



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**LAS CIENCIAS “ÓMICAS” APLICADAS AL ESTUDIO DEL
HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO**

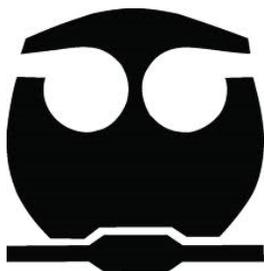
TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FRANCISCO CUAUHTÉMOC MARTÍNEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, CDMX

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Ruth Bustamante García**
VOCAL: **Profesor: Hugo Antonio Hernández Pérez**
SECRETARIO: **Profesor: Alberto García Lozano**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Edgar Ricardo Vázquez Martínez**
2° SUPLENTE: **Profesor: Bárbara Itzel Peña Espinoza**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: DR. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

SUSTENTANTE (S): FRANCISCO CUAUHTÉMOC MARTÍNEZ SÁNCHEZ

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	10
METODOLOGÍA	11
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	12
a) DEFINICIÓN	12
b) PREVALENCIA	15
c) ETIOLOGIA	18
1.1 Hipótesis de “doble impacto” (Day & James, 1998)	21
1.2 Hipótesis de lipotoxicidad	25
1.3 Fisiopatología	28
1.4 Influencia de la microbiota intestinal: eje intestino-hígado.	30
CAPÍTULO II: LA GENÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA	39
2.1 Epigenética de la EHGNA:	46
2.1.1 Metilaciones de histonas:	47
2.1.2 Metilación del ADN:	48
CAPÍTULO III: LA TRANSCRIPTÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA	52
3.1 miARN:	57
CAPÍTULO IV: LA PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA	63
CAPÍTULO V: LA METABOLÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA	83
CAPÍTULO VI: BIOLOGÍA DE SISTEMAS	92
ANEXOS	98
GLOSARIO DE TÉRMINOS	100
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	101
BIBLIOGRAFÍA	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Mutaciones de relevancia en EHGNA con sus respectivos genes y funciones Tomada de Buch, et al., 2015.	43
Tabla 3.1. Genes sobre expresados en EHGNA.	54
	60
Tabla 3.2. Asociación de miRNA específicos con el desarrollo y progresión de EHGNA en humanos.	60
Tabla 4.1. Proteínas desreguladas con diferencia significativa en pacientes con EHGNA vs. sanos.	64
Tabla 4.2. Factores de transcripción diferencialmente expresados.	70
Tabla 5.1. Estudios metabolómicos y lipidómicos para el diagnóstico de EHGNA.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la progresión en la EHGNA.	14
Figura 1.1. Comorbilidades que se encuentran presentes en EHGNA.	18
Figura 1.2. Metabolismo de la fructosa.	19
Figura 1.3. Diferencias metabólicas entre la glucosa y fructosa.	21
Figura 1.4. Mecanismo de teoría de doble impacto.	25
Figura 1.5. Lesión lipotóxica de patogénesis de EHNA.	27
Figura 1.6. Mecanismos de daño celular de las dos vías.	28
Figura 1.10. Relación entre EHNA en la biopsia hepática y la abundancia de <i>Bacteroides</i> o <i>Prevotella</i> en el intestino.	33
Figura 1.7. Dieta rica en grasas y resistencia a la insulina.	35
Figura 1.8. Mecanismo de FXR.	36
Figura 1.9. Mecanismos que relacionan la microbiota intestinal con el metabolismo de los lípidos y las condiciones fisiopatológicas asociadas con la dislipidemia.	38
Figura 2.1. Función de PNPLA3.	41
Figura 2.2. Función de TM6SF	42
Figura 3.1. Metabolismo intracelular del retinol (vitamina A) en el hígado.	56
Figura 3.2. miRNAs que rigen el metabolismo de la glucosa/lípidos y las vías inducidas por el estrés en el hígado.	59
Figura 3.3. Modelo de funcionamiento de SREBP y miR-33.	62
Figura 4.1. Reorganización subcelular y alteración de la secreción de OL en EHGNA	66
Figura 4.2. Proteómica de cuantificación de hígados de ratones alimentados con DRG y dieta normal	68
Figura 4.3. Análisis bioinformático de los PED que reveló los FT relacionados con la disfunción metabólica.	69
Figura 4.4. Localización subcelular de las 220 proteínas expresadas diferencialmente.	73
Figura 4.5. Vía compuesta de IL-10, ASK1.	75
Figura 4.6. Comparación del contenido de TAG en el hígado de ratones con diferentes tipos de dieta.	76
Figura 4.7. La expresión proteica relativa de PLIN2, LPIN1, FDPS y GSTA1 en el hígado	78

Figura 4.8. Número de OL en hígados presentado en función del tamaño de las OL.	80
Figura 4.9. Área promedio de OL que destaca una reducción en el área de OL más grandes en ratones SDC4 frente a Control.	80
Figura 4.10. Contenido de triacilglicéridos hepáticos.	81
Figura 5.1. Alteraciones en el perfil lipidómico relacionadas con la fisiopatología de EHGNA.	86
Figura 5.2. Mapa de sistemas metabólicos.	88
Figura 6.1 Descripción general de las modificaciones ómicas en la patogénesis de EHGNA y su papel potencial como biomarcadores de diagnóstico.	94
Figura 6.2. Direcciones futuras en la era del diagnóstico no invasivo de EHGNA mediante la integración de grandes datos “ómicos” con información e imágenes clínicas	96
Figura A.2.	99

RESUMEN

La obesidad es un problema que se ha convertido rápidamente en una patología de gran importancia. Actualmente en México existe un aumento del 39.1% del sobrepeso en la población adulta (Secretaría de Salud, 2019) y un 36.1% de la población con obesidad; en datos de obesidad infantil poseemos el 1^{er} lugar a nivel mundial. Esta patología trae consigo una enfermedad que ha tomado gran importancia en estos últimos años como lo es Diabetes Mellitus tipo 2 la cual ha tenido un aumento en la cantidad de persona que sufren este padecimiento, llegando a la cantidad de 8.6 millones de adultos jóvenes que lo padecen.

A este trastorno se le ha asociado otras comorbilidades, que aumentan su probabilidad de padecerlo, como son problemas cardiovasculares (dislipidemias), síndrome metabólico que forman parte de factores de riesgo que pueden ser modificables (dieta, genética, tabaquismo, alcoholismo) y a una disminuida actividad física.

Otra de las grandes enfermedades que han venido en aumento es la hipertensión arterial y que poco a poco se ha estado presentando en la población que se encuentra en el rango de edad de: 18 – 35 años (adulto joven). Se conoce que cerca de 15 millones de mexicanos viven con hipertensión y más del 50% de ellos no sigue un tratamiento para atender esta enfermedad siendo considerada por la OMS la primera causa de muerte mundial.

El Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) es una de las causas más comunes de cirrosis, falla hepática y cáncer de hígado en todo el mundo. Es una entidad clínico-patológica compleja que surge de numerosos factores genéticos, ambientales, de comportamiento, así como de origen social, que se define como una acumulación excesiva de grasa en el hígado en forma de triacilglicéridos denominada esteatosis (histológicamente definida como una infiltración >5% de triacilgliceridos en los hepatocitos) y comprende el Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) y la esteatohepatitis no alcohólica. El HGNA en personas con Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 30 (obesidad) tiene una incidencia que ronda el 98%. Patológicamente el HGNA puede

conservarse en una simple esteatosis o convertirse en algo más maligno siendo una esteatosis hepática donde se puede progresar a una cirrosis o, en su transcurso convertirse en un hepatocarcinoma que es el punto más grave de esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) comprende una serie de lesiones hepáticas histológicamente similares a las inducidas por el alcohol (inflamación hepática generalizada, hepatocitos dañados con citoplasma granular, gran acumulación de lípidos en el hepatocito) en personas con un consumo muy escaso, el cual según R. Bernal-Reyes, 2019 lo indica como un consumo mayor de 30 g/día en hombres y 20 g/día en mujeres, por otra parte Nwe Ni Than, 2015 lo define como un consumo menor a 168 g/día en hombres y 112 g/día en mujeres y Javier Mora, 2018 lo refiere como el consumo menor de 20 g/día en ambos sexos. Se define como una acumulación excesiva de grasa en el hígado en forma de triglicéridos denominada esteatosis (histológicamente infiltración >5% de triacilglicéridos en los hepatocitos) y comprende el Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) y la Esteatohepatitis No Alcohólica (EHNA) (IMSS, 2014).

Para definir a un paciente con esteatosis hepática se requiere la evidencia ya sea por imagen o por histología, además de la exclusión de causas secundarias de acumulación de grasa hepática como el consumo significativo de alcohol (entre 20 – 160 g/día en hombres y 20 – 110 g/día en mujeres), fármacos, pérdida acelerada de peso y otras enfermedades hepáticas específicas. La EHGNA puede ser definida de manera coloquial por las características colectivas de obesidad, diabetes, resistencia a la insulina y dislipidemia, siendo las causas más comunes de enfermedad hepática crónica en occidente. Este dato es relevante entre individuos obesos, donde su incidencia puede llegar al 98%. Patológicamente, la EHGNA comprende un espectro completo de afecciones hepáticas que van desde esteatosis relativamente benigna y simple hasta la enfermedad más agresiva como la esteatohepatitis no alcohólica. La EHNA a menudo puede progresar a cirrosis y, a su vez, predispone a hepatocarcinoma. De esto se puede deducir que una pequeña proporción de pacientes con EHNA eventualmente desarrollará cirrosis (35 - 47%) y progresará a hepatocarcinoma (6 – 7%); la creciente incidencia de obesidad acoplada con síndrome metabólico indica que una gran proporción de la población general es susceptible a EHNA o hepatocarcinoma asociado a EHNA.

La incidencia de esteatosis y su progresión a esteatohepatitis varía entre distintos grupos étnicos, siendo la población latina (principalmente Mexicoamericana) la que presenta la mayor prevalencia de esteatosis (58% vs. 44% en caucásicos) así como la progresión a esteatohepatitis (19% vs. 9% en caucásicos) (Santos, 2016). Clarence Gill (2017) demostró que la EHGNA se encuentra presente en cerca el 49.2% de sus participantes de los cuales el 42.2% eran pacientes masculinos y 57.8% pacientes femeninos. Estos pacientes con EHGNA demostraron una prevalencia del 70.1% de un síndrome metabólico comparado con aquellos que no tienen EHGNA, en los cuales la prevalencia fue del 38.5%. Estos estudios han demostrado que la prevalencia de HGNA en jóvenes mexicoamericanos incrementa los riesgos de aterosclerosis haciéndola una enfermedad de riesgo poblacional la cual incrementa anualmente con el aumento de las comorbilidades.

Brea (2017) señala que la importancia de la EHGNA radica en su alta prevalencia en nuestras sociedades occidentales y, desde el punto de vista hepático, en su progresiva evolución desde esteatosis a esteatohepatitis, cirrosis y cáncer de hígado. Durante la última década se ha observado que la EHGNA da lugar a un incremento del riesgo cardiovascular donde se ve acelerada la arteriosclerosis de las enfermedades cardiovasculares lo que conlleva a su principal causa de morbimortalidad.

Los avances significativos en la tecnología “ómica” y en el análisis de datos nos han proporcionado información importante sobre la fisiopatología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento de la EHGNA contribuyendo a la creación de modelos para el diagnóstico y estadificación de la enfermedad donde se ha conseguido posibles dianas terapéuticas. Ciertas “ómicas” han dado un enfoque amplio donde su aplicación se ha usado para identificar pacientes con alto riesgo (genómica) de padecerla, poder evaluar el efecto de los tratamientos en mecanismos fisiopatológicos clave (transcriptómica) o para desarrollar herramientas de diagnóstico no invasivas (metabolómica).

Aún hay desafíos considerables que deben superarse para aumentar los beneficios y la reproducibilidad de los resultados derivados del uso de estas tecnologías en la investigación de EHGNA:

a) Aspectos técnicos: el estudio en la mayoría de los procedimientos “ómicos” logra proporcionar resultados que son relativos y no absolutos para los parámetros medidos. Estos resultados relativos derivan a menudo después de la normalización al indicio de la existencia de síndrome metabólico. El ruido de fondo, la calidad de la muestra, las diferencias en las capacidades entre las máquinas de espectrometría de masas y el nivel de confianza en la identificación de las especies químicas investigadas (lípidos, proteínas, etc.) pueden tener un impacto importante en las concentraciones relativas finales y poner en peligro la reproducibilidad de los resultados, especialmente al validar herramientas de diagnóstico no invasivas basadas en las “ómicas”.

b) Diseño del estudio - Aspectos clínicos: algunos aspectos metodológicos relacionados con el diseño del estudio logran tener un impacto significativo en la interpretación de los resultados de las “ómicas”, principalmente en el desarrollo de pruebas no invasivas. Por ejemplo, un modelo de diagnóstico realizado en una población de pacientes de una clínica del hígado, la cual tiene una alta prevalencia de fibrosis avanzada, puede no funcionar de manera correcta usándose en población general donde la fibrosis avanzada es menos común. Además, la mayoría de los estudios “ómicos” se han realizado hasta el momento en poblaciones pequeñas o en cohortes con excluyentes específicos. Por lo tanto, estos modelos a menudo no tienen en cuenta la heterogeneidad de la población, lo cual es crucial para la precisión de todos los paneles de diagnóstico no invasivos. Esto se ha demostrado repetidamente en estudios que se centraron en pacientes con sobrepeso, obesidad y especialmente con DM-2. Se evaluaron varios y diversos paneles de biomarcadores (incluidos SteatoTest, ActiTest, NashTest-2, cytokeratin-18, FibroTest, OWLiver tests), pero ninguno de ellos demostró un rendimiento óptimo para diagnosticar EHNA, especialmente en pacientes con DM-2 (Bril, et al., 2018) (Bril, et al., 2020).

c) Muy pocas pruebas han sido evaluadas con visión de futuro: es un paso muy importante, donde otros algoritmos que son más “simples” o algunos en modalidad de imágenes no han podido atravesar (Bril, Barb, Lomonaco, Lai, & K., 2020). También, dependiendo de su mecanismo de función, los medicamentos pueden tener diferentes

niveles de impacto en el perfil metabólico en el hígado, lo que puede afectar el metaboloma circulante y su capacidad para reflejar el estadio de la enfermedad.

En conjunto, los modelos de diagnóstico basados en las “ómicas” aún no han logrado alcanzar niveles excepcionales de rendimiento, mientras que los estudios cuyos resultados han sido satisfactorios deben analizarse con cautela y validarse repetidamente en cohortes grandes de pacientes, tanto de manera transversal como prospectiva.

Conforme se analizaron los estudios relacionados con estas ciencias “ómicas” se dio un enfoque donde, en primer lugar, se pueda desarrollar modelos no invasivos que sean capaces de identificar a aquellos pacientes que tienen más probabilidades de padecer o no padecer EHNA en la selección con biopsia hepática del ensayo clínico, acelerando así el reclutamiento del estudio. Sin embargo, el objetivo final sigue siendo poder reemplazar la biopsia hepática con pruebas diagnósticas no invasivas altamente precisas y específicas tanto en ensayos clínicos como, en un futuro próximo, en la rutina clínica diaria para poder incluir y establecer la importancia de esta patología en la población mundial y, sobre todo, mexicana al conocer los datos donde nos colocan como primer lugar en obesidad infantil.

OBJETIVOS

➤ General.

Revisar la literatura científica referente al estudio del Hígado Graso No Alcohólico relacionada con su epidemiología, diagnóstico, tratamiento y enfoques empleados para su estudio. Se centrará el trabajo en la aplicación de las ciencias “ómicas” para el estudio de este padecimiento.

➤ Particulares.

Establecer la importancia de esta patología en la población mundial y mexicana.

Realizar un análisis del Hígado Graso No Alcohólico con las comorbilidades asociadas y/o síndrome metabólico que se ven asociados a modificaciones epigenéticas, generando cambios fenotípicos, que están reportadas en la literatura.

Analizar los estudios relacionados con las ciencias “ómicas” enfocados al Hígado Graso No Alcohólico.

METODOLOGÍA

Este trabajo es una revisión de la literatura especializada en EHGNA, realizada principalmente durante el periodo 2015 – 2023, considerando que pueda incluirse información relevante publicado en años anteriores. La consulta de la información se realizó en diversas bases de datos científicas como son PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), ELSEVIER (<https://www.elsevier.com/es-mx>), Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>), y bibliotecas digitales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La búsqueda en las bases de datos se realizó utilizando los siguientes términos: hígado graso, enfermedad del hígado graso no alcohólico, ciencias “ómicas” en el hígado graso, técnicas de estudio del hígado graso, genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica en el hígado graso no alcohólico. Estos términos también se pudieron emplear en idioma inglés. Los resultados obtenidos se analizaron y seleccionaron para conformar el documento.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

a) DEFINICIÓN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una enfermedad frecuente y que puede progresar a un daño crónico, que comparte muchos elementos del síndrome metabólico (SM) el cual, es una entidad clínica caracterizada por la asociación de varias enfermedades vinculadas a través de la resistencia a la insulina.

Para poder diagnosticar SM en un individuo se requiere que el individuo tenga al menos 3 de 5 condiciones que podían ocurrir por sí solas, pero tienden a ocurrir juntas (National Heart, 2021):

- Obesidad abdominal (diámetro abdominal mayor a 90 cm en mujeres y 102 cm en hombres)
- Nivel alto de triacilglicéridos (>150 mg/dL)
- Nivel bajo de colesterol HDL (<50 mg/dL en mujeres y menor a 40 mg/dL en hombres)
- Presión arterial alta (mayor a 130/85 mmHg)
- Nivel alto de glucosa en sangre en ayunas (>100 mg/dL)

Las personas que tienen estos parámetros anormales son más propensas a padecer enfermedades del sistema circulatorio, infartos cerebrales y del corazón, así como afecciones crónico-degenerativas, tales como la EHGNA y sus complicaciones.

Por otro lado, la acumulación de triacilglicerol (TAG) dentro del hígado proviene de tres fuentes: 59% de los ácidos grasos libres circulantes (AGL); 26% de lipogénesis *de novo* (LDN); y el 14% de la dieta (Schwarz J.-M., 2003). Los AGL que ingresan a la circulación portal experimentan uno de tres destinos: la β -oxidación, re-esterificación a TAG y su exportación como VLDL (lipoproteína de muy baja densidad); o la re-esterificación y su almacenamiento dentro del hígado. La LDN, es el proceso mediante el cual los carbohidratos se convierten en lípidos, también

contribuye a la acumulación de lípidos en el hígado. La LDN aumenta en estados de hiperinsulinemia como la resistencia a la insulina induciendo a una mayor acumulación de TAG en el hígado. Esta acumulación de TAG junto con el conjunto de comorbilidades del síndrome metabólico da progreso a la EHNA donde el hígado empieza a tener una infiltración mayor del 5% de TAG ya mencionada para presentar un empeoramiento y progresión a una fibrosis donde el hepatocito acumula colágeno por el polimorfismo en PNPLA3 I148M el cual se ha visto relacionado a favorecer la progresión de la EHGNA y la fibrosis hepática (Yu, 2018).

