80. Friedrich-Rust M, Roman D, Vermehren J, et al. Acoustic radiation force impulse-imaging and transient elastography for non-invasive assessment of liver fibrosis and steatosis in NAFLD. *Eur J Radiol*. 2012;81(3). doi:10.1016/J.EJRAD.2011.10.029
81. 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
82. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Yao Chang Liu, McCullough

BIBLIOGRAFÍA

- 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
83. 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
84. 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(6):1313-1321. doi:10.1002/hep.20701
85. Kleiner DE, Makhlof HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):293-312. doi:10.1016/j.cld.2015.10.011
86. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16(42):5286-5296. doi:10.3748/wjg.v16.i42.5286
87. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology*. 2012;61(2):141-152. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04145.x
88. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010;51(1):121-129. doi:10.1002/HEP.23276
89. Sullivan S, Kirk EP, Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(6):1738-1745. doi:10.1002/HEP.25548
90. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol*. 2014;5(3):211-218. doi:10.1136/FLGASTRO-2013-100403
91. Vilar-Gomez E, Yasells-Garcia A, Martinez-Perez Y, et al. Development and validation of a noninvasive prediction model for nonalcoholic steatohepatitis resolution after lifestyle intervention. *Hepatology*. 2016;63(6):1875-1887. doi:10.1002/HEP.28484/SUPPINFO
92. Ekstedt M, Franzén LE, Holmqvist M, et al. Alcohol consumption is associated with progression of hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(3):366-374. doi:10.1080/00365520802555991
93. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012;57(1):157-

166. doi:10.1016/J.JHEP.2012.02.023
94. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):603-608. doi:10.2337/DIABETES.54.3.603
95. 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
96. Orci LA, Gariani K, Oldani G, Delaune V, Morel P, Toso C. Exercise-based Interventions for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis and Meta-regression. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2016;14(10):1398-1411. doi:10.1016/J.CGH.2016.04.036
97. Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia*. 2012;55(4):885-904. doi:10.1007/S00125-011-2446-4
98. Solomon TPJ, Haus JM, Marchetti CM, Stanley WC, Kirwan JP. Effects of exercise training and diet on lipid kinetics during free fatty acid-induced insulin resistance in older obese humans with impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(2). doi:10.1152/AJPENDO.00220.2009
99. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-188. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ455
100. Ratziu V, Goodman Z, Sanyal A. Current efforts and trends in the treatment of NASH. *J Hepatol*. 2015;62(S1):S65-S75. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.041
101. Harrison S, Pence M, Stratton A, Torres D. Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome. In: Sanyal A, Terrault N, eds. *Zakim and Boyer's Hepatology A Textbook of Liver Disease*. ; 2016:406-411.
102. Li Y, Liu L, Wang B, Wang J, Chen D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep*. 2013;1(1):57-64. doi:10.3892/BR.2012.18
103. Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2014;7:241-253. doi:10.2147/DMSO.S43731

BIBLIOGRAFÍA

104. Belfort R, Harrison SA, Brown K, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2006;355(22):2297-2307. doi:10.1056/NEJMOA060326
105. 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
106. Cusi K, Orsak B, Bril F, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2016;165(5):305-315. doi:10.7326/M15-1774
107. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Baltim Md.* 2004;39(1):188-196. doi:10.1002/HEP.20012
108. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010;362(18):1675-1685. doi:10.1056/NEJMOA0907929
109. Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, et al. The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007;46(2):424-429. doi:10.1002/HEP.21661
110. Armstrong MJ, Houlihan DD, Rowe IA, et al. Safety and efficacy of liraglutide in patients with type 2 diabetes and elevated liver enzymes: individual patient data meta-analysis of the LEAD program. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(2):234-242. doi:10.1111/APT.12149
111. Scheen AJ. Sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(10):556-577. doi:10.1038/S41574-020-0392-2
112. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2019;381(21):1995-2008. doi:10.1056/NEJMOA1911303
113. Schernthaner G, Schernthaner-Reiter MH, Schernthaner GH. EMPA-REG and Other Cardiovascular Outcome Trials of Glucose-lowering Agents: Implications for Future Treatment Strategies in Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Ther.* 2016;38(6):1288-1298. doi:10.1016/J.CLINThERA.2016.04.037
114. Zelniker TA, Braunwald E. Clinical Benefit of Cardiorenal Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(4):435-447. doi:10.1016/J.JACC.2019.11.036
115. Dougherty JA, Guirguis E, Thornby KA. A Systematic Review of Newer

- Antidiabetic Agents in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ann Pharmacother.* 2021;55(1):65-79. doi:10.1177/1060028020935105
116. Mantovani A, Byrne CD, Scorletti E, Mantzoros CS, Targher G. Efficacy and safety of anti-hyperglycaemic drugs in patients with non-alcoholic fatty liver disease with or without diabetes: An updated systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes Metab.* 2020;46(6):427-441. doi:10.1016/J.DIABET.2019.12.007
117. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Targher G. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Metabolites.* 2021;11(2):1-13. doi:10.3390/METABO11020073
118. Kaplan LM, Golden A, Jinnett K, et al. Perceptions of Barriers to Effective Obesity Care: Results from the National ACTION Study. *Obesity.* 2018;26(1):61-69. doi:10.1002/OBY.22054
119. Michael D. J, Donna R, Caroline A, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation.* 2014;129(25 Suppl 2). doi:10.1161/01.CIR.0000437739.71477.EE
120. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism.* 2019;92:82-97. doi:10.1016/J.METABOL.2018.11.014
121. 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 Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2006;4(5):639-644. doi:10.1016/J.CGH.2006.02.004
122. Assy N, Hussein O, Abassi Z. Weight loss induced by orlistat reverses fatty infiltration and improves hepatic fibrosis in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2007;56(3):443-444. doi:10.1136/GUT.2006.106021
123. Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology.* 2009;49(1):80-86. doi:10.1002/HEP.22575
124. Wang H, Wang L, Cheng Y, Xia Z, Liao Y, Cao J. Efficacy of orlistat in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep.* 2018;9(1):90-96. doi:10.3892/BR.2018.1100
125. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind,

BIBLIOGRAFÍA

- randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Lond Engl.* 2016;387(10019):679-690. doi:10.1016/S0140-6736(15)00803-X
126. Dutour A, Abdesselam I, Ancel P, et al. Exenatide decreases liver fat content and epicardial adipose tissue in patients with obesity and type 2 diabetes: a prospective randomized clinical trial using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18(9):882-891. doi:10.1111/DOM.12680
127. Gastaldelli A, Gaggini M, Daniele G, et al. Exenatide improves both hepatic and adipose tissue insulin resistance: A dynamic positron emission tomography study. *Hepatol Baltim Md.* 2016;64(6):2028-2037. doi:10.1002/HEP.28827
128. Harrison SA, Calanna S, Cusi K, et al. Semaglutide for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: Trial design and comparison of non-invasive biomarkers. *Contemp Clin Trials.* 2020;97. doi:10.1016/J.CCT.2020.106174
129. Seko Y, Sumida Y, Tanaka S, et al. Effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibitor on liver function tests in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2017;47(10):1072-1078. doi:10.1111/HEPR.12834
130. Leung JCF, Loong TCW, Wei JL, et al. Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatol Baltim Md.* 2017;65(1):54-64. doi:10.1002/HEP.28697
131. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. Nonalcoholic fatty liver disease: multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46(4):272-284. doi:10.1097/MCG.0B013E31824587E0
132. Cignarella A, Busetto L, Vettor R. Pharmacotherapy of obesity: An update. *Pharmacol Res.* 2021;169:105649. doi:10.1016/J.PHRS.2021.105649
133. Singh AK, Singh R. Pharmacotherapy in obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of anti-obesity drugs. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020;13(1):53-64. doi:10.1080/17512433.2020.1698291
134. Allison DB, Gadde KM, Garvey WT, et al. Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults: a randomized controlled trial (EQUIP). *Obesity.* 2012;20(2):330-342. doi:10.1038/OBY.2011.330
135. Nissen SE, Wolski KE, Prcela L, et al. Effect of Naltrexone-Bupropion on Major Adverse Cardiovascular Events in Overweight and Obese Patients With Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016;315(10):990-1004. doi:10.1001/JAMA.2016.1558
136. Mintziori G, Polyzos SA. Emerging and future therapies for nonalcoholic steatohepatitis in adults. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17(14):1937-1946.

- doi:10.1080/14656566.2016.1225727
137. 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*. 2015;385(9972):956-965. doi:10.1016/S0140-6736(14)61933-4
 138. Xiang Z, Chen Y peng, Ma K fen, et al. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2013;13(1). doi:10.1186/1471-230X-13-140
 139. Wu SD, Li L, Wang JY. Ursodeoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012;24(11):1247-1253. doi:10.1097/MEG.0B013E3283572EC0
 140. Traussnigg S, Schattenberg JM, Demir M, et al. Norursodeoxycholic acid versus placebo in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 dose-finding trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(10):781-793. doi:10.1016/S2468-1253(19)30184-0
 141. Giorgio V, Miele L, Principessa L, et al. Intestinal permeability is increased in children with non-alcoholic fatty liver disease, and correlates with liver disease severity. *Dig Liver Dis*. 2014;46(6):556-560. doi:10.1016/j.dld.2014.02.010
 142. Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol*. 2003;38(5):681-687. doi:10.1016/S0168-8278(03)00097-7
 143. Aller R, De Luis DA, Izaola O, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(9):1090-1095.
 144. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, et al. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2012;57(2):545-553. doi:10.1007/S10620-011-1887-4
 145. Duman DG, Ozdemir F, Birben E, et al. Effects of pentoxifylline on TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2007;52(10):2520-2524. doi:10.1007/S10620-006-9723-Y
 146. Van Wagner LB, Koppe SW, Brunt EM, et al. Pentoxifylline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Ann Hepatol*. Published online 2011:277-286.
 147. Du J, Ma YY, Yu CH, Li YM. Effects of pentoxifylline on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):569-577. doi:10.3748/WJG.V20.I2.569

BIBLIOGRAFÍA

148. Zeng T, Zhang CL, Zhao XL, Xie KQ. Pentoxifylline for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized double-blind, placebo-controlled studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(6):646-653. doi:10.1097/MEG.000000000000068
149. Christopoulou FD, Kiortsis DN. An overview of the metabolic effects of rimonabant in randomized controlled trials: potential for other cannabinoid 1 receptor blockers in obesity. *J Clin Pharm Ther*. 2011;36(1):10-18. doi:10.1111/J.1365-2710.2010.01164.X
150. Cinar R, Iyer MR, Kunos G. The therapeutic potential of second and third generation CB 1 R antagonists. *Pharmacol Ther*. 2020;208. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107477
151. Wang S, Zhu Q, Liang G, et al. Cannabinoid receptor 1 signaling in hepatocytes and stellate cells does not contribute to NAFLD. *J Clin Invest*. 2021;131(22). doi:10.1172/JCI152242
152. Liu J, Zhou L, Xiong K, et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology*. 2012;142(5). doi:10.1053/J.GASTRO.2012.01.032
153. Mutlu B, Puigserver P. Controversies surrounding peripheral cannabinoid receptor 1 in fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2021;131(22). doi:10.1172/JCI154147
154. Adams LA, Crawford DH, Stuart K, et al. The impact of phlebotomy in nonalcoholic fatty liver disease: A prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology*. 2015;61(5):1555-1564. doi:10.1002/HEP.27662
155. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol*. 2014;20(11):3002-3010. doi:10.3748/WJG.V20.I11.3002
156. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: Evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(6):1251-1258. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01192.x
157. Nseir W, Mograbi J, Ghali M. Lipid-lowering agents in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis: human studies. *Dig Dis Sci*. 2012;57(7):1773-1781. doi:10.1007/S10620-012-2118-3
158. Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*. 2003;125(1):117-125. doi:10.1016/S0016-5085(03)00695-4
159. Borém LMA, Neto JFR, Brandi IV, Lelis DF, Santos SHS. The role of the

- angiotensin II type I receptor blocker telmisartan in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. 2018;41(6):394-405. doi:10.1038/S41440-018-0040-6
160. Li Y, Xu H, Wu W, et al. Clinical application of angiotensin receptor blockers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(35):24155-24167. doi:10.18632/ONCOTARGET.23816
161. Di Lorenzo N, Antoniou SA, Batterham RL, et al. Clinical practice guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES) on bariatric surgery: update 2020 endorsed by IFSO-EC, EASO and ESPCOP. *Surg Endosc*. 2020;34(6):2332-2358. doi:10.1007/S00464-020-07555-Y
162. 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
163. Hall JE, Guyton AC. Chapter 70: The liver as an organ. In: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Elsevier; 2010.
164. Le Lay J, Kaestner KH. The Fox Genes in the Liver: From Organogenesis to Functional Integration. *Physiol Rev*. 2010;90(1):1-22. doi:10.1152/physrev.00018.2009.-Formation
165. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013;48(4):434-441. doi:10.1007/S00535-013-0758-5
166. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-845. doi:10.1016/S0016-5085(98)70599-2
167. 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
168. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7(1):221-239. doi:10.2147/CEG.S62831
169. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-1846. doi:10.1002/hep.24001
170. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:451-496. doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-012615-044224

BIBLIOGRAFÍA

171. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2017;65(1):65-77. doi:10.1002/HEP.28776
172. Jamali R, Razavizade M, Arj A, Aarabi MH. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22(21):5096-5103. doi:10.3748/WJG.V22.I21.5096
173. Kumar R, Prakash S, Chhabra S, et al. Association of pro-inflammatory cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res*. 2012;136(2):229-236.
174. Uysal S, Armutcu F, Aydogan T, Akin K, Ikizek M, Yigitoglu MR. Some inflammatory cytokine levels, iron metabolism and oxidant stress markers in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem*. 2011;44(17-18):1375-1379. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.09.017
175. Wada N, Takaki A, Ikeda F, et al. Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*. 2017;11(1):115-124. doi:10.1007/S12072-016-9773-Y
176. Aragonès G, González-García S, Aguilar C, Richart C, Auguet T. Gut Microbiota-Derived Mediators as Potential Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Res Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/8507583
177. Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2011;31(2):128-146. doi:10.1055/S-0031-1276643
178. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *BioMed Res Int*. 2015;10(2). doi:10.1155/2015/460190
179. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*. 2018;68(2):268-279. doi:10.1016/J.JHEP.2017.09.003
180. Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14(22):2831-2838. doi:10.1101/GAD.850400
181. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(10):940-959. doi:10.1016/S1357-2725(01)00063-2
182. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. Longo DL, ed. *N Engl J Med*. 2015;372(19):1832-1843. doi:10.1056/NEJMRA1401038
183. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142(1):24-38. doi:10.1016/J.CELL.2010.06.028

184. Hall JE, Guyton AC. Chapter 32: Red Blood Cells, Anemia, and Polycythemia. In: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Elsevier; 2012:413-422.
185. Ganz T. Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood*. 2011;117(17):4425-4433. doi:10.1182/BLOOD-2011-01-258467
186. Stefanova D, Raychev A, Arezes J, et al. Endogenous hepcidin and its agonist mediate resistance to selected infections by clearing non-transferrin-bound iron. *Blood*. 2017;130(3):245-257. doi:10.1182/BLOOD-2017-03-772715
187. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7806-7810. doi:10.1074/jbc.M008922200
188. Ramey G, Deschemin JC, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S. Heparin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica*. 2010;95(3):501-504. doi:10.3324/haematol.2009.014399
189. Pietrangelo A. Heparin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol*. 2011;54(1):173-181. doi:10.1016/J.JHEP.2010.08.004
190. Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006;131(3):788-796. doi:10.1053/J.GASTRO.2006.07.007
191. Nemeth E. Heparin biology and therapeutic applications. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(2):153-155. doi:10.1586/ehm.10.1
192. Liu J, Sun B, Yin Y, Liu S. Heparin: A Promising Therapeutic Target for Iron Disorders: A Systematic Review. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(14):1913-1917. doi:10.1097/MD.0000000000003150
193. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10):4292-4297. doi:10.1182/BLOOD-2008-02-139915
194. Nai A, Pagani A, Silvestri L, et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood*. 2011;118(16):4459-4462. doi:10.1182/blood-2011-06-364034
195. Ahmed U, Latham PS, Oates PS. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(34):4651-4658. doi:10.3748/wjg.v18.i34.4651
196. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, et al. Hyperferritinemia, Iron Overload, and Multiple Metabolic Alterations Identify Patients at Risk for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;8:2448-2455.

