



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Papel de la lipotoxicidad mediada por ácidos grasos libres en la génesis de la disfunción mitocondrial hepática y sus consecuencias cardiovasculares.

Alba González Estévez

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43209455E

Treball tutelat per Francisco García Palmer
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Lipotoxicidad, hígado graso, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, resistencia a la insulina, consecuencias cardiovasculares.

ÍNDICE

Resumen	4
1. Introducción	5
2. Metodología	8
3. Etapas de la enfermedad	8
3.1. Esteatosis simple	9
3.2. Esteatohepatitis	9
3.3. Fibrosis y cirrosis	9
3.4. Carcinoma hepatocelular	10
4. Mecanismos mitocondriales en el manejo de lípidos en el hepatocito	10
4.1. Fuentes de ácidos grasos en el hígado	11
4.2. Oxidación de ácidos grasos	12
4.3. Papel del tejido adiposo: adipoquinas	12
4.4. Microbiota intestinal	13
5. Disfunción mitocondrial hepática mediada por ácidos grasos	14
5.1. Hipótesis	14
5.2. Factores que provocan disfunción mitocondrial	15
6. Consecuencias cardiovasculares	21
7. Tratamientos	23
8. Discusión	26
9. Conclusión	28
10. Bibliografía	28

RESUMEN

El hígado es un órgano multifuncional y clave en el metabolismo de todo el organismo. La acumulación de lípidos en su interior produce la disfunción de las células hepáticas y la activación de vías inflamatorias, así como de muerte celular, fenómeno conocido como lipotoxicidad y estrechamente relacionado con la disfunción mitocondrial.

Cuando el origen de la lipotoxicidad no es alcohólico, recibe el nombre de esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y comprende una serie de enfermedades de distinta gravedad, las cuales pueden darse de forma secuencial conforme avanza la lesión en las células hepáticas. La prevalencia es de aproximadamente un 45% en la población mundial y se espera que siga creciendo como consecuencia del ritmo de vida actual.

Cada vez existen más evidencias que relacionan NAFLD con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Estas alteraciones se han visto vinculadas a la disfunción mitocondrial hepática provocada por factores como el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina y estrés en el RE, donde juegan un papel importante las adipoquinas, hepatoquinas y la microbiota intestinal. Las principales alteraciones cardiovasculares vinculadas son la disfunción endotelial y el desarrollo de aterosclerosis, debido a modificaciones producidas en el metabolismo de los ácidos grasos.

El tratamiento específico para esta enfermedad aún se desconoce. Actualmente, está enfocado al tratamiento de los factores de riesgo asociados, como la obesidad o la resistencia a la insulina. No obstante, se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos cuyos resultados parecen ser prometedores.

Abreviaturas

¹H-MRS ¹ H-Magnetic Resonance Spectroscopy	HDL High density lipoprotein	PERK Protein kinase RNA-activated (PKR)-like ER kinase
ADIPOR2 Adiponectin receptor 2	HPCs Hepatic progenitor cells	PI3K Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
ALT Alanina transaminasa	HSC Hepatic stellate cell	PKB/Akt Protein kinase B
AMP Adenosine monophosphate	IL Interleukin	PKCε Proteína quinasa Cε
AMPK Adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase	IRE1 Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease	PNPLA3 Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
AST Aspartato aminotransferasa	IRS Insuline-Receptor substrate	PPARs Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
ATF-6 Activating Transcription Factor 6	LDL Low density lipoprotein	RAAS Renin-angiotensin system
ATP Adenosine Triphosphate	LXR Liver X Receptor	RE Retículo endoplasmático
CPT-1 Carnitina-palmitoiltransferasa	MCP Proteína quimiotáctica de monocitos	RI Resistencia a la insulina
DAG Diacilglicerol	MRI Magnetic Resonance Imaging	ROS Reactive oxygen species
DM2 Diabetes mellitus tipo 2	NADH Nicotinamide adenine dinucleotide	SOD Superoxide dismutase
EPCs Endothelial progenitor cells	NAFLD Nonalcoholic Fatty Liver Disease	SREBP Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
ERAD Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation	NASH Non-alcoholic Steatohepatitis	TNF-α Tumor necrosis factor alpha
FADH₂ Flavin adenine dinucleotide	NEFA Non-esterified fatty acid	TZD Tiazolidinedionas
FGF-21 Fibroblast growth factor 21	NF-κβ Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	UPR Unfolded protein response
FXR Farnesoid X receptor	OCA Ácido obeticólico	VLDL Very low density lipoprotein
GGT Gamma Glutamyl transpeptidasa	PAI-1 Plasminogen activator inhibitor-1	
GLUT4 Glucose transporter type 4		
GSK3 Glycogen Synthase Kinase-3		

1. INTRODUCCIÓN

Los cambios sociales y nutricionales que han tenido lugar en las últimas décadas han provocado una disminución de los correctos hábitos alimenticios, provocados en gran parte por la globalización, la industrialización de la alimentación, el estrés y la dedicación de un menor número de horas al descanso, ocasionando un aumento en el consumo de alimentos de elevado valor energético y por tanto, de alto contenido lipídico. Por otro lado, la creciente urbanización, la creación de puestos de trabajo de carácter sedentario o los nuevos métodos de transporte conducen a la población a reducir las horas dedicadas al ejercicio físico (Krzysztozek et al., 2015).

Como consecuencia de todo ello, se produce un desequilibrio energético que conduce a la aparición de depósitos de grasa ectópicos, como lo es la acumulación de lípidos en el hígado (Schrauwen et al., 2010). El hígado posee una amplia variedad de funciones entre las que se encuentra la detoxificación, la producción de hormonas y la síntesis de proteínas plasmáticas. Además, uno de sus cometidos principales es el metabolismo lipídico ya que es capaz de sintetizar colesterol, apoproteína B100 y llevar a cabo la lipogénesis *de novo*. Así mismo, realiza otras funciones como el almacenamiento de glucógeno, vitaminas solubles, hierro y cobre. Sin embargo, no está diseñado para el almacenamiento de lípidos (Scorletti and Byrne, 2013). La conexión que existe entre el hígado y el tejido adiposo hace posible que los triglicéridos sintetizados por los hepatocitos puedan almacenarse en los adipocitos sin presentar ningún tipo de toxicidad (Figura 1). El tráfico de triglicéridos desde el hígado hacia el tejido adiposo y el flujo de ácidos grasos del tejido adiposo hacia el hígado se encuentran regulados hormonalmente por la insulina y el glucagón respectivamente (Voet and Voet, 2006).

Cuando existe una acumulación de triglicéridos en el hígado tiene lugar lo que se conoce como esteatosis o hígado graso. Dicho almacenamiento ocupa al menos un 5% de los hepatocitos y excede entre un 5% y un 10% el peso total del hígado (Wei et al., 2008). Este acontecimiento puede ocasionar la activación de vías inflamatorias y de muerte celular (Zambo et al., 2013), fenómeno conocido como lipotoxicidad y frecuentemente relacionado con la disfunción mitocondrial (Schrauwen et al., 2010).

El origen de la esteatosis hepática puede ser alcohólico cuando la ingesta de alcohol ha sido elevada durante un periodo de tiempo, y puede darse a pesar de haber seguido unas prácticas alimentarias saludables. Sin embargo, también puede tener un origen no alcohólico, lo que se conoce como esteatosis hepática no alcohólica o NAFLD y en la que se centrará el presente trabajo. Se diagnostica en pacientes que no presentan hábitos alcohólicos en su historial médico (Grattagliano et al., 2012) y que padecen normalmente algunas de las alteraciones que engloba el síndrome metabólico, como son la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o hipertensión, ya que se considera que la esteatosis hepática no alcohólica es la manifestación en el hígado del síndrome metabólico (Neuman et al., 2014).

La prevalencia de NAFLD muestra diferencias geográficas, en Europa se sitúa entre un 14-27% y durante los últimos años se ha observado un incremento en los adolescentes y en población de la tercera edad (Weiss et al., 2014). En Estados Unidos la prevalencia es de alrededor del 20-35% y se espera que continúe creciendo. Mientras que en China se sitúa alrededor del 15%, dato que se ha duplicado durante los últimos veinte años (Fan, 2013; Wei et al., 2008).

Por otra parte, se ha observado una mayor prevalencia en la población masculina respecto a la población femenina con un 42% y 24%, respectivamente (Browning et al., 2004). Del mismo modo, existen diferencias entre la población hispánica, la población blanca y la población afroamericana. Este último dato, respalda la hipótesis basada en la existencia de un factor genético que aumenta la predisposición a padecer NAFLD (Wei et al., 2008).

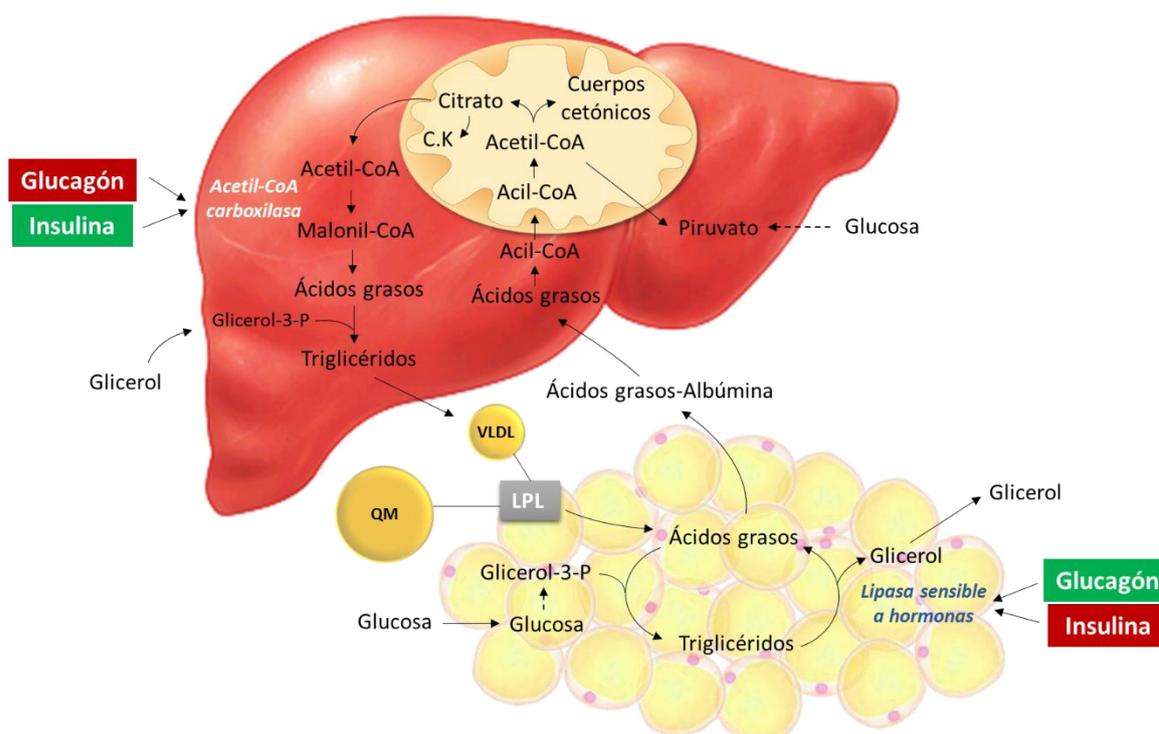


Figura 1. Conexión del metabolismo lipídico entre el hepatocito y el adipocito y su regulación hormonal. El color verde indica estimulación y el color rojo represión.

En estudios llevados a cabo con pacientes que padecen alteraciones metabólicas, se ha demostrado que la obesidad supone un factor de riesgo relevante ya que en sujetos obesos la prevalencia aumenta hasta un 57%, mientras que en personas con obesidad mórbida hasta un 90%. De la misma forma que se encuentra elevada hasta un 70% en pacientes que padecen DM2 (Gaggini et al., 2013).

A pesar de todos estos datos, la prevalencia real de NAFLD se desconoce al tratarse de una enfermedad asintomática en la mayoría de los casos, no obstante, se estima que se encuentra alrededor de un 45% en la población mundial (Karbasi-Afshar et al., 2014).

La esteatosis hepática no alcohólica engloba una serie de alteraciones en el hígado que se caracterizan por presentar distintos niveles de gravedad. La primera fase consiste en el desarrollo de una esteatosis simple, que puede evolucionar a una esteatohepatitis o NASH relacionada con lesión celular y procesos inflamatorios pudiendo conducir a una fibrosis, cirrosis y finalmente, carcinoma hepatocelular (Figura 2) que supone el estadio más grave de este grupo de enfermedades (Gaggini et al., 2013).