El escenario clínico-patológico es similar al observado en la lesión hepática inducida por alcohol; sin embargo, ocurre en sujetos sin antecedentes de uso o abuso de alcohol. En la actualidad es un padecimiento que se presenta con mayor frecuencia y puede progresar a etapas más graves e incluso mortales (**Figura 1**) (Yu, 2018).

Se considera como Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) y esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) a una acumulación excesiva de grasa en el hígado en forma de triacilglicéridos; histológicamente es una infiltración >5% de triacilgliceridos del volumen total de los hepatocitos (IMSS, 2014).

La EHGNA ha sido aceptada como una entidad patológica en los últimos años del siglo XX. Esta enfermedad ha tomado un papel muy importante mundialmente al ser considerada una enfermedad silenciosa que avanza hasta ser detectada en, posiblemente, un punto grave teniendo como compañera la cirrosis criptogénica la cual se define como una cirrosis de etiología desconocida a pesar de un extenso estudio clínico, de laboratorio y patológico y constituye aproximadamente del 5 al 10% de todos los casos de cirrosis (Nalbantoglu & Jain, 2019).

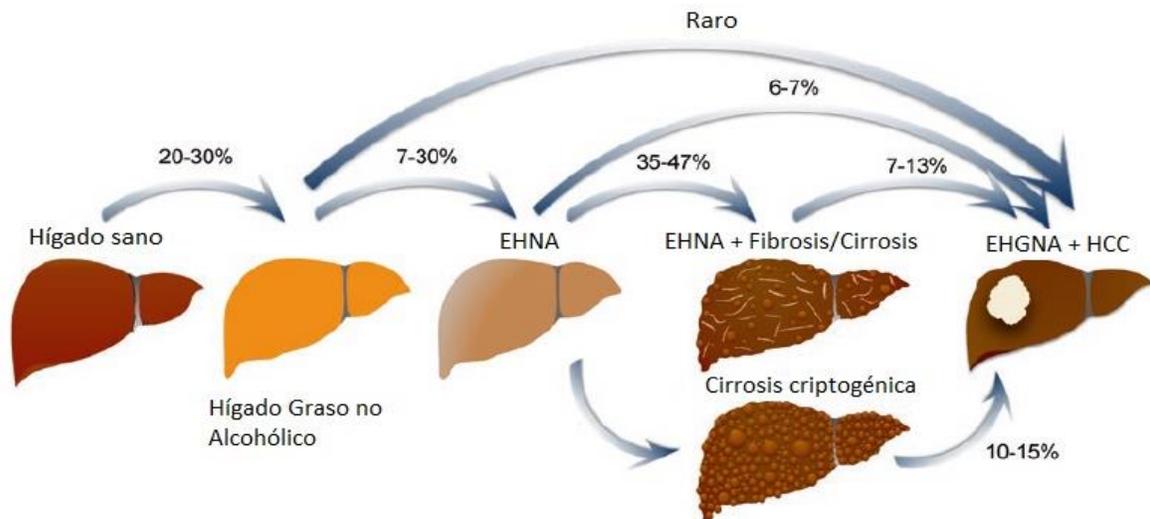


Figura 1. Representación esquemática de la progresión en la EHGNA. Se observa que el camino natural de la enfermedad principia por una acumulación de grasa hasta obtener en el 5% del volumen total de hepatocitos una infiltración de TAG. Esta infiltración conlleva a EHNA donde lo más común es progresar a una fibrosis. El contraer hepatocarcinoma por hígado graso no alcohólico es extremadamente raro por lo que existe mayor probabilidad de que progrese a una fibrosis o cirrosis. Aunque EHGNA proviene en la mitad de los casos de cirrosis criptogénica, existen una gran proporción de pacientes con cirrosis donde no se conoce si son asociados a la EHGNA. Modificado de Yu, 2018.

Actualmente los expertos llegaron a un consenso de que la EHGNA no refleja el conocimiento actual ni el metabolismo (disfunción) asociado a la enfermedad del hígado graso, se sugirió como un término más apropiado y general “Hígado Graso Asociado a Disfunción Metabólica”. Dado que el término EHGNA fue acuñado por Ludwig en 1980 para describir la enfermedad del hígado graso que surge en ausencia de una ingesta de cantidad significativa de alcohol, la nomenclatura y los criterios para un diagnóstico no se han revisado. Para evaluar mejor la conciencia del médico, la percepción de la severidad de esta enfermedad, los patrones de práctica para el diagnóstico y manejo de EHGNA y EHNA se realizó una encuesta donde la conclusión, tanto para los médicos como para los pacientes es que ambos subestiman la gravedad de la enfermedad del hígado graso (Fouad, Goma, Semida, Ghany, & Attia, 2020).

Hay una falta sustancial de conocimiento sobre las diferencias entre EHGNA y EHNA y, aunque se está diagnosticando a pacientes con EHGNA/EHNA estos son gestionados y atendidos a menudo fuera de las recomendaciones de directrices actuales.

El cambio de EHGNA a “Hígado Graso Asociado a Disfunción Metabólica” parece aumentar la concienciación entre los médicos y pacientes. (Fouad, Gomaa, Semida, Ghany, & Attia, 2020).

Esto abre la puerta a los esfuerzos de la comunidad científica para actualizar la nomenclatura y sub-fenotipo de la enfermedad con el fin de acelerar el camino de traslación hacia nuevos tratamientos (M., Sanyal, George, & Panel., 2020)

b) PREVALENCIA

La EHGNA es la enfermedad hepática más común en los países de Occidente, con una prevalencia mundial reportada del 6-35%. La incidencia de cirrosis y EHNA están en aumento y, actualmente, es la segunda causa de trasplante hepático en Estados Unidos dónde se ha tenido un incremento del 170% entre 2004 y 2013 (Bellentani, 2017).

Se ha reportado que la prevalencia más alta de EHGNA se encuentra en Medio Oriente con un 31.79% y en América del Sur con un 30.45%; y la más baja se reporta en África con un 13.48% (Bellentani, 2017).

La región de Asia y el Pacífico alberga a más de la mitad de la población mundial con EHGNA representando del 62 al 66% de las muertes mundiales por enfermedades hepáticas en 2015, donde el 54% de estas muertes son ocasionadas por cirrosis de las cuales del 72 al 77% de ellas son debido al carcinoma hepatocelular. Además, la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) causó más de la mitad de las muertes por cirrosis en la región, seguida por aquellas ocasionadas a consecuencia del consumo de alcohol (20.8%), enfermedad del hígado graso no alcohólico (12,1%) e infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC; 15.7%) (Sarin, et al, 2020). Aunque la EHGNA se ha considerado un problema sólo en los países occidentales, varios estudios asiáticos han informado de un aumento en su prevalencia (Méndez-Sánchez et al., 2018). La creciente prevalencia de EHGNA en Asia se debe, como se ha mencionado anteriormente, a la tendencia creciente de la obesidad en este continente, por lo que se ha informado que la prevalencia actual de EHNA en Asia es de alrededor del 25% al 30% (Méndez-Sánchez, et al, 2018). Shanghai, Hong Kong y China central son las

ciudades con las tasas de prevalencia más altas de EHGNA con un 38.17%, 28.8% y 245%, respectivamente (Wei et al., 2015). Estos datos son alarmantes debido a que es evidente que la obesidad y las enfermedades relacionadas se están convirtiendo en un problema grave a nivel mundial.

La prevalencia de la EHGNA en Europa se encuentra entre el 20 y el 30%, siendo notable el aumento debido al incremento de la obesidad en las últimas cuatro décadas en un 23.7% (Pimpin, et al, 2018)

Como los datos indican la EHGNA afecta a casi un tercio de la población mundial, México es uno de los países cuya población tiene varios factores de riesgo asociados a este padecimiento y su prevalencia podría superar el 50%. Según Méndez-Sánchez et al., 2018 la prevalencia mundial actual de EHGNA es del 59.1%. En México, se cuentan con pocos estudios que evalúen la prevalencia de EHGNA, por lo que no se conoce con exactitud. Históricamente en el año 2006 Lizardi y Cols. realizaron un análisis de 2503 expedientes clínicos (1843 hombres y 660 mujeres) en un rango de edad de entre 15 y los 80 años, durante un periodo de tiempo comprendido de enero/1999 a agosto/2002. Durante este estudio se encontró una prevalencia de 14.3% de EHGNA en población asintomática mexicana, de los cuales 84.12% eran hombres y 15.87% eran mujeres. Posteriormente, en el año 2012, un grupo de investigadores encontró que la prevalencia de EHGNA en población mexicana (193 participantes de los cuales fueron 122 hombres y 71 mujeres) que padecían síndrome metabólico fue de 82.9%, prevalencia que es mayor también en hombres (89.9%) que en mujeres (76.1%) (Castro-Martínez, et al. 2012). Otro reporte sobre población mexicana reciente demostró una prevalencia de esteatosis hepática del 49.19% en la población general (Briseño P, et al. 2018).

Como se ha mencionado anteriormente la EHGNA se encuentra asociada a diversas comorbilidades metabólicas que se incluyen a continuación, con su porcentaje de mayor prevalencia en esta enfermedad:

- Dislipidemia (69.16%), al estar caracterizada por TAG elevados aumenta la infiltración de ellos en los hepatocitos dando paso a una acumulación de grasa en el hígado (Mikhailidis, N. & Mantzoros, 2016).
- Obesidad (51.34%), la cual refleja un estado proinflamatorio generalizado con alto riesgo de comorbilidades metabólicas que están muy influenciadas por la distribución del tejido adiposo. Esto podría implicar un aumento de la secreción de citosinas y adipocinas pro-inflamatorias por parte del tejido adiposo visceral y la liberación de AGL en el sistema portal y la circulación sistémica, lo que causa dislipidemia y resistencia a la insulina sistémica (Milić, Lulić, & Štimac, 2014)
- Síndrome Metabólico (42.54%), su presencia predice un mayor riesgo de desarrollo de la EHGNA en ambos sexos, haciendo improbable la regresión de infiltración de grasa al hígado y facilitando la progresión hacia esteatohepatitis y cirrosis (Brea & Puzo, 2010).
- Hipertensión arterial (39.34%), existe un vínculo fisiopatológico entre las principales enfermedades cardiovasculares y anomalías metabólicas asociadas con la esteatosis hepática y la rigidez de la pared arterial. Este vínculo se podría explicar por la generación de especies reactivas de oxígeno en relación con los AGL en los hepatocitos, lo que conduce a la peroxidación de lípidos, producción de citocinas y activación de vías inflamatorias que conllevan a respuestas oxidativo-inflamatorias en la pared arterial (YC, et al, 2013).
- Diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (22.51%), la diabetes y la EHGNA son factores de riesgo recíprocos y, cuando se presentan juntos, aumenta la probabilidad de desarrollar complicaciones en la diabetes y aumenta el riesgo de la EHGNA de progresar a patologías como la cirrosis y el hepatocarcinoma (Hazlehurst, Woods, Marjot, Cobbold, & Tomlinson, 2016).

En los últimos 10 años se ha identificado a la EHGNA como una enfermedad multisistémica que afecta una gran cantidad de órganos que generan enfermedades como la Diabetes Mellitus (DM) y la enfermedad cardiovascular (ECV), entre otras. Se ha reportado que más del 76% de los pacientes con DM-2 tienen EHGNA (Younossi Z, et al. 2016) (**Figura 1.1**).

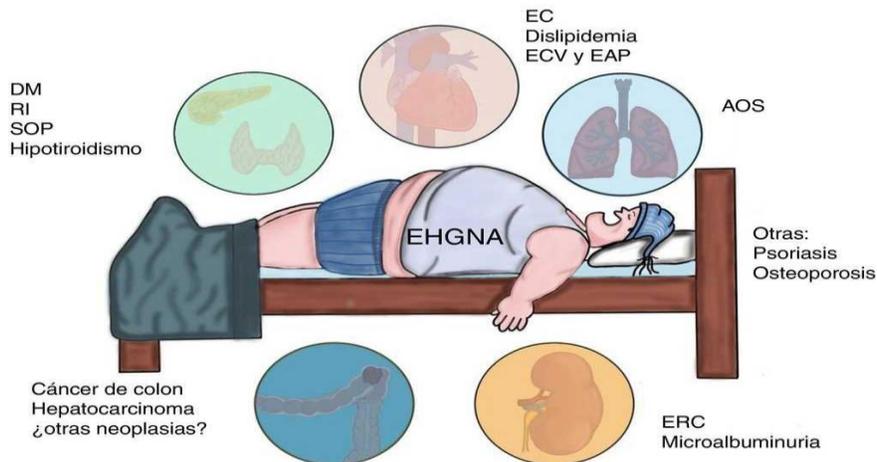


Figura 1.1. Comorbilidades que se encuentran presentes en EHGNA. Se observa el ejemplo de un paciente con EHGNA, el cual presenta un conjunto de comorbilidades que aumentan la probabilidad de padecer EHGNA. En los últimos años se han encontrado algunas enfermedades que no se tenían consideradas dentro de la prevalencia de EHGNA como son la psoriasis y la osteoporosis. Tomada de Lizardi-Cervera, Becerra, Chávez-Tapia, Ramos, & Uribe, 2006.

AOS: apnea obstructiva del sueño; **DM:** diabetes mellitus; **EAP:** enfermedad arterial periférica; **CE:** enfermedad coronaria; **ECV:** enfermedad cardiovascular; **ERC:** enfermedad renal crónica; **RI:** resistencia una la insulina; **SOP:** síndrome de ovario poliquístico.

c) ETIOLOGIA

Los "estilos de vida" actuales han hecho que muchos de los padecimientos sean universales, entre ellos la esteatohepatitis no alcohólica que se relaciona estrechamente con los hábitos alimenticios, la composición de los alimentos y la poca actividad física. Esta relación se debe a que los alimentos consumidos en los últimos años por la población tienen un alto contenido energético proveniente de carbohidratos (generalmente fructosa). Durante el consumo excesivo y sostenido de fructosa, la tasa de absorción aumenta haciendo que haya un mayor tránsito de fructosa hacia el hígado, lo que sugiere una adaptación fisiológica aumentando la tolerancia hacia los carbohidratos ante el incremento en la ingesta dietética (Nelson, Lehninger, & Cox, 2013).

Una vez absorbida, la fructosa es transportada al hígado, donde es fosforilada por la enzima fosfofructoquinasa a fructosa-1-fosfato, que se convierte en gliceraldehido-3-fosfato o dihidroxiacetona fosfato (**Figura 1.2**). Estas triosas fosfato podrán entrar en la

vía glucolítica hasta formar piruvato y oxidarse posteriormente a AcetilCoA. (Nelson, Lehninger, & Cox, 2013)

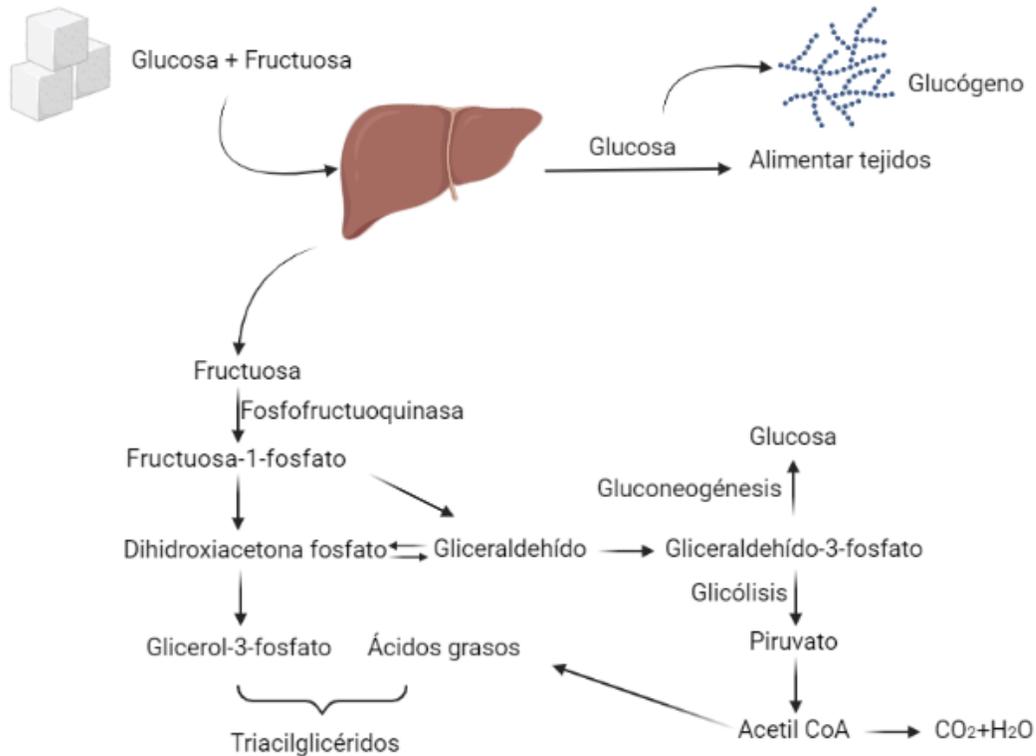


Figura 1.2. Metabolismo de la fructosa. La molécula de Acetil CoA provee los carbonos necesarios para la síntesis de novo de ácidos grasos de cadena larga, que posteriormente son esterificados para formar triglicéridos. Por lo tanto, la fructosa contribuye a la producción de triglicéridos hepáticos proporcionando sustrato para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y activando sistemas de señalización para mejorar la producción de lípidos. Tomado de Baynes & Dominiczak, 2019.

Es por esta razón que al consumir grandes cantidades de fructosa se estimulan las vías glucolítica y lipogénica en la célula hepática, lo cual se ve favorecido por el hecho de que, contrario a la glucosa, la molécula de fructosa entra a la vía glicolítica sin pasar por el punto de regulación: la reacción catalizada por la fosfofructocinasa (PFK) que trae como consecuencia pasos no regulados que permite flujos metabólicos deletéreos cuando hay exceso de sustrato (Gugliucci & Rodríguez-Mortera, 2020) (**Figura 1.3**). La PFK es inhibida alostéricamente por el citrato y el ATP esto ocurre porque la PFK existe en dos estados conformacionales; uno llamado “R” y otro llamado “T” y ambos están en

equilibrio entre sí. Cada subunidad de la PFK tiene dos sitios de unión para el ATP: un sitio ATP inhibidor y un sitio ATP sustrato.

El sitio ATP sustrato liga el ATP en ambos estados conformacionales en igual forma, pero el sitio ATP inhibidor liga casi exclusivamente en estado T. El otro sustrato (fructosa 6-fosfato) se liga al estado R, pero cuando la concentración de ATP es alta y se une al estado T, desplaza el equilibrio hacia dicho estado disminuyendo el estado R por lo que disminuye la afinidad de la PFK, regulando, por lo tanto, la subsecuente producción de triacilglicéridos que aumenta los depósitos de grasa en el hígado, lo anterior sumado a una actividad física reducida lleva a su progreso en la EHGNA (Hannou, Haslam, McKeown, & Herman, 2018).