BIBLIOGRAFÍA

- doi:10.1111/j.1572.0241.2001.04052.x
197. George DK, Goldwurm S, Macdonald GA, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*. 1998;114(2):311-318. doi:10.1016/S0016-5085(98)70482-2
 198. Senates E, Yilmaz Y, Colak Y, et al. Serum Levels of Hepcidin in Patients with Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011;9(4):287-290. doi:10.1089/met.2010.0121
 199. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-1023. doi:10.1056/NEJMRA041809
 200. Zimmermann A, Zimmermann T, Schattenberg J, et al. Alterations in lipid, carbohydrate and iron metabolism in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome. *Eur J Intern Med*. 2011;22(3):305-310. doi:10.1016/j.ejim.2011.01.011
 201. Aigner E, Theurl I, Theurl M, et al. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1374-1383. doi:0016-5085
 202. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, et al. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol*. 2008;49(1):123-133. doi:10.1016/j.jhep.2008.03.011
 203. Demircioğlu F, Görünmez G, Dağistan E, et al. Serum hepcidin levels and iron metabolism in obese children with and without fatty liver: case-control study. *Eur J Pediatr*. 2014;173(7):947-951. doi:10.1007/S00431-014-2268-8
 204. Vuppalanchi R, Troutt JS, Konrad RJ, et al. Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obesity*. 2014;22(3):836-841. doi:10.1002/oby.20403
 205. Berger M, Gray JA, Roth BL. The Expanded Biology of Serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60(1):355-366. doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
 206. Jones LA, Sun EW, Martin AM, Keating DJ. The ever-changing roles of serotonin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2020;125. doi:10.1016/J.BIOCEL.2020.105776
 207. Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev*. 2019;40(4):1092-1107. doi:10.1210/er.2018-00283
 208. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414. doi:10.1053/J.GASTRO.2006.11.002

209. Hoffman JM, Tyler K, MacEachern SJ, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT(4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology*. 2012;142(4). doi:10.1053/J.GASTRO.2011.12.041
210. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(8):473-486. doi:10.1038/NRGASTRO.2013.105
211. Baganz NL, Blakely RD. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(1):48-63. doi:10.1021/CN300186B
212. Peroutka SJ, Howell TA. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology*. 1994;33(3-4):319-324. doi:10.1016/0028-3908(94)90060-4
213. Reeves DC, Lummis SCR. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT3 receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol*. 2002;19(1):11-26. doi:10.1080/09687680110110048
214. Amireault P, Sibon D, Coité F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(1):64-71. doi:10.1021/CN300154J
215. Mercado CP, Quintero MV, Li Y, et al. A serotonin-induced N-glycan switch regulates platelet aggregation. *Sci Rep*. 2013;3(2795). doi:10.1038/SREP02795
216. Stasi C, Bellini M, Bassotti G, Blandizzi C, Milani S. Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Tech Coloproctology*. 2014;18(7):613-621. doi:10.1007/S10151-013-1106-8
217. Ducy P, Karsenty G. The two faces of serotonin in bone biology. *J Cell Biol*. 2010;191(1):7-13. doi:10.1083/JCB.201006123
218. Ghia JE, Blümer RM, Collins A, et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*. 2014;21(2):166-172. doi:10.1038/nm.3766
219. Oh CM, Namkung J, Go Y, et al. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat Commun*. 2015;6:1-12. doi:10.1038/ncomms7794
220. Sumara G, Sumara O, Kim JK, Karsenty G. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metab*. 2012;16(5):588-600. doi:10.1016/J.CMET.2012.09.014
221. Osawa Y, Kanamori H, Seki E, et al. L-tryptophan-mediated enhancement of

BIBLIOGRAFÍA

- susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem.* 2011;286(40):34800-34808. doi:10.1074/JBC.M111.235473
222. Omenetti A, Yang L, Gainetdinov RR, et al. Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(2). doi:10.1152/AJPGI.00368.2010
223. Ruddell RG, Oakley F, Hussain Z, et al. A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis. *Am J Pathol.* 2006;169(3):861-876. doi:10.2353/AJPATH.2006.050767
224. Park J, Jeong W, Yun C, Kim H, Oh CM. Serotonergic Regulation of Hepatic Energy Metabolism. *Endocrinol Metab.* 2021;36(6):1151-1160. doi:10.3803/ENM.2021.1331
225. Choi W, Namkung J, Hwang I, et al. Serotonin signals through a gut-liver axis to regulate hepatic steatosis. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/S41467-018-07287-7
226. Zhang Y, Deng R, Yang X, et al. Glucose potentiates β -cell function by inducing Tph1 expression in rat islets. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2017;31(12):5342-5355. doi:10.1096/FJ.201700351R
227. Niture S, Gyamfi MA, Kedir H, et al. Serotonin induced hepatic steatosis is associated with modulation of autophagy and notch signaling pathway. *Cell Commun Signal CCS.* 2018;16(1). doi:10.1186/S12964-018-0282-6
228. Fu J, Li C, Zhang G, et al. Crucial Roles of 5-HT and 5-HT₂ Receptor in Diabetes-Related Lipid Accumulation and Pro-Inflammatory Cytokine Generation in Hepatocytes. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;48(6):2409-2428. doi:10.1159/000492656
229. Aikiyo S, Kishi K, Kaji N, et al. Contribution of Serotonin 3A Receptor to Motor Function and Its Expression in the Gastrointestinal Tract. *Digestion.* 2021;102(4):516-526. doi:10.1159/000509209
230. Van Lelyveld N, Ter Linde J, Schipper MEI, Samsom M. Regional differences in expression of TPH-1, SERT, 5-HT(3) and 5-HT(4) receptors in the human stomach and duodenum. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* 2007;19(5):342-348. doi:10.1111/J.1365-2982.2006.00891.X
231. Hodge S, Bunting BP, Carr E, Strain JJ, Stewart-Knox BJ. Obesity, whole blood serotonin and sex differences in healthy volunteers. *Obes Facts.* 2012;5(3):399-407. doi:10.1159/000339981
232. Young RL, Lumsden AL, Martin AM, et al. Augmented capacity for peripheral serotonin release in human obesity. *Int J Obes 2005.* 2018;42(11):1880-1889.

- doi:10.1038/S41366-018-0047-8
233. Kim HJ, Kim JH, Noh S, et al. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res.* 2011;10(2):722-731. doi:10.1021/PR100892R
234. Mustajoki P, Pekkarinen T. Very low energy diets in the treatment of obesity. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* 2001;2(1):61-72. doi:10.1046/J.1467-789X.2001.00026.X
235. Mauvais-Jarvis F, Bairey Merz N, Barnes PJ, et al. Sex and gender: modifiers of health, disease, and medicine. *Lancet.* 2020;396(10250):565-582. doi:10.1016/S0140-6736(20)31561-0
236. Lonardo A, Suzuki A. Sexual Dimorphism of NAFLD in Adults. Focus on Clinical Aspects and Implications for Practice and Translational Research. *J Clin Med.* 2020;9(5):1278. doi:10.3390/JCM9051278
237. Terra X, Auguet T, Broch M, et al. Retinol binding protein-4 circulating levels were higher in nonalcoholic fatty liver disease vs. histologically normal liver from morbidly obese women. *Obesity.* 2013;21(1):170-177. doi:10.1002/OBY.20233
238. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology.* 2011;53(4):1333-1341. doi:10.1002/hep.24178
239. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640-1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
240. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, et al. miR33a/miR33b* and miR122 as possible contributors to hepatic lipid metabolism in obese women with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10). doi:10.3390/ijms17101620
241. 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(12):22173-22187. doi:10.3390/ijms151222173
242. Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, et al. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2009;39(4):366-373. doi:10.1111/j.1872-034X.2008.00464.x

BIBLIOGRAFÍA

243. Handa P, Maliken BD, Nelson JE, et al. Differences in hepatic expression of iron, inflammation and stress-related genes in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Hepatol.* 2017;16(1):77-85. doi:10.5604/16652681.1226818
244. Martinelli N, Traglia M, Campostrini N, et al. Increased Serum Hepcidin Levels in Subjects with the Metabolic Syndrome: A Population Study. *PLoS ONE.* 2012;7(10). doi:10.1371/journal.pone.0048250
245. Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Puig J, et al. Hepatic iron content is independently associated with serum hepcidin levels in subjects with obesity. *Clin Nutr.* 2017;36(5):1434-1439. doi:10.1016/j.clnu.2016.09.022
246. Boga S, Alkim H, Alkim C, et al. The Relationship of Serum Hemojuvelin and Hepcidin Levels with Iron Overload in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Gastrointest Liver Dis JGLD.* 2015;24(3):293-300. doi:10.15403/JGLD.2014.1121.243.HAK
247. Lee SH, Jeong SH, Park YS, et al. Serum prohepcidin levels in chronic hepatitis C, alcoholic liver disease, and nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Hepatol.* 2010;16(3):288. doi:10.3350/kjhep.2010.16.3.288
248. Pan X, Chen B, Liu W, et al. Circulating Iron Levels Interaction with Central Obesity on the Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case-Control Study in Southeast China. *Ann Nutr Metab.* 2019;74(3):207-214. doi:10.1159/000497228
249. Cheng HL, Bryant C, Cook R, O'Connor H, Rooney K, Steinbeck K. The relationship between obesity and hypoferraemia in adults: A systematic review. *Obes Rev.* 2012;13(2):150-161. doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00938.x
250. Del Giudice EM, Santoro N, Amato A, et al. Hepcidin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):5102-5107. doi:10.1210/jc.2009-1361
251. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, et al. Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females. *Obesity.* 2010;18(7):1449-1456. doi:10.1038/oby.2009.319
252. Giannini C, Polidori N, Saltarelli MA, Chiarelli F, Basilico R, Mohn A. Increased hepcidin levels and non-alcoholic fatty liver disease in obese prepubertal children: A further piece to the complex puzzle of metabolic derangements. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2022;35(1):39-47. doi:10.1515/jpem-2021-0070
253. Tsutsumi N, Nishimata S, Shimura M, Kashiwagi Y, Kawashima H. Hepcidin Levels and Pathological Characteristics in Children with Fatty Liver Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2021;24(3):295-305. doi:10.5223/PGHN.2021.24.3.295
254. Ryan JD, Armitage AE, Cobbold JF, et al. Hepatic iron is the major determinant of

- serum ferritin in NAFLD patients. *Liver Int.* 2018;38(1):164-173. doi:10.1111/liv.13513
255. Tsuchiya H, Ashla AA, Hoshikawa Y, et al. Iron state in association with retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2010;40(12):1227-1238. doi:10.1111/J.1872-034X.2010.00719.X
256. Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, et al. Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2015;62(3):751-761. doi:10.1002/HEP.27774
257. Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, et al. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model. *J Gastroenterol.* 2017;52(3):341-351. doi:10.1007/S00535-016-1237-6
258. Shi W, Wang H, Zheng X, et al. HNF-4alpha Negatively Regulates Hepcidin Expression Through BMPR1A in HepG2 Cells. *Biol Trace Elem Res.* 2017;176(2):294-304. doi:10.1007/S12011-016-0846-5
259. Dongiovanni P, Lanti C, Gatti S, et al. High fat diet subverts hepatocellular iron uptake determining dysmetabolic iron overload. *PLoS One.* 2015;10(2). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0116855
260. Wang C, Wang X, Song G, et al. A high-fructose diet in rats induces systemic iron deficiency and hepatic iron overload by an inflammation mechanism. *J Food Biochem.* 2021;45(1). doi:10.1111/jfbc.13578
261. Guo C, Xue H, Guo T, et al. Recombinant human lactoferrin attenuates the progression of hepatosteatosis and hepatocellular death by regulating iron and lipid homeostasis in: Ob / ob mice. *Food Funct.* 2020;11(8):7183-7196. doi:10.1039/d0fo00910e
262. Lu S, Mott JL, Harrison-Findik DD. Saturated fatty acids induce post-transcriptional regulation of HAMP mRNA via AU-rich element-binding protein, human antigen R (HuR). *J Biol Chem.* 2015;290(40):24178-24189. doi:10.1074/jbc.M115.648212
263. Graham RM, Chua ACG, Carter KW, et al. Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. *Hepatology.* 2010;52(2):462-471. doi:10.1002/hep.23712
264. Kirsch R, Sijtsma HP, Tlali M, Marais AD, Hall P de la M. Effects of iron overload in a rat nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2006;26(10):1258-1267. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01329.x
265. Xiaoli AM, Song Z, Yang F. Lipogenic SREBP-1a/c transcription factors activate

BIBLIOGRAFÍA

- expression of the iron regulator hepcidin, revealing cross-talk between lipid and iron metabolisms. *J Biol Chem.* 2019;294(34):12743-12753. doi:10.1074/JBC.RA119.009644
266. Feng D, Youn DY, Zhao X, et al. mTORC1 Down-Regulates Cyclin-Dependent Kinase 8 (CDK8) and Cyclin C (CycC). *PLoS ONE.* 2015;10(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0126240
267. Ritze Y, Schollenberger A, Hamze Sinno M, et al. Gastric ghrelin, GOAT, leptin, and leptinR expression as well as peripheral serotonin are dysregulated in humans with obesity. *NeurogastroeJournal Eur Gastrointest Motil Soc.* 2016;28(6):806-815. doi:10.1111/NMO.12773
268. Bertrand RL, Senadheera S, Markus I, et al. A Western diet increases serotonin availability in rat small intestine. *Endocrinology.* 2011;152(1):36-47. doi:10.1210/EN.2010-0377
269. Blum I, Vered Y, Graff E, et al. The influence of meal composition on plasma serotonin and norepinephrine concentrations. *Metabolism.* 1992;41(2):137-140. doi:10.1016/0026-0495(92)90141-V
270. Watanabe H, Nakano T, Saito R, et al. Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice. *PloS One.* 2016;11(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0147143
271. Brand T, Anderson GM. The measurement of platelet-poor plasma serotonin: a systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem.* 2011;57(10):1376-1386. doi:10.1373/CLINCHEM.2011.163824
272. Kundi ZM, Lee JCY, Pihlajamäki J, et al. Dietary Fiber from Oat and Rye Brans Ameliorate Western Diet-Induced Body Weight Gain and Hepatic Inflammation by the Modulation of Short-Chain Fatty Acids, Bile Acids, and Tryptophan Metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(1). doi:10.1002/MNFR.201900580
273. Strasser B, Fuchs D. Diet Versus Exercise in Weight Loss and Maintenance: Focus on Tryptophan. *Int J Tryptophan Res IJTR.* 2016;9(1):9-16. doi:10.4137/IJTR.S33385
274. Hata T, Asano Y, Yoshihara K, et al. Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice. *PLOS ONE.* 2017;12(7):e0180745. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0180745
275. Martin AM, Yabut JM, Choo JM, et al. The gut microbiome regulates host glucose homeostasis via peripheral serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(40):19802-19804. doi:10.1073/PNAS.1909311116
276. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell.* 2015;161(2):264-276. doi:10.1016/J.CELL.2015.02.047

277. Martin AM, Young RL, Leong L, et al. The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin. *Endocrinology*. 2017;158(5):1049-1063. doi:10.1210/EN.2016-1839
278. Young RL, Lumsden AL, Keating DJ. Gut Serotonin Is a Regulator of Obesity and Metabolism. *Gastroenterology*. 2015;149(1):253-255. doi:10.1053/J.GASTRO.2015.05.020
279. Ge X, Pan J, Liu Y, Wang H, Zhou W, Wang X. Intestinal Crosstalk between Microbiota and Serotonin and its Impact on Gut Motility. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(3):190-195. doi:10.2174/1389201019666180528094202
280. Aragonès G, Colom-Pellicer M, Aguilar C, et al. Circulating microbiota-derived metabolites: a “liquid biopsy”? *Int J Obes*. 2019;4(44):875-885. doi:10.1038/s41366-019-0430-0
281. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv Nutr*. 2019;10(9):S17-S30. doi:10.1093/advances/nmy078
282. Banskota S, Ghia JE, Khan WI. Serotonin in the gut: Blessing or a curse. *Biochimie*. 2019;161:56-64. doi:10.1016/J.BIOCHI.2018.06.008
283. Haub S, Ritze Y, Ladel I, et al. Serotonin receptor type 3 antagonists improve obesity-associated fatty liver disease in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(3):790-798. doi:10.1124/JPET.111.181834
284. Wegermann K, Howe C, Henao R, et al. Serum Bile Acid, Vitamin E, and Serotonin Metabolites Are Associated With Future Liver-Related Events in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol Commun*. 2021;5(4):608-617. doi:10.1002/HEP4.1665
285. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411. doi:10.1038/NRGASTRO.2017.38
286. Ebrahimkhani MR, Oakley F, Murphy LB, et al. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT_{2B} receptor in chronic liver disease. *Nat Med*. 2011;17(12):1668-1673. doi:10.1038/NM.2490
287. Kim DC, Jun DW, Kwon YI, et al. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit hepatic stellate cell activation and facilitate apoptosis. *J Int Assoc Study Liver*. 2013;33(4):535-543. doi:10.1111/LIV.12110
288. Wang L, Fan X, Han J, et al. Gut-Derived Serotonin Contributes to the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis via the Liver HTR2A/PPAR γ 2 Pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11. doi:10.3389/fphar.2020.00553
289. Kim M, Hwang I, Pagire HS, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Peripheral 5HT_{2A} Antagonists for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Med*

BIBLIOGRAFÍA

- Chem.* 2020;63(8):4171-4182. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00002
290. Cataldo LR, Mizgier ML, Sagua RB, et al. Prolonged Activation of the Htr2b Serotonin Receptor Impairs Glucose Stimulated Insulin Secretion and Mitochondrial Function in MIN6 Cells. *PLoS One.* 2017;12(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0170213
291. Besseiche A, Riveline JP, Gautier JF, Bréant B, Blondeau B. Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2015;41(5):347-357. doi:10.1016/J.DIABET.2015.02.002
292. Nocito A, Dahm F, Jochum W, et al. Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2007;133(2):608-618. doi:10.1053/J.GASTRO.2007.05.019
293. Pantano L, Agyapong G, Shen Y, et al. Molecular characterization and cell type composition deconvolution of fibrosis in NAFLD. *Sci Rep.* 2021;11(1). doi:10.1038/S41598-021-96966-5
294. Ritze Y, Hengelhaupt C, Bárdos G, et al. Altered intestinal neuroendocrine gene expression in humans with obesity. *Obesity.* 2015;23(11):2278-2285. doi:10.1002/OBY.21253
295. Ritze Y, Bárdos G, Hubert A, Böhle M, Bischoff SC. Effect of tryptophan supplementation on diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Br J Nutr.* 2014;112(1):1-7. doi:10.1017/S0007114514000440
296. Ko M, Kamimura K, Owaki T, et al. Modulation of serotonin in the gut-liver neural axis ameliorates the fatty and fibrotic changes in non-alcoholic fatty liver. *Dis Model Mech.* 2021;14(3). doi:10.1242/DMM.048922
297. Zhang K, Li X, Wang X, et al. Gut Barrier Proteins Mediate Liver Regulation by the Effects of Serotonin on the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Protein Pept Sci.* 2020;21(10):978-984. doi:10.2174/1389203721666200615171928

X. ANEXO

RESEARCH ARTICLE

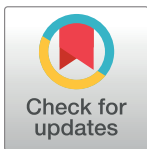
Hepcidin in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease

Teresa Auguet^{1,2}*, Gemma Aragonès¹, Alba Berlanga¹, Salomé Martínez³,
Fàtima Sabench⁴, Jessica Binetti², Carmen Aguilar¹, José Antonio Porras², Alicia Molina⁴,
Daniel Del Castillo⁴, Cristóbal Richart^{1,2}*

1 Grup de Recerca GEMMAIR (AGAUR)- Medicina Aplicada, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain, **2** Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain, **3** Servei d' Anatomia Patològica, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain, **4** Servei de Cirurgia, Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), IISPV, Reus, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* tauguet.hj23.ics@gencat.cat (TA); crichart.hj23.ics@gencat.cat (CR)



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, Martínez S, Sabench F, Binetti J, et al. (2017) Hepcidin in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. PLoS ONE 12(10): e0187065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187065>

Editor: Pavel Strnad, Medizinische Fakultät der RWTH Aachen, GERMANY

Received: July 21, 2017

Accepted: October 12, 2017

Published: October 24, 2017

Copyright: © 2017 Auguet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (FEDER, Grant Number PI116/00498 to Teresa Auguet), the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca (AGAUR 2009 SGR 959 to Cristóbal Richart), the Grup de Recerca en Medicina Aplicada URV (2016 PFR-URV-B2-72 to Cristóbal Richart) and the Fundació Biociència. The funders had no role in study

Background

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease in Western countries. Both iron and lipid metabolism seem to be involved in its pathogenesis. We aimed to assess the relationship between levels of hepcidin, the master iron-regulatory protein, in plasma and the presence of NAFLD in morbidly obese (MO) patients, and to investigate the association between the hepatic expression of the main iron and lipid metabolism-related genes.