Diversos procesos se han vinculado a un incremento del riesgo cardiovascular en pacientes con NAFLD, como es el aumento de la lipólisis y secreción de VLDL, aumento de LDL y disminución de HDL en

plasma. Por otro lado, tiene lugar una sobreproducción de glucosa y factores proinflamatorios. El conjunto de todos estos procesos contribuye al desarrollo de aterosclerosis, disfunción endotelial y a la estimulación de vías que conducen a promover la obesidad y la diabetes (Gaggini et al., 2013), ya considerados factores de riesgo, por lo que se forma un ciclo que agrava la situación del paciente si no se establece un tratamiento.

La esteatosis hepática no alcohólica es una enfermedad en la que la mayoría de los pacientes no muestran síntomas, sin embargo, puede sospecharse al encontrar niveles elevados de enzimas hepáticas (ALT, AST y GGT) y la existencia de factores de riesgo (Dyson et al., 2014). No obstante, hay que tener en cuenta que alrededor de un 80% de los casos no presentan dichas alteraciones clínicas (Manousou et al., 2011).

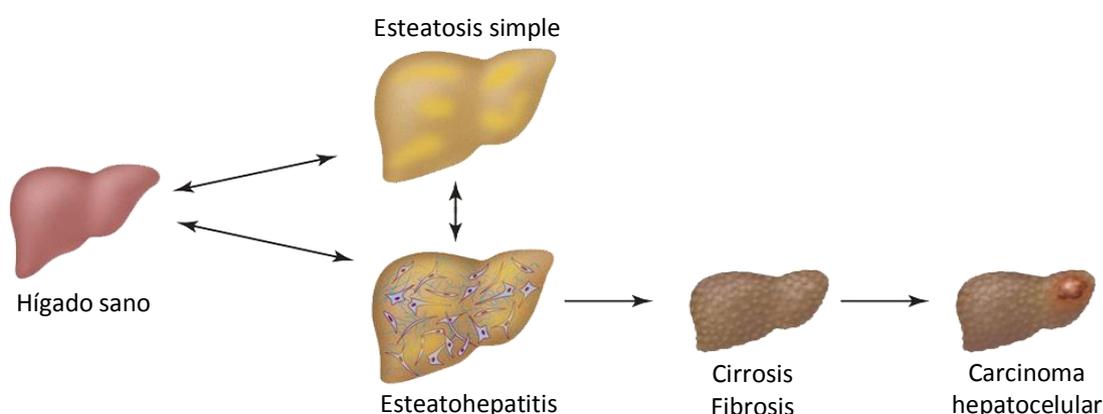


Figura 2. Evolución de NAFLD. El hígado sano puede evolucionar a esteatosis simple y esteatohepatitis siendo ambas etapas reversibles. Una vez que se alcanza un estado de cirrosis, el daño hepático ya es irreversible y puede evolucionar a carcinoma hepatocelular.

El siguiente paso para el diagnóstico de NAFLD es la ultrasonografía, prueba que aporta información cuantitativa del grado de acumulación lipídica en el hígado y realmente fiable cuando la esteatosis se produce en más del 33% de los hepatocitos. Otras técnicas precisas de diagnóstico son las resonancias magnéticas de imagen y de protón (MRI y ^1H -MRS) representando los mejores métodos no invasivos (Schwenzer et al., 2009).

Finalmente, el diagnóstico definitivo e inequívoco de la enfermedad se realiza mediante una biopsia del hígado. Esta prueba permite determinar el nivel de lesión que presenta el órgano y es el único método que permite diferenciar entre esteatosis hepática alcohólica y no alcohólica (Dyson et al., 2014). Los resultados de la biopsia se elaboran a partir de la evaluación del grado de esteatosis, aumento del tamaño del hepatocito, el nivel de inflamación y el nivel de fibrosis, obteniéndose una puntuación según el nivel de evolución que presente cada proceso. Cuando la puntuación obtenida es mayor de 5 el diagnóstico es NAFLD (Bedossa et al., 2012).

Una vez diagnosticada la enfermedad, se necesita establecer un tratamiento de manera que se frenen o disminuyan las lesiones producidas en el organismo. El primer paso se trata de la adopción de hábitos saludables, como la práctica de ejercicio físico y el seguimiento de una dieta basada en la restricción calórica (Dyson and Day, 2014). El siguiente paso, es el tratamiento farmacológico de las enfermedades asociadas, donde se ha visto que juegan un papel importante los sensibilizadores de insulina como la

metformina y las tiazolidinedionas (TZD). Estos fármacos intervienen en la regulación del metabolismo glucídico y lipídico o actúan sobre vías relacionadas con la sensibilidad a la insulina. Otro tratamiento son los bloqueadores de los receptores de angiotensina II capaces de disminuir la esteatosis, la resistencia a la insulina (RI) o el estrés oxidativo (Paschos and Tziomalos, 2012; Yang et al., 2009).

El objetivo del presente trabajo es la realización de una búsqueda bibliográfica sobre el estado del conocimiento en relación a la lipotoxicidad en el hígado, los mecanismos moleculares que tienen lugar y sus consecuencias cardiovasculares. Finalmente, se lleva a cabo una revisión y propuesta de tratamientos.

2. METODOLOGÍA

En primer lugar, para llevar a cabo una búsqueda bibliográfica sobre el conocimiento actual se utilizó la base de datos del US National Library of Medicine, Pubmed. Al tratarse de la primera búsqueda se utilizaron las palabras clave "*dysfunction mitochondria liver*", se restringió el límite de antigüedad de los resultados al año 2010, encontrándose alrededor de 95 resultados.

A partir de aquí y después de la lectura de algunos artículos se realizó una segunda búsqueda utilizando las palabras clave "*nonalcoholic fatty liver disease mitochondria*", restringiendo los resultados de la misma forma y añadiendo como filtro la especie humana, obteniéndose alrededor de 40 resultados, de los que se escogieron aquellos que pudiesen proporcionar una mayor información conceptual y generalizada del tema.

Por otro lado, se realizaron una serie de búsquedas haciendo uso de las mismas palabras clave, y empleando otras como "*lipotoxicity mitochondria*" en la base de datos ScienceDirect. Filtrándose de forma similar los resultados, restringiendo esta vez la búsqueda únicamente en revistas y libros. Se obtuvieron alrededor de 100 resultados, de los que se escogieron los de mayor interés.

Las siguientes búsquedas se basaron en la investigación de puntos concretos para la realización del trabajo usando como palabras clave "*prevalence of NAFLD*", "*therapies NAFLD*", "*diagnosis fatty liver*", etc., utilizando las bases de datos nombradas anteriormente y filtros similares.

Cabe mencionar, que a partir de la bibliografía aportada por cada uno de los artículos escogidos, se hizo posible la búsqueda específica de otros que pudieran aportar información más detallada para la realización de cada uno de los puntos desarrollados en el trabajo.

3. ETAPAS DE LA ENFERMEDAD

Como ya se ha comentado anteriormente, la esteatosis hepática no alcohólica comprende una serie de enfermedades de distinta gravedad que pueden desarrollarse de forma secuencial. La acumulación de lípidos en los hepatocitos en ausencia de daño celular es lo que se conoce como esteatosis simple.

Sin embargo, al tratarse de un estado alterado de las células, puede conducir a una reacción inflamatoria dando lugar a una esteatohepatitis (Than and Newsome, 2015). Se trata de una fase más grave y que en situaciones crónicas puede llevar a un proceso de fibrosis. Una situación de fibrosis establecida puede verse agravada por el desarrollo de cirrosis, proceso que provoca la alteración de la vascularización hepática comprometiendo su funcionalidad (García Buey et al., 2012). Todos estos procesos conducen a la lesión y desregulación grave de la célula hepática que finalmente puede evolucionar a un carcinoma hepatocelular.

3.1. ESTEATOSIS SIMPLE

La esteatosis hepática simple se define como el almacenamiento de triglicéridos en el hepatocito sin presentar lesión celular. Los pacientes que han sido diagnosticados de esteatosis simple y están siendo tratados no suelen presentar una progresión hacia fases más graves, o si la presentan tiene lugar de forma muy lenta y controlada (Chalasanani et al., 2012).

Una acumulación simple de triglicéridos en el hígado no provoca, por sí sola, la activación de vías inflamatorias en la célula y se cree que dicho almacenamiento puede actuar como un mecanismo protector frente a la lipotoxicidad (Sharma et al., 2015). Esto es posible gracias a la capacidad de la célula hepática para almacenar un exceso de triglicéridos en gotas lipídicas disminuyendo los efectos tóxicos que tiene para la célula (Aon et al., 2014). La histopatología se caracteriza por la presencia de macrovesículas formadas por gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 3B).

3.2. ESTEATOHEPATITIS

En la esteatohepatitis no alcohólica, la célula hepática ha agotado su capacidad para almacenar el exceso de lípidos, este hecho provoca lo que conocemos como lipotoxicidad e involucra la activación de las vías inflamatorias lo que se hace visible en las pruebas histológicas (Figura 3C). Tiene lugar la infiltración de células del sistema inmunológico y un engrosamiento de las células hepáticas (Takahashi and Fukusato, 2014) seguido de necrosis.

3.3. FIBROSIS Y CIRROSIS

En este estado, los hepatocitos han perdido la capacidad regenerativa y es necesaria la sustitución del tejido afectado por matriz extracelular, fenómeno conocido como fibrosis. En este proceso tiene lugar la activación de las células estrelladas hepáticas para la transformación fenotípica a miofibroblastos, que llevarán a cabo el proceso de fibrosis (Trautwein et al., 2015). La inflamación y necrosis son fácilmente visibles en una biopsia (Figura 3D).

El aumento del contenido fibroso conduce a un mayor depósito de matriz extracelular (Figura 3E) dando lugar a lo que conocemos como cirrosis. La patogenia de la cirrosis puede dividirse en dos etapas. En la primera el paciente no muestra síntomas, a pesar de ello, puede desarrollar hipertensión portal lo que conduce a una falta de riego sanguíneo en las células hepáticas y daño celular. Si esta hipertensión aumenta y además se alarga en el tiempo tendría lugar la segunda fase, caracterizada por una pérdida de la función hepática que conlleva a la aparición de multitud de complicaciones (García Buey et al., 2012).

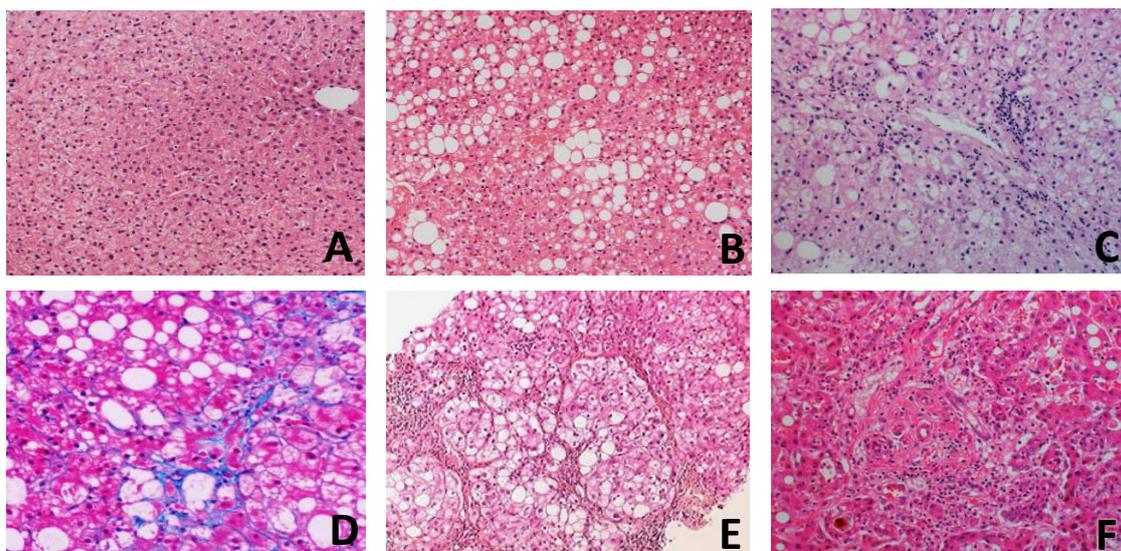


Figura 3. Evolución histológica de NAFLD. **A)** Biopsia de un hígado sano, se observa la distribución uniforme del hepatocito formando el tejido hepático. **B)** Patrón histológico en un caso de esteatosis simple, se observan macrovesículas ocupando el citoplasma de las células. **C)** Visualización de infiltración de células inflamatorias en un caso de NASH. **D)** Visualización de la inflamación, muerte celular y sustitución por matriz extracelular en un caso de fibrosis. **E)** Biopsia de cirrosis, se observa muerte celular y cicatrización del tejido. **F)** Biopsia de hepatocarcinoma, muestra acumulaciones lipídicas, engrosamiento de hepatocitos cancerosos, inflamación, fibrosis y agregados de eosinófilos o cuerpos de Mallory.