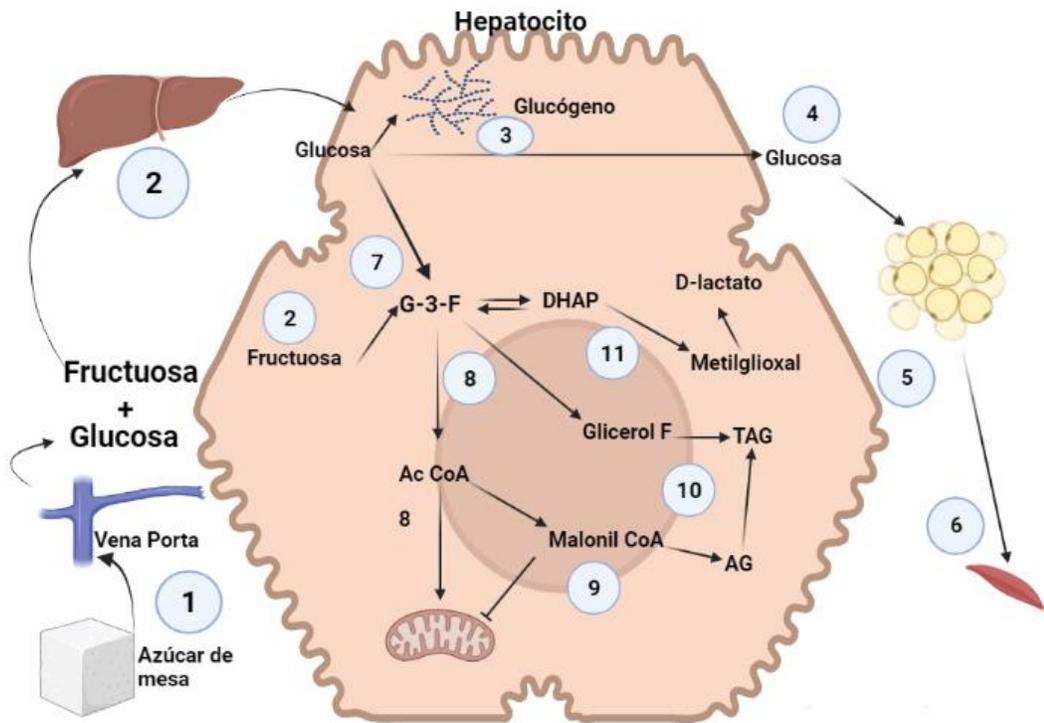


Figura 1.3. Diferencias metabólicas entre la glucosa y fructosa. 1) la glucosa entra al hígado por la vena porta, 2) conversión en glucógeno, 3) gran parte se va al torrente sanguíneo para 4) alimentar a los tejidos en medida que se libera la insulina, 5) ingresa a músculo y tejido adiposo, 6) da lugar a glucólisis, 7) se genera piruvato y posteriormente 8) Acetil CoA (AceCoA) mitocondrial que se usa para la oxidación de AGL y muy poca AceCoA sale para lipogénesis de novo (LDN). La fructosa no abandona el hígado en su mayor parte, en cambio, es rápidamente fosforilada por la fructoquinasa C, evitando los pasos reguladores en la glucólisis e inundando el sistema, 8) los metabolitos atrapados tienen un solo destino posible, convertirse (directa o indirectamente) en grasa por LDN, 9) y 10) el proceso disminuye la oxidación de AGL por la mitocondria, ya que el Malonil CoA inhibe el transporte de AGL a la mitocondria, 11) Las triosas también se transforman en un metabolito tóxico, el Metilglioxal, el cual mediante procesos de detoxificación puede convertirse a D-lactato. Tomado de Gugliucci & Rodríguez-Mortera, 2020.

Existe una alta asociación entre esta enfermedad hepática y el síndrome metabólico, donde la dislipidemia, particularmente la hipertriacilgliceridemia (HTAG), también ha sido asociada con la esteatosis hepática. Sin embargo, a pesar del hecho de que la mayoría de los pacientes tienen sobrepeso u obesidad, se ha observado que la EHGNA también puede ocurrir en pacientes con normopeso y se le ha asociado como un factor de riesgo cardiovascular independiente en este grupo poblacional (Velazco, et al. 2019). El mecanismo que desencadena la EHGNA podría explicarse por la teoría de doble impacto relacionado con la resistencia a la insulina (Day & James, 1998).

1.1 Hipótesis de “doble impacto” (Day & James, 1998)

La LDN hepática se puede ver aumentada mediante la activación de factores de transcripción como la producción de proteína de unión a elementos reguladores de esterol-1 (SREBP-1), la proteína de unión a elementos en respuesta a carbohidratos (ChREBP) y el receptor gamma activado por proliferación de peroxisoma (PPAR- γ) (George & Liddle, 2007). SREBP-1 es un factor de transcripción presente en tres isoformas: SREBP-1a, SREBP-1c que regula la activación de LDN y es estimulado por insulina y SREBP-2 el cual participa en la homeostasis del colesterol celular, por lo que

su desregulación está involucrada en la acumulación de grasa hepática (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016). El ChREBP es activado por glucosa y aumenta la LDN, pero también proporciona más sustrato para la síntesis de TAG y AGL.

La hipótesis de Day & James indica que existen dos impactos, en el "primer impacto" se encuentra la reducción en la capacidad celular para responder a la acción de la insulina que provoca una hiperinsulinemia compensatoria o insulinoresistencia debido a que, en los receptores de insulina, el sustrato de los receptores de insulina-2 (IRS-2) cuando se activa puede funcionar como regulador de SREBP-1c e influir en LDN (Schreuder, Verwer, van Nieuwkerk, & Mulder, 2008). En estados de resistencia a la insulina, el IRS-2 es regulado a la baja, por lo tanto, SREBP-1c se encuentra sobreexpresado y la LDN está regulado al alza (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016). Además, se inhibe la β -oxidación de los AG en estados de resistencia a la insulina, lo que promueve un aumento de la LDN y un incremento en la inhibición de la lipólisis del tejido adiposo aumentando el flujo de ácidos grasos al hígado (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016)

La absorción de glucosa disminuye en el músculo esquelético, mientras que en el hepatocito la hiperinsulinemia, que es ocasionada por los AGL al inducir defectos en la señal de insulina a través de la activación de serina-cinasas (aquellas que controlan procesos celulares como el metabolismo) (Shoelson, Lee, & Goldfine, 2006), aumenta la gluconeogénesis, disminuye la síntesis de glucógeno y aumenta la absorción de AGL alterando así el transporte de triacilglicéridos como la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) e inhibe la β -oxidación. Además, la insulina tiene una acción potente para suprimir la lipólisis del tejido adiposo en estados de resistencia, esta supresión se ve afectada, lo que resulta en aumento de la salida de AGL al hígado

El tejido adiposo, más allá de su función de un depósito de almacenamiento de grasa es un órgano endocrino, capaz de producir y liberar proteínas biológicamente activas llamadas adipocinas, las cuales desempeñan una función muy importante en la regulación de procesos metabólicos, tanto locales como sistémicos, cumpliendo una auténtica función endocrina. Estas adipocinas incluyen leptina, adiponectina, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Se ha sugerido que la liberación de

adipocinas puede verse afectada de manera específica y jugar un papel clave en la fisiopatología de las anomalías metabólicas (Boutari & Mantzoros, 2019).

La adiponectina media el efecto de la sensibilización a la insulina mediante la unión a sus receptores AdipoR1 y AdipoR2, lo que lleva a la activación de la cinasa dependiente de adenosina monofosfato (AMPK) y el receptor alfa activado por proliferación de peroxisoma (PPAR- α). La concentración plasmática de la adiponectina está inversamente asociada con el peso corporal, el IMC y, más importante, con la obesidad central y la resistencia a la insulina, por tanto, los niveles de adiponectina se asocian fuertemente con el riesgo de enfermedad hepática (Polyzos, Kountouras, & Mantzoros, 2019)

Por otra lado, la acción de la leptina es inhibir el apetito gracias a su isoforma ObRb que activa el transductor de señal y activador de la vía de señalización de transcripción-3 (STAT3) conduciendo a una disminución de la expresión de proopiomelancortina (POMC) y un fenotipo ligeramente encima del normopeso (Barrios-Correa, Estrada, & Contreras, 2018); además, estimula la termogénesis ya que al estar las adipocinas estrictamente reguladas por el Sistema Nervioso Simpático (SNS) este promueve la movilización de grasas estimulándola de esta manera (Caron, Lee, Elmquist, & Gautron, 2018); también mejora la oxidación de ácidos grasos aumentando la actividad de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (enzima que ayuda a controlar el crecimiento celular) y reduce los triglicéridos en el hígado, en el corazón y el músculo esquelético. La leptina reduce la actividad de la AcetilCoA carboxilasa aumentando así la actividad de AMPK, lo que resulta en un aumento de la oxidación de ácidos grasos (Liu, et al, 2019); disminuye la glucosa activando la vía de PI3K lo que aumenta la sensibilidad de la insulina para reducir los niveles de glucosa en sangre (Buzzetti et al., 2016)

Se ha reportado una asociación de dos polimorfismos funcionales, -11377G/C y + 45T/G, del gen de la adiponectina con la presencia y severidad de EHGNA. Observando que el genotipo mutante homocigoto para - 11377 (GG) y +45 (GG) se asoció significativamente con la aparición de EHGNA con respecto a otras variantes genéticas identificadas como, -11426A / G, -11391G / A y + 276G / T, ya que las

frecuencias alélicas fueron muy similares tanto en pacientes como en controles (Gupta, et al, 2012). Se ha observado una correlación significativa entre el aumento del IMC y los niveles más altos de leptina, lo que confirma que la leptina podría ser el factor que promueve la esteatosis y la fibrosis hepáticas actuando como citocina profibrótica; además, podría ser el mediador (o al menos uno de los mediadores) que explique la asociación entre la obesidad y la aparición de EHGNA (Bungau, et al, 2020).

La leptina aumenta la sensibilidad de las células a la insulina, lo que demuestra que en pacientes con prediabetes existe una resistencia a la acción de la leptina que conduce a un aumento de los niveles de insulina. La concentración sanguínea de insulina y leptina en pacientes obesos es elevada, demostrándose experimentalmente que la insulina estimula la producción y secreción de leptina por las células adiposas (Tiwari-Heckler, Gan-Schreier, Stremmel, Chamulitrat, & Pathil, 2018). Por el contrario, los niveles altos de insulina alteran la respuesta fisiológica del hipotálamo a la leptina para reducir el apetito, de esta manera el sobrepeso y la obesidad generan por sí mismos una acumulación de peso que generan un ciclo que se repite (Lustig, Sen, Soberman, & Velasquez-Mieyer, 2004).

Se conoce como “segundo impacto” a la consecuencia de la oxidación y estrés en los hepatocitos, que inicialmente se compensa con mecanismos antioxidantes celulares. Sin embargo, la sobrecarga hepática de AGL genera radicales libres de oxígeno en la mitocondria que actúa sobre los ácidos grasos de las membranas celulares provocando peroxidación lipídica conllevando a la pérdida de fluidez, una caída en el potencial de membrana, aumento de la permeabilidad de la membrana a protones e iones calcio y, finalmente a la ruptura de las membranas celulares debido a las deformidades (Catala, 2011). Las especies reactivas de oxígeno inducen en las células de Kupffer y los hepatocitos la síntesis de citocinas proinflamatorias, tales como:

- El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que activa la vía de las caspasas y conduce a la apoptosis de los hepatocitos
- El factor de crecimiento transformador β -1 (TGF- β 1);
- El ligando Fas que causa la muerte entre los hepatocitos adyacentes
- La interleucina-8 (IL-8), que es un potente quimiotáctico de neutrófilos

La **Figura 1.4** muestra el mecanismo de esta teoría de doble impacto.

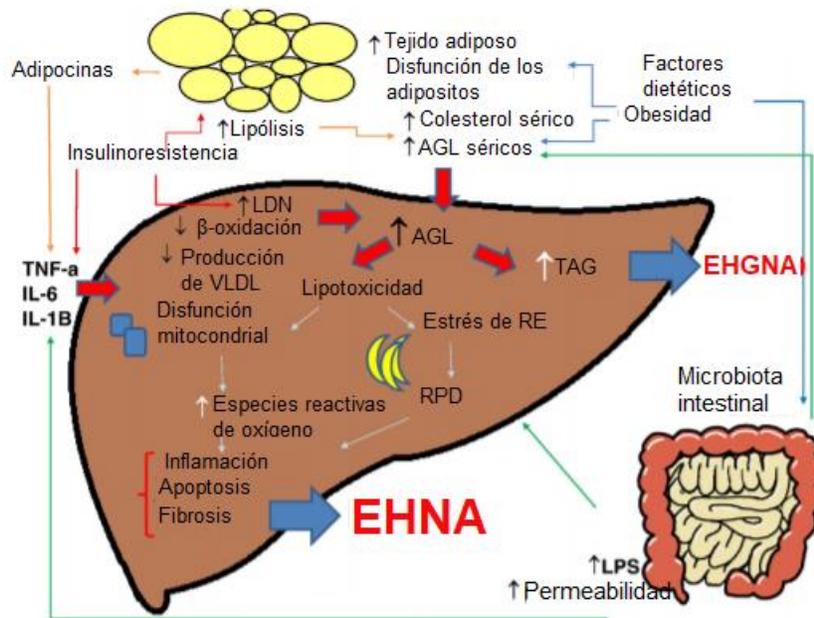


Figura 1.4. Mecanismo de teoría de doble impacto. Los factores dietéticos y ambientales sumados a la obesidad que presenta el paciente conducen a niveles séricos elevados de ácidos grasos y colesterol, desarrollo de resistencia a la insulina, proliferación y disfunción de adipocitos y cambios en el microbioma intestinal. La resistencia a la insulina actúa sobre el tejido adiposo aumentando la disfunción de los adipocitos, induce lipólisis y la liberación de adipocinas y citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α y la IL-6. En el hígado, la resistencia a la insulina amplifica la LDN. El aumento del flujo de AGL hepáticos que se deriva de los procesos anteriores y de una actividad alterada del microbioma intestinal conduce a dos situaciones diferentes: síntesis y acumulación de triglicéridos y niveles “tóxicos” de ácidos grasos, colesterol libre y otros metabolitos lipídicos que causan disfunción mitocondrial con estrés oxidativo, así como la producción de especies reactivas de oxígeno y estrés en el retículo endoplásmico (RE) con la activación de respuesta protéica desplegada (RPD), todo lo cual conduce a inflamación hepática. Además, la permeabilidad del intestino delgado se puede mejorar con el consiguiente aumento de los niveles circulantes de moléculas que contribuyen a la activación del estrés del RE, como el LPS, y a la liberación de citocinas proinflamatorias. Tomado de Buzzetti et al., 2016.

1.2 Hipótesis de lipotoxicidad

La grasa se acumula en el hígado de pacientes con EHGNA principalmente en forma de triacilglicéridos. Los triacilglicéridos se derivan de la esterificación de glicerol y AGL. Una vez sintetizados, los triacilglicéridos entran en reservas de almacenamiento o secretoras. Los AGL se derivan de la dieta o del tejido adiposo a través de lipólisis y/o

de LDN hepático. Una vez en los hepatocitos, los AGL experimentan actividad de la Acil-CoA sintetasa catalizando la síntesis de Acil-CoA de AGL de cadena larga para ser transportados a la mitocondria donde entrarán a esterificación de β - oxidación (Buzzetti et al., 2016).

La inhibición de la incorporación de triacilglicéridos en las nuevas VLDL provoca una secreción alterada de triglicéridos y, por lo tanto, la acumulación de triacilglicéridos a células hepáticas sin daño; por otro lado, la inhibición de la expresión de la diacilglicerol acetiltransferasa (DGAT2) (que cataliza la formación de un enlace éster de Acil-CoA de un AG de cadena larga y el grupo hidroxilo libre del diacilglicerol), una enzima clave involucrada en la formación de triacilglicéridos, da como resultado una reducción de los triglicéridos intrahepáticos y el consiguiente aumento de la oxidación de AGL y con ello la progresión de la esteatohepatitis (Buzzetti et al., 2016).

Por lo tanto, el aumento de la concentración de triglicéridos es un epifenómeno que ocurre simultáneamente con la generación de metabolitos tóxicos, lipotoxicidad y daño hepático (**Figura 1.5**). La LDN hepática se puede aumentar mediante la activación de factores de transcripción como SREBP-1, ChREBP y PPAR. (Neuschwander-Tetri, 2017). SREBP-1 es un factor de transcripción presente en tres isoformas: mientras que SREBP-1c regula la activación de LDN y es estimulado por insulina, SREBP-2 está involucrado en la homeostasis del colesterol celular, por lo tanto, su desregulación está involucrada en la acumulación de lípidos hepática. La ChREBP es activada por glucosa y aumenta la LDN, pero también proporciona más sustrato para la síntesis de triglicéridos y AGL.

La resistencia a la insulina es uno de los factores que predispone al desarrollo de EHGNA y la progresión a EHNA, es fundamental para el establecimiento de la lipotoxicidad, el estrés oxidativo y la activación de la cascada inflamatoria (Koehler et al., 2016).

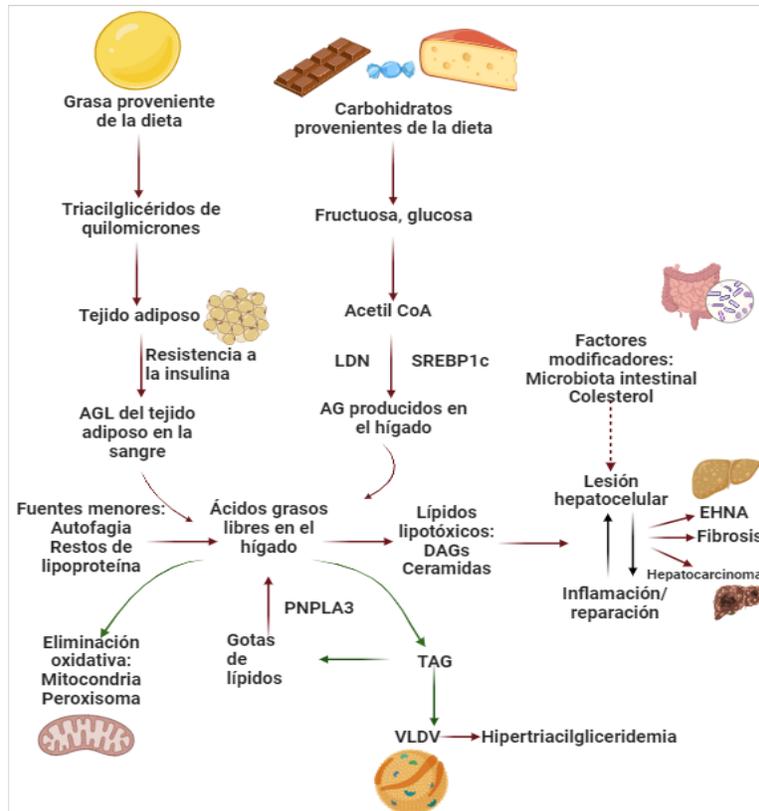


Figura 1.5. Lesión lipotóxica de patogénesis de EHNA. Los sustratos metabólicos primarios provienen de la glucosa y fructosa que se convierten en ácidos grasos en el hígado, además de los propios ácidos grasos que se entregan al hígado desde el tejido adiposo. Desde esta perspectiva, las anomalías más próximas en la patogenia de la EHNA son el suministro de un exceso de carbohidratos y ácidos grasos en la dieta. Los carbohidratos se pueden convertir en ácidos grasos a través del proceso de múltiples enzimas de LDN y el factor de transcripción SREBP1c. Los ácidos grasos en el hígado pueden ser oxidados por las mitocondrias o convertirse nuevamente en triglicéridos para exportarlos a la sangre como VLDL. En el contexto de una sobrecarga de sustratos de carbohidratos y ácidos grasos o deterioro de las vías de eliminación de ácidos grasos, o quizás más probablemente una combinación de ambos, los ácidos grasos pueden promover la generación de especies lipotóxicas (p. Ej., Diacilgliceroles (DAG), ceramidas, LPC que median el estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial, la lesión hepatoceleular, la inflamación y la apoptosis para producir el fenotipo histológico actualmente llamado EHNA. Modificada de Neuschwander-Tetri, 2017.