Materials and methods

Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure plasma hepcidin levels in 49 normal-weight control women, 23 MO women with normal liver (NL) histology and 46 MO women with NAFLD. The mRNA expression of hepcidin, the main iron metabolism-related genes, and the main lipid-metabolism genes was quantified by qRT-PCR in liver biopsies from members of the MO group undergoing bariatric surgery.

Results

Circulating hepcidin levels were significantly greater in MO than in normal-weight control women. However, there were no significant differences between MO women with NL and those with NAFLD. PCR analysis showed increased expression of hepcidin, FPN1, TfR1 and TfR2 in the liver of MO NAFLD women compared to those with NL. Moreover, a positive association of hepatic hepcidin mRNA expression and the iron metabolism-related genes was found with some key genes involved in the lipid metabolism.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

These findings suggest that circulating hepcidin levels are associated with obesity but not with the presence of NAFLD. However, the hepatic expression of hepcidin and the iron metabolism-related genes seem to play a role in regulating lipid metabolism pathways in liver, which has implications for NAFLD pathogenesis.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a wide spectrum liver disease, ranging from simple steatosis (SS) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). While SS is considered to be a relatively benign, non-progressive clinical entity, NASH can progress to cirrhosis and, in a small percentage of patients, to hepatocellular carcinoma [1]. The current estimate of the global prevalence of NAFLD is 25.24% and is quite high in patients with components of metabolic syndrome. For instance, over 90% of severely obese patients undergoing bariatric surgery have NAFLD [2].

The accumulation of fat in the liver, which occurs in the absence of significant alcohol consumption, is a key feature of NAFLD. It has been reported that the mechanisms leading to excessive hepatic lipid accumulation arise from an imbalance between lipid acquisition and removal, a process in which insulin resistance and lipid metabolism deregulation play a key role [3,4]. Although lipid accumulation alone may be benign, more aggressive forms of NAFLD can develop as a result of other mechanisms. In this regard, the most generally accepted hypothesis at present to explain the progression from SS to NASH is the “multiple hit” hypothesis, which considers multiple insults acting together, including hormones secreted from the adipose tissue, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, gut microbiota, genetic and epigenetic factors, and iron overload [5–8]. In the pathogenesis of NAFLD, iron is likely to induce oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation in the liver [9,10]. Serum iron indices and hepatic iron content are frequently shown in patients with NAFLD/NASH [11,12]. In fact, clinical studies with NAFLD patients have shown a clear association between hepatic iron deposition and disease severity [9,13–15]. Moreover, liver damage has been shown to improve after iron reduction therapy in patients with NAFLD [16,17].

The liver is the major site of iron deposition and has a central role in iron homeostasis because it regulates hepcidin production, the master iron-regulatory protein which is primarily synthesized in hepatocytes and is found in human serum and urine [18]. Hepcidin controls iron release from spleen macrophages and hepatocytes, and also dietary iron absorption from enterocytes by degrading ferroportin (FPN), the only known iron exporter in mammals [19,20]. Its hepatic expression is regulated by a combination of factors such as iron concentrations, inflammation, erythropoiesis, and sex hormone. Important up-stream regulators include hemojuvelin (HJV), hemochromatosis protein (HFE), and transferrin receptor 1 and 2 (TfR1/TfR2) [21]. Hepcidin expression is also enhanced by increased iron stores via bone-morphogenic protein receptor (BMPR) and Sma and Mad related proteins (SMAD) (HJV/BMPR/SMAD pathway) and also via induction of Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription (JAK2/STAT3) pathway when inflammation exists. Commonly, these conditions are present in NAFLD [22,23]. On the other hand, hepcidin is inhibited by anemia and hypoxia [24].

The role of hepcidin as a non-invasive biomarker for NASH or NAFLD has generated considerable interest since some studies have shown variable increase in its serum levels in

patients with NAFLD and variable correlations with hepatic inflammation and histological severity [25–27]. However, the role it plays in the pathogenesis of NAFLD still remains controversial [28–31]. Some authors have suggested that more severe forms of NAFLD are associated with insufficient hepcidin production [28,32]. Moreover, in a recent study, Handa et al., observed elevated hepatic hepcidin expression in patients with NASH and in NAFLD patients who had hepatic iron deposition, while proinflammatory cytokines displayed elevated expression only in patients with NASH, suggesting a regulatory role for hepcidin in NAFL to NASH transition and in mitigating inflammatory responses [23].

Finally, some studies have shown that lipid metabolism might be involved in hepcidin synthesis [29].

With the hypothesis that hepcidin have a regulatory role in the progression of NAFLD, the first aim of the present study was to evaluate the relationship between plasma hepcidin levels and the presence of NAFLD in a cohort of morbidly obese women with NAFLD. In addition, as lipid metabolism seems to be involved in the pathogenesis of NAFLD and may be related to hepcidin synthesis, our second aim was to investigate the association between the hepatic expression of the main genes involved in iron metabolism and the expression of lipid metabolism-related genes.

Material and methods

General protocol

This study was approved by the institutional review board (*Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, 23c/2015*), and all participants gave written informed consent for participation in medical research. We included 69 morbidly obese (MO) women and 49 normal-weight control women, with a body mass index (BMI) greater than 40 kg/m² and less than 25 kg/m², respectively.

Liver biopsies were only obtained from the MO group during planned bariatric surgery and were always performed for diagnostic indications. The weight of all subjects was stable for at least three months prior to surgery. The diagnosis of NAFLD was made on the basis of the following criteria: liver pathology, and an intake of less than 10 gr. of ethanol/day. The exclusion criteria were: (1) concurrent use of medications known to produce hepatic steatosis or hormone replacement therapy or herbal products (2) history of hepatotoxic drugs, (3) patients using lipid-lowering medications including PPAR α or γ -agonists, (4) menopausal and postmenopausal women and subjects receiving contraceptive treatment, (5) patients who had viral hepatitis or autoimmune hepatitis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha-1 antitrypsin deficiency, biliary disease, anemia, impaired renal function, current evidence of acute or chronic inflammatory diseases potentially capable of causing hyperferritinemia and end-stage malignant diseases.

Histological evaluation

All liver samples were scored by experienced hepatopathologists using the methods described elsewhere [33,34]. Simple steatosis (SS) was graded as follows: Grade 1 or mild SS: more than 5% and less than 33% of hepatocytes affected; Grade 2 or moderate SS: 33% to 66% of hepatocytes affected; or Grade 3 or severe SS: more than 66% of hepatocytes affected. Moreover, the minimum criteria for the steatohepatitis diagnosis included the presence of either ballooning cells and lobular inflammation or perisinusoidal /pericellular fibrosis in zone 3 of the hepatic acinus. According to their liver pathology and BMI, MO patients were sub-classified into the following groups: (1) MO women with normal liver (NL) histology (n = 23); (2) MO women

with simple steatosis (SS) (micro/macrovacuolar steatosis without inflammation or fibrosis, $n = 22$); (3) MO women with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (Brunt grade 1–3, $n = 24$).

Laboratory evaluation

All patients were evaluated by a complete anthropometrical, biochemical, and physical assessment. Body height and weight were measured with the subjects standing in light clothes and shoeless. BMI was calculated as body weight divided by height squared (Kg/m^2). Patient's waist circumference (WC) was measured with a soft tape midway between the lower rib and the iliac crest.

Laboratory analysis included circulating levels of glucose, insulin, glycosylated haemoglobin (HbA1c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), transaminases and circulating iron status (including ferritin, transferrin, transferrin saturation and iron levels), which were measured using a conventional automated analyzer after overnight fasting. Insulin resistance was estimated using the homeostatic model assessment 2-insulin resistance (HOMA2-IR) [35]. We also analyzed plasma hepcidin concentrations, measured by a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA) (Catalog No: EIA-5782, DRG Diagnostics, Marburg, Germany), according to the manufacturer's instructions. The detection limit was 0.153 ng/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were between 5 and 15%.

RNA Isolation and Real-time PCR

Liver biopsy sample were preserved in RNA later (Sigma, San Louis, MO, USA) for 24 h at 4°C and then stored at -80°C until use. Total RNA was isolated from liver by using an RNeasy mini kit (Qiagen, Barcelona, Spain) in accordance with the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was obtained from total RNA using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Real-time quantitative PCR was carried out with TaqMan Assays predesigned by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) for the detection of hepcidin (HAMP, Hs00221783_m1), ferroportin 1 (FPN1, Hs00205888_m1), hemojuvelin (HJV, Hs00377108_m1), transferrin receptor 1 (TfR1, Hs00951083_m1), transferrin receptor 2 (TfR2, Hs01056398_m1), LXR α (Hs00173195_m1), SREBP1c (Hs01088691_m1), ACC1 (Hs00167385_m1), FAS (Hs00188012_m1), PPAR α (Hs00947538_m1), CPT1a (Hs00912671_m1), CROT (Hs00221733_m1), SREBP2 (Hs01081784_m1), ABCA1 (Hs01059118_m1), ABCG1 (Hs00245154_m1), and 18S ribosomal RNA (4333760T) that was used as a housekeeping gene. All reactions were carried out in duplicate in 96-well plates using the 7900HT Fast Real-Time PCR systems (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 23.0 statistical package for Windows (IBM Corporation, New York, NY, USA). All values were tested for normality using the Kolmogorov—Smirnov test. Data are presented as the median (25th percentile -75th percentile). Differences between the study groups were calculated using non-parametric test: Mann—Whitney U-test and Kruskal-Wallis analysis. The strength of association between the study variables was analyzed by the Spearman's tests. p -Values <0.05 were considered to show statistically significant results.

Results

Baseline characteristics of subjects

The main characteristics of the study cohort, including anthropometric and biochemical (liver enzymes, and glucose, lipid and iron metabolism) parameters are shown in [Table 1](#). Our cohort of 118 women was classified according to the body mass index (BMI) and hepatic histology into normal-weight ($n = 49$), morbidly obese with normal liver histology (NL, $n = 23$), and morbidly obese with NAFLD ($n = 46$). In terms of age and anthropometric measurements (weight, BMI and waist circumference [WC]), there were no significant differences between NL and NAFLD in the morbidly obese group. Biochemical analyses indicate that insulin and triglycerides were also significantly lower in normal-weight women than in NL and NAFLD MO women. Although levels of glucose, homeostatic model assessment 2-insulin resistance (HOMA2-IR) and glycosylated haemoglobin (HbA1c) were not significantly different between normal-weight women and MO women with NL histology, its circulating levels were significantly lower in normal-weight women compared to MO women with NAFLD. When we compared liver histologies in the morbidly obese group, we observed that

Table 1. Clinical characteristics of the study cohort classified according to the BMI and histopathological characteristics.

Variables	Normal-Weight	Morbidly Obese ($n = 69$)	
	($n = 49$)	NL ($n = 23$)	NAFLD ($n = 46$)
Age (years)	43.9 (34.6–52.2)	45.1 (40.3–58.8)	48.3 (44.6–54.8)
Weight (Kg)	59.0 (52.2–64.0)	120.0 (112.0–131.0)*	120.0 (112.5–129.3)*
BMI (Kg/m ²)	23.1 (21.6–24.2)	47.5 (42.0–52.7)*	46.8 (44.2–51.4)*
WC (cm)	74.0 (69.5–79.5)	134.0 (121.8–149.3)*	133.0 (125.0–139.0)*
Glucose (mg/dL)	82.5 (69.0–91.0)	84.0 (76.8–96.8)	116.0 (102.0–152.0)*#
Insulin (mUI/L)	6.0 (4.2–9.9)	9.7 (7.9–13.1)*	17.3 (9.3–25.4)*#
HOMA2-IR	0.7 (0.5–1.3)	1.2 (1.0–1.6)	2.6 (1.4–3.5)*#
Total cholesterol (mg/dL)	180.0 (169.9–202.9)	163.2 (143.8–204.0)	178.9 (152.3–206.9)
HDL-C (mg/dL)	60.6 (50.8–65.3)	43.9 (35.8–54.3)*	38.0 (34.9–43.8)*#
LDL-C (mg/dL)	110.3 (93.9–123.0)	87.1 (76.5–127.5)	110.0 (88.8–131.3)
Triglycerides (mg/dL)	65.5 (53.8–104.5)	121.5 (90.0–166.3)*	153.0 (120.0–198.5)*#
AST (U/L)	21.0 (16.5–23.0)	19.0 (17.0–21.0)	39.0 (26.0–56.0)*#
ALT (U/L)	17.0 (13.0–23.5)	18.0 (16.0–23.5)	41.0 (29.0–65.0)*#
GGT (U/L)	13.0 (10.0–20.0)	16.5 (10.3–22.8)	30.5 (16.0–54.1)*
ALP (U/L)	59.0 (48.0–69.0)	60.0 (51.0–74.0)	74.0 (60.3–81.5)*#
HbA1c (%)	5.0 (4.6–5.3)	5.2 (4.8–5.7)	5.8 (5.0–6.6)*#
Iron (ug/dL)	79.0 (59.8–104.8)	62.0 (45.3–71.5)	61.0 (36.0–78.5)*
Transferrin (mg/dL)	262.0 (226.0–287.0)	251.0 (231.3–264.8)	244.0 (220.5–264.0)*
Transferrin saturation (%)	18.3 (15.2–26.5)	13.8 (10.8–23.7)	23.1 (12.1–29.6)
Ferritin (ng/mL)	30.0 (19.5–74.2)	49.0 (27.0–73.0)	67.8 (33.5–175.0)*#
Hepcidin (ng/mL)	17.5 (5.8–26.7)	26.6 (14.5–44.3)*	23.5 (8.8–40.8)*
CRP (mg/dl)	<0.00001	1.5 (1.0–5.19)*	1.0 (1.0–2.0)*

ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyltransferase; HbA1c, glycosylated haemoglobin; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA2-IR, homeostatic model assessment 2-insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NL, normal liver; WC, waist circumference. Data are presented as the median (25th percentile–75th percentile).

* indicates significant differences with respect to normal-weight ($p < 0.05$);

indicates significant differences with respect to morbidly obese group with NL histology ($p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187065.t001>

insulin, triglycerides, glucose, HOMA2-IR, and HbA1c were significantly greater in NAFLD than in NL subjects. Moreover, circulating levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were significantly higher in normal-weight women than in NL and NAFLD MO subgroups, and significantly lower in MO women with NAFLD than in those with NL histology. As far as transaminases are concerned, Table 1 showed that levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) were significantly higher in MO women with NAFLD than in normal-weight and MO women with NL histology. However, levels of gamma-glutamyltransferase (GGT) were not significantly different between NL and NAFLD in the morbidly obese group, although their circulating levels were significantly greater in MO women with NAFLD than in normal-weight control women. Finally, with regard to iron metabolism parameters, we observed significantly higher levels of iron and transferrin in normal-weight women than in MO women with NAFLD. However, hepcidin levels in both MO women with NAFLD and NL histology were significantly higher than in normal-weight subjects. We also observed that ferritin levels were significantly greater in MO NAFLD women than in MO with NL histology and normal-weight women. Regarding inflammation, CRP levels in both MO women with NAFLD and NL were significantly higher than in normal-weight subjects.

Evaluation of hepcidin circulating levels according to BMI and the presence of NAFLD

The first objective of the present study was to evaluate the relationship between plasma hepcidin levels and the presence of NAFLD. To do this, we first compared the hepcidin circulating levels in our cohort of MO and normal-weight control women. The results indicate that the plasma hepcidin levels were significantly greater in morbidly obese than in normal-weight control women (Fig 1A). Then, we evaluated the hepcidin levels in our cohort of MO women according to the presence of NAFLD. We observed that the plasma levels of hepcidin were not significantly different in MO women with normal liver histology and those with NAFLD, but they were significantly greater in MO women with NL histology than in normal-weight subjects (Fig 1B). Finally, we also analyzed the hepcidin circulating levels in the MO NAFLD subgroup, but there were no significant differences between those with simple steatosis (SS) and NASH (MO SS: 22.16 (10.87–39.42); MO NASH: 25.00 (6.35–42.07); $p = 0.811$).