3.4. CARCINOMA HEPATOCELULAR

Cuando las alteraciones relacionadas con la cirrosis se alargan en el tiempo, la probabilidad de progresar hacia un carcinoma hepatocelular aumenta considerablemente. Existen numerosos factores que activan procesos favorables para la aparición del cáncer y que se desarrollan durante la patogénesis de la esteatosis hepática no alcohólica. La obesidad relacionada con la resistencia a la insulina provoca el incremento de factores que actúan como mitógenos estimulando la proliferación celular. Por otro lado, en pacientes con NAFLD se ha visto que tiene lugar un aumento de la proliferación de las células progenitoras de los hepatocitos. Uno de los procesos de mayor relevancia que tiene lugar durante el progreso de la enfermedad es el estrés oxidativo que involucra mutaciones en genes supresores de tumores como p53.

La biopsia muestra acumulaciones lipídicas, engrosamiento de hepatocitos cancerosos, inflamación, fibrosis y agregados de eosinófilos o cuerpos de Mallory (Figura 3F).

4. MECANISMOS MITOCONDRIALES EN EL MANEJO DE LÍPIDOS EN EL HEPATOCITO

La mitocondria es un orgánulo crítico en el metabolismo de los lípidos ya que lleva a cabo la β -oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de colesterol. Así pues, juega un papel importante en el desarrollo de las alteraciones comentadas anteriormente, ya que un aumento de ácidos grasos libres supone una sobrecarga de trabajo por encima de su capacidad metabólica, lo que provoca una acumulación tóxica de triglicéridos en el hepatocito (Gaggini et al., 2013).

4.1. FUENTES DE ÁCIDOS GRASOS EN EL HÍGADO

Los ácidos grasos constituyen una de las principales fuentes de energía en el organismo mediante la β -oxidación llevada a cabo en la mitocondria, también presentan un papel estructural ya que son necesarios para la síntesis de esfingolípidos y fosfolípidos. Por otro lado, se encuentran involucrados en la respuesta inmune siendo capaces de alterar la síntesis de eicosanoides y de activar receptores Toll (Ramadori et al., 2015). Además, la conjugación de los ácidos grasos y el coenzima A puede dar lugar a la alteración de cascadas de transducción de señal, regular la actividad enzimática de proteínas como la acetil-CoA carboxilasa, así como los canales de K^+ dependientes de ATP (Kazantzis and Stahl, 2012). Por último, regulan la transcripción de genes específicos mediante la interacción con distintos factores de transcripción como PPARs, SREBP, LXR y NF- κ B (Grattagliano et al., 2012).

Las principales fuentes de ácidos grasos en el hígado están constituidas por la dieta, la lipólisis que tiene lugar en el tejido adiposo y la lipogénesis *de novo* que se desarrolla en el hepatocito. Se ha visto que un 59% de los ácidos grasos que contribuyen al desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica provienen de los ácidos grasos liberados a la circulación tras la lipólisis, un 26% de la lipogénesis *de novo* y un 15% de la dieta (Nassir and Ibdah, 2014).

Después de la ingesta, los ácidos grasos son absorbidos por el intestino delgado, donde serán ensamblados en quilomicrones o secretados directamente a la circulación llegando hasta el hígado (Nguyen et al., 2008). Los ácidos grasos de cadena corta son translocados al interior del hepatocito mediante transportadores específicos, donde pueden interactuar con otras moléculas y ser conducidos a distintas zonas de célula, como por ejemplo al núcleo o la mitocondria. Los triglicéridos pertenecientes a los quilomicrones remanentes, pueden almacenarse en el hígado formando gotas lipídicas o exportarse como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Nguyen et al., 2008).

Por otro parte, el tejido adiposo blanco es capaz de almacenar el exceso de energía producida en el organismo tras la ingesta en forma de lípidos (Lafontan and Langin, 2009). Mediante la lipólisis, los triglicéridos almacenados son liberados como ácidos grasos no esterificados (NEFA) a la circulación. Este proceso se encuentra regulado hormonalmente por la insulina afectando negativamente a la transcripción de distintas proteínas como las lipasas. Cuando debido a la ingesta, el incremento de calorías se alarga en el tiempo, es probable desarrollar resistencia a la insulina, lo que provoca un incremento de la lipólisis y una disminución de la lipogénesis, liberándose ácidos grasos a la circulación y produciendo la acumulación de grasa ectópica (Nassir and Ibdah, 2014).

La lipogénesis *de novo* tiene lugar en el citoplasma de la célula y consiste en la conversión de un exceso de carbohidratos en ácidos grasos a partir de acetil-CoA. Este proceso se activa por la insulina secretada tras una elevada ingesta de carbohidratos capaz de activar factores de transcripción como SREBP-1c encargado de la transcripción de enzimas hepáticas lipogénicas (Ferre and Foufelle, 2010; Nassir and Ibdah, 2014). Los ácidos grasos sintetizados pueden pasar a formar triglicéridos y ensamblarse en VLDL. No obstante, se considera que la lipogénesis *de novo* es un factor importante para el desarrollo de la esteatosis hepática (Nassir and Ibdah, 2014).

4.2. OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

En el interior celular los ácidos grasos son unidos al Coenzima A (CoA) mediante las acil-CoA sintetasas, proceso conocido como activación y que tiene como objetivo evitar la salida de los ácidos grasos de la célula y facilitar su transporte a la matriz mitocondrial (Zambo et al., 2013).

Los ácidos grasos entran en la mitocondria por acción de la CPT-1 que permite la regeneración del acil-CoA y carnitina libre (Nassir and Ibdah, 2014). Una vez en la matriz, tiene lugar la oxidación del acil-CoA dando como resultado el acortamiento de la cadena de ácido graso, la formación de acetil-CoA y la producción de NADH y FADH₂ (Wei et al., 2008). El acetil-CoA formado será oxidado después en el ciclo de Krebs y los equivalentes de reducción NADH y FADH₂ en la cadena respiratoria mitocondrial (Grattagliano et al., 2012). La β -oxidación también puede darse en los peroxisomas, el acetil-CoA formado es exportado al citosol donde podrá ser oxidado en el ciclo de Krebs.

La regulación de la β -oxidación viene marcada por una serie de vías metabólicas. Cuando los niveles de glucosa son elevados, el acetil-CoA es transformado a citrato que puede salir al citosol y dar lugar, de nuevo, a acetil-CoA. Mediante la acción de la acetil-CoA carboxilasa, el acetil-CoA es convertido a malonil-CoA, dado que éste último es necesario para la síntesis de ácidos grasos, elevados niveles suponen la inhibición de la CPT-1 y por tanto la disminución de la β -oxidación en la matriz mitocondrial. Por ello, se ha visto que largos periodos de elevada ingesta calórica conducen a un incremento de la síntesis de ácidos grasos y a la inhibición de su oxidación en el hepatocito (Wei et al., 2008).

4.3. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO: ADIPOQUINAS

El tejido adiposo contribuye a la homeostasis energética en el organismo mediante la integración de vías metabólicas como la lipogénesis, la lipólisis y la β -oxidación (Giby and Ajith, 2014). En dicha homeostasis presentan un papel importante los PPARs. El subtipo PPAR α se encarga de la activación del catabolismo lipídico, mientras que el subtipo PPAR γ promueve el almacenamiento de lípidos (Yessoufou and Wahli, 2010).

El tejido adiposo secreta distintas adipoquinas para comunicarse con el hígado, músculo e hipotálamo (Giby and Ajith, 2014). Las principales adipoquinas son adiponectinas, leptinas y citoquinas (como por ejemplo, TNF- α e IL-6). El equilibrio en la secreción de estos mediadores conducirá a distintos efectos sobre el hígado: la adiponectina presenta un papel antiinflamatorio y antiesteatogénico, mientras que el resto de adipoquinas son responsables de la activación de las vías inflamatorias que conducen a la RI y esteatohepatitis (Berlanga et al., 2014; Tilg and Moschen, 2010).

La adiponectina es la responsable de la estimulación de PPAR α en el hígado mediante su unión al receptor específico ADIPOR2, potenciando la utilización de la glucosa y promoviendo la β -oxidación, por otro lado ejerce un efecto inhibitorio frente a la acumulación de triglicéridos en el hígado mediante la inhibición de SREBP-1c (Jung et al., 2013b). Se han encontrado niveles bajos de adiponectina en pacientes que presentan obesidad, DM2, RI y NAFLD (Giby and Ajith, 2014). Se ha demostrado que estimula la secreción de factores antiinflamatorios, bloquea la activación de NF- κ B e inhibe la secreción de TNF- α y IL-6 (Tilg and Moschen, 2010). En una situación de obesidad, los macrófagos del tejido

adiposo secretan elevadas cantidades de TNF- α y IL-6 que conducen a la supresión de la producción de adiponectina (Berlanga et al., 2014).

4.4. MICROBIOTA INTESTINAL

El hígado puede verse afectado por cambios en la microbiota intestinal debido a su conexión con el intestino mediante la vena porta, mediante la cual recibe continuamente metabolitos y endotoxinas de origen bacteriano. En condiciones normales, dichos metabolitos ingresan en el hígado y son eliminados por las células de Kupffer (Minemura and Shimizu, 2015).

Las células que forman la mucosa intestinal constituyen una barrera de defensa para el organismo evitando la entrada de bacterias y endotoxinas a la circulación sanguínea. Cuando tiene lugar una alteración en esta barrera, se produce la translocación de dichas bacterias a los tejidos. Esta translocación provoca una producción de etanol excesiva así como la liberación de lipopolisacáridos y otros metabolitos bacterianos a la vena porta, lo que conduce a la activación del sistema inmunitario y la secreción de factores proinflamatorios (Figura 4) como TNF- α en el hígado (Than and Newsome, 2015).

Estudios llevados a cabo en ratones han demostrado que estos metabolitos pueden influir en la absorción de nutrientes, en la adiposidad, en la inflamación a nivel sistémico y finalmente en el desarrollo de la RI (Eslamparast et al., 2013), factores que contribuyen al desarrollo de NAFLD.

Esta asociación se va haciendo más evidente a medida que progresa la esteatosis ya que aumenta la lesión hepática: se produce un aumento en el crecimiento bacteriano, la reducción de la motilidad intestinal, un aumento de la permeabilidad del intestino así como una disminución de la acción de las células del sistema inmunitario (Boursier and Diehl, 2015).

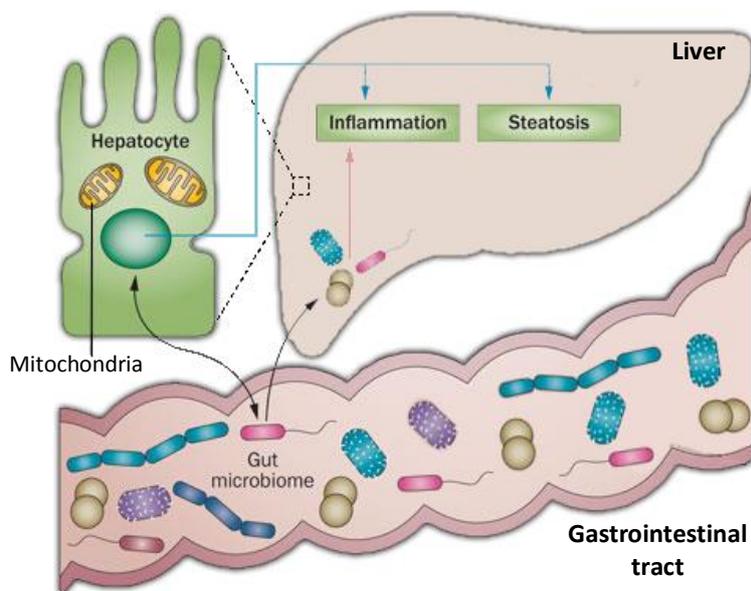


Figura 4. Relación entre la microbiota intestinal y el desarrollo de NAFLD. Los microorganismos intestinales son capaces de activar vías inflamatorias en el hepatocito (Cohen et al., 2011).

5. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL HEPÁTICA MEDIADA POR ÁCIDOS GRASOS

Como hemos visto, el hígado presenta un papel importante en el metabolismo de los lípidos, participando en su transporte al interior celular, jugando un papel importante en su catabolismo, así como en su almacenamiento y exportación al resto de tejidos. Cualquier alteración de estos procesos puede conducir al desarrollo de la esteatosis hepática no alcohólica (Musso et al., 2009).