1.3 Fisiopatología

La EHGNA, está asociada con obesidad, síndrome metabólico, DM-2, resistencia a la insulina, hiperlipidemia y enfermedad cardiovascular, que a menudo pueden cursar juntas. El tejido adiposo es considerado un reservorio de grasa y un importante órgano endocrino secretor de múltiples moléculas, entre ellas factores inflamatorios (lipotoxicidad). Los desórdenes que ocurren en el síndrome metabólico son el resultado de una producción anormal de citocinas que dan entrada a una respuesta inflamatoria donde existe un incremento de sustancias proinflamatorias en relación con las sustancias antiinflamatorias (**Figura 1.6**).

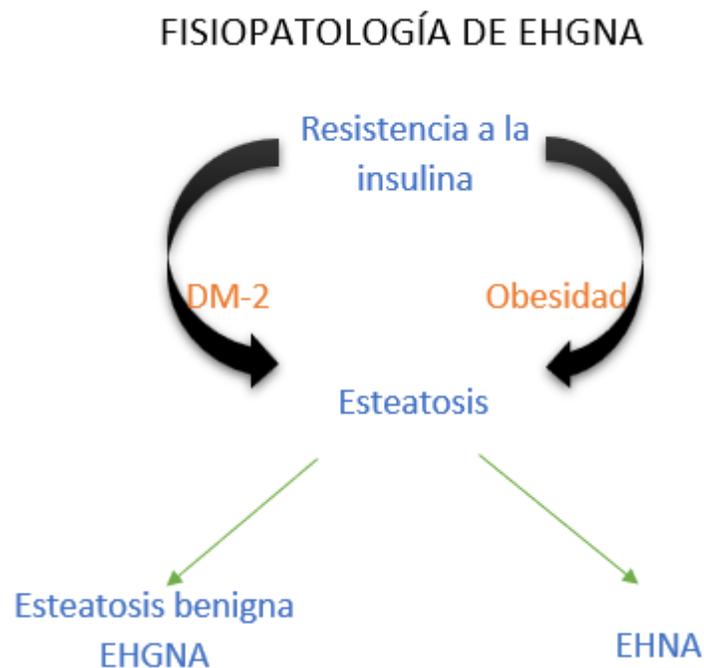


Figura 1.6. Mecanismos de daño celular de las dos vías. Ambas vías provienen del mismo factor, la resistencia a la insulina, donde conducirá a una esteatosis. La sobre nutrición conduce directamente a la esteatosis hepática y a la obesidad, situación que lleva a la inflamación del hepatocito, por incremento de leptina conduciendo a una mayor resistencia a la insulina, esto produce un aumento de los ácidos grasos libres, el colesterol y la esteatosis hepática. La DM-2 se ha mencionado que es factor recíproco de la EHGNA donde su descontrol lleva a una progresión de la enfermedad. Autoría propia.

Los mecanismos de daño celular en el hepatocito pueden ser de dos tipos diferentes, aquellos mecanismos de daño directo que están relacionados con la citotoxicidad de los hepatocitos donde existe una excesiva acumulación de ácidos grasos intra hepatocitarios con disrupción de la membrana en muy altas concentraciones y, por

otra parte, la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa y la desregulación del calcio intracelular que ocasiona daño indirecto por efectos cito-tóxicos de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos (Coronel, et al. 2016).

En las dos vías de daño hepático, los productos finales de la peroxidación de lípidos, el 4-hidroxinenal (HNE) y el monodialdehído (MDA), también están involucrados en la patogénesis del hígado el daño debido a la toxicidad de manera directa, y puede intervenir en la formación del cuerpo de Mallory que son inclusiones hialinas citoplasmáticas de hepatocitos las cuales se pensaban que eran específicas de la hepatitis alcohólica y se ha demostrado que ocurren en enfermedades hepáticas como la EHNA (Kurtovic & Limaiem, 2021). Esta formación de cuerpos de Mallory genera un aumento en la síntesis de colágeno que lleva a la aparición de células muertas en el hígado, estas células que han muerto poco a poco empiezan a tener gran importancia en el hígado ya que empiezan a formar en diferentes sitios una fibrosis y posiblemente generan una fibrosis maligna que puede transitar a hepatocarcinoma (Velazco, et al. 2019).

Para las vías mostradas, existen algunos factores que se ven implicados en la patogénesis de la EHGNA:

- Aumento en los niveles de ferritina sérica, así mismo, la expresión de receptores de transferrina aumenta el hierro en el hígado generando así radicales hidroxilos (Datz, Müller, & Aigner, 2017).
- La adinopectina juega un papel muy importante debido a su capacidad antiinflamatoria, antiaterosclerótica, antilipogénica y sus efectos hipoglucémicos, también se ha visto que tiene un mecanismo de protección para el desarrollo del hígado graso y su capacidad de actuar contra las células muertas inhibiendo la fibrogénesis. Se han identificado dos receptores de adiponectina: el tipo I el cual se encuentra en el músculo esquelético y el tipo II que se encuentra en el hígado (donde su disminución se ha asociado con un mayor grado de esteatosis) (Shabalala, et al, 2020).

1.4 Influencia de la microbiota intestinal: eje intestino-hígado.

Al recibir más del 50% de su suministro de sangre, el hígado es uno de los órganos más expuestos a las toxinas del intestino y también representa la primera línea de defensa contra los productos derivados de bacterias. La comunicación cruzada entre el huésped y la microbiota en la interfaz de la mucosa intestinal es fundamental para el desarrollo y la homeostasis del sistema inmunológico innato y adaptativo del huésped (Ma, Zhou, & Li, 2017).

Se han caracterizado los cambios en la abundancia y diversidad de la microbiota intestinal que la han relacionado con la progresión de la EHGNA. Cada etapa de EHGNA tiene una firma de microbiota intestinal especial (Aron-Wisnewsky, et al., 2017). La gravedad de EHGNA se ha asociado con disbiosis y pérdida de funciones metabólicas bacterianas comensales.

Bacteroides y *Firmicutes* representan más del 90 % de la microbiota intestinal humana, mientras que otros phyla de bacterias se encuentran menos representados tales como *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Cyanobacteria* (Xiang, Sun, Liu, She, & Chen, 2022).

Existen tres clases principales de bacterias (*Bacilos*, *Clostridia* y *Mollicutes*) que abarcan más de 250 géneros se incluyen en *Firmicutes*, dentro de los cuales casi todos son Gram positivos (Rinninella, et al., 2019). Por el contrario, todas las bacterias intestinales pertenecientes al filo *Bacteroidetes* son Gram negativos, compuestos principalmente por los géneros de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes* y *Parabacteroides* (Rinninella, et al., 2019).

Saltzman y colaboradores postulan en su estudio la teoría de que la EHGNA está íntimamente asociada con la alteración del equilibrio entre *Firmicutes* y *Protoebacteria* de las cuales encuentran un aumento mientras que los *Bacteroides* disminuyen. Aunque se señala la asociación entre el aumento de la abundancia de *Firmicutes* intestinales y la EHGNA, Bastian y colaboradores confirman los resultados previamente mencionados en los cuales el crecimiento excesivo de *Bacteroides* desempeña un papel clave en el

desarrollo de la EHGNA. Además, a nivel de familia bacteriana se ha reportado un aumento de *Enterobacteriaceae*, así como una disminución de *Rikenellaceae* y *Ruminococcaceae*. Mientras que a nivel de género bacteriano *Escherichia*, *Dorea*, *Peptoniphilus* están aumentados y *Anaerosporobacter*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Prevotella* se encuentran disminuidos (Aron-Wisnewsky, et al., 2017)

Los cambios de la microbiota en la EHNA se superponen con la esteatosis y se identifican diferencias especialmente en aquellos diagnosticados con EHNA con fibrosis. Por ejemplo, *Eubacterium rectale* aumenta en la EHGNA moderadamente grave, pero disminuye en la EHNA con fibrosis gracias a los metabolitos derivados del microbioma intestinal (lactato, etanol, TMAO) o la inducción en la disminución de los ácidos biliares totales que a su vez pueden afectar la señalización del receptor X fernesioide (FXR) en la EHGNA. En comparación con la esteatosis, el microbioma intestinal asociado con EHNA se presenta con una mayor abundancia de *Bacteroides* mientras que con fibrosis se presenta un aumento significativo de *Ruminococcus* (Boursier, et al., 2016).

Schwimmer, et al., en 2019 estudiaron la microbiota intestinal de niños del Centro Clínico de San Diego con EHGNA e informaron que la EHGNA tenía una diversidad alfa (la riqueza de especies de una comunidad a la que consideramos como homogénea y esta diversidad puede ser medida según el número de especies presentes o bien según la distancia filogenética que hay entre ellas) más baja de microbiota intestinal en comparación con los controles sanos, mientras que EHNA tenía la diversidad alfa más baja. La expresión de genes implicados en la síntesis de lipopolisacáridos (LPS) en la microbiota intestinal aumentó en EHNA en comparación con la esteatosis, mientras que el aumento de la expresión génica de la biosíntesis flagelar en EHNA indicó fibrosis (Kolodziejczyk, Zheng, Shibolet, & Elinav, 2019).

Además, la gravedad de EHGNA se asocia con un aumento en la abundancia fecal de *Bacteroides*, acompañado de una disminución en el nivel de *Prevotella*, este hallazgo es consistente con la evidencia de que *Bacteroides* y *Prevotella* son competidores. Se sabe que la composición de la dieta influye en el equilibrio

entre *Bacteroides* y *Prevotella* en el intestino: las dietas occidentales ricas en grasas, proteínas animales y carbohidratos favorecen a *Bacteroides*; mientras que las dietas de la sociedad agraria ricas en fibra, almidón y polisacáridos vegetales promueven la abundancia de *Prevotella* (Boursier, et al., 2016) (**Figura 1.10**). Otra evidencia sugiere que la abundancia fecal de *Anaerosporbacter* y *Faecalibacterium* es menor, mientras que *Allisonella* y *Parabacteroides* son mayores en pacientes con EHNA (Chen & Vitetta, 2020). La secuenciación del metagenoma reveló que *Bacteroides vulgatus* y *Eubacterium rectale* presentan la mayor abundancia en las heces de EHNA leve y moderada, mientras que *Bacteroides vulgatus* y *Escherichia coli* son los más abundantes en la fibrosis hepática (Chen & Vitetta, 2020).

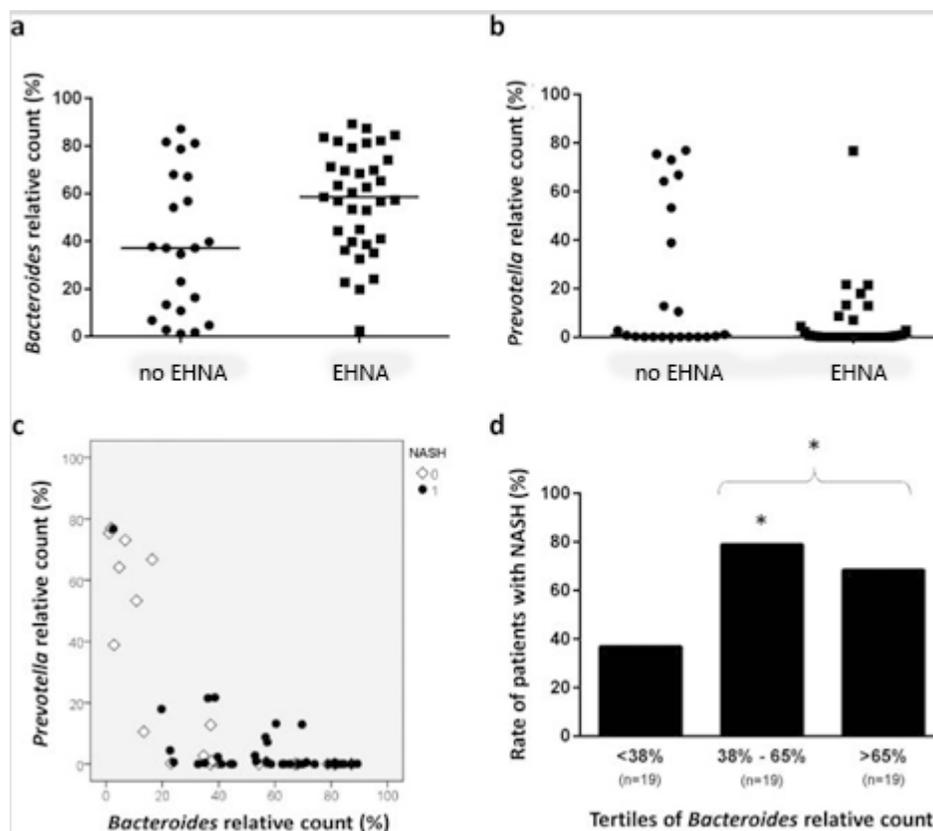


Figura 1.10. Relación entre EHNA en la biopsia hepática y la abundancia de *Bacteroides* o *Prevotella* en el intestino. a/b: Los pacientes con EHNA tenían una mayor abundancia de *Bacteroides* intestinales ($p=0,013$) y una menor abundancia de *Prevotella* ($p=0,053$). C: Como estas bacterias actúan como competidores, la abundancia de *Bacteroides* y *Prevotella* tuvo una relación inversa. D: Tasa de pacientes con EHNA en función de los terciles de recuento relativo de *Bacteroides*. La tasa de EHNA fue significativamente menor en pacientes con baja abundancia de *Bacteroides* (tercil 1). * $p \leq 0.02$ vs 1er tercil. Tomada de Boursier, et al., 2016.

Del Chierico y colaboradores demostraron en su estudio que, en comparación con controles sanos, las bacterias *Ruminococcus*, *Blautia* y *Dorea* aumentaron en pacientes con EHNA, mientras que *Oscillospira* disminuyó. Además, la progresión de HGNA a EHNA también se acompaña de cambios en la microbiota intestinal, pero los estudios recientes son insuficientes. De manera similar, Schwimmer, et al., 2019 encontró que los pacientes con EGHNA tenían una mayor abundancia de *Oscillibacter*, *Lactonifactor*, *Akkermansia* y *Enterococcus*, mientras que los pacientes con EHNA estaban acompañados de una mayor abundancia de *Lactobacillus* y *Oribacterium*.

En conjunto, múltiples estudios clínicos han demostrado que los cambios en la composición de la microbiota intestinal son comunes en pacientes con EHGNA/EHNA, pero dichos cambios siguen siendo en gran medida inconsistentes y contradictorios debido a la heterogeneidad de la distribución relativa de la microbiota intestinal. Por lo tanto, se necesitan con urgencia más estudios para aclarar los cambios en la composición de la microbiota intestinal en cada etapa de EHNA, incluso comenzando desde la etapa saludable, y esto tiene implicaciones positivas para los futuros tratamientos de EHNA al enfocarse en la microbiota intestinal individual de pacientes con los mismos criterios de inclusión y exclusión.

El lipopolisacárido (LPS), es un compuesto estructural asociado a patógenos presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, el cual se comporta como una endotoxina ya que puede iniciar una fuerte respuesta inmunológica y sirve como una señal de advertencia temprana de una infección bacteriana. El LPS induce inflamación a través de la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4), el cual se expresa en células inmunitarias tales como los macrófagos en muchos otros tipos de células no inmunitarias como los hepatocitos y los adipocitos.

Bajo condiciones normales el epitelio intestinal actúa como una barrera para prevenir la translocación de factores derivados de las bacterias. Sin embargo, el aumento de peso, la dieta alta en grasas y el aumento de la exposición a los ácidos grasos pueden alterar la función de barrera intestinal permitiendo la translocación de LPS (Schoeler & Caesar, 2019). Esto da como resultado un aumento moderado en los niveles de LPS en la sangre, lo que se define como una endotoxina metabólica generando una condición relacionada con alteraciones metabólicas como dislipidemia, resistencia a la insulina, EHGNA y enfermedades cardiovasculares (Kitabatake, et al, 2017) (**Figura 1.7**).

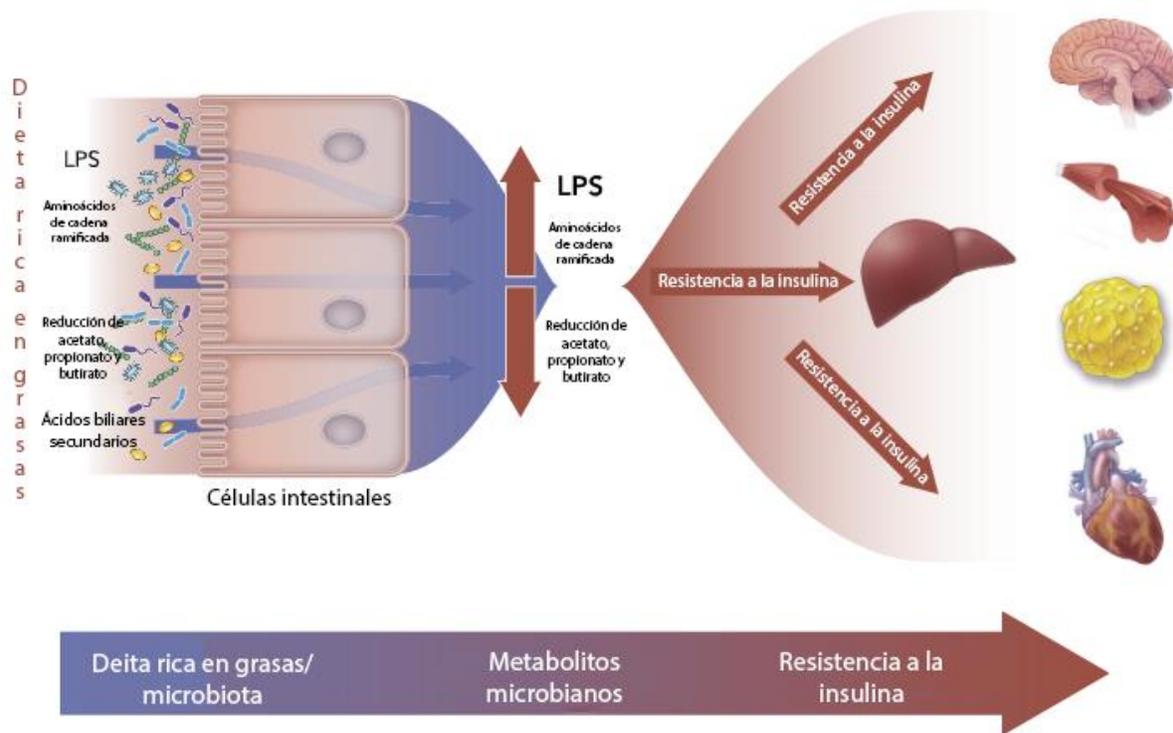


Figura 1.7. Dieta rica en grasas y resistencia a la insulina. La dieta alta en grasas modula la microbiota e induce una alteración en la barrera intestinal asociada con un aumento en la absorción y los niveles circulantes de LPS y aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) así como una reducción en acetato, propionato, butirato y ácidos biliares secundarios. El LPS induce inflamación subclínica, resistencia a la insulina y aumento de la masa adiposa. Un aumento en los BCAA circulantes se asocia con un riesgo cinco veces mayor de desarrollar DM-2. Una disminución afecta la expresión de proteínas de unión estrecha, lo que contribuye a una mayor permeabilidad intestinal. Los ácidos biliares secundarios activan la secreción del péptido 1 similar al glucagón (GLP1), que puede proteger contra la resistencia a la insulina. Estas alteraciones contribuyen a desarrollar resistencia a la insulina. Los LPS y una dieta rica en grasas provocan una respuesta inflamatoria similar en el tejido muscular, adiposo y hepático que viene determinada por el aumento de la expresión de TNF- α , interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) promoviendo un desarrollo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina hasta provocar la DM-2 (Manco, Putignani, & Bottazzo, 2010). Modificado de Saad, Santos, & Prada, 2016.