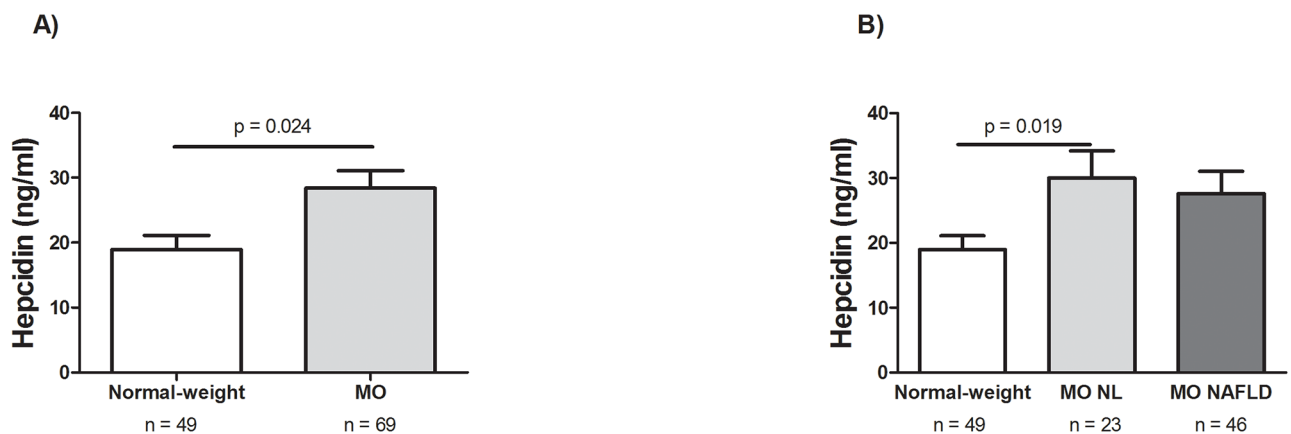


Fig 1. Hepcidin circulating levels. (A) Differential circulating hepcidin concentrations between normal-weight and morbidly obese women. (B) Hepcidin circulating levels in normal-weight women and in MO women according to liver histology into normal liver and NAFLD. MO, morbidly obese; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease. NL, normal liver. $p < 0.05$ were considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187065.g001>

Evaluation of the hepatic expression of genes involved in iron metabolism

The second objective of the present study was to evaluate the hepatic expression of hepcidin in our cohort of MO women and to analyze other genes involved in the iron metabolism (FPN1, TfR1, TfR2 and HJV). Although a lot of genes are involved in these pathways, we chose to measure FPN1, TfR1, TfR2 and HJV mRNA expression because mutations in TfR2, HJV, and FPN1 prevent appropriate hepcidin response to iron, allowing increased absorption of dietary iron, and eventually iron overload [36]. We observed that in MO women with NAFLD the hepatic mRNA expression of hepcidin, FPN1, TfR1 and TfR2 was significantly greater than in MO women with normal hepatic histology (Fig 2). We categorized the MO NAFLD subjects in terms of their histological severity into simple hepatic steatosis and NASH. In this case, we did not observe any significant differences in the hepatic mRNA expression of the iron metabolism genes studied. However, the hepatic mRNA expression of FPN1, HJV, TfR1 and TfR2 was significantly higher in MO women with SS than in those with normal liver histology. Moreover, the hepatic mRNA expression of TfR1 and TfR2 was also significantly greater in NASH than in NL morbidly obese women (Fig 3).

Correlations of hepcidin circulating levels with biochemical parameters

When we analyzed the association of hepcidin circulating levels with the biochemical parameters studied, we observed that plasma hepcidin correlated positively with ferritin ($r = 0.708$; $p < 0.001$), transferrin saturation ($r = 0.230$; $p = 0.028$) and iron ($r = 0.274$; $p = 0.007$) levels, but negatively with transferrin levels ($r = -0.306$; $p = 0.003$). In addition, we observed a negative association between hepcidin circulating levels and HDL-C ($r = -0.198$; $p = 0.038$), while a positive association with ALP was shown ($r = 0.252$; $p = 0.009$).

Correlations of hepatic hepcidin and iron metabolism-related gene expression with genes involved in lipid metabolism, and biochemical parameters involved in iron metabolism

The results shown in Table 2 indicate that in our cohort of MO women the hepatic mRNA expression of hepcidin and the iron metabolism-related genes studied were positively associated with some key genes involved in the lipid metabolism. We also observed that hepcidin expression in liver correlated positively with FPN1 ($r = 0.529$; $p < 0.001$), TfR2 ($r = 0.551$; $p < 0.001$) and HJV ($r = 0.593$; $p < 0.001$). Moreover, hepatic hepcidin expression was not only positively associated with its circulating levels ($r = 0.710$; $p < 0.001$), but also with the plasma levels of iron, ferritin and transferrin saturation (Iron: $r = 0.389$; $p = 0.014$; Ferritin: $r = 0.525$; $p < 0.001$; Transferrin saturation: $r = 0.471$; $p = 0.005$). Finally, a strong negative association was observed between the hepatic expression of hepcidin and transferrin circulating levels ($r = -0.633$; $p < 0.001$).

Discussion

In our previous studies, we showed that lipogenesis seems to be downregulated in advanced stages of simple steatosis [4], as well as the hepatic lipid metabolism seems to be “controlled” by some miRNAs in patients with NAFLD [37]. As both the lipid and the iron metabolism seem to be involved in the pathogenesis of NAFLD [28,32], hepcidin seems to have a role in transition from steatosis to NASH [23] and lipid metabolism might be involved in hepcidin synthesis [28,32], in the present work we aimed to go one step further by exploring the relationship between plasma hepcidin levels, and the presence of NAFLD in morbidly obese

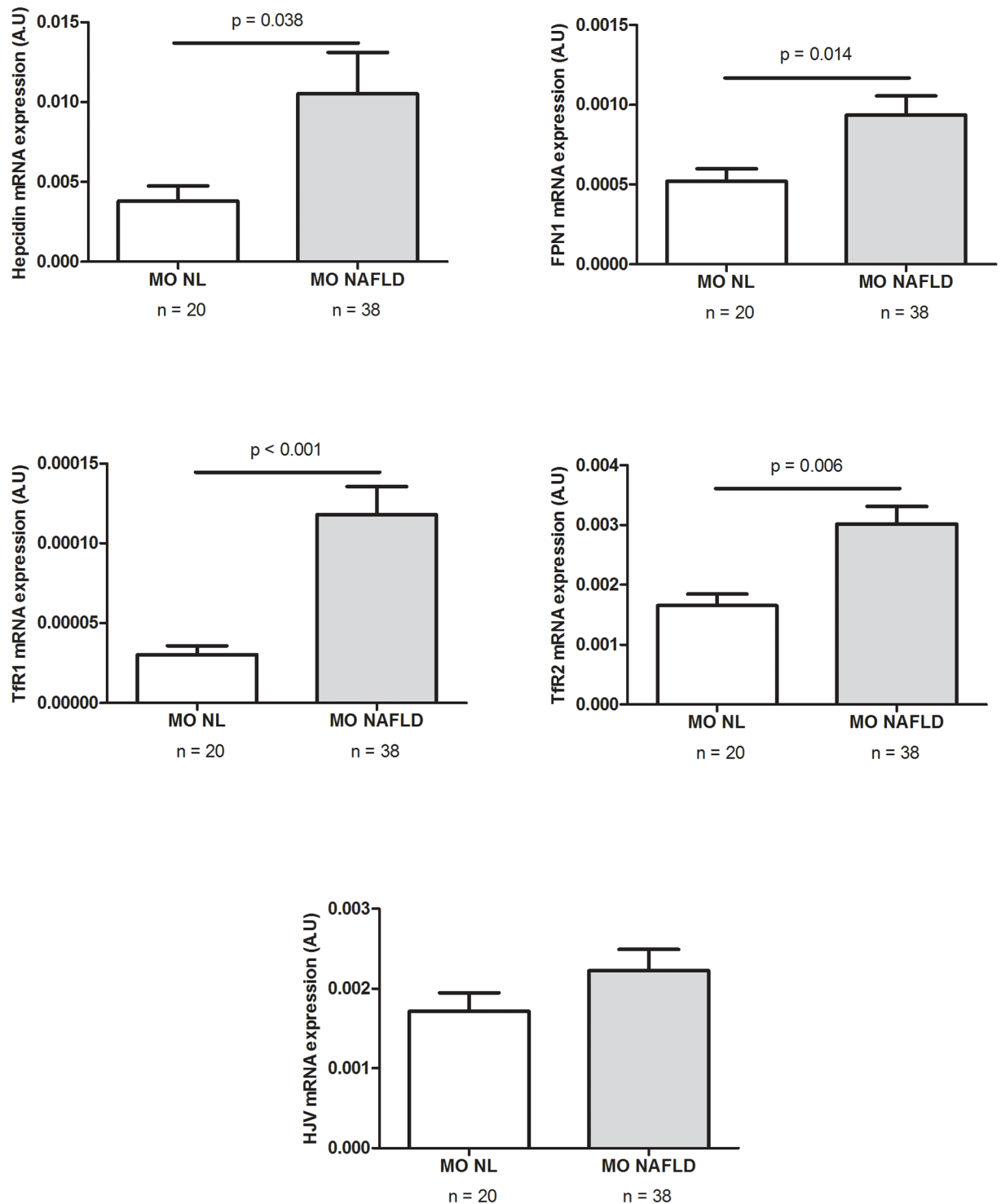


Fig 2. Differential hepatic expression of hepcidin and iron-related genes between MO women with normal liver histology and MO women with NAFLD. A.U.; arbitrary units; MO, morbidly obese; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease. NL; normal liver. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187065.g002>

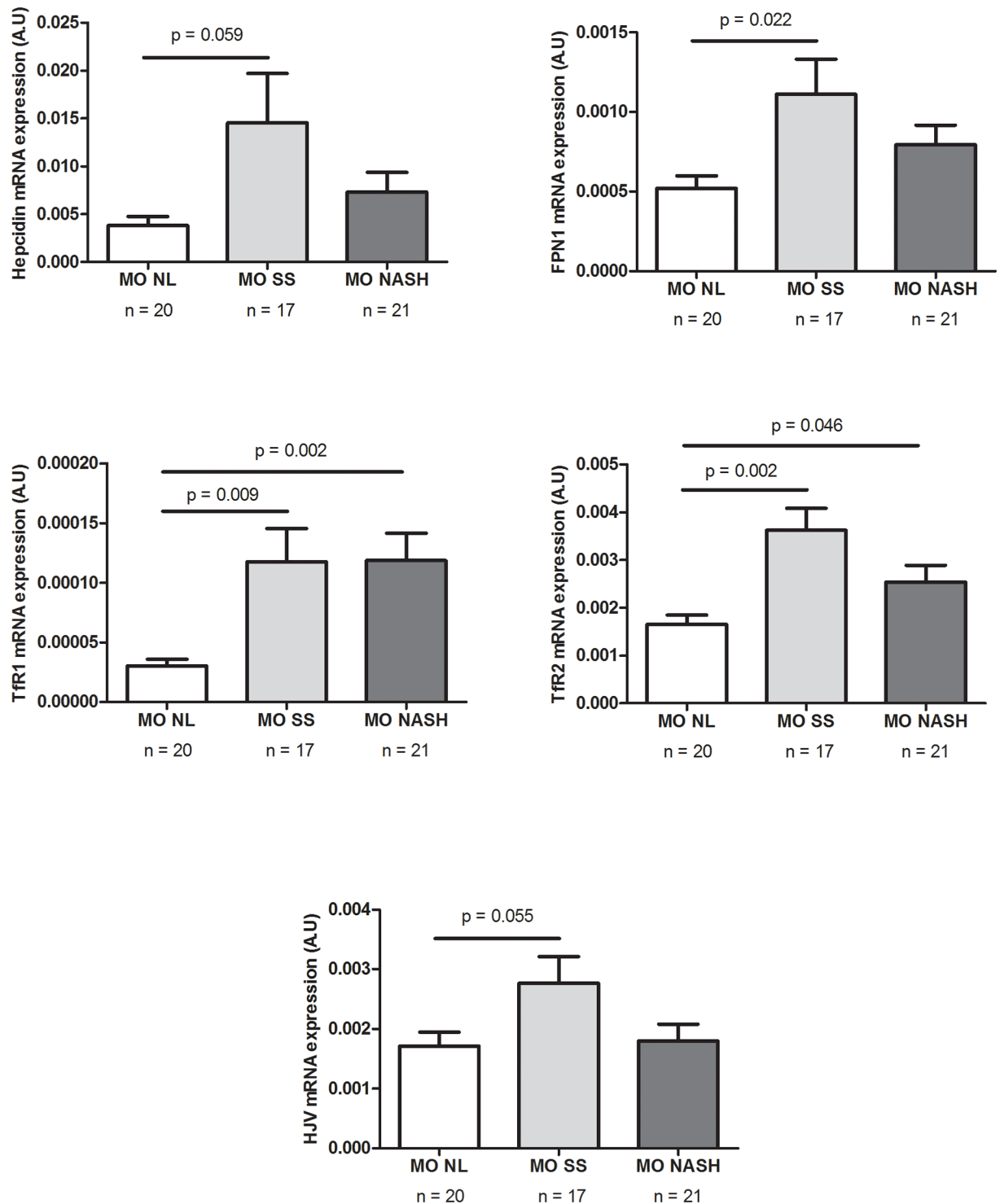


Fig 3. Hepatic expression in MO women according to liver pathology into NL, SS and NASH. A.U; arbitrary units; MO, morbidly obese; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease. NL; normal liver; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; SS; steatosis. $p < 0.05$ is considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187065.g003>

Table 2. Correlations of hepatic hepcidin and iron metabolism related genes expression with genes involved in lipid metabolism.

Variables	Hepcidin		FPN1		HJV		TfR1		TfR2	
	<i>r</i>	* <i>p</i> -Value	<i>r</i>	* <i>p</i> -Value	<i>r</i>	* <i>p</i> -Value	<i>r</i>	* <i>p</i> -Value	<i>r</i>	* <i>p</i> -Value
<i>Lipid metabolism genes</i>										
LXRα	0.392	0.022	0.521	0.005	0.439	0.011	0.447	0.011	0.434	0.011
SREBP1c	0.380	0.022	0.384	0.019	0.389	0.022	0.175	0.293	0.377	0.022
ACC1	0.021	0.888	0.116	0.513	-0.069	0.781	0.148	0.354	0.034	0.906
FAS	-0.151	0.381	0.108	0.513	-0.102	0.667	0.242	0.164	-0.003	0.982
PPARα	0.414	0.022	0.583	0.005	0.559	0.011	0.374	0.040	0.622	0.005
CPT1α	0.186	0.332	0.276	0.094	0.318	0.057	0.231	0.164	0.461	0.005
CROT	0.156	0.381	0.273	0.094	0.243	0.169	0.317	0.082	0.318	0.057
SREBP2	0.138	0.392	0.173	0.330	0.044	0.839	0.247	0.164	0.261	0.121
ABCA1	0.224	0.240	0.026	0.863	0.010	0.946	0.022	0.881	0.074	0.763
ABCG1	0.245	0.213	0.362	0.026	0.123	0.628	0.433	0.011	0.255	0.121
PNPLA3	0.431	0.022	0.418	0.019	0.397	0.027	0.255	0.164	0.434	0.016

ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1, ATP-binding cassette transporter G1; ACC1, acetyl-coenzyme A carboxylase 1; CPT1 α , carnitine palmitoyltransferase I; CROT, carnitine O-octanoyltransferase FAS, fatty acid synthase; LXR α , liver X receptor; PNPLA3, patatin-like phospholipase domain-containing protein 3; PPAR α , peroxisome-proliferator-activated receptor α ; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein 1c; SREBP2, sterol regulatory element binding protein 2. $p < 0.05$ is considered statistically significant.

**p*-Value adjusted by Benjamini & Hochberg method -.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187065.t002>

patients, and also if any association between the hepatic expression of the main iron and lipid metabolism-related genes exists.

Although hepcidin has long been known to be linked with insulin-resistant states, including type 2 diabetes mellitus, the Metabolic Syndrome (MetS) and obesity [11,38], those studies that have examined the relationship between circulating hepcidin levels and the presence or severity of NAFLD have reported conflicting data. In this regard, in our study the plasma hepcidin levels were significantly greater in morbidly obese than in normal-weight control women. However, the plasma levels of hepcidin were not significantly different between MO women with normal liver histology and those with NAFLD. We confirm that obesity but not the presence of NAFLD was associated with circulating hepcidin levels, in agreement with other authors [31,39,40].

In a meta-analysis of obesity, Cheng *et al.* reviewed the association between adult obesity and iron homeostasis and found that obese subjects showed increased blood hemoglobin and serum ferritin concentration [41]. It is known that systemic iron homeostasis is controlled by hepcidin. In this regard, several studies have demonstrated that circulating hepcidin and ferritin concentrations are increased in obese subjects with low-grade chronic inflammation [11,42–49]. In our study, both hepcidin and CRP levels in MO women, regardless of their liver histology, were higher than those in normal-weight subjects.

With regard to NAFLD, although some authors have described higher serum levels of hepcidin in patients with NAFLD [25,27,30,39], others, according to our results, did not find any relationship between circulating levels of hepcidin and the presence of NAFLD [26,31,40]. These discrepancies could be explained by the different characteristics of the cohorts studied and the methods used. Our study was conducted in a cohort of morbidly obese women whereas Senates *et al.* [25] included a cohort of mildly obese patients of both genders. It should also be noted that Senates *et al.* do not provide the ferritin levels of the control group. As these levels have an influence on the levels of hepcidin, a bias could exist. Likewise, the study by Demircioglu *et al.*, focused on overweight/mildly obese children and NAFLD was diagnosed

by ultrasonography [30]. Finally, Zimmermann *et al.* included mildly obese patients of both genders with NASH and observed that hepcidin correlated with hepatic inflammation [27]. On contrary, we could not demonstrate any association between hepcidin circulating levels and the histological severity of NAFLD.

It is well known that obesity and NAFLD are associated with dysregulated lipid metabolism [3]. In fact, we have demonstrated elsewhere that there is a relation between a downregulation of the lipogenic pathway and the severity of steatosis in a cohort of MO women [4], and also between the liver expression of PNPLA3 and the severity of steatosis [50]. In addition, Barisani *et al.* and H. Mitsuyoshi *et al.* have reported that lipid metabolism might be involved in hepcidin synthesis [28,32]. Taking these results into account, the second goal of the present study was to evaluate the hepatic expression of hepcidin and other genes involved in iron metabolism, and to investigate if any association with lipid-metabolism related genes exists.