5.1. HIPÓTESIS

La evolución de una esteatosis simple no patológica a NASH no siempre se produce y es posible que se desarrolle la segunda sin tener lugar una esteatosis simple previa. La distinta evolución de la enfermedad ha sido objeto de muchas investigaciones, lo que ha llevado a la generación de una serie de hipótesis sobre la patogénesis de NAFLD (Day and James, 1998).

5.1.1. "TWO HIT" HIPÓTESIS

Postula que debe producirse un primer impacto o "first hit" que estimule la acumulación lipídica en el hígado seguido de un segundo impacto o "second hit" donde tiene lugar la activación de los procesos inflamatorios (Berlanger et al., 2014).

El almacenamiento lipídico podría verse inducido por el desarrollo de resistencia a la insulina por parte de los tejidos, lo que provoca un incremento del flujo de los ácidos grasos hacia el hepatocito. Los elevados niveles de ácidos grasos exceden la capacidad de oxidación de la célula hepática lo que conduce al desarrollo de esteatosis hepática (Nassir and Ibdah, 2014).

El segundo impacto viene facilitado por el estado alterado del hepatocito debido al primer impacto. Tienen lugar sucesos como la disfunción mitocondrial, la secreción de citoquinas y adipocinas, así como un aumento del estrés del retículo endoplasmático (Day and James, 1998). Estos procesos activan vías inflamatorias que conducen al desarrollo de NASH (Dowman et al., 2010).

5.1.2. "MULTI-HITS" HIPÓTESIS

Esta hipótesis defiende un nuevo modelo en el que un mayor número de sucesos participan en la evolución de la esteatosis simple a NASH, además de la acumulación inicial de lípidos en el hepatocito. En este mecanismo juegan un papel central los factores secretados por el intestino y por el tejido adiposo (Tilg and Moschen, 2010).

Además, también se han encontrado evidencias entre la ingesta de diversos alimentos y la predisposición a desarrollar esteatosis hepática. Así, se ha visto que una alimentación rica en ácidos grasos trans y/o fructosa aumenta la resistencia a la insulina y a la lesión hepática conduciendo al desarrollo de esteatohepatitis (Abdelmalek et al., 2010; Tetri et al., 2008).

5.1.3. "DISTINCT HIT" HIPÓTESIS

Considera la esteatosis simple y la esteatohepatitis como dos enfermedades distintas que no presentan una patogenia común. Viene dada por el descubrimiento de factores genéticos y del papel de las células progenitoras hepáticas (HPCs) en el desarrollo de la esteatohepatitis (Yilmaz, 2012).

En pacientes con NAFLD, se ha detectado el polimorfismo rs738409 relacionado con el gen que codifica para la proteína PNPLA3 importante en la lipólisis y lipogénesis de los hepatocitos y adipocitos. Dicho polimorfismo conduce a la pérdida de la función enzimática de PNPLA3 (Wang et al., 2011). Su presencia ha sido más frecuente en los casos de esteatohepatitis que en los casos de esteatosis simple, así como su asociación con la inflamación y fibrosis en el hígado (Rotman et al., 2010). También se ha visto que el papel regenerativo de las HPCs es menos eficiente en los enfermos de esteatohepatitis que en los enfermos de esteatosis simple (Yilmaz, 2012). Todo ello apoya la hipótesis de que dichas enfermedades se puedan desarrollar por vías patológicas distintas.

5.1.4. "IN UTERO" HIPÓTESIS

Se han encontrado evidencias que proponen que el desarrollo del feto puede verse alterado por el estado nutricional y metabólico que presente la madre durante la gestación. Por ello, perturbaciones metabólicas en la madre durante la etapa gestacional pueden conducir a alteraciones irreversibles en el feto, que pueden no manifestarse hasta etapas avanzadas de la vida (Herrera, 2008).

Esta hipótesis se basa en un aumento del riesgo de sufrir NAFLD en individuos que durante la etapa fetal han estado expuestos a una elevada ingesta lipídica por parte de la madre. En estudios llevados a cabo con ratones se ha observado que tiene lugar una estimulación de la lipogénesis *de novo* y una inhibición de la β -oxidación (Brumbaugh and Friedman, 2014). Se ha observado que un incremento de los lípidos plasmáticos maternos puede contribuir a la acumulación de lípidos en el feto y al desencadenamiento de peroxidación lipídica, induciendo un aumento del estrés oxidativo y un mayor riesgo de padecer aterosclerosis en etapas posteriores de la vida del feto (Herrera, 2008).

5.2. FACTORES QUE PROVOCAN DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Existen un gran número de factores que provocan la disfunción de la mitocondria relacionados con un excedente de ácidos grasos libres. Algunos de ellos son la formación de ROS, resistencia a la insulina, estrés en el retículo endoplásmico, secreción de adipocinas, así como la activación o inhibición de ciertas enzimas, procesos que serán explicados a lo largo del presente trabajo (Gaggini et al., 2013).

5.2.1. Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La formación de ROS es el evento mayoritario relacionado con la disfunción mitocondrial y representa el inicio de los principales eventos que forman las enfermedades crónicas del hígado. Una excesiva formación de ROS produce modificaciones oxidativas en componentes lipídicos y proteicos de la membrana mitocondrial así como en el DNA mitocondrial (Figura 5). Estos cambios determinan alteraciones estructurales, cambios en la fluidez y permeabilidad de membrana así como la inactivación de los sistemas de transporte y de receptores (Grattagliano et al., 2012).

El incremento del estrés oxidativo en la mitocondria viene dado por un aumento de los equivalentes de reducción NADH y FADH₂, formados durante la β -oxidación de los ácidos grasos en la matriz mitocondrial. El aumento de dichos equivalentes provoca la formación del ión superóxido (O₂^{•-}) en los complejos I (NADH-coenzima Q reductasa) y III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa) de la cadena de transporte electrónico donde la reacción se ve favorecida termodinámicamente (Gusdon et al., 2014). Además, la generación de ROS también tiene lugar en el interior de los peroxisomas cuando llevan a cabo la oxidación de los ácidos grasos libres (Paradies et al., 2014).

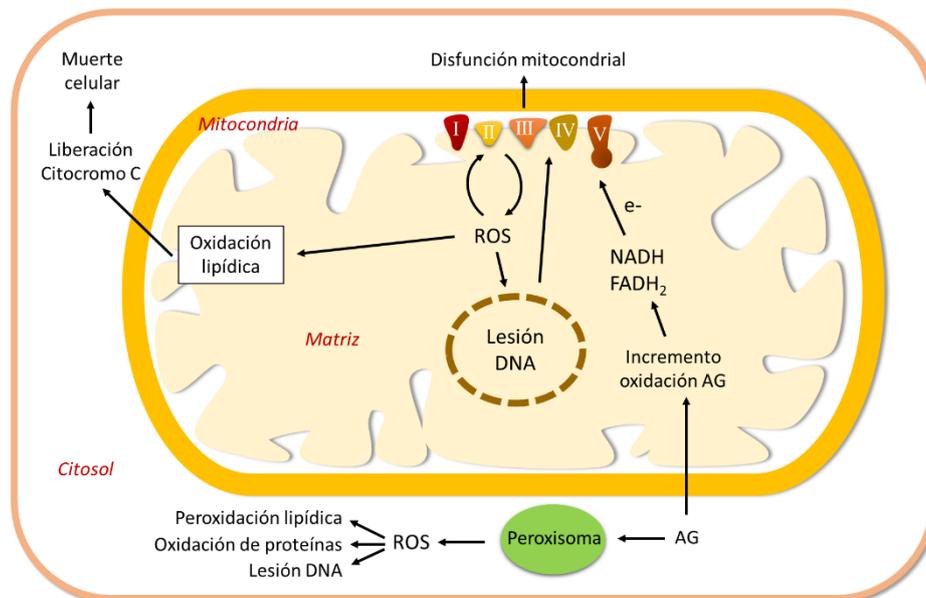


Figura 5. Mecanismos relacionados con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disfunción mitocondrial relacionada con el desarrollo de lipotoxicidad y esteatosis hepática no alcohólica.

Las distintas clases de ácidos grasos hacen posible la formación de diferentes cantidades de equivalentes de reducción durante su β -oxidación. Así, los ácidos grasos poliinsaturados conllevan la formación de un mayor número de moléculas de NADH y FADH₂ contribuyendo al aumento del estrés oxidativo (Figura 5). Sin embargo, gran parte de las especies reactivas de oxígeno formadas son dirigidas a inhibir la glucólisis, de manera que se conduce a la célula a realizar un catabolismo lipídico, disminuyendo la cantidad de lípidos en la célula y por tanto contribuyendo a disminuir los riesgos de sufrir esteatosis hepática (Gusdon et al., 2014). Se trata de una estrategia, que aunque implique la formación de ROS, lleva a cabo una función beneficiosa para la célula hepática.

En la matriz mitocondrial, la superóxido dismutasa (SOD) se encarga de catalizar la conversión del ión superóxido en H₂O₂. Finalmente, éste será reducido por distintas enzimas (como la glutatión peroxidasa o catalasa) o puede difundir al citoplasma. La depleción del glutatión en la mitocondria se ha visto implicado en el desarrollo de NAFLD aumentando el estrés oxidativo (Gusdon et al., 2014).

En condiciones normales, la tasa de mutación del genoma mitocondrial es elevada, debido a la ausencia de histonas y a la falta de mecanismos de reparación. En situaciones de elevado estrés oxidativo, estas mutaciones son más frecuentes debido a las modificaciones ejercidas por ROS

(Murphy, 2009). Dichas modificaciones conducen a una disminución de la expresión de proteínas mitocondriales y por tanto, a una disfunción de la cadena de transporte electrónico, que a su vez, conduce a la generación de más ROS, formando un ciclo con consecuencias lesivas para la mitocondria y la célula (Kawahara et al., 2007).

Otro efecto adverso que conlleva la presencia de ROS es la oxidación de los lípidos que forman la membrana mitocondrial. La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que forman la membrana conduce a la formación de productos muy reactivos que se unirán a componentes de la cadena de transporte electrónico inhibiendo su función. Como por ejemplo la interacción que se forma entre el malonaldehído y la citocromo c oxidasa (Negre-Salvayre et al., 2010).

La peroxidación lipídica de los fosfolípidos también conduce a un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial debido a la formación de poros de transición. Estos poros son los responsables de la pérdida del potencial de membrana viéndose disminuida la síntesis de ATP (Bernardi, 2013). La formación de estos poros conduce a la salida del citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas, desde la mitocondria al espacio citoplasmático llevando a la inducción de apoptosis (Figura 5) mediante la activación de caspasas. La disminución de la síntesis de ATP conduce a una disfunción mitocondrial que es capaz de inducir necrosis celular, produciendo inflamación en el tejido hepático (Grattagliano et al., 2012).

5.2.2. Resistencia a la insulina

Dada la importancia energética que supone la glucosa para la homeostasis del organismo, situaciones de hipoglicemia o hiperglicemia tienen efectos en toda la fisiología del organismo. La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de las células para hacer uso de la glucosa como fuente de energía a pesar de existir secreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas (García-Ruiz et al., 2013).

Un vez que la insulina es secretada, se une a su receptor situado en las células diana, activando una cascada de fosforilación que conduce a la expresión de genes destinados a promover la entrada de glucosa en las células. El receptor de insulina pertenece a la familia tirosina quinasa, por lo que la unión del ligando estimula la actividad intrínseca del receptor de manera que se produce la fosforilación de los residuos de tirosina (Cheng et al., 2010). Ahora que el receptor se encuentra activado, hace posible el reclutamiento y fosforilación de IRS-1. Ésta última reacción conduce a la activación de la PI3K y de PKB/Akt (Dowman et al., 2010). Finalmente, la activación de PKB/Akt tiene como resultado la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática, mediante la regulación del factor de transcripción FOXO, facilitando la entrada de glucosa en el hepatocito. Por otra parte, también tiene lugar un aumento de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis y una disminución de la expresión de genes gluconeogénicos debido a la desfosforilación de GSK3 (Figura 6).

La insulina también juega un papel importante inhibiendo la lipólisis del tejido adiposo en situaciones de baja demanda energética. En un estado de RI esta inhibición no se produce, conduciendo a aumento de los ácidos grasos en el tejido adiposo y a su transporte hasta el hígado (Dowman et al., 2010).

La consecuencia de la RI es un aumento de los niveles de glucosa en sangre que provoca una sobrerregulación por parte de SREBP-1c de genes relacionados con la lipogénesis *de novo* y la inhibición de la β -oxidación en el hepatocito, dando lugar al desarrollo de la esteatosis hepática (Postic and Girard, 2008).