Ciertos patrones de diversidad de microbiomas pueden mejorar la permeabilidad de la mucosa intestinal y provocar lipopolisacáridemia. Los pacientes con EHGNA tienen una permeabilidad intestinal significativamente mayor y una mayor prevalencia de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado en comparación con los controles sanos (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016).

También se ha demostrado que los ácidos biliares influyen en el metabolismo de los lípidos del huésped. Los ácidos biliares primarios se sintetizan a partir del colesterol y se conjugan con taurina o glicina en el hígado, se almacenan en la vesícula biliar y se excretan en el duodeno después de la ingestión de alimentos para ayudar a la emulsificación de los lípidos de la dieta. La mayoría de los ácidos biliares se reabsorben y se recirculan al hígado, pero la desconjugación del grupo glicina o taurina, mediada por bacterias, reduce la reabsorción. Los ácidos biliares desconjugados se pueden metabolizar aún más a ácidos biliares secundarios a través de la deshidrogenación, deshidroxilación y epimerización por bacterias del colon. El procesamiento microbiano da como resultado una reserva de ácidos biliares más hidrofóbica y facilita la excreción en las heces (Arab, Karpen, Dawson, Arrese, & M., 2017).

Además los ácidos biliares pueden actuar como moléculas de señalización que regulan el metabolismo del huésped al unirse al receptor X farnesoide del receptor nuclear (FXR) y al receptor de ácidos biliares acoplado a la proteína G Takeda, TGR5. El receptor FXR participa en la regulación del metabolismo de los lípidos, especialmente en el tráfico, la síntesis y la utilización de triglicéridos (Schoeler & Caesar, 2019) (**Figura 1.8**). Por lo tanto, el procesamiento microbiano de los ácidos biliares puede influir en el metabolismo de los lípidos a través de la interacción con FXR.

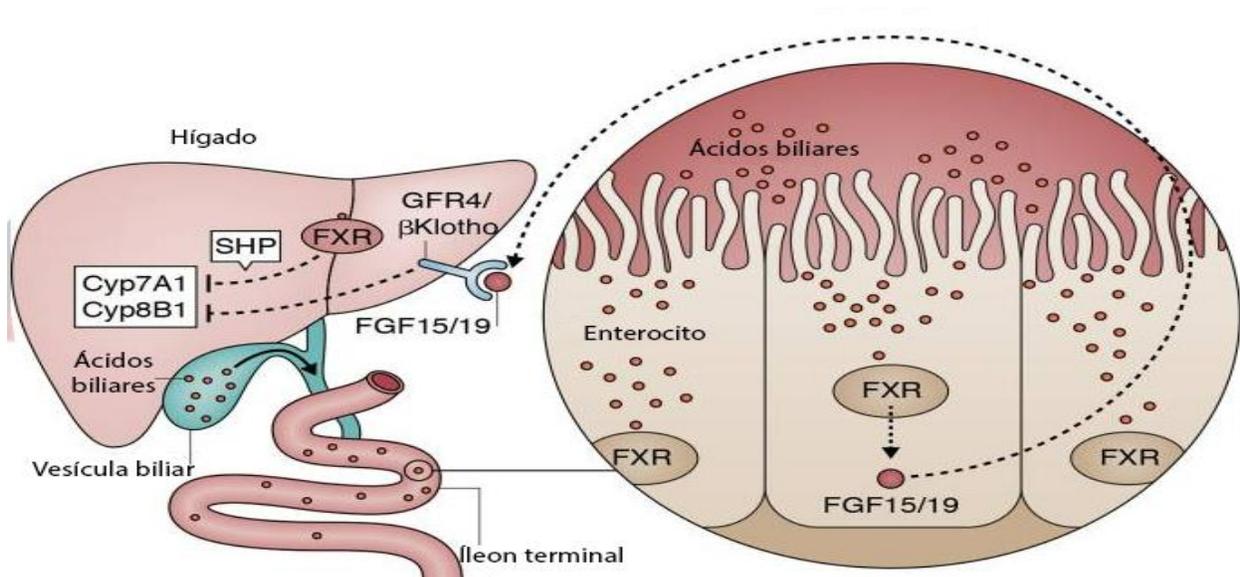


Figura 1.8. Mecanismo de FXR. FXR forma un heterodímero con el receptor retinoico X (RXR), lo que suprime la expresión de CYP7A1, la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos biliares, lo que conduce a una conversión hepática atenuada de colesterol en ácidos biliares. La supresión dependiente de CYP7A1 por FXR está mediada por dos mecanismos: (1) en el hígado, FXR induce la expresión del pequeño heterodímero asociado (SHP), que a su vez inhibe la expresión de CYP7A1; (2) en el intestino, FXR aumenta los niveles del factor de crecimiento de fibroblastos circulante 19 (FGF19), lo que reduce la expresión de CYP7A1 y citocromo P450 12a-hidroxilasa B1 (CYP8B1), lo que conduce a la inhibición de la síntesis de ácidos biliares. Modificada de Shapiro, Kolodziejczyk, Halstuch, & Elinav, 2018.

Los ácidos biliares se han implicado en la patogenia de la EHGNA. Se ha demostrado que los pacientes con EHNA tienen una composición de ácidos biliares primarios (ácido cólico y quenodesoxicólico) fecales alterada en concentraciones altas y correlacionando positivamente con esteatosis, edema celular y fibrosis (Mouzaki, et al., 2016). Además, se ha informado una relación inversa entre el factor de crecimiento de

fibroblastos 19 (FGF19), una hormona regulada por FXR producida en el íleon, y EHNA (Alisi, et al., 2013). La importancia de comprender la interacción entre la microbiota intestinal, los ácidos biliares y la homeostasis de los lípidos se destaca por los esfuerzos para utilizar los ácidos biliares como tratamientos para EHGNA y EHNA. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio clínico dirigido a la microbiota intestinal para modificar específicamente la señalización de FXR en EHGNA o EHNA.

La microbiota intestinal metaboliza los nutrientes que contienen metilamina, como la colina, la lecitina y la L-carnitina para generar trimetilamina (TMA) (**Figura 1.9**), que luego se procesa en N-óxido de trimetilamina (TMAO) mediante la enzima llamada flavin monooxigenasas (FMO) en el hígado. Los niveles de TMAO se han correlacionado con el riesgo de eventos cardiovasculares (Arias et al., 2020). FMO3 es la enzima principal que convierte TMA en TMAO. La caída de FMO3 da resultado una reducción de las áreas de las lesiones ateroscleróticas, un metabolismo alterado de los lípidos como el colesterol y una disminución de los niveles plasmáticos de TMAO (Shih, et al, 2015). Se ha verificado que TMAO exacerba la esteatosis hepática al bloquear la señalización de FXR activada por ácidos biliares (Ji, Yin, Sun, & Zhang, 2020). La expresión de FMO3 está regulada por ácidos biliares por un mecanismo que involucra FXR, por lo tanto, el procesamiento de los ácidos biliares por la microbiota intestinal podría ser un mecanismo alternativo por el cual la microbiota intestinal regula la producción de TMAO (Arias, et al, 2020).

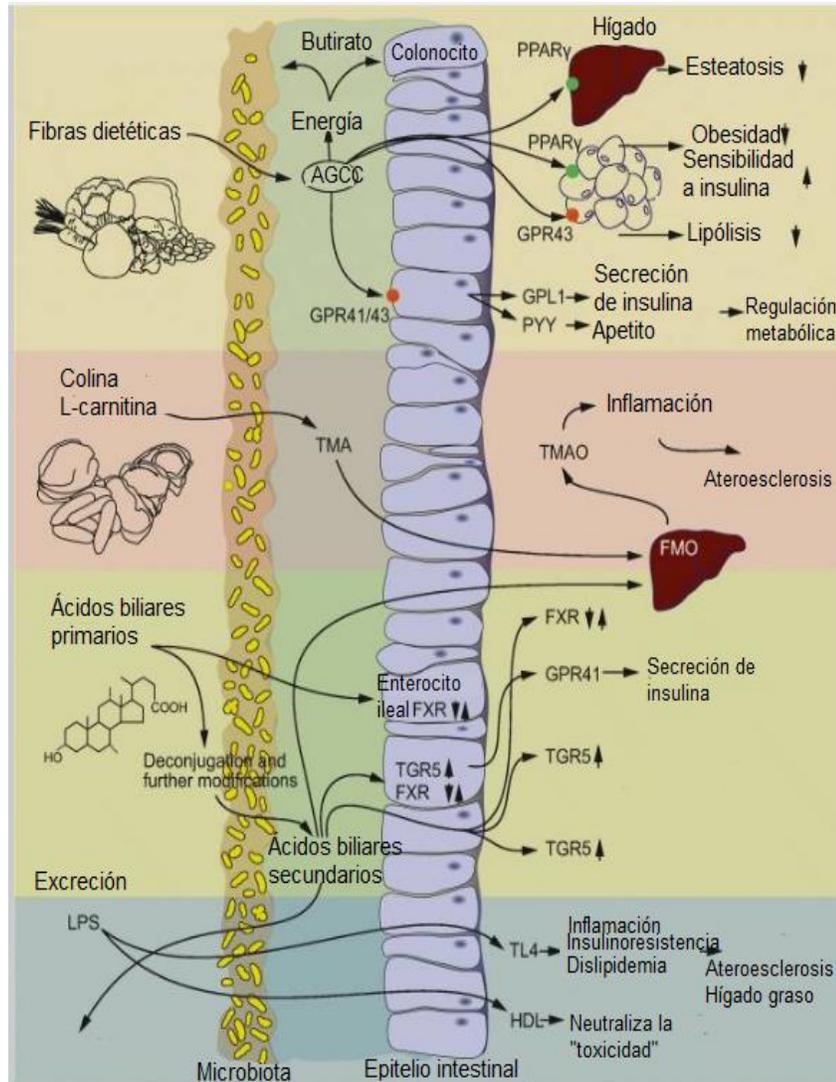


Figura 1.9. Mecanismos que relacionan la microbiota intestinal con el metabolismo de los lípidos y las condiciones fisiopatológicas asociadas con la dislipidemia.

Los ácidos grasos de cadena corta regulan el metabolismo de los lípidos del huésped al suministrarle energía y mejorándolo en los tejidos periféricos. La microbiota intestinal transforma la colina y la L-carnitina en TMA. La TMA se transforma en TMAO que puede promover un aumento de la aterosclerosis a través de mecanismos relacionados con el metabolismo de los lípidos y la inflamación. Los ácidos biliares regulan el metabolismo al unirse a FXR y a TGR5 en tejidos diferentes. La desconjugación de los ácidos biliares reduce la absorción y aumenta la excreción de los ácidos biliares. El aumento de la permeabilidad intestinal facilita la translocación de LPS sobre el epitelio intestinal. Los LPS inducen inflamación a través de TLR4 que puede resultar en perturbaciones metabólicas y contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas. El HDL puede neutralizar el efecto tóxico del LPS. También se ha demostrado que el butirato y el propionato activan PPAR γ , la activación de PPAR γ inducida por los ácidos grasos de cadena corta modula el metabolismo de los lípidos a través del aumento del gasto de energía, la reducción del peso corporal y la disminución de la acumulación de triacilglicéridos en el hígado. Modificado de Schoeler & Caesar, 2019.

Abreviaturas: PPAR γ , receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma; GPR43, receptores acoplados a proteína G GPR43 (FFAR2); GPR41, receptores acoplados a proteína G GPR43 (FFAR3); AGCC, ácido graso de cadena corta; PYY, péptido YY; TLR4, receptor tipo toll 4.

CAPÍTULO II: LA GENÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHNA

La palabra genoma procede del latín “genus”, que puede traducirse como “linaje”, “nacimiento” o incluso “estirpe”. Es el conjunto de la sucesión de nucleótidos que forma el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una especie o de un individuo (Genoma, 2022). Puede decirse, por lo tanto, que el genoma es el material genético. Cabe destacar que los nucleótidos son compuestos orgánicos que se constituyen con un ácido fosfórico, una base nitrogenada y un carbohidrato. En el caso del ADN, el carbohidrato en cuestión es la desoxirribosa y el nucleótido recibe el nombre de desoxirribonucleótido.

La secuencia de desoxirribonucleótidos presente en el ADN determina el genoma. Este contiene a los cromosomas, los cuales son filamentos condensados de ADN que se hallan en el núcleo de las células, con un número constante en las células de cada especie. El genoma comprende tanto al ADN del núcleo como al ADN mitocondrial donde su conjunto define la forma completa de la naturaleza de un organismo vivo. El genoma humano es considerado el patrimonio completo de información genética, comprendida por veinte mil genes organizados en 46 cromosomas que están ubicados en el núcleo de las células (Drouet & Leon, 2017).

En el 2008 Romeo, et al., realizó el primer estudio de asociación de genoma completo (GWAS) de HGNA en una población multiétnica de 2000 pacientes (con ascendencia europea, hispana y afroamericana) tomando más de 9000 mutaciones no sinónimas, definidas como sustituciones nucleotídicas que cambian un aminoácido por otro. El estudio identificó que la mutación o polimorfismo (mutación en la secuencia de ADN que está presente en al menos uno por ciento de la población) (Polimorfismo, 2021) no sinónima rs738409 C>G p.I148M del dominio que contiene la enzima fosfolipasa-3 similar a patatina (PNPLA3) se asoció significativamente con el aumento de los niveles de grasa hepática y la susceptibilidad a la EHNA. Los análisis posteriores demostraron que PNPLA3 rs738409 también se asocia con niveles de grasa hepática y con inflamación hepática aumentando la gravedad de la enfermedad y su progresión natural. Además de que presenta una frecuencia más alta de este alelo en población hispana.

La proteína PNPLA3 es también conocida como adinopurina y en los mamíferos incluye las hidrolasas lipídicas con especificidad a diversos sustratos como lo son TAG, fosfolípidos y ésteres de retinol. Esta proteína de 481 aminoácidos comparte un papel con PNPLA2 sumamente importante en el metabolismo de TAG al ser mediadora de la velocidad en la hidrólisis de los TAG. El gen de PNPLA3 se encuentra en el cromosoma 22 (22q13.31) el cual consta de 9 exones con una longitud de 2805 pb y la cual en humanos posee una ubicación transmembranal con una alta expresión en hepatocitos debido a su actividad enzimática a TAG previniendo la acumulación de TAG hepáticos (Drouet & Leon, 2017).

El polimorfismo de la proteína PNPLA3 (**Figura 2.1**) es peculiar porque al codificar la sustitución de isoleucina a metionina en la posición 148 (I148M) lo hace cerca del dominio catalítico y, por lo tanto, elimina la actividad hidrolasa (Funuyet-Salas J. , Martín-Rodríguez, Rupert, & Pérez-San-Gregorio, 2020): Este polimorfismo además se presenta en 77% de la población de origen mexicano con una edad de entre 18 – 70 años de edad, las cuales poseen como criterio de selección contar con más de dos generaciones de familia con residencia en la Ciudad de México. Este porcentaje favorece la insuficiencia hepática severa en pacientes con el alelo de riesgo incluso en aquellos con masa corporal más baja y en edades tempranas. (Martínez, Larrieta, Calva, Kershenobich, & Torre, 2017).

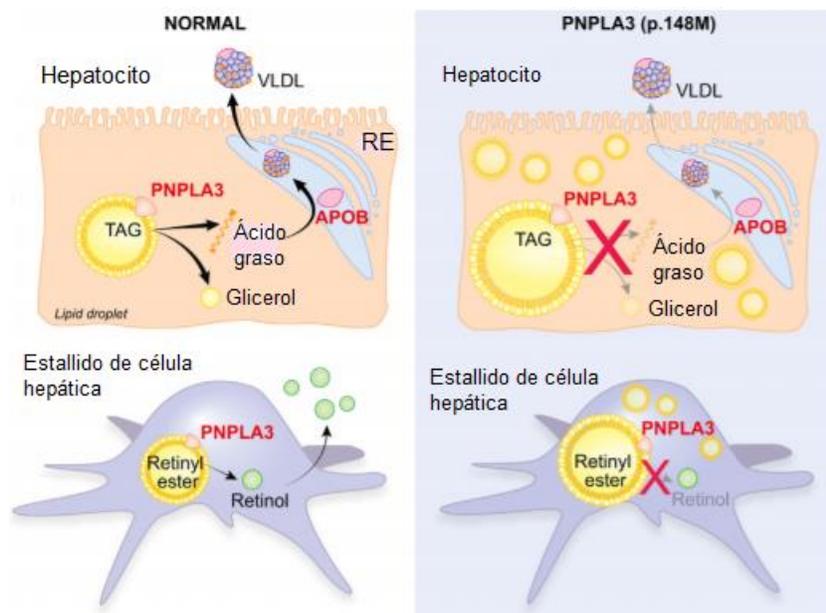


Figura 2.1. Función de PNPLA3. PNPLA3 está altamente expresado en hepatocitos y células estrelladas hepáticas (células de Ito) humanas. En células humanas, PNPLA3 también es regulado negativamente por los niveles de retinol intracelular; a nivel celular, PNPLA3 se ubica en retículo endoplásmico y membranas de vacuolas lipídicas. En ambas células esta proteína se encuentra en vacuolas lipídicas y tiene actividad hidrolasa frente a triglicéridos y ésteres de retin en hepatocitos y células de Ito, respectivamente. La mutación I148M da como resultado la pérdida de la función de la proteína con retención de grasa hepática en los hepatocitos y retención de retinol en las células de Ito. Esta mutación también induce una reducción en su actividad de hidrolasa en los TAG monoinsaturados haciendo que su acumulación reduzca la secreción de VLDL del hepatocito. Modificado de Trépo, Romeo, Zucman-Rossi, & Nahon, 2016.