We observed that in our population of MO women, hepatic hepcidin expression was significantly higher in patients with NAFLD than in those with normal liver histology, and the same pattern was observed for the expression of important up-stream regulators of hepcidin expression, including transferrin receptor 1 (TfR1) and 2 (TfR2) and ferroportin 1 (FPN1). This finding is consistent with previous reports in which the hepatic levels of these genes in NAFLD patients were significantly higher than in controls, suggesting that the activity of FPN1 does not coincide with the amount of FPN1 [32,51]. Another recent study has reported increased hepatic hepcidin expression [23] in patients with NASH, suggesting that hepcidin plays a regulatory role in SS to NASH transition. Nevertheless, we did not observe any significant differences between NAFLD patients with simple steatosis and those with NASH. Regarding these discrepancies, it is important to note that these authors did not include a MO cohort, the BMI of the subjects studied was higher than 30 kg/m² and lower than 40 kg/m², and men were also included in the study.

Then, we also studied the relationship between some lipid-metabolism related genes and the expression of hepcidin and its up-stream regulators. The novelty of the study lies in the fact that our results show positive associations between hepcidin, hemojuvelin, FPN1, TfR1 and TfR2 hepatic expression with lipid metabolism-related genes involved in the *de novo* synthesis of fatty acids (LXR α and SREBP1c), fatty acid oxidation (PPAR α), the secretion of lipoproteins (ABCG1), and the triacylglycerol lipase PNPLA3 in liver. In this regard, some authors have described the post-transcriptional regulation of human hepcidin genes by fatty acids in HepG2 cells [52]. Moreover, 1 different experimental models suggested that iron overload seems to have direct effects on hepatic lipid metabolism [53,54]. However, further human studies are necessary to clarify our findings because the association between the hepatic expression of the main iron and lipid metabolism-related genes can be casual. Perhaps, rather than a direct relationship, could exist a common pathogenic mechanism that causes the progression to NASH, as oxidative stress or inflammation [23].

We should point out that a limitation of this work is the lack of evaluation of protein expression. Additionally, the study is cross-sectional. We could not prove a causal link between iron and lipid metabolism-related genes in NAFLD. However, our study cohort of morbidly obese women has revealed a relationship between iron and lipid metabolism-related genes in NAFLD, without the interference of gender or age. Thus, our findings cannot be extrapolated to men or other obesity groups.

In summary, our results suggest that hepcidin circulating levels are associated with obesity but not with the presence of NAFLD. On the other hand, the hepatic expression of hepcidin and the expression of its important up-stream regulators could be related to lipid metabolism pathways in liver or at least sharing a common pathogenic mechanism, which might have

implications for NAFLD pathogenesis. Further studies need to be performed in order to confirm or clarify these findings.

Author Contributions

Conceptualization: Teresa Auguet, Gemma Aragonès, Alba Berlanga, Cristóbal Richart.

Formal analysis: Gemma Aragonès, Alba Berlanga, José Antonio Porras.

Funding acquisition: Teresa Auguet, Cristóbal Richart.

Investigation: Teresa Auguet, Gemma Aragonès, Alba Berlanga, Salomé Martínez, Fátima Sabench, Jessica Binetti, Carmen Aguilar, José Antonio Porras, Alicia Molina, Daniel Del Castillo, Cristóbal Richart.

Methodology: Gemma Aragonès, Alba Berlanga, Salomé Martínez, Fátima Sabench, Jessica Binetti, Carmen Aguilar, José Antonio Porras.

Project administration: Teresa Auguet.

Resources: Salomé Martínez, Fátima Sabench, Alicia Molina, Daniel Del Castillo.

Supervision: Teresa Auguet, Cristóbal Richart.

Validation: Gemma Aragonès, Alba Berlanga, Salomé Martínez, Jessica Binetti, Carmen Aguilar, José Antonio Porras.

Visualization: Teresa Auguet, Gemma Aragonès, Alba Berlanga.

Writing – original draft: Teresa Auguet, Gemma Aragonès, Alba Berlanga, Jessica Binetti.

Writing – review & editing: Teresa Auguet, Alba Berlanga, Cristóbal Richart.

References

1. De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des.* 2013; 19: 5239–49. <https://doi.org/10.2174/1381612811319290006> PMID: 23394093
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. *Hepatology.* 2016; 64: 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431> PMID: 26707365
3. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014; 7: 221–239. <https://doi.org/10.2147/CEG.S62831> PMID: 25045276
4. Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martinez S, Porras JA, Aragonès G, et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 22173–87. <https://doi.org/10.3390/ijms151222173> PMID: 25474087
5. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010; 52: 1836–46. <https://doi.org/10.1002/hep.24001> PMID: 21038418
6. Jung U, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 6184–6223. <https://doi.org/10.3390/ijms15046184> PMID: 24733068
7. Nouredin M, Mato JM, Lu SC. Nonalcoholic fatty liver disease: update on pathogenesis, diagnosis, treatment and the role of S-adenosylmethionine. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240: 809–20. <https://doi.org/10.1177/1535370215579161> PMID: 25873078
8. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* Elsevier Inc.; 2016; 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012> PMID: 26823198
9. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-Term Follow-up of Patients with NAFLD and Elevated Liver Enzymes. *Hepatology.* 2006; 44: 865–873. <https://doi.org/10.1002/hep.21327> PMID: 17006923

10. Ahmed U, Latham PS, Oates PS. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012; 18: 4651–4658. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4651> PMID: 23002334
11. Martinelli N, Traglia M, Campostrini N, Biino G, Corbella M, Sala C, et al. Increased Serum Hepcidin Levels in Subjects with the Metabolic Syndrome: A Population Study. Sesti G, editor. *PLoS One.* 2012; 7: e48250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048250> PMID: 23144745
12. Aigner E, Weiss G, Datz C. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. 2015; 7: 177–188. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i2.177> PMID: 25729473
13. George D. Increased hepatic iron concentration in non alcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology.* 1998; 114: 311–8. PMID: 9453491
14. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, et al. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 2448–2455. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.04052.x> PMID: 11513189
15. Hernandez-gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 425–456. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246> PMID: 21073339
16. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102: 1251–8. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01192.x> PMID: 17391316
17. Beaton MD, Chakrabarti S, Levstik M, Speechley M, Marotta P, Adams P. Phase II clinical trial of phlebotomy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013; 37: 720–729. <https://doi.org/10.1111/apt.12255> PMID: 23441892
18. Nemeth E. Hepcidin biology and therapeutic applications. *Expert Rev Hematol.* 2010; 3: 153–5. <https://doi.org/10.1586/ehm.10.1> PMID: 21083458
19. Park CH, Valore E V, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *J Biol Chem.* 2001; 276: 7806–7810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200> PMID: 11113131
20. Ramey G, Deschemin JC, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica.* 2010; 95: 501–504. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.014399> PMID: 19773263
21. Lui J, Sun B, Yin H, Liu S. Hepcidin: A promising therapeutic target for iron disorders: A systematic review. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95: 1–13. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003150> PMID: 27057839
22. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood.* 2007; 109: 353–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-033969> PMID: 16946298
23. Handa P, Maliken BD, Nelson JE, Hennessey KA, Vemulakonda LA, Morgan-stevenson V, et al. Differences In Hepatic Expression of Iron, Inflammation and Stress-Related Genes in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. 2017; 16: 77–85.
24. Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood.* 2011; 118: 4459–4462. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-364034> PMID: 21873547
25. Senates E, Yilmaz Y, Colak Y, Ozturk O, Altunoz ME, Kurt R, et al. Serum Levels of Hepcidin in Patients with Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 2011; 9: 287–290. <https://doi.org/10.1089/met.2010.0121> PMID: 21417913
26. Uysal S, Armutcu F, Aydogan T, Akin K, Ikizek M, Yigitoglu MR. Some inflammatory cytokine levels, iron metabolism and oxidant stress markers in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem.* Elsevier B.V.; 2011; 44: 1375–1379. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.09.017> PMID: 22015687
27. Zimmermann A, Zimmermann T, Schattenberg J, Pöttgen S, Lotz J, Rossmann H, et al. Alterations in lipid, carbohydrate and iron metabolism in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome. *Eur J Intern Med.* 2011; 22: 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2011.01.011> PMID: 21570653
28. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, et al. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. 2008; 49: 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.03.011> PMID: 18462824
29. Aigner E, Theurl I, Theurl M, Lederer D, Haufe H, Dietze O, et al. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 1374–1383. PMID: 18469261

30. Demircio F, Görünmez G. Serum hepcidin levels and iron metabolism in obese children with and without fatty liver: case-control study. *Eur J Pediatr.* 2014; 173: 947–951. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2268-8> PMID: 24500395
31. Vuppalanchi R, Troutt JS, K R. Serum Hepcidin Levels Are Associated With Obesity but Not Liver Disease. *Obesity.* 2014; 22: 836–841. <https://doi.org/10.1002/oby.20403> PMID: 23512600
32. Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, et al. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2009; 39: 366–73. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00464.x> PMID: 19054139
33. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41: 1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701> PMID: 15915461
34. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie M. A, Neuschwander-Tetri B, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94: 2467–2474. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x> PMID: 10484010
35. Terra X, Auguet T, Broch M, Sabench F, Hernandez M, Pastor RM, et al. Retinol binding protein-4 circulating levels were higher in nonalcoholic fatty liver disease vs. histologically normal liver from morbidly obese women. *Obesity (Silver Spring).* G 2013; 21: 170–177. <https://doi.org/10.1002/oby.20233> PMID: 23505183
36. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology.* 2011; 53: 1333–41. <https://doi.org/10.1002/hep.24178> PMID: 21480335
37. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, Guiu-jurado E, Martí A, Martínez S, et al. miR33a / miR33b * and miR122 as possible contributors to hepatic lipid metabolism in obese women with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms17101620> PMID: 27669236
38. Moreno-navarrete M, Moreno M, Puig J, Blasco G, Fern M. Hepatic iron content is independently associated with serum hepcidin levels in subjects with obesity. *Clin Nutr.* 2016: 31262–31266. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.09.022> PMID: 27745814
39. Lee SH, Jeong S, Park YS, Hwang J, Kim J, Kim N, et al. Serum prohepcidin levels in chronic hepatitis C, alcoholic liver disease, and nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Hepatol.* 2010; 16: 288–294. <https://doi.org/10.3350/kjhep.2010.16.3.288> PMID: 20924211
40. Boga S, Alkim H, Alkim C, Koksar AR, Bayram M, Banu M, et al. The relationship of serum hemojuvelin and hepcidin levels with iron overload in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015; 24: 293–300. <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.243.hak> PMID: 26405701
41. Cheng HL, Bryant C, Cook R, Rooney K, Steinbeck K. The relationship between obesity and hypoferremia in adults: a systematic review. *Obes Rev.* 2012; 13: 150–161. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00938.x> PMID: 21981048
42. del Giudice EM, Santoro N, Amato A, Brienza C, Calabrò P, Wiegerinck ET, et al. Hepcidin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 5102–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1361> PMID: 19850683
43. Vuppalanchi R, Troutt JS, Konrad RJ, Ghabril M, Saxena R, Bell LN, et al. Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obesity (Silver Spring).* 2014; 22: 836–41. <https://doi.org/10.1002/oby.20403> PMID: 23512600
44. Aeberli I, Hurrell RF, Zimmermann MB. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children. *Int J Obes (Lond).* 2009; 33: 1111–7. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.146> PMID: 19636315
45. Andrews M, Soto N, Arredondo-Olguín M. Association between ferritin and hepcidin levels and inflammatory status in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nutrition.* 2015; 31: 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.04.019> PMID: 25441587
46. Amato A, Santoro N, Calabrò P, Grandone A, Swinkels DW, Perrone L, et al. Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes (Lond).* 2010; 34: 1772–4. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.204> PMID: 20877286
47. Aigner E, Feldman A, Datz C. Obesity as an Emerging Risk Factor for Iron Deficiency. *Nutrients.* 2014; 6: 3587–3600. <https://doi.org/10.3390/nu6093587> PMID: 25215659
48. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Guzman G, Holterman AL, et al. Elevated Systemic Hepcidin and Iron Depletion in Obese Premenopausal Females. *Obesity.* 2010; 18: 1449–1456. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.319> PMID: 19816411

49. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Holterman A-XL, Galvani C, et al. Decreased Serum Hepcidin and Improved Functional Iron Status 6 Months After Restrictive Bariatric Surgery. *Obesity*. 2010; 18: 2010–2016. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.490> PMID: 20075851
50. Aragonès G, Auguet T, Armengol S, Berlanga A, Guiu-jurado E, Aguilar C, et al. PNPLA3 expression is related to liver steatosis in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2016; 17: 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms17050630> PMID: 27128907
51. Tsuchiya H, Ashla AA, Hoshikawa Y, Matsumi Y, Kanki K, Enjoji M, et al. Iron state in association with retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2010; 40: 1227–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2010.00719.x> PMID: 20880062
52. Lu S, Mott JL, Harrison-findik DD. Saturated fatty acids induce post-transcriptional regulation of HAMP mRNA via AU-rich element-binding protein, human antigen R (HuR). *J Biol Chem*. 2015; 290: 24178–24189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648212> PMID: 26304124
53. Kirsch R, Hp S, Tlali M, Ad M, Pm H, Tlali M, et al. Effects of iron overload in a rat nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2006; 26: 1258–1267. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01329.x> PMID: 17105592
54. Graham RM, Chua ACG, Carter KW, Delima RD, Johnstone D, Herbison CE, et al. Hepatic Iron Loading in Mice Increases Cholesterol. 2010; 462–471. <https://doi.org/10.1002/hep.23712> PMID: 20683946



Article

Deregulated Serotonin Pathway in Women with Morbid Obesity and NAFLD

Jessica Binetti ^{1,2,†}, Laia Bertran ^{1,†}, David Riesco ², Carmen Aguilar ¹, Salomé Martínez ³,
Fàtima Sabench ⁴, Jose Antonio Porras ^{1,2}, Javier Camaron ², Daniel Del Castillo ⁴,
Cristóbal Richart ^{1,2} and Teresa Auguet ^{1,2,*}

¹ Grup de Recerca GEMMAIR (AGAUR)—Medicina Aplicada. Universitat Rovira i Virgili (URV), Departament de Medicina i Cirurgia. Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43007 Tarragona, Spain; jessica.binetti@gmail.com (J.B.); laia.bertran@urv.cat (L.B.); caguilar.hj23.ics@gencat.cat (C.A.); aporras.hj23.ics@gencat.cat (J.A.P.); cristobalmanuel.richart@urv.cat (C.R.)

² Servei Medicina Interna, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, 43007 Tarragona, Spain; driesco.hj23.ics@gencat.cat (D.R.); javiercamaron93@gmail.com (J.C.)

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

⁴ Servei de Cirurgia, Hospital Universitari Sant Joan de Reus. Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV). Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43204 Reus, Spain; fatima.sabench@urv.cat (F.S.); danieldel.castillo@urv.cat (D.D.C.)

* Correspondence: tauguet.hj23.ics@gencat.cat; Tel.: +34-97-729-5833

† These authors contributed equally to this work.

Received: 25 August 2020; Accepted: 14 October 2020; Published: 16 October 2020

Abstract: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) extends from simple steatosis (SS) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Peripheral serotonin (5-HT) has become as an important regulator of different metabolic pathways. 5-HT has been related to obesity and lipid accumulation in the liver. The objective of this study was to assess the relationship between the 5-HT signaling pathway and the degree of NAFLD, as well as to investigate whether peripheral 5-HT levels are related to the hepatic and jejunal mRNA abundance of serotonin receptors (HTR) in a cohort of women with morbid obesity (MO) and NAFLD. ELISA was used to quantify the serum 5-HT from normal-weight subjects (n = 26) and patients with MO (n = 58). We used RTq-PCR analysis to evaluate the relative expression of HTR in women with MO with normal liver (n = 22), SS (n = 21), and NASH (n = 15). The 5-HT was diminished in women with MO under a hypocaloric diet, regardless of the presence of NAFLD. Additionally, we report a negative correlation of 5-HT levels with metabolic syndrome criteria, suggesting that serotonin may have a protective role in obesity. Additionally, the hepatic expression of HTR2A and HTR2B were decreased in women with MO and NAFLD, but no significant differences in the HTR jejunal expression according to the presence of NAFLD were found.

Keywords: serotonin; non-alcoholic fatty liver disease; morbid obesity; bariatric surgery; metabolic syndrome

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a current health problem that affects people worldwide, and is a main cause of liver transplantation and hepatocellular carcinoma [1]. In recent years, it has been reported that the clinical relevance of NAFLD is not only focused on liver-related

morbidity and mortality. NAFLD has become a multisystemic disease, affecting extra hepatic tissues, and is linked to metabolic complications such as type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular disease independent of other risk factors. Moreover, recent studies have suggested a possible relationship between NAFLD and depressive disorders [2]. In this sense, treatment for obesity, T2DM, or even anti-depressant drugs in selected NAFLD cases should be useful in treating NAFLD [3]; nevertheless, specific pharmacological treatments for NAFLD have not yet been approved [4–6]. Therefore, improving our knowledge of molecular pathways involved in the progression of NAFLD is needed to identify future therapeutic targets.