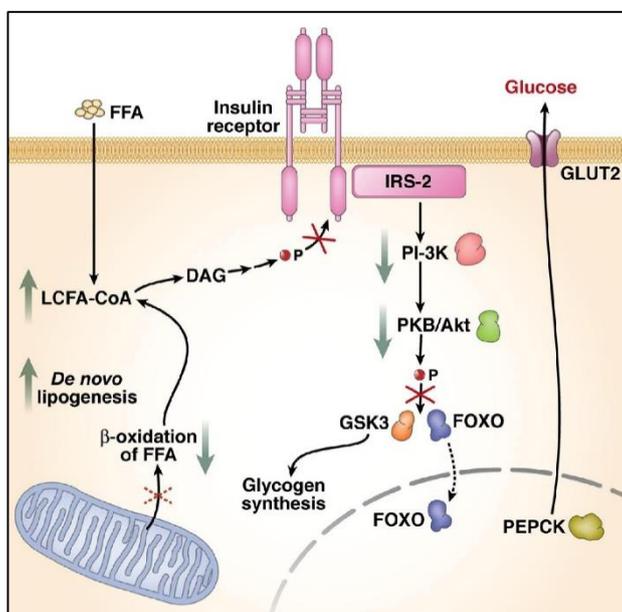


Figura 6. Mecanismo molecular de resistencia a la insulina en el hepatocito (Parekh and Anania, 2007).

Algunas de las alteraciones que se han encontrado en pacientes de NAFLD y que conducen a la RI son aumento de ácidos grasos libres, y de ceramida, así como del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el factor nuclear kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$).

Por otro lado, la RI se ha visto relacionada directamente con la obesidad ya que es considerada como un estado crónico de baja inflamación. Además, el 80% de los individuos que presentan NAFLD son obesos (Fabbrini et al., 2010). Un estado de obesidad y una dieta rica en grasa activa al inhibidor de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ lo que conduce a un estado de inflamación crónica. En el hígado, los ácidos grasos son capaces de activar dicha vía inflamatoria así como de aumentar los niveles de diacilglicerol (DAG) (Postic and Girard, 2008). El incremento de éste último se ha visto relacionado con una interferencia en la señalización de la insulina (Figura 6) al activar a la proteína quinasa $\text{C}\epsilon$ (PKC ϵ). Cuando ésta se encuentra activada, se une al receptor de la insulina e inhibe su actividad tirosina quinasa impidiendo la transducción de señal y promoviendo la resistencia a la insulina (Samuel et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado una relación entre el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y el desarrollo de NAFLD promoviendo la resistencia a la insulina. En situaciones de obesidad la expresión de angiotensina II se ha visto incrementada en los adipocitos lo que conduce a la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, IL-6 y PAI-1 (Marcus et al., 2013). Por otro lado, la angiotensina II es capaz de estimular la fosforilación de los residuos de serina del receptor de insulina, así como de PI3K lo que resulta en una inhibición de la interacción entre estos dos componentes imposibilitando la señalización de la insulina en el interior celular (Paschos and Tziomalos, 2012).

5.2.3. Estrés en el retículo endoplasmático

En el retículo endoplasmático (RE) tiene lugar la síntesis, maduración, control de calidad y tráfico de una gran variedad de proteínas (Passos et al., 2015). Cuando el plegamiento proteico no es el adecuado, las proteínas son retenidas en el lumen del RE donde serán o bien remodeladas para conseguir su correcto plegamiento o conducidas a la degradación por el proteosoma mediante el proceso ERAD (ER-associated degradation) (Malhotra and Kaufman, 2007).

Cuando se dan situaciones de estrés en la célula, tiene lugar una mayor demanda de la síntesis proteica lo que conduce a una disminución de la eficiencia en el RE. Dicha ineficiencia produce mayor número de proteínas desplegadas o malplegadas, así como su acumulación, conduciendo a lo que se conoce como estrés en el retículo endoplasmático (Zhang et al., 2014).

Cuando tiene lugar dicha alteración, el RE es capaz de activar un proceso de adaptación conocido como UPR (unfolded protein response), que se caracteriza por la activación de tres señales: PERK, IRE1 y ATF-6 (Figura 7). Dicha activación implica la estimulación de una serie de vías que actúan de forma coordinada para regular la transcripción de genes involucrados en el crecimiento o expansión del RE, en la disminución de la síntesis proteica, en el incremento de la eficiencia de plegamiento y en el aumento de la degradación de las proteínas desplegadas o mal plegadas en el interior del RE (Malhi and Kaufman, 2011). Sin embargo, si a pesar de la activación de estas vías, retomar la homeostasis del ER no es posible, la función de la célula se verá comprometida y se activarán señales pro-apoptóticas conduciendo a la muerte celular (Passos et al., 2015).

Recientemente, se ha encontrado una posible relación entre el estrés del RE en el adipocito y el incremento de lípidos en el hígado. Dicho estrés provocaría la activación de vías lipolíticas en el adipocito aumentando el flujo de ácidos grasos libres tejido adiposo-hígado (Bogdanovic et al., 2015).

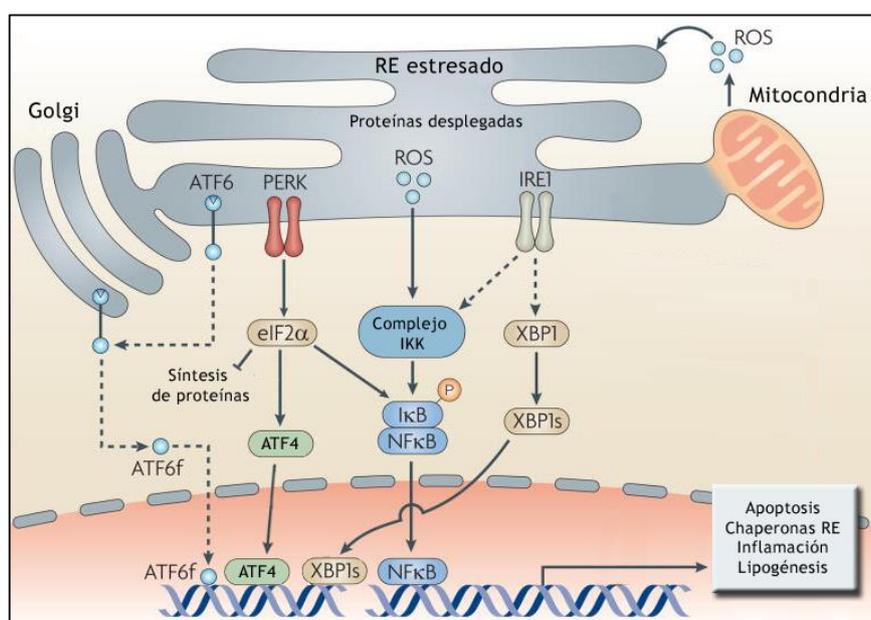


Figura 7. Mecanismos desencadenados por el aumento del estrés en el RE que conducen a un aumento de la síntesis de chaperonas, inflamación, activación de vías lipogénicas así como de apoptosis. Imagen adaptada (Hotamisligil and Erbay, 2008).

Además, en situaciones de estrés en el RE también se ha visto favorecida la síntesis de SREBP-1c activando la lipogénesis en el hepatocito y contribuyendo a un aumento de los niveles de lípidos intracelulares (Passos et al., 2015).

Por otro lado, se ha propuesto el estrés en el RE como activador de la inflamación que tiene lugar en casos de esteatohepatitis, ya que el mecanismo UPR conduce a la fosforilación del inhibidor de NF- κ B activándose así la respuesta inflamatoria. La activación de NF- κ B promueve la expresión de IL-6 y TNF- α (Zhang et al., 2014).

5.2.4. Papel de las adipoquinas

De acuerdo con la hipótesis “two hits” se ha propuesto un papel importante de las proteínas secretadas por el tejido adiposo blanco en la patogenia del NAFLD constituyendo el segundo suceso o “second hit” responsable de la activación la respuesta inflamatoria (Abenavoli and Peta, 2014).

Estudios realizados en pacientes que presentan NASH han encontrado valores disminuidos de adiponectina y de ADIPOR2 en comparación con pacientes que presentan esteatosis simple, por lo que se cree que su disminución predispone a la progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis (Berlanga et al., 2014).

Sabemos que la secreción de leptina por parte del tejido adiposo es proporcional a la cantidad de lípidos almacenados y tiene como consecuencia la disminución del apetito y el aumento del gasto energético en el organismo mediante sus efectos en el hipotálamo. La ingesta, el nivel de energía y la inflamación son mediadores que regulan la síntesis de leptina (Abenavoli and Peta, 2014). Diferentes estudios han demostrado que existen niveles elevados de leptina en individuos obesos y en pacientes que presentan NASH lo que lleva a pensar que hayan podido desarrollar resistencia a la acción de la leptina (Figura 8). Por otro lado, también juega un papel importante en el progreso de la resistencia a la insulina e inhibe la gluconeogénesis induciendo la esteatosis en el hígado. Además, presenta acción proinflamatoria y puede activar el desarrollo de la fibrosis en el hígado, mediante la secreción de IL-6, IL-2 y TNF- α (Tsochatzis et al., 2006).

Finalmente, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) puede ser secretado por los adipocitos, por las células de Kupffer y por las células estrelladas hepáticas (HSC) como respuesta a una actividad inflamatoria crónica (Figura 8). Entre los efectos relacionados con NAFLD se ha visto que TNF- α induce el desacoplamiento de la cadena de transporte mitocondrial (Giby and Ajith, 2014). Una vez que TNF- α es secretado, promueve la fosforilación de IRS-1 inhibiendo la translocación del transportador de glucosa a la membrana plasmática conduciendo al desarrollo de la resistencia a la insulina (Stojavljević et al., 2014). Por otro lado, también activa lipasas que se encargan de promover un aumento de los niveles de ácidos grasos y su transporte al hígado. La acumulación de lípidos en el hepatocito conduce a la translocación del factor proapoptótico Bax al lisosoma, causando la liberación de catepsina B mediante la activación de NF- κ B y potenciando la expresión de citoquinas proinflamatorias (Basaranoglu et al., 2013).

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina con función proinflamatoria que puede ser producida por los adipocitos, hepatocitos, células endoteliales y células del sistema inmune (Stojsavljević et al., 2014). Cuando tiene lugar un crecimiento bacteriano anormal en el intestino se produce la estimulación de los macrófagos para secretar TNF- α que activa la producción de IL-6 por los adipocitos y por los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo en situaciones de obesidad (Tarantino and Finelli, 2013). El papel de IL-6 en el desarrollo de DM2 y por tanto de la resistencia a la insulina ha sido confirmado por diversos estudios. La secreción crónica de IL-6 conlleva a la lesión del hepatocito, sin embargo, algunos estudios concluyen que la IL-6 presenta un papel protector en la progresión de la esteatosis hepática simple a otras formas más graves (Yamaguchi et al., 2010).

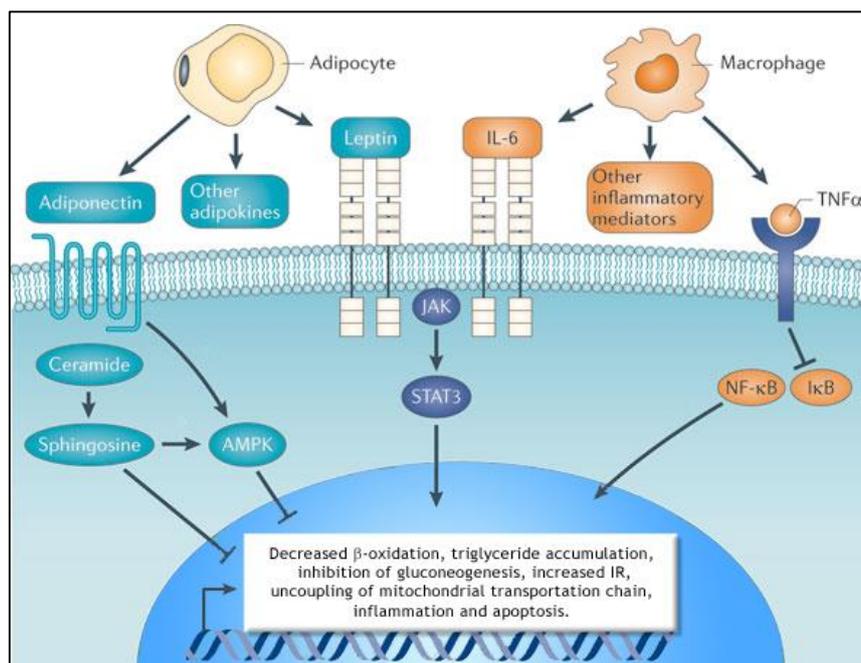


Figura 8. Acción de las distintas adipocinas en el desarrollo de NAFLD. Se observan las acciones inhibitorias y las acciones activadoras de cada una. Imagen adaptada (Khandekar et al., 2011).