La secreción de VLDL representa la vía de salida de grasa del hígado y esta reducción puede explicar parcialmente el aumento de la grasa hepática en portadores de la mutación de PNPLA3 (Trépo, Romeo, Zucman-Rossi, & Nahon, 2016).

La segunda mutación más estudiada es la no sinónima rs58542926 C>T en el gen miembro 2 de la superfamilia transmembranal 6 (TM6SF2). La variante codifica para una sustitución de Glutamato (E) a lisina (K) en la posición 167 provocando la retención de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado y aumenta el contenido de TAG intrahepático. En los seres humanos, TM6SF2 se encuentra en el cromosoma 19 y codifica una proteína de 351 aminoácidos, se expresa principalmente en el hígado y el intestino delgado, se ubica en retículo endoplásmico y el complejo RE-Golgi. La evidencia científica propuesta por Funuyet-Salas, et al., en 2020 sugiere que TM6SF2 regula la síntesis de colesterol y la secreción de lipoproteínas (**Figura 2.2**) y está involucrado en el enriquecimiento de TAG a apolipoproteína B100 la cual es una proteína que participa en la movilización del colesterol alrededor del cuerpo en la vía de secreción de lipoproteínas de muy baja densidad de los hepatocitos.

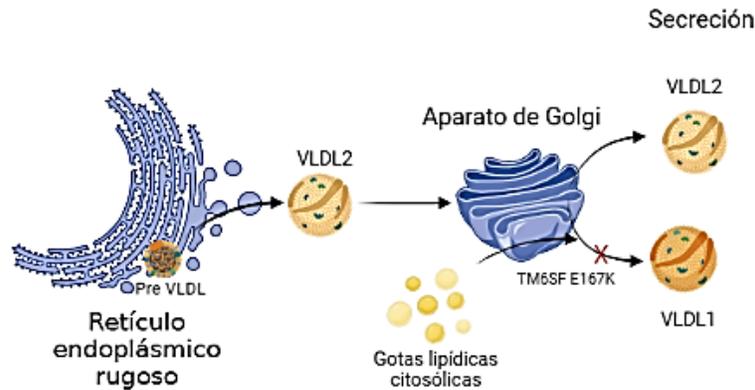


Figura 2.2. Función de TM6SF. TM6SF introduce vacuolas lipídicas al aparato de Golgi para convertir VLDL ricas en TAG (VLDL1), la variante induce la acumulación de grasa hepática aumentando la entrada de lípidos en el hígado. En sujetos homocigotos para esta variante, hay un impacto específico en la síntesis y secreción de VLDL1 ricas en TAG grandes pero ningún efecto en la secreción directa de las VLDL2 más pequeñas y menos ricas en TAG. Elaborado con BioRender

Curiosamente, TM6SF2-rs58542926 está asociado con una paradoja clínica, donde el alelo T (Lys167) está asociado con un aumento de EHGNA, pero protege contra las enfermedades cardiovasculares al estar vinculada a una reducción específica en la secreción hepática de apolipoproteína B100 teniendo consecuencias para los productos de la lipólisis de VLDL que están implicados en la aterosclerosis llevando a concentraciones reducidas de TAG en plasma y menor riesgo de enfermedad cardiovascular (Borén, et al., 2020).

Todas estas mutaciones en diferentes proteínas y genes ocasionan que el hepatocito sufra una respuesta inflamatoria crónica donde logra cambiar su fenotipo de célula almacenadora de retinol a células análogas activadoras de miofibroblastos que secretan el colágeno responsable de la fibrosis hepática (Trépo, Romeo, Zucman-Rossi, & Nahon, 2016). En general el papel de PNPLA3 en la acumulación de grasa intrahepática y sus mecanismos moleculares que conectan esta enzima con la inflamación y la fibrogénesis siguen sin estar claros.

Otro polimorfismo encontrado se encuentra en la glucocinasa (GCKR) la cual regula la lipogénesis de *novo* y la concurrencia de glucosa en los hepatocitos. La mutación GCKR (rs1260326) genera una pérdida de función de la proteína que codifica la mutación de la proteína P446L que se le asocia una reducida capacidad para controlar la glucoquinasa en respuesta a la fructosa-6-fosfato al no poder unirse alostéricamente

a la proteína reguladora de GCKRP. Esto da como resultado una mejora de las vías lipogénicas y un aumento de la acumulación de lípidos hepáticos (Funuyet-Salas et al., 2020).

Una cuarta mutación de riesgo de EHGNA se encuentra en rs641738 C>T en el gen tipo canal transmembranal 4 (TMC4) el cual está vinculado a la región 3' UTR del dominio de la O-aciltransferasa unido a membrana 7 (MBOAT7). Esta mutación fue identificada por primera vez por medio del uso de la metodología GWAS en pacientes con cirrosis alcohólica la cual se correlaciona con una disminución de la función hepática, expresión y actividad de MBOAT7; en informes posteriores se ha demostrado que se asocia con el espectro histológico completo de EHGNA (Buch, et al., 2015) (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Mutaciones de relevancia en EHGNA con sus respectivos genes y funciones Tomada de Buch, et al., 2015.

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Mutación</i>	<i>Impacto</i>
<i>PNPLA3</i>	Hidrolasa con especificidad a sustratos	Aumento en frecuencia de EHGNA, EHNA, fibrosis y HCC	rs738409 C>G	Pérdida, a favor de la aparición de la enfermedad
<i>MBOAT7</i>	Metabolismo de fosfolípidos	Aumento del riesgo de EHGNA, HCC	rs641738 C>T	Pérdida, a favor de la aparición de la enfermedad
<i>TM6SF2</i>	Secreción de VLDL	Aumento en frecuencia de EHGNA, EHNA, fibrosis	rs58542926 C>T	Pérdida, a favor de la aparición de la enfermedad

Continuación Tabla 2.1

GCKR	Regulación de lipogénesis <i>novo</i>	de Aumento de frecuencia de EHGNA, EHNA, fibrosis	en rs780094 A>G	Pérdida, a favor de la aparición de la enfermedad
KLF6 (Villani, et al., 2021)	Regulación de lipogénesis <i>novo</i> ; fibrogénesis	de Disminución de fibrosis	rs3750861 G>A	Pérdida, protección contra fibrosis
IL28B (Gatselis, Azariadis, Lyberopoulou, & Dalekos, 2021)	Inmunidad innata, transcripción alternativa de IFNL3/4	Disminución de fibrosis	rs12979860 C>T	Pérdida, protector contra fibrosis
SOD2 (Huang, Chang, Perng, & Huang, 2021)	Antioxidante mitocondrial	Aumento de fibrosis	rs4880 C>T	Pérdida, a favor de la aparición de la enfermedad
LYPLAL1 (Sliz, et al., 2018)	Catabolismo de TAG	Aumento de frecuencia de EHGNA	en rs12137855 C>T	A favor de la aparición de la enfermedad
LPIN1 (Cobbina & Akhlaghi, 2017)	Regulación del metabolismo de lípidos	Disminución de aparición de EHGNA y fibrosis	rs13412852 C>T	Protector contra la EHGNA

Continuación Tabla 2.1.				
UCP2 (Abbasalizad Farhangi, Mohseni, Farajnia, & Jafarabadi, 2016)	Metabolismo de lípidos mitocondirales	Disminución de aparición de EGHNA	rs695366 G>A	Ganar, protector contra la EGHNA
IRS1 (Bhatt & Guleria, 2021)	Señalización de insulina	Aumento de fibrosis	rs1801278 A>C	Pérdida, a favor de la aparición de la enfermedad
MERTK (Cai, et al., 2020)	Inmunidad innata	Disminución de fibrosis	rs4374383 G>A	Pérdida, protector contra la enfermedad

EHGNA es un rasgo hereditario y complejo cuyo componente genético se ha estudiado en gemelos logrando contribuir al conocimiento de la susceptibilidad genética de enfermedades complejas comparando el riesgo genético de una enfermedad entre gemelos monocigóticos y dicigóticos. Los estudios de asociación de genes candidatos se centran en loci seleccionados sobre la base de su función conocida o supuesta o de su plausibilidad biológica en la fisiopatología de la enfermedad. Finalmente, los estudios funcionales y experimentales tienen como objetivo proporcionar información del mecanismo sobre el papel de una variante o locus de interés en el fenotipo explorado.

Debido a que el enfoque GWAS se denomina "método libre de hipótesis", puede identificar genes o vías biológicas no informados previamente. Por otro lado, no siempre podemos entender cómo los loci identificados contribuyen a la progresión de la enfermedad. Además, GWAS no puede comprobar todos los factores genéticos asociados a una enfermedad, y los resultados dependen de los sujetos del estudio. Sin

embargo, es más probable que los GWAS identifiquen el riesgo genético que los estudios de genes candidatos.

Según los datos disponibles, las estimaciones de heredabilidad oscilan entre el 20 y el 70 %, según el diseño del estudio, la etnia y la metodología utilizada para caracterizar el fenotipo. Palmer, et al., 2014 encontraron que la esteatosis hepática era hereditaria en un 20% a un 34% en familias afroamericanas e hispanoamericanas después de tener en cuenta la variación asociada con la edad, el sexo y el consumo de alcohol. Dentro de este análisis encontraron que las variantes en o cerca de *PNPLA3* (rs738409), *PPP1R3B* (rs4240624) y *NCAN* (rs2228603) estaban asociadas en afroamericanos y *PNPLA3* (rs738409) en hispanoamericanos. Speliotes, et al., 2011 informaron que las estimaciones de heredabilidad de la esteatosis hepática eran del 26% al 27% en una muestra grande (n = 6629) de sujetos de ascendencia europea.

Todos estos estudios tienen pacientes que se habían sometido a una biopsia de hígado como parte del estudio de diagnóstico de rutina por sospecha de EHGNA que originalmente se identificó debido a pruebas bioquímicas anormales (ALT y/o gamma-glutamilttransferasa) y/o un hígado asociado con características del síndrome metabólico; o tener pruebas bioquímicas anormales (ALT y/o gamma-glutamilttransferasa) y apariencias macroscópicas de un hígado esteatósico en el momento de la cirugía bariátrica. Se excluyeron los diagnósticos que incluían ingesta excesiva de alcohol (ingesta de alcohol <20 g/día para mujeres; <30 g/día para hombres), hepatitis viral crónica (hepatitis B y hepatitis C), enfermedades hepáticas autoinmunes, hemocromatosis hereditaria, deficiencia de α 1-antitripsina, enfermedad de Wilson y daño hepático inducido por fármacos (Anstee, et al., 2020).

2.1 Epigenética de la EHGNA:

La epigenética es el estudio de la expresión génica y variación fenotípica que no es causada por cambios en la secuencia de ADN (Eslam, Valenti, & Romeo, 2018). Las modificaciones epigenéticas pueden ser causadas por alteraciones en la metilación del

ADN, modificaciones a las proteínas histonas o la remodelación de cromatina, así como mecanismos basados en ARN como los ARN no codificantes.

Los cambios epigenéticos son alteraciones relativamente estables que pueden transmitirse a la progenie a través de la división celular, explicando así los efectos ambientales sobre el fenotipo, y parte de la heredabilidad faltante de enfermedades comunes como EHGNA, que no se explica por las variantes de la genética común. (Choudhary & Duseja, 2021).

2.1.1 Metilaciones de histonas:

Las modificaciones de los extremos amino terminales de las histonas son factores clave en el mantenimiento de la estructura de la cromatina y la expresión génica donde las principales modificaciones son las acetilaciones relacionadas con la activación de la transcripción genética y catalizadas por histonas acetiltransferasas (HAT), y las desacetilaciones, implicadas en la represión de genes y catalizadas por histonas desacetilasas (HDAC). El desequilibrio entre ambas enzimas parece influir en la expresión del gen fenotípico en EHGNA, lo que resulta en daño hepático (Del Campo, Gallego-Durán, Gallego, & Grande, 2018).

La histona desmetilasa que contiene el dominio Jumonji (JMJD)-1C regula positivamente la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos. La supresión de JMJD-1C en modelos animales protege de EHGNA inducida por la dieta y su sobreexpresión aumenta el contenido de grasa en el hígado (Hyun & Jung, 2020)

El estrés metabólico y las lesiones hepáticas agudas pueden inducir la escisión de la proteína H de unión a elementos sensible al monofosfato de adenosina cíclico (CREBH) quien es mediada por la proteasa del sitio 1 (SP1) y la proteasa del sitio 2 (SP2) siendo importantes al procesar las proteínas de unión a los elementos reguladores de esterol según las demandas de la biosíntesis de lípidos o esterol. La modulación de la acetilación de CREBH puede afectar significativamente la actividad transcripcional de

CREBH y conducir a la alteración de la homeostasis lipídica asociada con la esteatosis hepática y la hiperlipidemia (Del Campo, Gallego-Durán, Gallego, & Grande, 2018).

Se sabe que la desacetilasa sirtuina-1 (SIRT1) media la modulación nutricional y hormonal del metabolismo energético hepático. La activación de SIRT1 muestra potencial contra los mecanismos fisiológicos relacionados con EHGNA, y se ha encontrado que sus niveles plasmáticos están aumentados en pacientes obesos con EHGNA (Mariani, y otros, 2015). El efecto beneficioso de la activación de SIRT1 se ha relacionado con la modulación de la actividad de PPAR- α y la oxidación de ácidos grasos más que a la remodelación de la cromatina (Mukhopadhyay, et al., 2017).

Por tanto, SIRT1 podría desempeñar un doble papel, por un lado, como posible objetivo terapéutico y también como biomarcador no invasivo de EHGNA (Choudhary & Duseja, 2021).

2.1.2 Metilación del ADN:

La metilación del ADN es la adición de un grupo metilo a una citosina con guanina como el siguiente nucleótido (llamadas islas CpG) catalizada por ADN metiltransferasas (DNMT). La metilación del ADN juega un papel central en la regulación de la expresión génica, lo que representa un nivel de regulación epigenética comúnmente asociado con la represión transcripcional y la accesibilidad a la cromatina. Los patrones aberrantes de metilación del ADN afectan la homeostasis celular al representar uno de los cambios epigenéticos importantes que pueden causar una expresión génica anormal en EHGNA. Muchas metilaciones tienen lugar en el hígado, por lo que la esteatosis hepática se ve comúnmente desde el punto de vista de la desregulación del metabolismo del carbono (Del Campo, Gallego-Durán, Gallego, & Grande, 2018).

La EHGNA se ha asociado principalmente con la hipometilación muy probablemente causada por un desequilibrio en el suministro de donantes de metilo (niveles reducidos de folato) (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021). Además, se sabe que varios genes, cuya transcripción depende de la metilación

del ADN en EHGNA, se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Los genes involucrados en la fibrogénesis como TGF- β 1, Colágeno 1A1 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) estaban hipometilados y su expresión aumentaba en etapas más graves de progresión de EHGNA, lo que indica riesgo de desarrollar fibrosis (Gerhard, et al., 2018). La proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina ((IGFBP)-2) a menudo se reprime en pacientes con EHGNA y EHNA a través de la metilación. Se ha observado una reducción de los niveles circulantes de IGFBP2 en adultos obesos (Hyun & Jung, 2020) y su estado de hipermetilación se ha correlacionado con el riesgo de desarrollar DM2 (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021), lo que sugiere que el estado epigenético dependiente de la dieta de IGFBP2 podría desempeñar un papel en la patogénesis y la interconexión entre estas enfermedades.

Los primeros estudios en animales han demostrado que la esteatosis hepática puede ser inducida por el trastorno del metabolismo de un carbono, asociado con dietas deficientes en nutrientes de donantes de metilo y reducción de la metilación del ADN hepático (Lee, Kim, Friso, & Choi, 2017). Los nutrientes donantes son folato, metionina, serina, betaína y colina que finalmente se utilizan para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM) en el metabolismo de un carbono. Curiosamente, los nutrientes donantes de metilo solían llamarse "lipótropos" porque su deficiencia resultó en una infiltración grasa del hígado. Después de transferir el grupo metilo, SAM se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH) perdiendo así capacidad de metilación una disminución en SAM o un aumento en SAH (Lee, Kim, Friso, & Choi, 2017).

Se ha visto que la perturbación del metabolismo de un carbono, especialmente el desequilibrio celular de SAM y SAH, puede alterar el metabolismo de los lípidos hepáticos para producir hígado graso (Zhao, 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que la deficiencia de folato induce acumulación hepática de TAG y afecta la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (Lee, Kim, Friso, & Choi, 2017). La deficiencia de folato, transfiere grupos metilo a la ruta de remetilación de metionina en el metabolismo de un carbono, reduce la producción de SAM y, posteriormente, disminuye la síntesis de novo de fosfatidilcolina acumulando TAG en el hígado (Zhao, 2018).

Pirola, et al, en el 2013 utilizó muestras de biopsia de hígado de pacientes humanos con EHGNA, encontró que el estado de metilación del gen deshidrogenasa 6 codificado mitocondrialmente (MT-ND6) fue significativamente mayor en pacientes con EHNA que en pacientes con una simple esteatosis. Además, la proporción de ADN metilado/no metilado de MT-ND6 se asoció significativamente con la puntuación de actividad de EHGNA.

En un estudio de casos y controles de pacientes con EHGNA, la metilación del promotor del ADN hepático en el coactivador 1 alfa de $PPAR\gamma$ (PGC1- α) quien es un factor clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial, se correlacionó significativamente con resistencia periférica a la insulina (Lee, Kim, Friso, & Choi, 2017).

Un estudio epigenómico reciente sugirió que diferencialmente los genes metilados podrían distinguir a los pacientes con EHNA avanzada de aquellos con esteatosis simple (Zeybel, et al., 2015), se informaron sitios CpG metilados (76 % hipometilados, 24 % hipermetilados) en pacientes con EHNA avanzada en comparación con aquellos que poseían esteatosis simple. En EHGNA avanzado, en muchos tejidos habían genes de reparación que estaban hipometilados en el hígado, mientras que los genes para las vías metabólicas, incluido el metabolismo de un carbono, fueron hipermetilado (Zeybel, et al., 2015).

Otro gen destacado pero ahora hipermetilado en EHGNA es el coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), un regulador maestro de varios aspectos del metabolismo energético, especialmente la oxidación de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial, las cuales son características involucradas en la patogénesis de la grasa en el hígado. Los pacientes de EHGNA tienen una expresión disminuida de PGC1 α debido a la metilación del promotor, que se correlaciona con defectos mitocondriales y resistencia a la insulina (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021).

La metilación anormal del ADN parece ser el punto de partida de la carcinogénesis, especialmente en el carcinoma hepatocelular relacionado con EHGNA. Los metabolitos derivados del síndrome metabólico, como la insulina, la glucosa o los lípidos, podrían

alterar la regulación génica a nivel epigenético, llevando al organismo a un estado proinflamatorio que altere las vías metabólicas (Xu, et al., 2017).

CAPÍTULO III: LA TRANSCRIPTÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA

Hasta la fecha, los esfuerzos para examinar los cambios transcriptómicos que ocurren a medida que avanza la EHGNA han utilizado, en gran medida, técnicas basadas en microarreglos (Anexo 1) y, por lo tanto, han carecido del enfoque integral proporcionado por secuenciación global de ARN (Teufel, et al., 2016) o se han limitado a cohortes de pacientes relativamente pequeños que no representan adecuadamente a la enfermedad completamente desde el hígado normal pasando por HGNA hasta llegar a EHNA, exhibiendo etapas progresivas de fibrosis y cirrosis (Gerhard, et al., 2018).