The NAFLD progression mechanism is usually explained with the “multiple hit” theory of NAFLD pathogenesis, which states that lipid accumulation triggers liver steatosis, bringing about other processes such as adipokine release, inflammation, lipotoxicity, glucose, and lipid homeostasis dysregulation, which end up causing non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis. Systemic inflammation is linked to progression to NASH, but it is also related to other pathological processes, such as innate immunity alterations, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, toll-like receptors activation, and gut dysbiosis [7]. In this sense, the gut–liver axis plays a key role in the progression of NAFLD. Changes in the microbial composition generated by a high-fat diet (HFD) or high-carbohydrate diet (HCD) give rise to a release of metabolites derived from the microbiota that have a negative impact on liver metabolism, promoting the development of metabolic diseases such as NAFLD [8]. On the other hand, the release into the bloodstream of histamine synthesized by intestinal mast cells [9], or enterochromaffin (EC) cell-derived serotonin [10] also promote liver metabolic dysregulation, leading to steatosis and liver inflammation.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a monoamine neurotransmitter that regulates central and peripheral functions. The central and peripheral 5-HT mechanisms of action function separately, since 5-HT cannot cross the blood–brain barrier [11]. Therefore, 5-HT plays a role not only as a neuronal neurotransmitter controlling mood, sleep, and anxiety but also as a relevant regulator molecule in the gastrointestinal tract and other organs [12].

Most of the peripheral 5-HT is produced in the gut. 5-HT biosynthesis is a rate-limited process carried out by tryptophan hydroxylase isoform (TPH1) in intestinal EC cells, which respond to mechanical stimuli, glycemic status, and microbial digestion products [12]. The physiological actions of peripheral 5-HT occur through the activation of more than 14 serotonin receptor subtypes (HTRx) of seven families [13] located on different cell types such as enterocytes [14], enteric neurons [15], or immune cells [16]. HTR receptors are G-protein-coupled receptors except for serotonin receptor 3 (HTR3), which is a ligand-gated cation channel [17,18].

Once released into the bloodstream, most 5-HT is sequestered into platelets and distributed to different parts of the body [19]. The rest of the 5-HT goes through the systemic circulation and arrives at peripheral tissues in free form. The free 5-HT levels in systemic circulation are very low because most of them are metabolized in the liver and lungs [11]. These gut-derived 5-HT modulate different actions, such as enteric motor and secretory reflexes [13], platelet aggregation [20], and immune responses [16], among others. The dysregulation of 5-HT levels has been involved in the pathogenesis of diseases such as irritable bowel syndrome [21], cardiovascular disease, and osteoporosis [22].

Peripheral serotonin has become an important regulator of energy metabolism, carrying out diverse physiopathological roles in multiple metabolic tissues [23–25]. 5-HT has been known to promote gluconeogenesis and lipid accumulation in hepatocytes *in vitro*, as shown in Figure 1 [26]. In response to fasting, the 5-HT levels increase considerably due to the overexpression of TPH1. High levels of 5-HT promote lipolysis in adipocytes that generate substrates for hepatic gluconeogenesis [25]. Additionally, high levels of 5-HT modulate glucose metabolism, enhancing pancreatic insulin secretion, which gives rise to insulin resistance that promotes hepatic steatosis [27,28]. Recently, an *in vitro* and *in vivo* study has demonstrated that 5-HT regulates hepatocarcinoma steatosis and may enhance hepatic carcinogenesis [29]. Furthermore, the inhibition of hepatic serotonin receptor 2A (HTR2A) signaling *in vivo* by blocking the synthesis of 5-HT improves liver steatosis [28], as well as hyperglycemia and dyslipidemia [30]. 5-HT signaling has

recently been studied in human intestinal mucosal biopsies, and it has been reported that HTR3 and HTR4 may act as gastrointestinal sensory and motor function receptors [31,32], which may impact liver metabolism through the gut–liver axis.

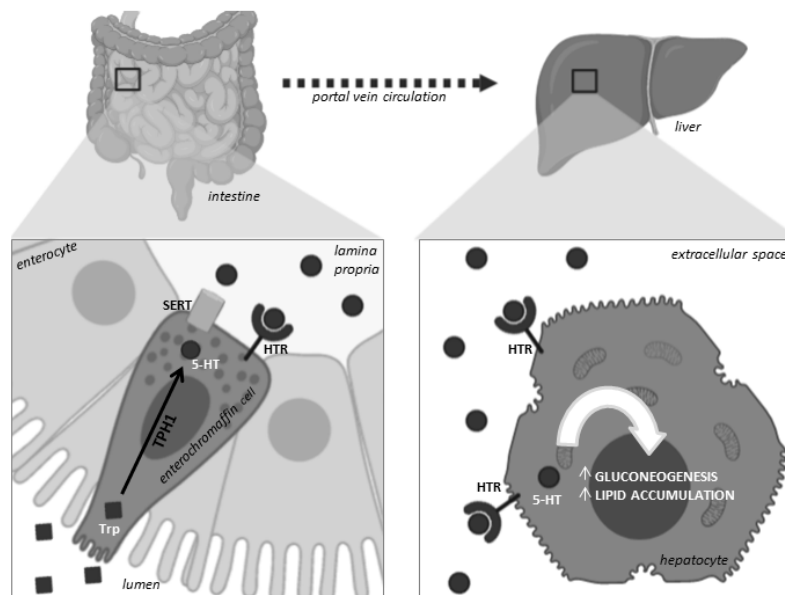


Figure 1. Gut-derived serotonin mechanism of action of hepatocytes. TPH1 enzyme synthesizes 5-HT in enterochromaffin cells from tryptophan captured from the intestinal mucosa. This 5-HT is released and travels through the portal vein circulation to the liver, where it is captured by hepatocytes HTR and promotes lipid accumulation and gluconeogenesis. These processes result in the progression of hepatic steatosis. 5-HT, serotonin; SERT, serotonin transporter; TPH1, tryptophan hydroxylase; HTR, 5-HT receptor; Trp, tryptophan.

Despite all this, regarding obesity there are controversies [33,34]. On one hand, peripheral 5-HT inhibits adaptive thermogenesis process, also called browning, by inactivating the hormone-sensitive lipase and reducing the expression of uncoupling protein 1 [23,24]. In contrast, high levels of 5-HT have been reported in humans with obesity [34] and in rodents with a HFD [35]. This may be due to the fact that, in obesity conditions, there is a higher density of EC cells and an increased expression of TPH1 [34]; however, the role of 5-HT in obesity still remains unclear.

Therefore, the first objective of the present work is to elucidate the role of 5-HT in obesity. Moreover, as the relationship between the serum 5-HT and its liver and gut receptors is poorly studied in humans with NAFLD, the second aim was to assess the relationship between the 5-HT signaling pathway and the degrees of NAFLD. We further aim to investigate whether the peripheral 5-HT levels are related to the hepatic and jejunal mRNA abundance of serotonin receptors (HTR) in a cohort of women with morbid obesity (MO) and NAFLD.

2. Materials and Methods

2.1. Study Subjects

The study was approved by the institutional review board, and all participants gave written informed consent (23c/2015).

The study population consisted of 84 Caucasian women: 26 NW controls (BMI < 25 kg/m²) without caloric restrictions and 58 patients with MO (BMI > 40 kg/m²) who have undergone a very low caloric diet (VLCD) from 3 months before bariatric surgery [36]. VLCD is based on administering up to 800 kcal/day for a period prior to bariatric surgery in order to decrease the risk

of complications and increase the chances of long-term success. Obese patients under a VLCD lost an average weight of 7.65 ± 2.66 kg.

On the other hand, as men and women differ substantially in regard to body composition, energy imbalance, hormones, and lipid and glucose metabolism [37], and also sexual dimorphism in NAFLD seems to exist [38], we included only women in our study in order to avoid the interference of gender.

Liver and jejunal biopsies from patients with MO were obtained during planned laparoscopic bariatric surgery. All the liver biopsies were indicated for clinical diagnosis. The exclusion criteria were as follows: (1) subjects who had alcohol consumption higher than 10 g/day; (2) patients who had acute or chronic hepatic, inflammatory, infectious, or neoplastic diseases; (3) women who were menopausal or undergoing contraceptive treatment; (4) diabetic women receiving pioglitazone, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors, or insulin; (5) patients treated with antibiotics in the previous 4 weeks or receiving cholestyramine or ursodeoxycholic acid; (6) patients with depressive disorders undergoing antidepressant treatment (selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors, and tricyclic antidepressants) and serotonin receptor agonists. In subjects taking other medications, blood was sampled in the morning just before taking medicines.

2.2. Sample Size

Accepting an α risk of 0.05 and a β risk of less than 0.2 in a bilateral contrast, 24 subjects per group are needed to detect a difference ≥ 0.2 units. It is assumed that the common standard deviation is 0.3.

2.3. Liver Pathological Features

Liver samples were scored by experienced hepatopathologists using methods described elsewhere [39]. According to their liver pathological features, women with MO were subclassified into three groups: NL ($n = 22$), SS (micro/macrovacuolar steatosis without inflammation or fibrosis, $n = 21$) and NASH (Brunt Grades 1–3, $n = 15$).

2.4. Biochemical Analyses

All of the subjects included underwent physical, anthropometric, and biochemical assessments. Blood samples were obtained from patients with MO and control subjects. Biochemical parameters were analyzed using a conventional automated analyzer after 12 h of fasting. Insulin resistance (IR) was estimated using the homeostasis model assessment of IR (HOMA2-IR).

Blood extraction, which was obtained from either the group with MO or the control group, was performed by specialized nurses through a BD Vacutainer® system after overnight fasting. Venous blood samples were centrifuged within 30 min on ice after collection at 3500 rpm at 4 °C for 15 min. The serum aliquots were stored at -80 °C. The serum 5-HT levels were analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Ref. BA E-8900, Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany). Cytokines such as IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , and adiponectin were determined using multiplex sandwich immunoassays, the MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 (HADK1MAG-61K, Millipore, Billerica, MA, USA), the MILLIPLEX MAP Human High-Sensitivity T Cell Panel (HSTCMAG28SK, Millipore, Billerica, MA, USA), and the Bio-Plex 200 instrument at the Center for Omic Sciences (Universitat Rovira i Virgili) according to the manufacturer's instructions.

2.5. mRNA Levels in the Liver and Jejunum

The liver and jejunal 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. The total RNA was extracted from both tissues 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 (RT-qPCR) was performed with the TaqMan Assay pre-designed by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) for the detection of HTR2A, HTR2B, and HTR3 in the liver and HTR3 and HTR4 in the jejunum. The mRNA levels of each gene were calculated relative to the expression of 18S RNA for liver genes and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for genes in the jejunum, using the control group (NL) as a calibrator. All the reactions were carried out in duplicate in 96-well plates using the 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Madrid, Spain).

2.6. 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 \pm SD, while non-continuous variables were reported as the median and 25–75th percentile. 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 the variables was calculated using Pearson’s method (parametric variables) and Spearman’s rho correlation test (nonparametric variables). $p < 0.05$ was considered statistically significant. GraphPad Prism 5 for Windows software (version 5.03) was used to elaborate the figures, and the statistical analysis of the relative abundance of analyzed genes was carried out the Wilcoxon test.

3. Results

3.1. Baseline Characteristics of Subjects

The baseline characteristics of the subjects given in Table 1 show the anthropometric and biochemical parameters, expressed as the mean and standard deviation or as the median and percentiles, depending on the distribution of the variables. First, we classified the subjects into two groups according to their body mass index (BMI): normal weight (NW) (BMI < 25 kg/m²; $n = 26$) and MO (BMI > 40 kg/m²; $n = 58$). Biochemical analyses showed that the women with MO had significantly higher levels of fasting glucose, insulin, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA2-IR), triglycerides (TG), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), and alkaline phosphatase (ALP) ($p < 0.05$) than women with NW. Moreover, the high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level was significantly lower in patients with MO than in subjects with NW ($p < 0.001$). There was no difference in the rest of the lipid profile, because the patients with MO were taking lipid-lowering drugs.

Then, our cohort of women with MO was subclassified based on their hepatic histology: first as normal liver (NL, $n = 22$) and NAFLD ($n = 36$) histology; second, the patients were sub-classified into NL, SS ($n = 21$), and NASH ($n = 15$) groups.

Table 1. Anthropometric and biochemical variables of the study cohort classified according to their BMI and histopathological characteristics.

Variables	NW (n = 26)	MO (n = 58)	NL (n = 22)	SS (n = 21)	NASH (n = 15)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Age (years)	49.91 \pm 9.47	45.08 \pm 10.85	42.73 \pm 10.01	45.45 \pm 12.42	48.00 \pm 9.52
WC (cm ²)	NA	125.10 \pm 11.71	124.08 \pm 6.69	130.07 \pm 12.39	120.42 \pm 13.66
Cholesterol (mg/dl)	180.74 \pm 14.27	170.41 \pm 35.59	168.20 \pm 36.25	171.56 \pm 31.60	171.30 \pm 8.62
LDL-C (mg/dL)	95.60 \pm 28.18	136.34 \pm 74.74	106.40 \pm 36.21	99.78 \pm 25.00	95.88 \pm 30.27
ALP (U/L)	54.78 \pm 4.90 *	67.84 \pm 14.22	63.54 \pm 11.54 §	75.72 \pm 13.76 *	61.23 \pm 12.76
	Med (25th–75th)	Med (25th–75th)	Med (25th–75th)	Med (25th–75th)	Med (25th–75th)
Weight (kg)	58.00	116.40	117.50	116.80	113.50
	(52.75–60.38) *	(108.00–130.10)	(110.25–132.00)	(110.00–130.20)	(104.00–124.00)
BMI (kg/m ²)	21.63	43.90	43.30	44.59	44.95
	(20.07–24.04) *	(40.89–46.85)	(40.89–47.53)	(40.84–46.81)	(41.14–48.83)
Glucose (mg/dL)	80.00	92.00	85.50	102.00	99.00

	(73.00–85.00) *	(80.50–107.00)	(76.75–93.00) §	(83.00–153.00)	(83.00–106.00)
Insulin (mUI/L)	5.66 (4.94–7.89) *	9.42 (5.54–15.80)	9.43 (4.04–17.63)	9.80 (6.94–15.75)	6.57 (5.09–17.48)
HOMA2-IR	0.72 (0.62–1.01) *	1.19 (0.71–2.27)	1.23 (0.46–2.27)	1.32 (0.93–2.28)	0.86 (0.61–2.42)
HbA1c (%)	5.40 (5.20–5.70)	5.60 (5.30–5.98)	5.40 (5.30–5.70)	5.60 (5.30–6.10)	5.60 (5.20–6.33)
HDL-C (mg/dL)	68.00 (59.00–81.00) *	38.50 (33.00–47.00)	39.00 (32.00–46.00)	45.00 (33.75–47.50)	38.00 (33.50–48.50)
TG (mg/dL)	62.00 (49.00–71.00) *	123.00 (86.00–166.00)	105.00 (86.00–141.00)	128.00 (82.25–186.25)	128.00 (83.75–187.50)
AST (U/L)	17.00 (14.00–22.00) *	23.00 (17.00–37.00)	20.00 (16.00–31.50)	27.00 (20.00–43.00)	30.00 (17.00–44.00)
ALT (U/L)	16.00 (12.00–20.00) *	28.50 (18.00–35.00)	21.00 (15.50–30.00) §	32.50 (24.25–35.75)	33.00 (16.00–30.50)
GGT (U/L)	13.00 (11.00–17.00) *	22.00 (16.00–31.00)	21.00 (16.00–29.00)	22.00 (16.25–31.75)	26.00 (12.50–30.50)
SBP (mmHg)	120.00 (109.00–122.00)	118.00 (107.00–133.00)	122.50 (99.25–132.75)	121.00 (110.00–140.00)	115.00 (101.50–125.25)
DBP (mmHg)	65.00 (65.00–66.00)	66.00 (59.00–75.50)	70.50 (56.75–79.50)	62.00 (59.00–77.00)	66.00 (59.00–71.50)
RBC (10 ¹² /L)	4.22 (4.09–4.45)	4.26 (3.94–4.45)	4.19 (3.89–4.43)	4.20 (3.91–4.41)	4.24 (3.93–4.49)
WBC (10 ⁹ /L)	6.00 (5.24–7.00) *	7.55 (6.17–9.12)	6.13 (5.55–9.03)	7.57 (6.38–9.37)	7.17 (5.90–9.07)
PLT (10 ⁹ /L)	269.00 (230.00–326.00)	255.00 (218.00–310.00)	228.00 (188.00–285.00)	256.00 (234.00–318.00)	247.50 (200.50–304.25)
HGB (g/dL)	13.00 (12.00–13.40) *	12.10 (11.00–13.00)	12.10 (11.90–12.60)	12.05 (11.30–12.77)	11.95 (10.72–13.17)
HCT (%)	37.80 (36.00–39.00) *	36.00 (32.90–38.50)	35.60 (34.20–38.00)	35.90 (33.42–37.92)	35.85 (32.42–38.90)

MO, morbid obesity; NW, normal weight; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NA, not available; BMI, body mass index; WC, waist circumference; HOMA2-IR, homeostatic model assessment method insulin resistance; HbA1c, glycosylated hemoglobin; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; ALP, alkaline phosphatase; SBP, systolic blood pressure, DBP, diastolic blood pressure; RBC, red blood cells; WBC, white blood cells; PLT, platelets; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit. Data of parametric variables are expressed as the mean \pm SD. Data of non-parametric variables are expressed as median (25th and 75th percentiles). * Significant differences between the NW controls and the group with MO ($p < 0.05$). § Significant differences between the patients with NL and SS ($p < 0.05$). # Significant differences between SS and NASH ($p < 0.05$).

In terms of age and anthropometric measurements (weight, BMI), there were no significant differences between the NL, SS, and NASH patients in the MO group. The laboratory parameters indicated that the glucose and alkaline phosphatase (ALP) levels were increased in SS women compared to NL and NASH women with MO. In the same way, alanine aminotransferase (ALT) was decreased in the NL group compared to SS women with MO. Finally, the glucose and GPT levels were significantly increased in women with NAFLD compared to NL.

3.2. Peripheral Levels of Serotonin in the Studied Cohort

We analyzed the serum levels of 5-HT in both the NW controls and subjects with MO. We found that the peripheral 5-HT was reduced in women with MO compared to women with NW ($p =$

0.001, Figure 2). When we analyzed the serum levels of 5-HT according to the liver histology structure (NL vs. NAFLD), there were no significant differences ($p = 0.700$).