6. CONSECUENCIAS CARDIOVASCULARES

Los mecanismos relacionados con un elevado riesgo cardiovascular y NAFLD todavía no han sido completamente elucidados. Sin embargo, estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos han mostrado que los individuos con NAFLD presentan un aumento de la predisposición a sufrir enfermedades cardiovasculares, independientemente de la presencia de otros factores de riesgo como hipertensión, diabetes, obesidad o dislipidemia (Than and Newsome, 2015). Además, las enfermedades cardiovasculares han sido consideradas la principal causa de muerte asociada a un estado avanzado de NAFLD (Gaudio et al., 2012).

6.1. Disfunción endotelial y aterosclerosis

Como se ha ido comentado a lo largo del presente trabajo, la patogénesis de NAFLD se encuentra relacionada con la resistencia a la insulina (Kasumov et al., 2015). Dicha RI estimula la sobreproducción

de VLDL por el hígado con el fin de suplir energéticamente al resto de tejidos, ello conlleva transferencias de colesterol esterificado desde las HDL hacia las VLDL, lo que forma pequeñas partículas de HDL susceptibles de ser degradadas. De esta manera, se produce una disminución de los niveles de HDL y un aumento de VLDL aumentando la predisposición de sufrir aterosclerosis (Parekh and Anania, 2007).

Otro factor relacionado es la ceramida, cuya síntesis *de novo* se ve estimulada por la inflamación y por una elevada ingesta de ácidos grasos saturados. Sus niveles se han visto incrementados en pacientes con NAFLD relacionados con el desarrollo de placas de ateroma debido su capacidad de inhibir IRS-1, PI3K y PKB (Kasumov et al., 2015).

Por otra parte, se ha visto tras diversos estudios que individuos con NAFLD presentan alteraciones en los mecanismos relacionados con la vasodilatación, lo que supone un daño en la íntima de las arterias y la disminución de su grosor (Villanova et al., 2005). La integridad del endotelio constituye un factor importante a la hora de evitar la formación de placas de ateroma. Una vez que el endotelio se encuentra dañado, las células progenitoras endoteliales (EPCs) son las encargadas de llevar a cabo la regeneración del tejido. Sujetos que presentan NAFLD poseen niveles de EPCs disminuidos lo que provoca la disfunción del endotelio y un aumento en el riesgo de desarrollar placas de ateroma (Gaggini et al., 2013).

Además, numerosos genes se encuentran sobreexpresados en pacientes con NAFLD relacionados con la lipólisis, el reclutamiento de monocitos y macrófagos así como de factores relacionados con la coagulación e inflamación (Targher et al., 2009). Por otro lado, la activación de genes relacionados con el proceso aterosclerótico y la oxidación de proteínas se ha visto más marcada en individuos que presentan NASH y no tanto en los que sufren esteatosis simple, por lo que se cree que la esteatohepatitis contribuye en mayor medida a la formación de aterosclerosis (Gaudio et al., 2012).

6.2. Papel de las hepatoquinas en la enfermedad cardiovascular

En la esteatosis hepática no alcohólica, el hígado lesionado es capaz de secretar una serie de factores, conocidos como hepatoquinas, que presentan efectos proaterogénicos, proinflamatorios y diabotogénicos contribuyendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Anstee et al., 2013).

Recientemente se ha propuesto que las hepatoquinas son capaces de promover la disfunción mitocondrial y la inflamación en las paredes de los vasos, contribuyendo así a la progresión de la aterosclerosis en pacientes con NAFLD. Algunas de estas hepatoquinas son el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-21), fetuína A y la selenoproteína P y tienen efectos sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Yoo and Choi, 2015).

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) es un péptido secretado principalmente por el hígado lesionado y su expresión se encuentra regulada por PPAR- α en situaciones de ayuno. Su administración disminuye el peso así como los niveles de triglicéridos y de LDL, mientras que mejora la sensibilidad a la insulina (Mashili et al., 2011). Se han encontrado valores elevados de FGF-21 en sujetos que presentan aterosclerosis (Yoo and Choi, 2015), lo que conduce a pensar que presenta un papel protector frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

La fetuína A es una glucoproteína sintetizada por los hepatocitos cuya función es inhibir al receptor de la insulina y promover la activación de vías inflamatorias conduciendo al desarrollo de RI, además de reducir la expresión de adiponectina en el adipocito (Hennige et al., 2008). La fetuína A activa SREBP-1c estimulando la acumulación de triglicéridos en las células hepáticas. Se han observado elevados niveles circulantes de fetuína A en sujetos obesos, diabéticos o que presentan síndrome metabólico y/o NAFLD (Ou et al., 2012). Por otro lado, la fetuína A incrementa la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-8, IL-6, MCP y PAI-1 en las células adiposas que rodean los vasos sanguíneos, formando un ambiente que predispone a la formación de placas de ateroma (Britton and Fox, 2011; Siegel-Axel et al., 2014).

La última hepatoquina relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares es la selenoproteína P, glucoproteína sintetizada por el hígado y posteriormente secretada al plasma (Yoo and Choi, 2015). Los niveles de selenoproteína P se han encontrado incrementados en individuos que presentan DM2 y NAFLD, estableciéndose una relación con la resistencia a la insulina. En este contexto, se ha observado que la adiponectina es capaz de impedir el desarrollo de RI inhibiendo la expresión de selenoproteína P mediante la vía AMPK-FOXO1 (Jung et al., 2013a).

7. TRATAMIENTOS

Actualmente no existe ninguna terapia específica para NAFLD y los tratamientos que se llevan a cabo dependen de la progresión de la enfermedad. Existen dos estrategias principales para tratar la acumulación de grasa en el hígado: por un lado, las terapias dirigidas a tratar la obesidad y alteraciones que acompañan al síndrome metabólico y por otro lado, las terapias dirigidas específicamente al hígado para aquellos individuos que se encuentran en una etapa muy avanzada de la enfermedad (Dyson and Day, 2014).

Según el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos actualmente se encuentran en desarrollo 353 ensayos clínicos destinados a hallar un tratamiento efectivo, 144 se están llevando a cabo en Estados Unidos y 94 en la zona europea de los cuales 7 se están desarrollando en España.

7.1. Dieta

Ya que la obesidad se encuentra relacionada directamente con la aparición y progresión de NAFLD, el primer paso para combatir la enfermedad se basa en la adopción de una dieta hipocalórica que permita disminuir el peso de los pacientes (Eslamparast et al., 2015). Se ha demostrado que la reducción del peso entre un 7 y 10% se asocia a una disminución de la inflamación hepática (Than and Newsome, 2015)

Los suplementos más empleados para el tratamiento de la enfermedad son los antioxidantes, ya que fomentan la disminución del estrés oxidativo en el hepatocito. En la mayoría de estudios llevados a cabo para probar los efectos de la vitamina E, vitamina C y resveratrol, los resultados son satisfactorios en modelos animales, mientras que en humanos no lo son o es necesario realizar ensayos clínicos (Eslamparast et al., 2015).

No obstante, la vitamina D está cobrando importancia debido a su capacidad para mediar señales intracelulares en el hígado. Se cree que se encuentra vinculada con la expresión de un gran número de genes relacionados con el metabolismo lipídico y glucídico, así como con la inflamación, la proliferación y la apoptosis (Eliades and Spyrou, 2015). Se ha observado una relación positiva entre la concentración de vitamina D y los niveles de adiponectina en pacientes de NAFLD independientemente del índice de masa corporal (Vaidya et al., 2012).

Por otro lado, en la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados se han encontrado distintos beneficios. Los ácidos grasos ω -3 poliinsaturados son capaces de regular la transcripción de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Mejoran la resistencia a la insulina, disminuyen la expresión de TNF- α , inhiben la síntesis de ácidos grasos y potencian la oxidación de los ácidos grasos, actuando sobre SREPB-1c y PPAR α respectivamente (Valenzuela et al., 2012). En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados se cree que son capaces de reducir la oxidación de las LDL y sus niveles en sangre, así como del colesterol total y los triglicéridos mediante la estimulación de la secreción de adiponectina (Eslamparast et al., 2015).

Finalmente, la suplementación con prebióticos puede modular la microbiota intestinal. Su consumo se ha visto relacionado con una disminución de los niveles de insulina y glucosa tras la ingesta. También se han establecidos relaciones con la regulación de la ingesta, el peso, la secreción de péptidos intestinales, la sensibilidad a la insulina y la función inmune, sin embargo, todos estos beneficios solamente han sido probados en animales y es necesario realizar más investigaciones en este ámbito (Papandreou and Andreou, 2015).

7.2. Sensibilizadores de insulina

Debido a la amplia relación entre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, a lo largo del tiempo se ha prestado especial interés en el desarrollo de sensibilizadores de insulina como tratamiento para los pacientes tanto de esteatosis simple como de NASH. Las tiazolidinedionas (TZDs) son agonistas de PPAR γ de manera que son capaces de disminuir la resistencia a la insulina. Algunas de las tiazolidinedionas más estudiadas son la rosiglitazona y la pioglitazona (Takahashi et al., 2015).

Los resultados obtenidos en ensayos clínicos muestran que la rosiglitazona mejora la esteatosis y disminuye los valores de aminotransferasas en pacientes que presentan NASH. Sin embargo, su uso se ha prohibido en Europa y restringido en Estados Unidos debido a que aumenta el riesgo de sufrir infarto de miocardio (Ratziu et al., 2008). Por otro lado, la poliglitazona también induce la disminución de los niveles de aminotransferasas y mejora la histología del tejido hepático, no obstante, sus efectos en etapas avanzadas como fibrosis no se han podido demostrar. Además, se han asociado efectos negativos como la ganancia de peso, la formación de edemas, fallo cardiaco y disminución de la densidad ósea, por lo que su uso en Francia y Alemania ha sido prohibido (Takahashi et al., 2015).

Finalmente, uno de los tratamientos más utilizados es la metformina. Se trata de una biguanida usada para el tratamiento de DM2 que actúa incrementando la sensibilidad a la insulina mediante la disminución de la gluconeogénesis y la síntesis de triglicéridos. Estudios han demostrado que la terapia con metformina consigue únicamente efectos transitorios que consisten en una disminución de la lesión hepática, reflejada en un descenso de los niveles de ALT/AST pero no se llegan a observar

mejoras en la histología hepática (Gitto et al., 2015). El mecanismo mediante el cual actúa la metformina se basa en la activación de la vía de las AMPK quinasas que induce un aumento del AMP en el hepatocito. Este aumento conduce a una disminución de la gluconeogénesis y de la síntesis de triglicéridos aumentando la β -oxidación de los ácidos grasos (Figura 9), también se ha visto que es capaz de inducir un descenso en la actividad de SREBP-1c (Yoon and Cha, 2014).

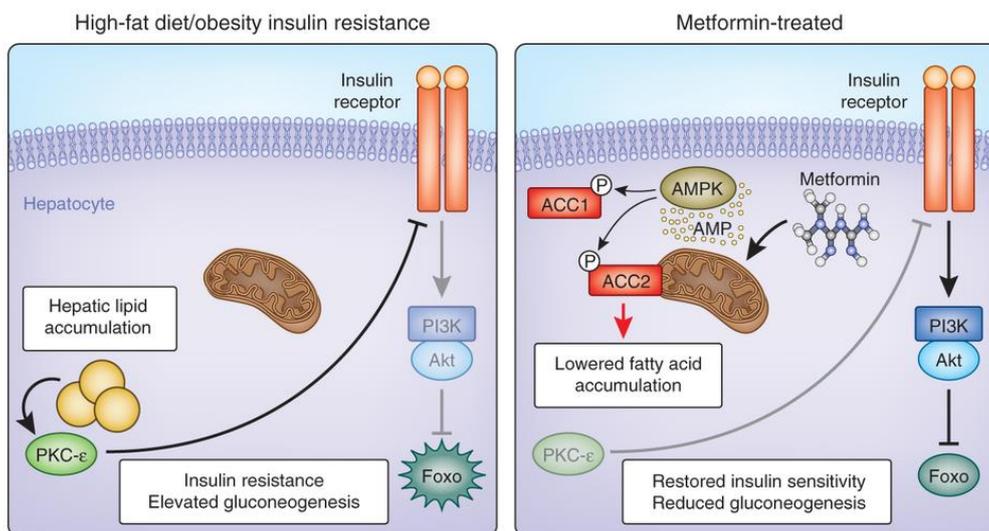


Figura 9. Comparativa entre el mecanismo de RI y la acción de la metformina. Ésta activa AMPK con la consecuente fosforilación e inhibición de las acetil-coA carboxilasas (ACC1 y ACC2) y por tanto disminución de malonil-coA haciendo posible la entrada de los ácidos grasos en la mitocondria para su oxidación mediante la CPT-1. La disminución de lípidos inhibe la activación de PKC-ε (Shaw, 2013).