El estudio de la transcriptómica de un organismo en una condición dada puede realizarse con diferentes técnicas; estas pueden ser basadas en hibridación o secuenciación. Las técnicas basadas en hibridación, como los microarreglos, requieren el conocimiento previo de los transcritos de interés para generar las sondas. Además, se introduce ruido por posibles hibridaciones cruzadas que son inherentes al proceso de diseño de sondas lo que limita el rango de detección a genes previamente descritos (Rodríguez Cubillos, Perlaza Jiménez, & Bernal Giraldo, 2014). Por su lado, las técnicas basadas en secuenciación tienen mayor alcance; técnicas como SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) y MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) se basan en la secuenciación de cDNA, o librerías de ESTs con Sanger. El nuevo enfoque de interés de la transcriptómica es la secuenciación masiva y profunda de RNAs, la cual se denomina RNA-Seq que tiene como objetivo principal catalogar todos y cada uno de los transcritos (RNA) expresados por una célula en una condición específica.

Gerhard et al., utilizando biopsias de hígado de individuos blancos inscritos en el Programa de Cirugía Bariátrica en el Centro Clínico Geisinger para Nutrición y Control de Peso realizó un análisis de perfiles de ARNm basado en secuenciación de muestras de hígado de individuos obesos con hallazgos histológicos normales (forma hexagonal de hepatocitos, existencia de drenaje venoso por vena porta, conducto biliar, revestimiento sinusoidal) (Murli Krishna, 2014) y pacientes con EHGNA identificando

genes regulados positivamente solo en la fibrosis, tales como la proteína 1 de unión a AE (AEBP1), la dermatopontina (DPT), la proteína de activación de fibroblastos α (FAP), la subunidad β de la integrina 1 (ITGBL1), la proteína A6 de unión al calcio S100 (S100A6), la osteopontina (SPP1) y la estatmina 2 (STMN2) con roles en procesos biológicos relevantes para la fibrosis (mantenimiento de matriz extracelular, cicatrización de heridas o función del citoesqueleto) o se han asociado previamente con fibrosis EHNGA en modelos de ratón con la enfermedad (Wang, et al., 2017).

Este estudio encontró 16 genes que mostraron una expresión diferencial en la relación de fibrosis y cirrosis, dentro de los cuales se encuentran los siguientes: complemento C7 (C7), molécula CD24, quitinasa 3 similar a 1 (CHI3L1), colágeno tipo 1, cadena α 1 (COL1A1), colágeno tipo 1, cadena α 2 (COL1A2), colágeno tipo III, cadena α 1 (COL3A1), proteína 2 que contiene el dominio Doublecorting (DCDC2), proteína 1 de matriz extracelular tipo fibulina contenedora de EGF (EFEMP1), receptor A3 de EPH (EPHA3), fibulina-5 (FBLN5), proteína de unión a GTP sobreexpresada en el músculo esquelético (GEM), ITGBL1, subunidad de laminina α 2 (LAMA2), proteína de matriz extracelular codificada por el gen Lum (LUM), SPP1 y proteoglicano de matriz extracelular codificado por el gen VCAN.

Varios de estos genes han estado implicados en la cirrosis humana. Por ejemplo, *COL1A1* el cual codifica para una proteína de matriz ampliamente expresada que contribuye a la fibrosis en una variedad de etiologías de cirrosis (Ma, et al., 2019), mientras que la regulación positiva de *COL1A2* en células estrelladas hepáticas se ha implicado en la fibrosis hepática inducida por etanol (Ao, Guan, Wang, & Wang, 2019). La expresión de *COL3A1* se ha asociado con la fibrosis hepática por virus de hepatitis C y EHNA (Kuivaniemi & Tromp, 2019), ITGBL1 interactúa con TGFB1 (factor de crecimiento transformante β 1) para regular la progresión de la fibrosis en pacientes con hepatitis B (Wang, et al., 2017). Los niveles plasmáticos de SPP1 se han asociado con un mayor riesgo de fibrosis hepática en EHNA (Wang, et al., 2022), enfermedad hepática alcohólica (Lazaro, et al., 2015), mientras que los niveles sanguíneos de CHI3L1 pudieron distinguir entre las etapas temprana y avanzada de la fibrosis hepática, incluida la cirrosis, en pacientes con EHNGA (Zhang, et al., 2021). La expresión de LUM, un proteoglicano que

regula el ensamblaje de las fibrillas de colágeno aumentó con la gravedad de la EHNA y se correlacionó con la tasa de síntesis fraccional de colágeno en la fibrosis por EHNA (Chang, He, Xiang, & Li, 2021).

Suppli, et al., en 2019 menciona que el uso de marcadores inmunohistoquímicos de hepatocitos dará un diagnóstico más efectivo de EHGNA ya que se encontró que muchos genes encargados de la organización y remodelación de la matriz extracelular, la apoptosis y proteínas antioxidantes se encuentran sobre expresados (**Tabla 3.1**)

Tabla 3.1. Genes sobre expresados en EHGNA.

<i>Gen</i>	<i>Nombre del gen</i>	<i>Función</i>	<i>Vía de acción</i>	<i>Efecto sobre EHGNA</i>
MMP2	Metaloproteinasa de matriz 2	Remodelación de matriz extracelular	Organización de matriz extracelular	Inicio de fibrosis hepática
FMNL3	Poteína similar a la formina	Adhesión célula-célula, proliferación celular	Transducción de señal	Progresión de la enfermedad
OTOA	Otoancorina	Adhesión célula-célula	Metabolismo de proteínas	Progresión de la enfermedad
CPXM1	Carboxipeptidasa X1 probable	Remodelación de matriz extracelular	No identificado	Desarrollo de cirrosis
PROCR	Receptor de proteína C	Serina proteasa, Proliferación celular	Hemostasia	Progresión de la enfermedad
MMP24	Metaloproteinasa de matriz 24	Remodelación de matriz extracelular	Organización de matriz extracelular	Progresión de la enfermedad

Continuación tabla 3.1.				
TNNT1	Troponina T1 de músculo esquelético lento	Proteína reguladora filamento	Contracción de muscular	Progresión de la enfermedad
GPC3	Glipican 3	Proliferación celular	Metabolismo de proteínas	Progresión a carcinoma
ADGRG1	Receptor de adhesión acoplado a proteína G	Adhesión célula-célula, receptor de colágeno	No identificado	Progresión de la enfermedad
MRC2	Receptor de manosa C tipo 2	Remodelación de matriz extracelular, proliferación celular	Sistema inmune	Progresión a carcinoma

Pettinelli, et al., en 2018 evaluó el gen **AKR1B10** de la familia de las aldo-ceto reductasa 1 B10 encontrando que se encuentra altamente sobre expresado en pacientes con EHGNA en comparación con donadores sanos de hígado. La sobre expresión encontrada podría disminuir el ácido retinoico favoreciendo que esta enfermedad progrese a un hepatocarcinoma (**Figura 3.1**). También observó que la expresión hepática de AKR1B10 estaba altamente regulada al alza en pacientes con EHGNA en comparación con donadores sanos. Una sobre expresión de AKR1B10 acompañada de una subexpresión de ALDH1A2 y ALDH1A3 puede favorecer la progresión de EHGNA a hepatocarcinoma.

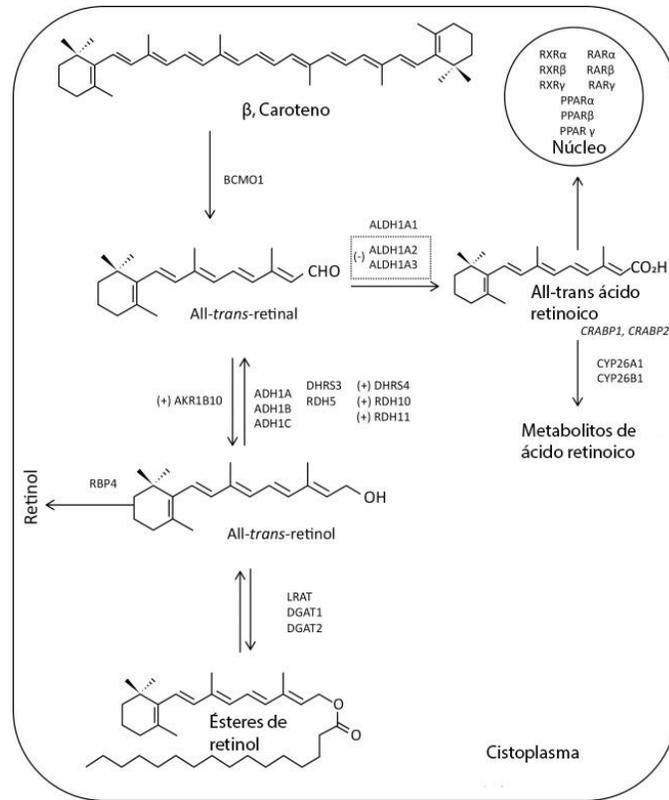


Figura 3.1. Metabolismo intracelular del retinol (vitamina A) en el hígado. El retinol lo proporciona nuestra dieta y se transporta a través de quilomicrones al hígado, donde se une a la proteína fijadora de retinol (RBP). El retinol se convierte en éster de retinilo mediante la lecitina retinol aciltransferasa (LRAT), para su almacenamiento. El retinol se convierte en all-trans-retinal en el hígado a través de dos pasos oxidativos. El primer paso enzimático es la oxidación reversible de retinol a retinal por tres tipos de enzimas: 1) miembros de la familia retinal deshidrogenasa (RDH5, RDH10, RDH11), 2) alcohol deshidrogenasas (ADH1, ADH1B y ADH1C); y 3) deshidrogenasas/reductasas de cadena corta unidas a la membrana (DHRS3 y DHRS4), todas involucradas en el mantenimiento de un equilibrio entre la retina y el retinol. El segundo e irreversible paso es la oxidación del retinal a ácido all-trans-retinoico por parte de la familia retinaldehído deshidrogenasa 1, miembro A1, A2 y A3 (ALDH1A1, ALDH1A2 y ALDH1A3). El exceso de ácido all-trans-retinoico, que se une a las proteínas de unión al ácido retinoico celular (CRABP1 y CRABP2), no se recicla de nuevo a retinol y debe oxidarse para ser eliminado del cuerpo por los miembros de la familia CYP26A1 y CYP26B1 del citocromo P450. El ácido all-trans-retinoico recién sintetizado se puede unir a CRABP2. Ácido all-trans-retinoico que ingresa al núcleo, se une a un heterodímero receptor de ácido retinoico/receptor X retinoico (RAR/RXR) y estimula la transcripción de genes diana. El signo más (+) indica una expresión aumentada de la enzima AKR1B10, mientras que el signo menos (-) indica una expresión reducida de las enzimas ALDH1A2 y ALDH1A3. Modificado de Pettinelli, et al, 2018.

En un hígado sano, las células de Ito mantienen un fenotipo inactivo no proliferativo que almacena entre el 70 y el 80 % del retinoide hepático total (vitamina A). Cuando las células se activan, pierden su reserva de vitamina A intracelular, que conduce a la transformación en miofibroblastos productores de colágeno dándole una gran relevancia a **AKR1B10** (Pettinelli, et al, 2018). El hígado es el órgano más importante para el almacenamiento y el metabolismo del retinol y contiene las enzimas para el metabolismo del retinol. Los pacientes con EHGNA tenían una gran expresión de los genes: DHRS4 (deshidrogenasa/reductasa 4), RDH11 (retinol deshidrogenasa 11), ADH1B (deshidrogenasa alcohólica) y RDH10 (retinol deshidrogenasa 10) que están relacionados con el metabolismo del retinol, lo cual podría llevar a una biosíntesis alterada del ácido retinoico (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021).

En los últimos años, el interés se orienta al estudio de ARN largos no codificantes (lncRNA) (transcritos no codificantes mayores a 200 nucleótidos) con respecto al desarrollo o progresión de la fibrosis EHGNA (Atanasovska, et al., 2017). Sorprendentemente se han encontrado indicios de que estas moléculas son contribuyentes clave a los procesos biológicos subyacentes a la enfermedad.

La investigación de Atanasovska, et al., 2017 revela que lnc18q22.2 mostró niveles de expresión elevados en el tejido hepático de pacientes con EHGNA. Además, propusieron que este lncRNA puede desempeñar un papel importante en la regulación de la función hepática, aportando perspectivas alternativas a la regulación de la viabilidad de los hepatocitos en la EHNA.

3.1 miARN:

Los miARN son una clase de pequeñas moléculas de ARN no codificante de cadena sencilla que actúan como reguladores de la expresión génica y participan en la traducción de proteínas. Pueden interferir con todos los aspectos de la actividad celular, como la diferenciación y el desarrollo, la proliferación, el metabolismo, la apoptosis y la

carcinogénesis (Del Campo, Gallego-Durán, Gallego, & Grande, 2018). Estas moléculas están recibiendo una atención cada vez mayor ya que comúnmente se desregulan en situaciones patológicas y actualmente son los factores epigenéticos más estudiados en la EHGNA.

Los microARN circulan protegidos de la degradación de las RNAsas contenidas en los fluidos corporales y actualmente se están estudiando ampliamente para el diagnóstico no invasivo de una serie de enfermedades hepáticas, incluida la EHGNA (de Conti, et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que la expresión que se aparta de lo normal o la expresión aberrante de miARN puede tener un significado en el desarrollo de la carcinogénesis hepática asociada a EHGNA y puede servir como un indicador para el desarrollo de hepatocarcinoma (HCC) derivado de EHGNA.

La alteración con más solidez que se ha observado en EHGNA está representada por la regulación a la baja de miR-122, que es el miARN hepático más expresado (70% de la abundancia total) (Zarrinpar, Gupta, Maurya, Subramaniam, & Loomba, 2016). De hecho, la regulación a la baja de miR-122 favorece la lipogénesis, además, en modelos de ratón in vivo, la delección hepática de miR-122 se asocia con el desarrollo espontáneo de EHGNA debido a que existe una mayor lipogénesis y alteración de la secreción de lípidos conllevando a un hepatocarcinoma (Gerhard & DiStefano, 2015). La reducción de miR-122 también está involucrada en la regulación positiva de vías fibróticas mediante la inducción del factor 1- α inducible por hipoxia (HIF1 α) y la proteína activada por mitógeno quinasa 1 (MAPK1) (Csak, et al., 2015).

Estos datos sugieren que la regulación a la baja de miR-122 tiene un papel causal en la patogenia de EHGNA junto con la participación de otros miRNAs. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que la regulación al alza de miR-21 y miR-34a están involucrados en el patogénesis de EHGNA, a través de la regulación de la lipogénesis hepática y la secreción de lípidos. (**Figura 3.2**).

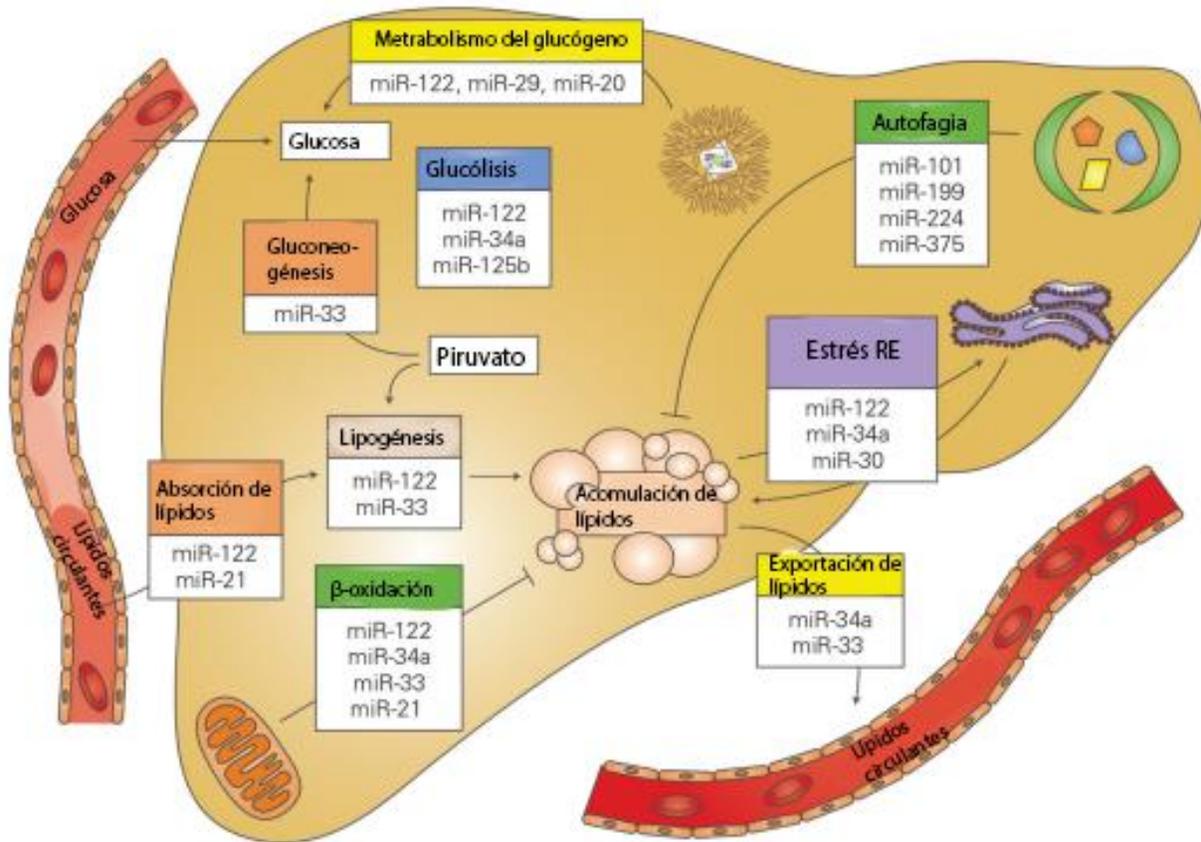


Figura 3.2. miRNAs que rigen el metabolismo de la glucosa/lípidos y las vías inducidas por el estrés en el hígado. Representación esquemática de los miRNAs que están desregulados en EHGNA y contribuyen al desarrollo de esteatosis al alterar el metabolismo hepático de glucosa y lípidos, la autofagia y el estrés ER. Todos estos procesos metabólicos están estrictamente regulados por miRNAs. Dado que los niveles elevados de glucosa alimentan LDN, las alteraciones de la glucólisis hepática, la gluconeogénesis y el metabolismo del glucógeno dependientes de miARN también son factores patológicos clave siendo mecanismos que contribuyen al desarrollo de EHGNA. Tomado de Gjorgjieva, Sobolewski, Dolicka, Correia de Sousa, & Foti, 2019.

Liu, et al., 2016 menciona que miR-34a (**Tabla 3.2**) puede ser un indicador más sensible de EHGNA que hepatocarcinoma celular. En el estudio se puede observar niveles elevados de miR-34a en el suero y el hígado de pacientes con EHGNA sugiriendo que miR-34a podría distinguir la EHGNA no solo de los controles sanos sino también de otras enfermedades hepáticas usándolo como huella digital extrahepática regulando a la baja SIRT1 llevando a la desfosforilación de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) y a la acumulación de colesterol (Fan, et al., 2021).