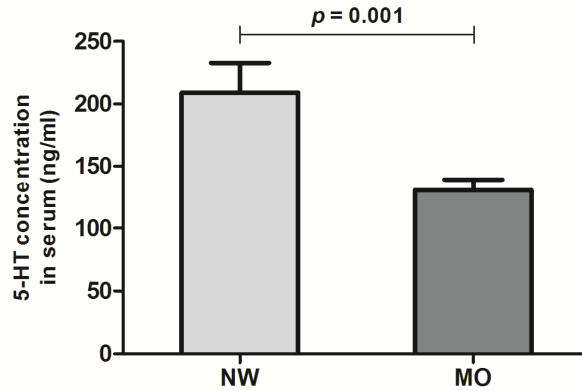


Figure 2. Serum levels of 5-HT in women with normal weight (NW) and women with morbid obesity (MO). $p < 0.05$ is considered statistically significant.

3.3. Correlations of Serum Levels of Serotonin with Metabolic Syndrome Presence

Given that the peripheral 5-HT levels have been related to obesity and T2DM, we analyzed the association between the peripheral levels of 5-HT and the presence of metabolic syndrome in our cohort. Metabolic syndrome presence was defined according to the Alberti et al. criteria described elsewhere [40]. We observed a negative correlation between them ($\rho = -0.334$, $p = 0.003$). In this regard, the peripheral 5-HT levels correlated positively with the levels of HDL-C ($\rho = 0.271$, $p = 0.028$) and negatively with triglycerides ($\rho = -0.251$, $p = 0.04$). Unfortunately, we did not find any correlation between the serum levels of 5-HT and fasting glucose, systolic blood pressure (SBP), nor waist circumference (WC) (data not shown).

3.4. Evaluation of HTR2A, HTR2B, and HTR3 mRNA Levels in Liver and HTR3 and HTR4 in Jejunum According to Liver Histology

In the studied population of women with MO, we analyzed the relative abundance of HTR2A, HTR2B, and HTR3 mRNA in the liver. Our results showed that NAFLD women had decreased mRNA relative levels of HTR2A and HTR2B compared to the NL control group (Figure 3a,b).

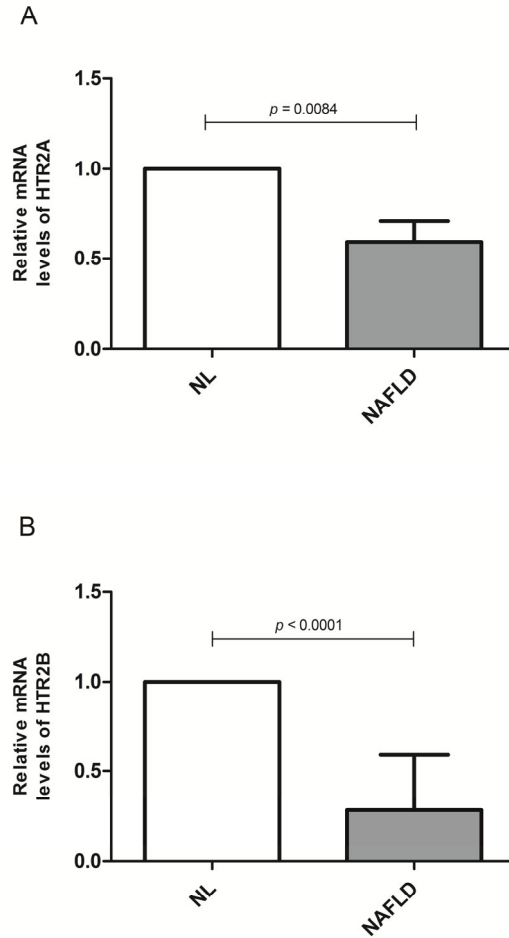


Figure 3. (A) Differential relative mRNA levels of HTR2A and (B) relative mRNA levels of HTR2B between women with MO with NL histology and women with MO with NAFLD. Relative mRNA abundance was expressed as the fold-change in NAFLD vs. control ($2^{-\Delta Ct_{NAFLD}}/2^{-\Delta Ct_{NL}}$). NL; normal liver; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Finally, we sub-classify our cohort into NL, SS, and NASH groups. We found that the HTR2A relative levels of mRNA were lower in SS compared to NL (Figure 4a). We have not found significant differences between the NL and NASH groups ($p = 0.0625$) because we had to remove some outliers in the NASH group using the Tukey correction test. The cohort obtained in the NASH group was too much small to compare with. On the other hand, the relative mRNA levels of HTR2B were significantly decreased in women with SS or NASH compared to the control group (Figure 4b).

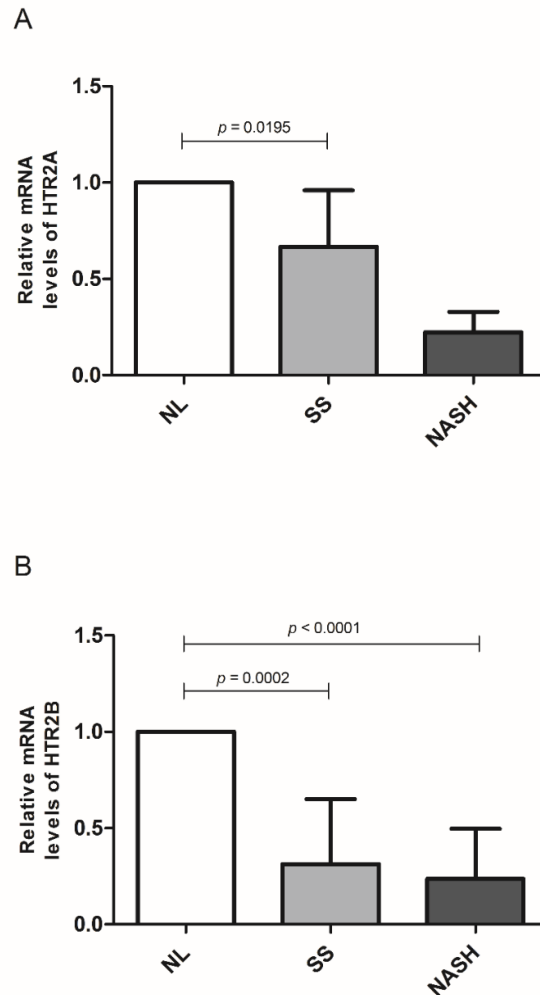


Figure 4. (A) Differential relative mRNA levels of HTR2A and (B) relative mRNA levels of HTR2B between women with SS or NASH compared to the NL control group. Relative mRNA abundance was expressed as the fold-change SS or NASH groups vs. the control group ($2^{-\Delta\text{Ct SS or NASH}}/2^{-\Delta\text{Ct NL}}$). NL; normal liver; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; SS, simple steatosis. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

To add new information about the role that plays intestinal receptors (HTR3 and HTR4) in the pathogenesis of NAFLD, we studied their jejunal mRNA abundance according to the liver histology. There were no significant differences in the relative mRNA levels of HTR3 and HTR4 according to the liver histology in women with MO (data not shown).

3.5. Correlations of Liver Expression of HTR2A, HTR2B, and HTR3 and Jejunal Expression of HTR3 and HTR4 with Serum 5-HT Levels and Metabolic Syndrome Presence

We could not find any correlation between the liver HTR2A, HTR2B, and HTR3 expression and the jejunal expression of HTR3 and HTR4 with the peripheral 5-HT levels (data not shown).

No correlation was found between the liver expression of HTR2A, HTR2B, and HTR3 and the jejunal expression of HTR3 and HTR4 with metabolic syndrome presence (data not shown).

3.6. Correlations of Peripheral Levels of Serotonin with Inflammatory Cytokines

As the circulating levels of some pro-inflammatory cytokines seems to be directly related to NAFLD [41–45], we studied the correlation between the serum levels of serotonin with the cytokine

circulating levels. The serum 5-HT levels correlated negatively with the levels of interleukin (IL)-1 ($\rho = -0.399$, $p < 0.001$) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ($\rho = -0.287$, $p = 0.011$). However, no correlation was found between the 5-HT levels and the circulating interleukins (IL-6, IL-8, C-reactive protein (CRP), and adiponectin).

4. Discussion

The novelty of the present study lies in the fact that we analyzed the peripheral 5-HT levels in a well-characterized cohort of women with MO and NAFLD in relation to the hepatic and jejunal mRNA abundance of HTR. We found that the peripheral 5-HT levels were lower in women with MO compared to NW subjects. Moreover, a decreased expression of hepatic HTR2B was found in women with MO and NAFLD.

First, we analyzed the serotonin peripheral levels according to the presence of obesity. We found that the 5-HT levels were decreased in women with MO. Regarding the serotonin levels in obesity, the evidence described in the literature is controversial. Some studies agree with our results and reported a negative association between the serotonin levels and weight or BMI [33,46]. According to these authors, circulating serotonin interacts with leptin in the adipose tissue and increases the feeling of satiety; therefore, it is believed that serotonin has a protective role against obesity [33]. However, other studies reported that high levels of serum 5-HT are related to obesity in animal models [35,47]. These authors describe that a HFD promotes the over-expression of TPH1, which increases the circulating serotonin levels. Moreover, in humans, it has been shown that carbohydrate-rich meals and duodenal glucose infusions enhance the 5-HT release from the gut [34,48]. This serotonin reaches tissues such as the liver, adipose tissue, or the pancreas and promotes gluconeogenesis and lipogenesis, which induce obesity [49]. The controversies arising from these articles regarding obesity and the circulating levels of 5-HT could be explained for different reasons: 1) Each study was carried out using different determination methods (HPLC, ELISA, fluorometry...) [33], which creates an important variability measurement [50]. 2) It is also possible that this variation may result from differences in diet before the measurement. Studies that reported higher levels of serotonin in subjects with obesity included a study cohort that has previously been fed a carbohydrate-rich diet or has been infused with glucose [34,48]. The same occurs in animal models in which obesity has been induced with a HFD [35,47]. Conversely, our cohort is made up of women with MO who have undergone bariatric surgery and were on a VLCD during the three months prior to surgery. It has been described that serotonin decreases with a low-calorie diet [46,51]. 3) We also have to consider that other studies, unlike ours, have been carried out with a heterogeneous cohort of men and women with a different range of age or BMI [33,34,48].

Second, we observed a negative association between the serum 5-HT levels and the presence of metabolic syndrome. Accordingly, the serum 5-HT levels correlated positively with HDL-C and negatively with triglycerides. Serotonin, this multifunctional bioamine, is synthesized in EC cells that generate all of the peripheral 5-HT. 5-HT has a local role in modulating gastrointestinal motility, but gut-derived 5-HT has also been involved in the regulation of glucose homeostasis; lipid metabolism; bone density; and diseases associated with metabolic syndrome, such as obesity and T2DM [52,53], via intestinal dysbiosis [54,55].

We also analyzed the correlation between the 5-HT levels and the circulating levels of inflammatory cytokines. In this regard, our results have shown a negative correlation between the circulating 5-HT and the levels of IL-1 and TNF- α , two important pro-inflammatory cytokines. Our results were supported by evidence from Ritze et al., who described that the circulating 5-HT levels were lower in subjects with MO compared to the NW group, while inflammatory markers were increased [46]. All these findings suggest that serotonin may have a protective role in obesity.

As intestinal dysbiosis can generate altered gut-derived metabolites that have been related to NAFLD [56] and also disrupts gut homeostasis which may affect serotonin synthesis [57], we also wanted to analyze serotonin levels according to the presence of NAFLD. There is evidence that the gut-derived serotonin reaches the liver, promoting gluconeogenesis and lipogenesis, which induce hepatic steatosis [58]. However, we were unable to find any relationship between these factors.

One of the novelties of the present work is the analysis of the expression of serotonin hepatic (HTR2A, HTR2B, and HTR3) and jejunal receptors (HTR3 and HTR4) in a cohort of women with MO and NAFLD. Our findings indicated that the hepatic HTR2A and HTR2B mRNA abundance was significantly lower in women with MO and NAFLD than the control group (NL with MO). There are several studies describing the role of serotonin receptors in hepatic steatosis, but all these studies have been assessed in animal models or cell cultures. Tsuchida and Friedman reported that the hepatic stellate cells (HSCs) involved in NAFLD progression seem to be activated by serotonin [59]. It has also been seen that inhibition of HTR2A and HTR2B reduces proliferation, increases serotonin-induced apoptosis [60] and can attenuate steatosis and fibrosis [61,62]. Recently, it was shown that the inhibition of HTR2A signaling in vivo by blocking 5-HT synthesis ameliorates hepatic steatosis [28]. Furthermore, it has also been described that HTR3 antagonist can avoid pathological processes such as lipid deposition in the liver, attenuating NAFLD progression [58]. In addition, HTR2B antagonist seems to block the serotonin-mediated activation of Notch signaling and autophagy, suggesting that HTR2B could be implicated in serotonin-mediated Notch activation, promoting cell steatosis in HepG2 cells [29]. However, Sumara et al. observed that HTR2B activation by serotonin during periods of fasting appears to regulate glucose production by promoting liver gluconeogenesis and inhibits glucose uptake [25]. Moreover, Cataldo et al. showed that pharmacological prolonged HTR2B activation reduces glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells (cell line derived from a mouse insulinoma), probably due to an impaired mitochondrial activity and ATP production by mechanisms likely dependent on enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α /PPAR γ) levels [63], improving insulin-resistance and, consequently, fatty accumulation in the liver [64]. Given the previous evidence that 5-HT-derived ROS play a key role in the pathogenesis of diet-induced steatohepatitis in murine models [65], we subclassified our cohort of women with MO into NL, SS, and NASH groups, according their liver damage. Unfortunately, in the present study we did not find any relationship between the hepatic HTR expression and NASH presence.

Moreover, the jejunal HTR expression was analyzed for the first time in women with NAFLD in the present study. In a previous work of our group, we reported that the intestine–liver axis is very important in NAFLD [8]. As stated previously, intestinal dysbiosis disrupts gut homeostasis and may affect serotonin synthesis [57]. This fact could be related to liver metabolism [52] and NAFLD development [58]. Serotonergic signaling seemed to play a prominent role in the duodenal mucosa, with high expression levels of HTR3 and HTR4 [31,66]. Ritze et al. provided the first evidence of a jejunal dysregulation of neuroendocrine markers through serotonin system in humans with severe obesity [66]. According to previous studies in mice [67] and humans with obesity [66], it has been speculated that 5-HT could promote the development of metabolic syndrome consequences, such as inflammation and fatty liver disease. Despite this, in the current study there were no significant differences in the jejunal expression levels of HTR3 and HTR4 according to the presence of NAFLD.

Some limitations should be considered. Although our cohort made it possible to establish a clear relationship between women with morbid obesity and NAFLD with deregulated hepatic HTR2B expression, these results cannot be extrapolated to overweight subjects. Additionally, because sex differences have been described in metabolic disorders and NAFLD, we have performed our study including only women in order to avoid the interference of several confounding factors such as gender. Thus, the results cannot be extrapolated to men. Moreover, our study lacks a control group of patients with MO under a standard diet to determine with certainty whether the serotonin levels in obesity are influenced by diet. Other limitations of our study are that we only examined expression profiles in jejunum samples; therefore, the findings may not be representative of the entire intestinal HTR expression. The determination of peripheral 5-HT levels probably does not reflect the platelet serotonin levels.

In summary, the present work has added some evidence regarding the role of serum serotonin and its receptor signaling in NAFLD, although some controversies remain because there are not enough reports in humans. Further studies are needed to progress in clarifying the role of serotonin and HTR in NAFLD pathogenesis.

5. Conclusions

Peripheral serotonin levels are decreased in women with morbid obesity under a hypocaloric diet. The negative correlation between serotonin levels and metabolic syndrome criteria suggests a protective effect on obesity. Finally, we provide the first evidence of the dysregulation of hepatic HTR2A and HTR2B mRNA abundance in women with MO and NAFLD, which could suggest a new therapeutic target.

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

Funding: This study has been funded by 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), Grup estudi Malalties metabòliques associades a insulín resistència (2019PFR-URV-71) and a donation from the City Council of Perafort.