7.3. Bloqueadores de los receptores de angiotensina II

El papel que juegan los antagonistas de los receptores de angiotensina II parece ser que se encuentra relacionado con la estimulación selectiva de PPAR- γ (Paschos and Tziomalos, 2012), los más conocidos son telmisartan e irbesartan.

Telmisartan es capaz de activar PPAR- γ induciendo genes relacionados con el metabolismo lipídico y glucídico. Se ha visto que potencia la expresión de genes relacionados con la gliceroneogénesis y con la reesterificación de ácidos grasos conduciendo a la disminución de los niveles de lípidos en adipocitos viscerales. Además, es capaz de incrementar la expresión de GLUT4 en los preadipocitos incrementando la entrada de glucosa al interior celular (Galzerano et al., 2010; Towfighi and Ovbiagele, 2008).

En cuanto al irbesartan, estudios llevados a cabo en modelos animales muestran efectos beneficiosos ya que mejora la sensibilidad a la insulina y disminuye la depleción de adiponectina en el suero (Towfighi and Ovbiagele, 2008).

En modelos animales, el tratamiento con bloqueadores de los receptores de angiotensina II ha conseguido disminuir los niveles de lípidos en el hígado y prevenir el progreso a NASH. Estos efectos se ha visto relacionados con una disminución del estrés oxidativo en el hepatocito y con la inhibición de la secreción de factores proinflamatorios y factores capaces de inducir la fibrosis (Hirose et al., 2007).

7.4. Perspectivas de futuro

Como se ha comentado anteriormente, se están llevando a cabo ensayos clínicos algunos de los cuales parecen ser prometedores. Por un lado se han realizado estudios preclínicos relacionados con la inhibición selectiva de caspasas (Hardy et al., 2015), los resultados obtenidos han mostrado mejoras en los niveles de ALT y una disminución de marcadores de neoplasia hepática (Ratziu et al., 2012).

Por otro lado, se están investigando los efectos de fármacos agonistas tanto de PPAR α como de PPAR δ . En modelos animales se ha observado que tras su administración tiene lugar la disminución de los niveles lipídicos y de la expresión de genes proinflamatorios (Staels et al., 2013). Además, se ha demostrado que también posee propiedades antifibrinolíticas. Estudios llevados a cabo en humanos han manifestado una mejoría en la dislipidemia y resistencia a la insulina (Hardy et al., 2015).

Finalmente, comentar el papel de los agonistas del receptor de FXR (farnesoid X receptor). Se trata de agonistas de los ácidos biliares capaces de unirse al receptor nuclear FXR e inhibir la lipogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas (Hardy et al., 2015). En modelos animales se ha podido observar que poseen efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de NF- κ B. Un tipo de agonista del receptor FXR es el ácido obeticólico (OCA), en pacientes tratados con OCA se ha podido ver una pérdida de peso y una disminución de los niveles de GGT, así como una reducción de la esteatosis y de la inflamación. No obstante, se han observado aspectos negativos como un aumento del colesterol total y un aumento del ratio LDL/HDL (Neuschwander-Tetri et al., 2015).

8. DISCUSIÓN

Los datos epidemiológicos obtenidos en los últimos años hacen evidente el abandono de dietas equilibradas y su sustitución por dietas de alto contenido lipídico en los países desarrollados, especialmente por los adolescentes. Este hecho conduce a pensar que en un futuro la esteatosis hepática no alcohólica pasará a ser una enfermedad crónica y generalizada mundialmente.

Uno de los principales problemas de esta enfermedad es su dificultad de diagnóstico, debido a que en la mayoría de los casos es asintomática. Además, se suma el hecho de que la fase inicial no implica lesión celular por lo que el paciente no siempre presenta alteraciones en los niveles de ALT, AST o de otros marcadores de enfermedad hepática. Este hecho supone que la mayoría de los casos sean detectados en etapas avanzadas donde la progresión de la enfermedad es ya difícil de detener. Todo ello incrementa la necesidad de adquirir técnicas de detección precoz no invasivas.

Por otra parte, la esteatosis simple se considera un mecanismo protector frente al fenómeno de lipotoxicidad que podría considerarse una adaptación del organismo hacia los cambios de alimentación que se están produciendo en las últimas décadas. Esta capacidad de almacenamiento limitada puede verse extendida a otros tejidos que hasta ahora tampoco han sido diseñados para llevar a cabo dicha función, haciendo presente la capacidad moduladora de nuestro organismo a los cambios ambientales.

A lo largo del trabajo se ha hecho patente el origen variable de los ácidos grasos que llegan al hígado y el papel que juegan como activadores o represores de multitud de genes. A la enorme complejidad

que envuelve a los mecanismos implicados en el desarrollo de esta enfermedad se suma la interacción del hígado con otros tejidos, de manera que se ven incrementados los factores involucrados en la aparición y progresión de la enfermedad así como la dificultad de regulación de cada uno de ellos.

A pesar de que la interacción hígado-tejido adiposo amplía el número de factores implicados en la patogenia de la enfermedad, también aumenta la posibilidad de nuevas dianas reguladoras a la hora de disminuir el flujo de ácidos grasos dirigido al hígado. En concreto, el papel de las adipoquinas en este contexto es de gran importancia y la obtención de fármacos que ayuden a equilibrar su secreción puede ser una buena opción a la hora de disminuir la acumulación de lípidos, así como los procesos inflamatorios relacionados con progresión de la enfermedad.

Otro aspecto relevante recientemente descubierto es la contribución de la microbiota intestinal al desarrollo de la enfermedad. Este vínculo subraya el papel que juegan los microorganismos en el organismo y hace pensar en que aún quedan muchas relaciones por establecer entre ambos. Además, hace presente la posible interacción entre tejidos alejados anatómicamente pudiendo tener efectos tanto positivos como negativos en su homeostasis.

El origen y la progresión de la enfermedad aún no están totalmente aclarados, sin embargo, la existencia de distintas hipótesis planteadas previamente en este trabajo hace pensar que se trata de una enfermedad en la que participan gran cantidad de factores etiológicos relacionados con la RI y activación de procesos inflamatorios, puntos clave en la esteatosis hepática no alcohólica.

Por otro parte, la producción de ROS y la relación con la enfermedad se encuentra perfectamente establecida ya que afecta al funcionamiento correcto de la mitocondria y por tanto a la funcionalidad de la célula hepática. No obstante, es posible conducir a la célula a la utilización de estos ROS obteniendo efectos beneficiosos en la señalización celular, por lo que sería interesante potenciar estos mecanismos de cara a la progresión de esta enfermedad a etapas más graves e irreversibles, así como de cualquier otra relacionada con el aumento del estrés oxidativo.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el papel del retículo endoplasmático y su contribución a la esteatosis hepática, ya que se trata de un punto clave en la síntesis de proteínas y lípidos, por lo que cualquier alteración en su funcionamiento puede desencadenar problemas patológicos graves. Por ello, es necesario potenciar mecanismos que ayuden a proteger su correcta funcionalidad y disminuir el riesgo de estrés.

En lo que respecta a las alteraciones cardiovasculares relacionadas con NAFLD, las más comunes son la disfunción endotelial y la aterosclerosis, ambas estrechamente relacionadas dado que la integridad del endotelio es el factor principal para el desarrollo de placas de ateroma. Un camino a seguir interesante sería el diseño de un tratamiento preventivo que potenciara el crecimiento de EPCs en aquellas personas que presentan factores de riesgo en el desarrollo de aterosclerosis.

En relación a la formación de placas de ateroma se ha observado que las hepatoquinas juegan un papel relevante por lo que un mayor estudio y conocimiento de su regulación podría ser útil a la hora de disminuir las consecuencias de la enfermedad dirigiendo el tratamiento directamente el órgano afectado, es decir, al hígado.

9. CONCLUSIÓN

Para finalizar, comentar de nuevo la importancia de la dieta, ya que es un factor clave en la mejora de la enfermedad. Debido a que se trata de una enfermedad cada vez más común en la población, supondrá en un futuro, un elevado coste económico para el sistema de salud español, por lo que sería interesante concienciar a la población desde instituciones públicas sobre la adopción de dietas equilibradas y ricas en antioxidantes, sirviendo así como hábito preventivo, no sólo de esteatosis hepática sino de muchas otras enfermedades metabólicas.

En cuanto al tratamiento farmacológico, las TZDs no están consideradas como una opción adecuada debido a los efectos secundarios negativos que presentan y la metformina dirigida a la mejora de la resistencia a la insulina no proporciona efectos beneficiosos en las alteraciones específicas del tejido hepático. Por ello, las posibilidades de obtener fármacos más efectivos se centran en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo y que presentan de momento resultados prometedores.

En conclusión, la esteatosis hepática no alcohólica es una enfermedad que afecta cada vez a más personas como consecuencia del cambio en la dieta y ritmo de vida que experimenta la población. Los mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad son complejos y cada vez se establecen nuevas relaciones que conciernen nuevos factores de riesgo. Por todo ello, la investigación y la obtención de nuevas formas de diagnóstico, así como tratamientos específicos y efectivos serán de gran importancia en las próximas décadas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abdelmalek, M.F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R.J., and Diehl, A.M. (2010). Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51, 1961-1971.

Abenavoli, L., and Peta, V. (2014). Role of adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Reviews on recent clinical trials* 9, 134-140.

Anstee, Q.M., Targher, G., and Day, C.P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 10, 330-344.

Aon, M.A., Bhatt, N., and Cortassa, S.C. (2014). Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Frontiers in physiology* 5, 282.

Basaranoglu, M., Basaranoglu, G., Sabuncu, T., and Senturk, H. (2013). Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* : WJG 19, 1166-1172.

Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., and Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 56, 1751-1759.

Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J.A., and Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental gastroenterology* 7, 221-239.

Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in physiology* 4, 95.

Bogdanovic, E., Kraus, N., Patsouris, D., Diao, L., Wang, V., Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2015). Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue augments lipolysis. *Journal of cellular and molecular medicine* 19, 82-91.

Boursier, J., and Diehl, A.M. (2015). Implication of gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS pathogens* 11, e1004559.

- Britton, K.A., and Fox, C.S. (2011). Perivascular adipose tissue and vascular disease. *Clinical lipidology* 6, 79-91.
- Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., and Hobbs, H.H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387-1395.
- Brumbaugh, D.E., and Friedman, J.E. (2014). Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatric research* 75, 140-147.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science (New York, NY)* 332, 1519-1523.
- Chalasan, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., and Sanyal, A.J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55, 2005-2023.
- Cheng, Z., Tseng, Y., and White, M.F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21, 589-598.
- Day, C.P., and James, O.F.W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842-845.
- Dowman, J.K., Tomlinson, J.W., and Newsome, P.N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 103, 71-83.
- Dyson, J., and Day, C. (2014). Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases* 32, 597-604.
- Dyson, J.K., Anstee, Q.M., and McPherson, S. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline gastroenterology* 5, 211-218.
- Eliades, M., and Spyrou, E. (2015). Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World journal of gastroenterology : WJG* 21, 1718-1727.
- Eslamparast, T., Egtesad, S., Hekmatdoost, A., and Poustchi, H. (2013). Probiotics and Nonalcoholic Fatty liver Disease. *Middle East journal of digestive diseases* 5, 129-136.
- Eslamparast, T., Egtesad, S., Poustchi, H., and Hekmatdoost, A. (2015). Recent advances in dietary supplementation, in treating non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology* 7, 204-212.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., and Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51, 679-689.
- Fan, J.G. (2013). Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China. *Journal of gastroenterology and hepatology* 28 Suppl 1, 11-17.
- Ferre, P., and Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2, 83-92.
- Gaggini, M., Morelli, M., Buzzigoli, E., DeFronzo, R.A., Bugianesi, E., and Gastaldelli, A. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients* 5, 1544-1560.
- Galzerano, D., Capogrosso, C., Di Michele, S., Galzerano, A., Paparello, P., Lama, D., and Gaudio, C. (2010). New standards in hypertension and cardiovascular risk management: focus on telmisartan. *Vascular health and risk management* 6, 113-133.
- García-Ruiz, C., Baulies, A., Mari, M., García-Roves, P.M., and Fernandez-Checa, J.C. (2013). Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: cause or consequence? *Free radical research* 47, 854-868.
- García Buey, L., González Mateos, F., and Moreno-Otero, R. (2012). Cirrosis hepática. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 11, 625-633.
- Gaudio, E., Nobili, V., Franchitto, A., Onori, P., and Carpino, G. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Internal and emergency medicine* 7 Suppl 3, S297-305.
- Giby, V.G., and Ajith, T.A. (2014). Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology* 6, 570-579.
- Gitto, S., Vitale, G., Villa, E., and Andreone, P. (2015). Treatment of nonalcoholic steatohepatitis in adults: present and future. *Gastroenterology research and practice* 2015, 732870.
- Grattagliano, I., de Bari, O., Bernardo, T.C., Oliveira, P.J., Wang, D.Q., and Portincasa, P. (2012). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease--from origin to propagation. *Clinical biochemistry* 45, 610-618.
- Gusdon, A.M., Song, K.X., and Qu, S. (2014). Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, 637027.
- Hardy, T., Anstee, Q.M., and Day, C.P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: new treatments. *Current opinion in gastroenterology* 31, 175-183.
- Hennige, A.M., Staiger, H., Wicke, C., Machicao, F., Fritsche, A., Haring, H.U., and Stefan, N. (2008). Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PloS one* 3, e1765.
- Herrera, E.R., P. (2008). Papel del tejido adiposo, sensibilidad insulínica e ingesta lipídica en la gestación y su implicación en el riesgo de padecer diabetes en la edad adulta. In *Desarrollo perinatal : origen de patologías*

- adultas, R.A.d. Farmacia, ed. (Universidad San Pablo - CEU), pp. 205-238.
- Hirose, A., Ono, M., Saibara, T., Nozaki, Y., Masuda, K., Yoshioka, A., Takahashi, M., Akisawa, N., Iwasaki, S., Oben, J.A., *et al.* (2007). Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1375-1381.
- Hotamisligil, G.S., and Erbay, E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 923-934.
- Jung, T.W., Choi, H.Y., Lee, S.Y., Hong, H.C., Yang, S.J., Yoo, H.J., Youn, B.-S., Baik, S.H., and Choi, K.M. (2013a). Salsalate and Adiponectin Improve Palmitate-Induced Insulin Resistance via Inhibition of Selenoprotein P through the AMPK-FOXO1 α Pathway. *PLoS one* 8, e66529.
- Jung, T.W., Youn, B.S., Choi, H.Y., Lee, S.Y., Hong, H.C., Yang, S.J., Yoo, H.J., Kim, B.H., Baik, S.H., and Choi, K.M. (2013b). Salsalate and adiponectin ameliorate hepatic steatosis by inhibition of the hepatokine fetuin-A. *Biochemical pharmacology* 86, 960-969.
- Karbasi-Afshar, R., Saburi, A., and Khedmat, H. (2014). Cardiovascular disorders in the context of non-alcoholic Fatty liver disease: a literature review. *The journal of Tehran Heart Center* 9, 1-8.
- Kasumov, T., Li, L., Li, M., Gulshan, K., Kirwan, J.P., Liu, X., Previs, S., Willard, B., Smith, J.D., and McCullough, A. (2015). Ceramide as a Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Atherosclerosis. *PLoS one* 10, e0126910.
- Kawahara, H., Fukura, M., Tsuchishima, M., and Takase, S. (2007). Mutation of mitochondrial DNA in livers from patients with alcoholic hepatitis and nonalcoholic steatohepatitis. *Alcoholism, clinical and experimental research* 31, S54-60.
- Kazantzis, M., and Stahl, A. (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 852-857.
- Khandekar, M.J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* 11, 886-895.
- Krzysztozek, J., Wierzejska, E., and Zielinska, A. (2015). Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. *Archives of medical science : AMS* 11, 24-33.
- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research* 48, 275-297.
- Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology* 54, 795-809.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & redox signaling* 9, 2277-2293.
- Manousou, P., Kalambokis, G., Grillo, F., Watkins, J., Xirouchakis, E., Pleguezuelo, M., Leandro, G., Arvaniti, V., Germani, G., Patch, D., *et al.* (2011). Serum ferritin is a discriminant marker for both fibrosis and inflammation in histologically proven non-alcoholic fatty liver disease patients. *Liver International* 31, 730-739.
- Marcus, Y., Shefer, G., and Stern, N. (2013). Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. *Molecular and cellular endocrinology* 378, 1-14.
- Mashili, F.L., Austin, R.L., Deshmukh, A.S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J.R., Chibalin, A.V., Moller, D.E., Kharitonkov, A., *et al.* (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes/metabolism research and reviews* 27, 286-297.
- Minemura, M., and Shimizu, Y. (2015). Gut microbiota and liver diseases. *World journal of gastroenterology : WJG* 21, 1691-1702.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.
- Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2009). Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in lipid research* 48, 1-26.
- Nassir, F., and Ibdah, J.A. (2014). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences* 15, 8713-8742.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., *et al.* (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free radical research* 44, 1125-1171.
- Neuman, M.G., French, S.W., French, B.A., Seitz, H.K., Cohen, L.B., Mueller, S., Osna, N.A., Kharbanda, K.K., Seth, D., Bautista, A., *et al.* (2014). Alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *Experimental and molecular pathology* 97, 492-510.
- Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A.M., Hameed, B., *et al.* (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 385, 956-965.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., and Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 92, 272-283.
- Ou, H.Y., Yang, Y.C., Wu, H.T., Wu, J.S., Lu, F.H., and Chang, C.J. (2012). Increased fetuin-A concentrations in

- impaired glucose tolerance with or without nonalcoholic fatty liver disease, but not impaired fasting glucose. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *97*, 4717-4723.
- Papandreou, D., and Andreou, E. (2015). Role of diet on non-alcoholic fatty liver disease: An updated narrative review. *World journal of hepatology* *7*, 575-582.
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* *20*, 14205-14218.
- Parekh, S., and Anania, F.A. (2007). Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *132*, 2191-2207.
- Paschos, P., and Tziomalos, K. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease and the renin-angiotensin system: Implications for treatment. *World journal of hepatology* *4*, 327-331.
- Passos, E., Ascensao, A., Martins, M.J., and Magalhaes, J. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. *Metabolism: clinical and experimental*.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation* *118*, 829-838.
- Ramadori, P., Kroy, D., and Streetz, K.L. (2015). Immunoregulation by lipids during the development of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary surgery and nutrition* *4*, 11-23.
- Ratziu, V., Giral, P., Jacqueminet, S., Charlotte, F., Hartemann-Heurtier, A., Serfaty, L., Podevin, P., Lacorte, J.M., Bernhardt, C., Bruckert, E., *et al.* (2008). Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* *135*, 100-110.
- Ratziu, V., Sheikh, M.Y., Sanyal, A.J., Lim, J.K., Conjeevaram, H., Chalasani, N., Abdelmalek, M., Bakken, A., Renou, C., Palmer, M., *et al.* (2012). A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study of GS-9450 in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *55*, 419-428.
- Rotman, Y., Koh, C., Zmuda, J.M., Kleiner, D.E., and Liang, T.J. (2010). The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *52*, 894-903.
- Samuel, V.T., Liu, Z.-X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X.-m., Monia, B.P., Bhanot, S., and Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 739-745.
- Scorletti, E., and Byrne, C.D. (2013). Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of nutrition* *33*, 231-248.
- Schrauwen, P., Schrauwen-Hinderling, V., Hoeks, J., and Hesselink, M.K. (2010). Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta* *1801*, 266-271.
- Schwenzer, N.F., Springer, F., Schraml, C., Stefan, N., Machann, J., and Schick, F. (2009). Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *Journal of hepatology* *51*, 433-445.
- Sharma, M., Mitnala, S., Vishnubhotla, R.K., Mukherjee, R., Reddy, D.N., and Rao, P.N. (2015). The Riddle of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Progression From Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of clinical and experimental hepatology*.
- Shaw, R.J. (2013). Metformin trims fats to restore insulin sensitivity. *Nat Med* *19*, 1570-1572.
- Siegel-Axel, D.I., Ullrich, S., Stefan, N., Rittig, K., Gerst, F., Klingler, C., Schmidt, U., Schreiner, B., Randrianarisoa, E., Schaller, H.E., *et al.* (2014). Fetuin-A influences vascular cell growth and production of proinflammatory and angiogenic proteins by human perivascular fat cells. *Diabetologia* *57*, 1057-1066.
- Staels, B., Rubenstrunk, A., Noel, B., Rigou, G., Delataille, P., Millatt, L.J., Baron, M., Lucas, A., Tailleux, A., Hum, D.W., *et al.* (2013). Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *58*, 1941-1952.
- Stojšavljević, S., Gomerčić Pačič, M., Virović Jukić, L., Smirčić Duvnjak, L., and Duvnjak, M. (2014). Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* *20*, 18070-18091.
- Takahashi, Y., and Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* *20*, 15539-15548.
- Takahashi, Y., Sugimoto, K., Inui, H., and Fukusato, T. (2015). Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* *21*, 3777-3785.
- Tarantino, G., and Finelli, C. (2013). Pathogenesis of hepatic steatosis: the link between hypercortisolism and non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* *19*, 6735-6743.
- Targher, G., Chonchol, M., Miele, L., Zoppini, G., Pichiri, I., and Muggeo, M. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease

as a contributor to hypercoagulation and thrombophilia in the metabolic syndrome. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 35, 277-287.

Tetri, L.H., Basaranoglu, M., Brunt, E.M., Yerian, L.M., and Neuschwander-Tetri, B.A. (2008). Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 295, G987-995.

Than, N.N., and Newsome, P.N. (2015). A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 239, 192-202.

Tilg, H., and Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836-1846.

Towfighi, A., and Ovbiagele, B. (2008). Partial Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist Angiotensin Receptor Blockers. *Cerebrovascular Diseases* 26, 106-112.

Trautwein, C., Friedman, S.L., Schuppan, D., and Pinzani, M. (2015). Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *Journal of hepatology* 62, S15-S24.

Tsochatzis, E., Papatheodoridis, G.V., and Archimandritis, A.J. (2006). The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *The American journal of gastroenterology* 101, 2629-2640.

Vaidya, A., Williams, J.S., and Forman, J.P. (2012). The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. *Obesity* 20, 186-191.

Valenzuela, R., Espinosa, A., Gonzalez-Manan, D., D'Espessailles, A., Fernandez, V., Videla, L.A., and Tapia, G. (2012). N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PloS one* 7, e46400.

Villanova, N., Moscatiello, S., Ramilli, S., Bugianesi, E., Magalotti, D., Vanni, E., Zoli, M., and Marchesini, G. (2005). Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42, 473-480.

Voet, D., and Voet, J.G. (2006). *Bioquímica*, 3rd edn (Médica panamericana).

Wang, C.W., Lin, H.Y., Shin, S.J., Yu, M.L., Lin, Z.Y., Dai, C.Y., Huang, J.F., Chen, S.C., Li, S.S., and Chuang, W.L. (2011). The PNPLA3 I148M polymorphism is associated with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in a normoglycaemic population. *Liver international* :

official journal of the International Association for the Study of the Liver 31, 1326-1331.

Wei, Y., Rector, R.S., Thyfault, J.P., and Ibdah, J.A. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World journal of gastroenterology : WJG* 14, 193-199.

Weiss, J., Rau, M., and Geier, A. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Deutsches Arzteblatt international* 111, 447-452.

Yamaguchi, K., Itoh, Y., Yokomizo, C., Nishimura, T., Niimi, T., Fujii, H., Okanoue, T., and Yoshikawa, T. (2010). Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 1169-1178.

Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A.J., Hannun, Y.A., and Samad, F. (2009). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 297, E211-224.

Yessoufou, A., and Wahli, W. (2010). Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss medical weekly* 140, w13071.

Yilmaz, Y. (2012). Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Alimentary pharmacology & therapeutics* 36, 815-823.

Yoo, H.J., and Choi, K.M. (2015). Hepatokines as a Link between Obesity and Cardiovascular Diseases. *Diabetes & metabolism journal* 39, 10-15.

Yoon, H.J., and Cha, B.S. (2014). Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology* 6, 800-811.

Zambo, V., Simon-Szabo, L., Szelenyi, P., Kereszturi, E., Banhegyi, G., and Csala, M. (2013). Lipotoxicity in the liver. *World journal of hepatology* 5, 550-557.

Zhang, X.-Q., Xu, C.-F., Yu, C.-H., Chen, W.-X., and Li, Y.-M. (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 20, 1768-1776.