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

Abbreviations

ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
ATP	adenosine triphosphate
BMI	body mass index
CRP	C-reactive protein
DBP	diastolic blood pressure
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
EC	enterochromaffin cells
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGT	gamma-glutamyltransferase
GI	gastrointestinal
GLP-1	glucagon-like peptide-1
HbA1c	glycosylated hemoglobin
HCT	hematocrit
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HepG2	human hepatocellular carcinoma
HFD	high-fat diet
HGB	hemoglobin
HOMA2-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance
HPLC	high-performance liquid chromatography
HSCs	hepatic stellate cells
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
HTR2A	serotonin receptor 2A
HTR2B	serotonin receptor 2B
HTR3	serotonin receptor 3
HTR4	serotonin receptor 4
HTRx	serotonin receptor subtypes
IBS	irritable bowel syndrome
IL	interleukin

IR	insulin resistance
LDL-C	low-density lipoprotein-cholesterol
MO	morbid obesity
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NL	normal liver
NW	normal weight
PGC1 α /PPAR γ	peroxisome proliferator- activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PLT	platelets
RBC	red blood cells
ROS	reactive oxygen species
RT-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
SBP	systolic blood pressure
SERT	serotonin transporter
SS	simple steatosis
T2DM	type 2 diabetes mellitus
TG	triglycerides
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TPH1	tryptophan hydroxylase 1
VLCD	very low calorie diet
WBC	white blood cells
WC	waist circumference

References

1. Younossi, Z.; Tacke, F.; Arrese, M.; Chander Sharma, B.; Mostafa, I.; Bugianesi, E.; Wai-Sun Wong, V.; Yilmaz, Y.; George, J.; Fan, J.; et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2019**, *69*, 2672–2682, doi:10.1002/hep.30251.
2. Jung, J.Y.; Park, S.K.; Oh, C.-M.; Chung, P.-W.; Ryoo, J.-H. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Association with Depression in Korean General Population. *J. Korean Med. Sci.* **2019**, *34*, e199, doi:10.3346/jkms.2019.34.e199.
3. Lonardo, A.; Ballestri, S. Perspectives of nonalcoholic fatty liver disease research: A personal point of view. *Explor. Med.* **2020**, *1*, 85–107, doi:10.37349/emed.2020.00007.
4. Promrat, K.; Kleiner, D.E.; Niemeier, H.M.; Jackvony, E.; Kearns, M.; Wands, J.R.; Fava, J.L.; Wing, R.R. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2010**, *51*, 121–129, doi:10.1002/hep.23276.
5. Sullivan, S.; Kirk, E.P.; Mittendorfer, B.; Patterson, B.W.; Klein, S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2012**, *55*, 1738–1745, doi:10.1002/hep.25548.
6. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357, doi:10.1002/hep.29367.
7. Auguet, T.; Bertran, L.; Binetti, J.; Aguilar, C.; Martínez, S.; Sabench, F.; Lopez-Dupla, J.M.; Porras, J.A.; Riesco, D.; Del Castillo, D.; et al. Relationship between IL-8 Circulating Levels and TLR2 Hepatic Expression in Women with Morbid Obesity and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4189, doi:10.3390/ijms21114189.
8. Aragonès, G.; Colom-Pellicer, M.; Aguilar, C.; Guiu-Jurado, E.; Martínez, S.; Sabench, F.; Antonio Porras, J.; Riesco, D.; Del Castillo, D.; Richart, C.; et al. Circulating microbiota-derived metabolites: A “liquid biopsy”? *Int. J. Obes.* **2020**, *44*, 875–885, doi:10.1038/s41366-019-0430-0.
9. Yamada, S.; Guo, X.; Wang, K.-Y.; Tanimoto, A.; Sasaguri, Y. Novel function of histamine signaling via histamine receptors in cholesterol and bile acid metabolism: Histamine H₂ receptor protects against nonalcoholic fatty liver disease: Roles of HRs in cholesterol/BA metabolism. *Pathol. Int.* **2016**, *66*, 376–385, doi:10.1111/pin.12423.

10. El-Merahbi, R.; Löffler, M.; Mayer, A.; Sumara, G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 1728–1734, doi:10.1016/j.febslet.2015.05.054.
11. Berger, M.; Gray, J.A.; Roth, B.L. The Expanded Biology of Serotonin. *Annu. Rev. Med.* **2009**, *60*, 355–366, doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802.
12. Jones, L.A.; Sun, E.W.; Martin, A.M.; Keating, D.J. The ever-changing roles of serotonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *125*, 105776, doi:10.1016/j.biocel.2020.105776.
13. Gershon, M.D.; Tack, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 397–414, doi:10.1053/j.gastro.2006.11.002.
14. Hoffman, J.M.; Tyler, K.; MacEachern, S.J.; Balemba, O.B.; Johnson, A.C.; Brooks, E.M.; Zhao, H.; Swain, G.M.; Moses, P.L.; Galligan, J.J.; et al. Activation of Colonic Mucosal 5-HT₄ Receptors Accelerates Propulsive Motility and Inhibits Visceral Hypersensitivity. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 844–854, doi:10.1053/j.gastro.2011.12.041.
15. Mawe, G.M.; Hoffman, J.M. Serotonin signalling in the gut—Functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 473–486, doi:10.1038/nrgastro.2013.105.
16. Baganz, N.L.; Blakely, R.D. A Dialogue between the Immune System and Brain, Spoken in the Language of Serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 48–63, doi:10.1021/cn300186b.
17. Peroutka, S.J.; Howell, T.A. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: Focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* **1994**, *33*, 319–324, doi:10.1016/0028-3908(94)90060-4.
18. Reeves, D.C.; Lummis, S.C.R. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: A model ligand-gated ion channel (Review). *Mol. Membr. Biol.* **2002**, *19*, 11–26, doi:10.1080/09687680110110048.
19. Amireault, P.; Sibon, D.; Côté, F. Life without Peripheral Serotonin: Insights from Tryptophan Hydroxylase 1 Knockout Mice Reveal the Existence of Paracrine/Autocrine Serotonergic Networks. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 64–71, doi:10.1021/cn300154j.
20. Mercado, C.P.; Quintero, M.V.; Li, Y.; Singh, P.; Byrd, A.K.; Talabnin, K.; Ishihara, M.; Azadi, P.; Rusch, N.J.; Kuberan, B.; et al. A serotonin-induced N-glycan switch regulates platelet aggregation. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2795, doi:10.1038/srep02795.
21. Stasi, C.; Bellini, M.; Bassotti, G.; Blandizzi, C.; Milani, S. Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Tech. Coloproctol.* **2014**, *18*, 613–621, doi:10.1007/s10151-013-1106-8.
22. Ducey, P.; Karsenty, G. The two faces of serotonin in bone biology. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 7–13, doi:10.1083/jcb.201006123.
23. Crane, J.D.; Palanivel, R.; Mottillo, E.P.; Bujak, A.L.; Wang, H.; Ford, R.J.; Collins, A.; Blümer, R.M.; Fullerton, M.D.; Yabut, J.M.; et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 166–172, doi:10.1038/nm.3766.
24. Oh, C.-M.; Namkung, J.; Go, Y.; Shong, K.E.; Kim, K.; Kim, H.; Park, B.-Y.; Lee, H.W.; Jeon, Y.H.; Song, J.; et al. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6794, doi:10.1038/ncomms7794.
25. Sumara, G.; Sumara, O.; Kim, J.K.; Karsenty, G. Gut-Derived Serotonin Is a Multifunctional Determinant to Fasting Adaptation. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 588–600, doi:10.1016/j.cmet.2012.09.014.
26. Osawa, Y.; Kanamori, H.; Seki, E.; Hoshi, M.; Ohtaki, H.; Yasuda, Y.; Ito, H.; Suetsugu, A.; Nagaki, M.; Moriwaki, H.; et al. 1-Tryptophan-mediated Enhancement of Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Dependent on the Mammalian Target of Rapamycin. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 34800–34808, doi:10.1074/jbc.M111.235473.
27. Zhang, Y.; Deng, R.; Yang, X.; Xu, W.; Liu, Y.; Li, F.; Zhang, J.; Tang, H.; Ji, X.; Bi, Y.; et al. Glucose potentiates β -cell function by inducing *Tphl* expression in rat islets. *FASEB J.* **2017**, *31*, 5342–5355, doi:10.1096/fj.201700351R.
28. Choi, W.; Namkung, J.; Hwang, I.; Kim, H.; Lim, A.; Park, H.J.; Lee, H.W.; Han, K.-H.; Park, S.; Jeong, J.-S.; et al. Serotonin signals through a gut-liver axis to regulate hepatic steatosis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4824, doi:10.1038/s41467-018-07287-7.
29. Niture, S.; Gyamfi, M.A.; Kadir, H.; Arthur, E.; Ransom, H.; Deep, G.; Kumar, D. Serotonin induced hepatic steatosis is associated with modulation of autophagy and notch signaling pathway. *Cell Commun. Signal.* **2018**, *16*, 78, doi:10.1186/s12964-018-0282-6.

30. Fu, J.; Li, C.; Zhang, G.; Tong, X.; Zhang, H.; Ding, J.; Ma, Y.; Cheng, R.; Hou, S.; An, S.; et al. Crucial Roles of 5-HT and 5-HT₂ Receptor in Diabetes-Related Lipid Accumulation and Pro-Inflammatory Cytokine Generation in Hepatocytes. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 2409–2428, doi:10.1159/000492656.
31. Van lelyveld, N.; Ter Linde, J.; Schipper, M.E.; Samsom, M. Regional differences in expression of TPH-1, SERT, 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in the human stomach and duodenum. *Neurogastroenterol. Motil.* **2007**, *19*, 342–348, doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00891.x.
32. Aikiyo, S.; Kishi, K.; Kaji, N.; Mikawa, S.; Kondo, M.; Shimada, S.; Hori, M. Contribution of Serotonin 3A Receptor to Motor Function and Its Expression in the Gastrointestinal Tract. *Digestion* **2020**, *2020*, 1–11, doi:10.1159/000509209.
33. Hodge, S.; Bunting, B.P.; Carr, E.; Strain, J.J.; Stewart-Knox, B.J.; Obesity, Whole Blood Serotonin and Sex Differences in Healthy Volunteers. *Obes. Facts* **2012**, *5*, 399–407, doi:10.1159/000339981.
34. Young, R.L.; Lumsden, A.L.; Martin, A.M.; Schober, G.; Pezos, N.; Thazhath, S.S.; Isaacs, N.J.; Cvijanovic, N.; Sun, E.W.L.; Wu, T.; et al. Augmented capacity for peripheral serotonin release in human obesity. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 1880–1889, doi:10.1038/s41366-018-0047-8.
35. Kim, H.-J.; Kim, J.H.; Noh, S.; Hur, H.J.; Sung, M.J.; Hwang, J.-T.; Park, J.H.; Yang, H.J.; Kim, M.-S.; Kwon, D.Y.; et al. Metabolomic Analysis of Livers and Serum from High-Fat Diet Induced Obese Mice. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 722–731, doi:10.1021/pr100892r.
36. Mustajoki, P.; Pekkarinen, T. Very low energy diets in the treatment of obesity. *Obes. Rev.* **2001**, *2*, 61–72, doi:10.1046/j.1467-789x.2001.00026.x.
37. Mauvais-Jarvis, F.; Bairey Merz, N.; Barnes, P.J.; Brinton, R.D.; Carrero, J.-J.; DeMeo, D.L.; De Vries, G.J.; Epperson, C.N.; Govindan, R.; Klein, S.L.; et al. Sex and gender: Modifiers of health, disease, and medicine. *Lancet* **2020**, *396*, 565–582, doi:10.1016/S0140-6736(20)31561-0.
38. Lonardo, A.; Suzuki, A. Sexual Dimorphism of NAFLD in Adults. Focus on Clinical Aspects and Implications for Practice and Translational Research. *JCM* **2020**, *9*, 1278, doi:10.3390/jcm9051278.
39. 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, doi:10.1002/hep.20701.
40. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.-C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith, S.C. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
41. Jamali, R.; Razavizade, M.; Arj, A.; Aarabi, M.H. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease. *WJG* **2016**, *22*, 5096, doi:10.3748/wjg.v22.i21.5096.
42. Ajmera, V.; Perito, E.R.; Bass, N.M.; Terrault, N.A.; Yates, K.P.; Gill, R.; Loomba, R.; Diehl, A.M.; Aouizerat, B.E.; NASH Clinical Research Network. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2017**, *65*, 65–77, doi:10.1002/hep.28776.
43. Wada, N.; Takaki, A.; Ikeda, F.; Yasunaka, T.; Onji, M.; Nouse, K.; Nakatsuka, A.; Wada, J.; Koike, K.; Miyahara, K.; et al. Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Int.* **2017**, *11*, 115–124, doi:10.1007/s12072-016-9773-y.
44. Uysal, S.; Armutcu, F.; Aydogan, T.; Akin, K.; Iktek, M.; Yigitoglu, M.R. Some inflammatory cytokine levels, iron metabolism and oxidant stress markers in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Biochem.* **2011**, *44*, 1375–1379, doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.09.017.
45. Kumar, R.; Prakash, S.; Chhabra, S.; Singla, V.; Madan, K.; Gupta, S.D.; Panda, S.K.; Khanal, S.; Acharya, S.K. Association of pro-inflammatory cytokines, adipokines & oxidative. *Indian, J. Med. Res.* **2012**, *136*, 229.
46. Ritze, Y.; Schollenberger, A.; Hamze Sinno, M.; Bühler, N.; Böhle, M.; Bárdos, G.; Sauer, H.; Mack, I.; Enck, P.; Zipfel, S.; et al. Gastric ghrelin, GOAT, leptin, and leptinR expression as well as peripheral serotonin are dysregulated in humans with obesity. *Neurogastroenterol. Motil.* **2016**, *28*, 806–815, doi:10.1111/nmo.12773.
47. Bertrand, R.L.; Senadheera, S.; Markus, I.; Liu, L.; Howitt, L.; Chen, H.; Murphy, T.V.; Sandow, S.L.; Bertrand, P.P. A Western Diet Increases Serotonin Availability in Rat Small Intestine. *Endocrinology* **2011**, *152*, 36–47, doi:10.1210/en.2010-0377.

48. Blum, I.; Vered, Y.; Graff, E.; Grosskopf, Y.; Don, R.; Harsat, A.; Raz, O. The influence of meal composition on plasma serotonin and norepinephrine concentrations. *Metabolism* **1992**, *41*, 137–140, doi:10.1016/0026-0495(92)90141-V.
49. Watanabe, H.; Nakano, T.; Saito, R.; Akasaka, D.; Saito, K.; Ogasawara, H.; Minashima, T.; Miyazawa, K.; Kanaya, T.; Takakura, I.; et al. Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147143, doi:10.1371/journal.pone.0147143.
50. Brand, T.; Anderson, G.M. The Measurement of Platelet-Poor Plasma Serotonin: A Systematic Review of Prior Reports and Recommendations for Improved Analysis. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 1376–1386, doi:10.1373/clinchem.2011.163824.
51. Strasser, B.; Fuchs, D. Diet versus Exercise in Weight Loss and Maintenance: Focus on Tryptophan. *Int. J. Tryptophan Res.* **2016**, *9*, IJTR-S33385, doi:10.4137/IJTR.S33385.
52. Young, R.L.; Lumsden, A.L.; Keating, D.J. Gut Serotonin Is a Regulator of Obesity and Metabolism. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 253–255, doi:10.1053/j.gastro.2015.05.020.
53. Martin, A.M.; Young, R.L.; Leong, L.; Rogers, G.B.; Spencer, N.J.; Jessup, C.F.; Keating, D.J. The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin. *Endocrinology* **2017**, *158*, 1049–1063, doi:10.1210/en.2016-1839.
54. Yano, J.M.; Yu, K.; Donaldson, G.P.; Shastri, G.G.; Ann, P.; Ma, L.; Nagler, C.R.; Ismagilov, R.F.; Mazmanian, S.K.; Hsiao, E.Y. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* **2015**, *161*, 264–276, doi:10.1016/j.cell.2015.02.047.
55. Ge, X.; Pan, J.; Liu, Y.; Wang, H.; Zhou, W.; Wang, X. Intestinal Crosstalk between Microbiota and Serotonin and its Impact on Gut Motility. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 190–195, doi:10.2174/1389201019666180528094202.
56. Cuevas-Sierra, A.; Ramos-Lopez, O.; Riezu-Boj, J.I.; Milagro, F.I.; Martinez, J.A.; Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, S17–S30, doi:10.1093/advances/nmy078.
57. Banskota, S.; Ghia, J.-E.; Khan, W.I. Serotonin in the gut: Blessing or a curse. *Biochimie* **2019**, *161*, 56–64, doi:10.1016/j.biochi.2018.06.008.
58. Haub, S.; Ritze, Y.; Ladel, I.; Saum, K.; Hubert, A.; Spruss, A.; Trautwein, C.; Bischoff, S.C. Serotonin Receptor Type 3 Antagonists Improve Obesity-Associated Fatty Liver Disease in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *339*, 790–798, doi:10.1124/jpet.111.181834.
59. Tsuchida, T.; Friedman, S.L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 397–411, doi:10.1038/nrgastro.2017.38.
60. Ruddell, R.G.; Oakley, F.; Hussain, Z.; Yeung, I.; Bryan-Lluka, L.J.; Ramm, G.A.; Mann, D.A. A Role for Serotonin (5-HT) in Hepatic Stellate Cell Function and Liver Fibrosis. *Am. J. Pathol.* **2006**, *169*, 861–876, doi:10.2353/ajpath.2006.050767.
61. Kim, D.C.; Jun, D.W.; Kwon, Y.I.; Lee, K.N.; Lee, H.L.; Lee, O.Y.; Yoon, B.C.; Choi, H.S.; Kim, E.K. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit hepatic stellate cell activation and facilitate apoptosis. *Liver Int.* **2013**, *33*, 535–543, doi:10.1111/liv.12110.
62. Ebrahimkhani, M.R.; Oakley, F.; Murphy, L.B.; Mann, J.; Moles, A.; Perugorria, M.J.; Ellis, E.; Lakey, A.F.; Burt, A.D.; Douglass, A.; et al. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT_{2B} receptor in chronic liver disease. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1668–1673, doi:10.1038/nm.2490.
63. Cataldo, L.R.; Mizgier, M.L.; Bravo Sagua, R.; Jaña, F.; Cárdenas, C.; Llanos, P.; Busso, D.; Olmos, P.; Galgani, J.E.; Santos, J.L.; et al. Prolonged Activation of the Htr2b Serotonin Receptor Impairs Glucose Stimulated Insulin Secretion and Mitochondrial Function in MIN6 Cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170213, doi:10.1371/journal.pone.0170213.
64. Besseiche, A.; Riveline, J.-P.; Gautier, J.-F.; Bréant, B.; Blondeau, B. Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* **2015**, *41*, 347–357, doi:10.1016/j.diabet.2015.02.002.
65. Nocito, A.; Dahm, F.; Jochum, W.; Jang, J.H.; Georgiev, P.; Bader, M.; Renner, E.L.; Clavien, P. Serotonin Mediates Oxidative Stress and Mitochondrial Toxicity in a Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 608–618, doi:10.1053/j.gastro.2007.05.019.

66. Ritze, Y.; Hengelhaupt, C.; Bárdos, G.; Ernst, B.; Thurnheer, M.; D'Haese, J.G.; Bischoff, S.C.; Schultes, B. Altered intestinal neuroendocrine gene expression in humans with obesity: Neuroendocrine Genes Are Altered in Obesity. *Obesity* **2015**, *23*, 2278–2285, doi:10.1002/oby.21253.
67. Ritze, Y.; Bárdos, G.; Hubert, A.; Böhle, M.; Bischoff, S.C. Effect of tryptophan supplementation on diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1–7, doi:10.1017/S0007114514000440.

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



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).