Tabla 3.2. Asociación de miRNA específicos con el desarrollo y progresión de EHGNA en humanos.

Tomada de Del Campo, Gallego-Durán, Gallego, & Grande, 2018.

<i>miARN</i>	<i>Vía de acción</i>	<i>Efecto sobre EHGNA</i>
<i>miR-122</i>	Metabolismo lipídico, carcinogénesis	Progresión de la enfermedad
<i>miR-192</i>	Activación de macrófagos	Progresión de la enfermedad
<i>miR-34a, miR-16</i>	Metabolismo de los lípidos	Progresión de la enfermedad
<i>miR-21, miR-34a</i>	Metabolismo de los lípidos	Progresión de la enfermedad
<i>miR-1290, miR-27b-3p y miR-192-5p</i>	Varios	Biomarcadores
<i>miR-301a-3p, miR-34a-5p y miR-375</i>	Biomarcadores	Biomarcadores
<i>miR-182</i>	Fibrogénesis	Progresión de la enfermedad
<i>miR-155</i>	Vía inflamatoria y daño hepático	Progresión de la enfermedad

Los otros miRNA (**Figura 3.3**) involucrados en la regulación de la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos son miR-33a y miR-33b, los cuales son miRNAs intrónicos ubicados dentro de los genes del factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides (*SREBF*) 2 y *SREBF* 1, respectivamente, regulando negativamente los niveles del miembro 1 de la subfamilia de transportadores ABCA (*ABCA1*), que controla la biogénesis de lipoproteínas de alta densidad, promoviendo así altos niveles de VLDL y triglicéridos circulantes (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021).

miR-33a y b controlan directamente la expresión de varias proteínas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos, estos incluyen la carnitina O-octanoiltransferasa (CROT), que ayuda a descomponer los ácidos grasos de cadena muy larga (>20 carbonos) en los peroxisomas, así como la carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A) que es el transportador limitante de los ácidos grasos hacia las mitocondrias, así como la hidroxiaxil-coenzima A-deshidrogenasa (HADHB) la cual es una subunidad de la enzima trifuncional directamente involucrada en la β -oxidación de ácidos grasos mitocondriales (Khan, Gupta, & Mahapatra, 2022).

Curiosamente, un estudio de ratones knock-out para sirtuina 6 (SIRT6) específico del hígado reveló un aumento de la glucólisis hepática, la lipogénesis y la producción de triglicéridos, lo que resultó en hepatoesteatosis (Kim, et al, 2010). Se demostró que SIRT6 regula directamente los genes diana de SREBP-1 relevantes para la producción de ácidos grasos, tales como acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), el esteroil-CoA desaturasa 1 (Scd1) y el ácido graso sintasa (FASN). Esto sugiere que la inhibición de miR-33 de la expresión de SIRT6 puede resultar en un aumento de la acetilación de la cromatina y la desrepresión de los genes de biosíntesis de ácidos grasos dependientes de SREBP y una lipogénesis elevada.

MiR-33a y miR-33b también actúan sobre la subunidad α de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), uno de los reguladores centrales del metabolismo celular y del organismo en eucariotas (Han, et al., 2020). A niveles bajos de energía, AMPK disminuye los procesos que consumen energía, como la biogénesis de ácidos grasos para promover la síntesis de ATP, mientras que la inhibición de la expresión de AMPK a través de miR-33 aumenta los niveles de colesterol y TG intracelulares (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021). Por el contrario, la inhibición de miR-33a/b mejora la oxidación de ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina, lo que sugiere que miR-33a/b podría ser un objetivo molecular potencial en el tratamiento del síndrome metabólico y EHGNA (Han, et al., 2020).

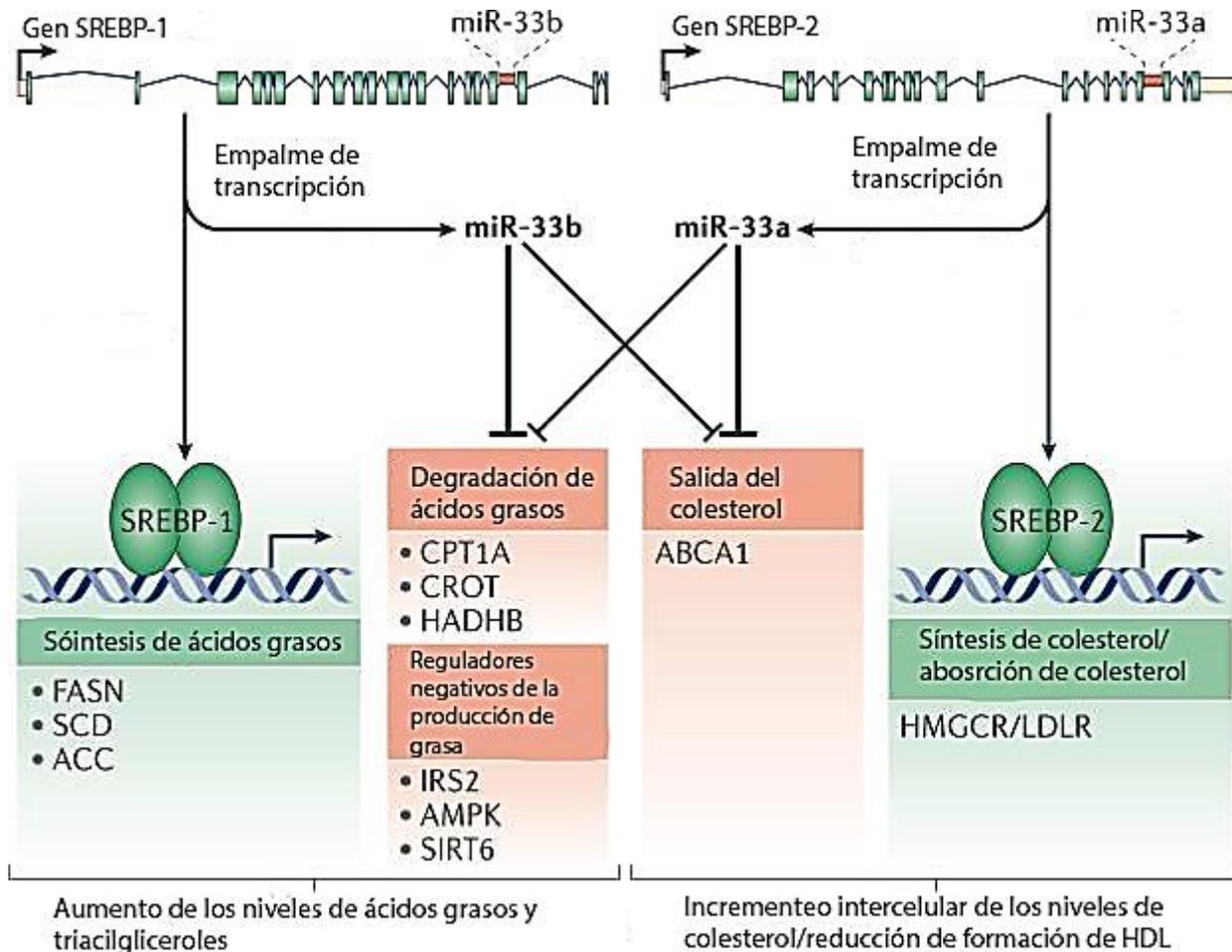


Figura 3.3. Modelo de funcionamiento de SREBP y miR-33.

Los factores de transcripción de SREBP actúan de forma coordinada con sus miARN intrónicos para regular la homeostasis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol. La transcripción de SREBF1 y SREBF2 da lugar a los factores de transcripción SREBP-1 y SREBP-2 y los miARN miR-33a/b. SREBP-1 activa genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos, mientras que SREBP-2 activa genes involucrados en la síntesis de colesterol/absorción. miR-33a y b actúan para reprimir los genes que funcionan en la β -oxidación de ácidos grasos y salida de colesterol.

En el caso de miR-34, se sabe que se sobreexpresa en pacientes con EHGNA donde se dirige a SIRT1, una desacetilasa involucrada en la regulación de la homeostasis energética como se mencionó. Además, miR-34 puede reprimir la lipofagia al reducir la oxidación mitocondrial, lo que favorece la acumulación de lípidos en el hígado (Juanola, Martínez-López, Francés, & Gómez-Hurtado, 2021).

CAPÍTULO IV: LA PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA

El "proteoma" se puede definir como el contenido global de aquellas proteínas que se encuentra dentro de una célula y se caracteriza con respecto a su localización, interacciones, modificaciones postraduccionales y rotación, en un momento determinado. El término "proteómica" se utilizó por primera vez por Marc Wilkins en 1996 para denotar el "complemento PROTein de un genOMA" (Aslam et al., 2017). La mayor parte de la información funcional de los genes se caracteriza por el proteoma.

Las proteínas son efectoras de la función biológica y los niveles no solo dependen de sus correspondientes niveles de ARNm, sino que también sobre el control y la regulación del paciente. Por lo tanto, la proteómica se consideraría como el conjunto de datos más relevantes para caracterizar un sistema biológico. El uso de esta ciencia en el estudio de EHGNA ha demostrado brindar información importante sobre la patogénesis. El análisis de alguna muestra biológica (por ejemplo, suero o plasma) permite la determinación de perfiles proteómicos y la identificación de las proteínas en estas muestras, que se pueden utilizar como una huella dactilar para el diagnóstico en la EHGNA (Sveinbjornsson, et al., 2022).

Desde el 2005 Younossi, et al, tomaron 98 pacientes del Inova Fairfax Hospital y su base de datos donde estudiaron los perfiles proteómicos de 91 pacientes con diagnóstico patológico de EHGNA y 7 controles obesos destacando 12 proteínas sin poder ser identificadas, que tenían diferencia significativa en su expresión respecto los pacientes con diagnóstico patológico comparado con los controles obesos.

Por ello Niu, et al, se centró en la investigación del perfil del proteoma plasmático de pacientes con EHGNA empleando 48 pacientes con una media de edad de 57 años; los resultados obtenidos en el estudio reportaron seis proteínas que se encontraron significativamente desreguladas que se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Proteínas desreguladas (a la alza) con diferencia significativa en pacientes con EHGNA vs. sanos.

Tomado de Harrison, et al, 2016.

<i>Proteína</i>	<i>Nombre</i>	<i>Función</i>	<i>Efecto sobre EHGNA</i>
ALDOB	Fructosa-bisfosfato aldosa B	Glucólisis	Desarrollo de esteatohepatitis
APOM	Apolipoproteína M	Transporte de lípidos	Progresión a cirrosis
LGALS3BP	Galectina-3 proteína de unión	Candidato biomarcador para la fibrosis relacionada a Hepatitis C y cirrosis.	Desarrollo de fibrosis y cirrosis
PIGR	Receptor de inmunoglobulina polimérico	Receptor de unión de IgA e IgM	Progresión a cirrosis
VTN	Vitronectina		Progresión de la enfermedad
AFM	Precursor de afamina	Proteína de unión a vitamina E	Desarrollo de esteatohepatitis

AFM y LGALS3BP ya se han sugerido como posibles marcadores de EHGNA (Wood, et al, 2017). AFM es una proteína de unión a vitamina E humana en plasma que se expresa principalmente en el hígado y se secreta en la circulación y está fuertemente asociada con componentes del síndrome metabólico (Niu, et al, 2019) y EHGNA. Curiosamente, galectina-3, el ligando de LGALS3BP, también se asocia con fibrosis en diversos tejidos, por ejemplo, riñón, pulmón, hígado y corazón. Su papel fundamental en la fibrosis ha dado lugar a estudios en curso para desarrollar fármacos antifibróticos dirigidos a la galectina-3.

Inamine y Schnabl en 2018 encontraron una regulación positiva en la Inmunoglobulina A (IgA) la cual fue propuesta como un biomarcador para daño hepático, mientras que en las inmunoglobulinas G (IgG) y M (IgM) no se encontró evidencia de alguna anomalía en pacientes sanos. Por otra parte, Niu y colaboradores observaron que había cadenas de inmunoglobulinas que se regulaban al alza en la cirrosis (IgA, IgM

e IgG) las cuales indicaban una respuesta inmune elevada en pacientes con EHGNA que se encuentran con cirrosis.

Como es conocido los trastornos metabólicos como obesidad y diabetes tienen relación con una mala función hepática y, de esta manera, con EHGNA. La existencia de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en pacientes con EHGNA que tienen alteraciones en su composición proteica ha tenido gran importancia en los trastornos metabólicos lo que conlleva a una pérdida de la función teniendo una relación con el riesgo de presentar una enfermedad cardiovascular (Heeren & Scheja, 2021).

El mantenimiento de la homeostasis de los lípidos celulares proporciona un ejemplo de actividades coordinadas entre orgánulos que involucran varios procesos de reacciones enzimáticas, mecanismos de detección de metabolitos y respuestas celulares reguladas que ocurren en un sinnúmero de ubicaciones sub-celulares como: membrana plasmática, el retículo endoplásmico (RE), los peroxisomas, las mitocondrias y los orgánulos lipídicos (OL) (Li & Olzmann, 2018). La investigación de la patogénesis de EHGNA ha mostrado importancia en el estudio de OL que se forman en el RE como una serie de vesículas de gemación que se fusionan almacenando triacilglicéridos y fosfolípidos.

En el 2018 Krahmer y colaboradores asignaron localizaciones subcelulares a aproximadamente ~6000 proteínas y más de 16000 fosfopéptidos en hígados aislados de ratones alimentados con una dieta rica en grasas (DRG) durante 3 o 12 semanas. A las 3 semanas de la DRG, cuando los ratones mostraban una resistencia a la insulina pero no mostraban niveles normales de triacilglicerol, se observó la relocalización en varios reguladores de las vías de señalización y en los factores de transcripción. Sin embargo, los cambios que más llamaron la atención se encontraron después de 12 semanas de la DRG, siguiendo el desarrollo de EHGNA donde sumado de la regulación positiva de las proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos, más del 20 % del proteoma exhibió localizaciones alteradas y una porción significativa (aproximadamente de 6 %) se redistribuyó en fracciones de OL. La asociación de proteínas con OL se ve afectada por la aglomeración de proteínas y la competencia por una superficie de membrana limitada (Kory, Thiam, Farese, & Walther, 2015). Por lo

tanto, los OL desproporcionadamente grandes en EHGNA pueden proporcionar una mayor área de superficie accesible, lo que permite la inserción anómala de proteínas en los OL y actúa como un "sumidero" de proteínas (**Figura 4.1**), causando probablemente deficiencias en una amplia variedad de procesos celulares.

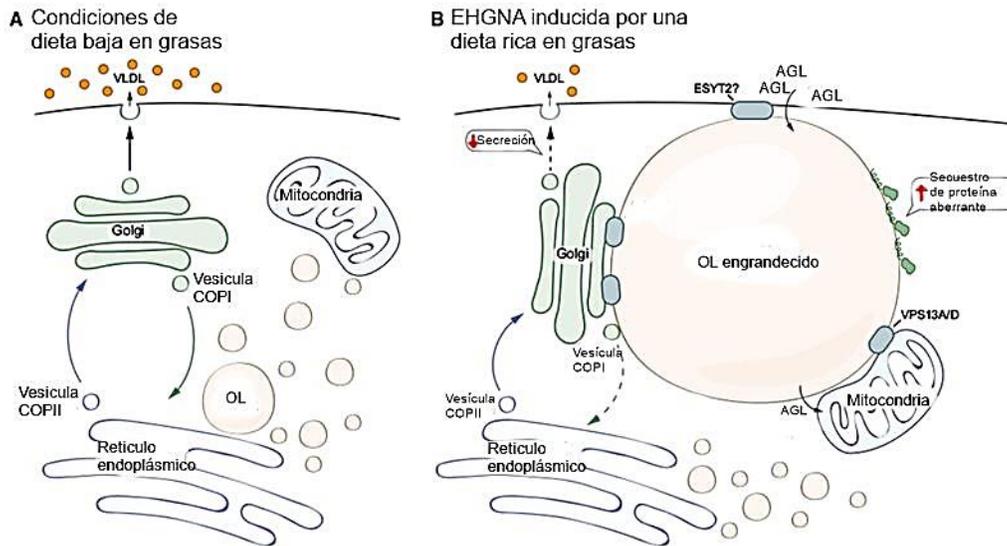


Figura 4.1. Reorganización subcelular y alteración de la secreción de OL en EHGNA. (A y B) El desarrollo de EHGNA está asociado con una reorganización subcelular dramática, que incluye el secuestro de proteínas aberrantes en las OL y el aumento de las interacciones de las OL con la membrana plasmática, las mitocondrias y el aparato de Golgi. Las proteínas del sitio de contacto de la membrana VPS13A/D (ER-mitocondria y ER-OL) y ESYT2 (ER-membrana plasmática) mostraron una distribución parcial de OL después del desarrollo de EHGNA. Esta observación plantea la intrigante posibilidad de que el aumento de la formación de contactos de OL con la membrana plasmática, el RE y las mitocondrias facilite el flujo de lípidos absorbidos en OL para su almacenamiento durante EHGNA. La microscopía electrónica confirmó una mayor asociación de las OL con las mitocondrias, lo que podría permitir la transferencia de ácidos grasos a las mitocondrias para la β -oxidación. Las alteraciones en la fosforilación de VPS13A/D y ESYT2 se correlacionaron con su redistribución, pero se desconoce si estos eventos de fosforilación afectan su localización y/o las funciones de anclaje de orgánulos. COPI: Proteína del complejo de cubierta I, COPII: Proteína del complejo de cubierta II. Modificado de Li & Olzmann, 2018.

Por otra parte, Zhi y colaboradores realizaron un estudio con un grupo de ratones a los cuales sometieron a una dieta rica en grasas (DRG) para establecer el modelo de ratón con EHGNA mientras que otro grupo de ratones fueron alimentados con una dieta normal durante 16 semanas. En este estudio se realizó el análisis bioinformático de 362 proteínas expresadas diferencialmente (PED) las cuales se asociaron con el proceso metabólico de lípidos, el proceso metabólico de ácidos grasos, el proceso metabólico de ácidos orgánicos y el proceso de oxidación-reducción (**Figura 4.2D**). Como era de

esperar, las PED aumentaron respecto a los controles en la mitocondria y el peroxisoma, donde tuvo lugar la catálisis metabólica de los orgánulos (**Figura 4.2E**). El análisis demostró que las vías relacionadas con el metabolismo, incluidas la señalización de PPAR, la señalización de AMPK, la señalización de insulina y la señalización metabólica de ácidos grasos, se veían en aumento (**Figura 4.2F**). Con base a las PED se construyó una red de procesos biológicos con reguladores ascendentes presentes en estas vías mediante un análisis de vías con dos componentes: la importancia y su valoración, donde se demuestra que el exceso de lípidos podría activar PPAR- α , PPAR- γ , SREBP, ESRR e INSR en los hepatocitos del grupo con DRG dando como resultado la activación de oxidación de ácidos grasos y formación de OL (**Figura 4.2G**).

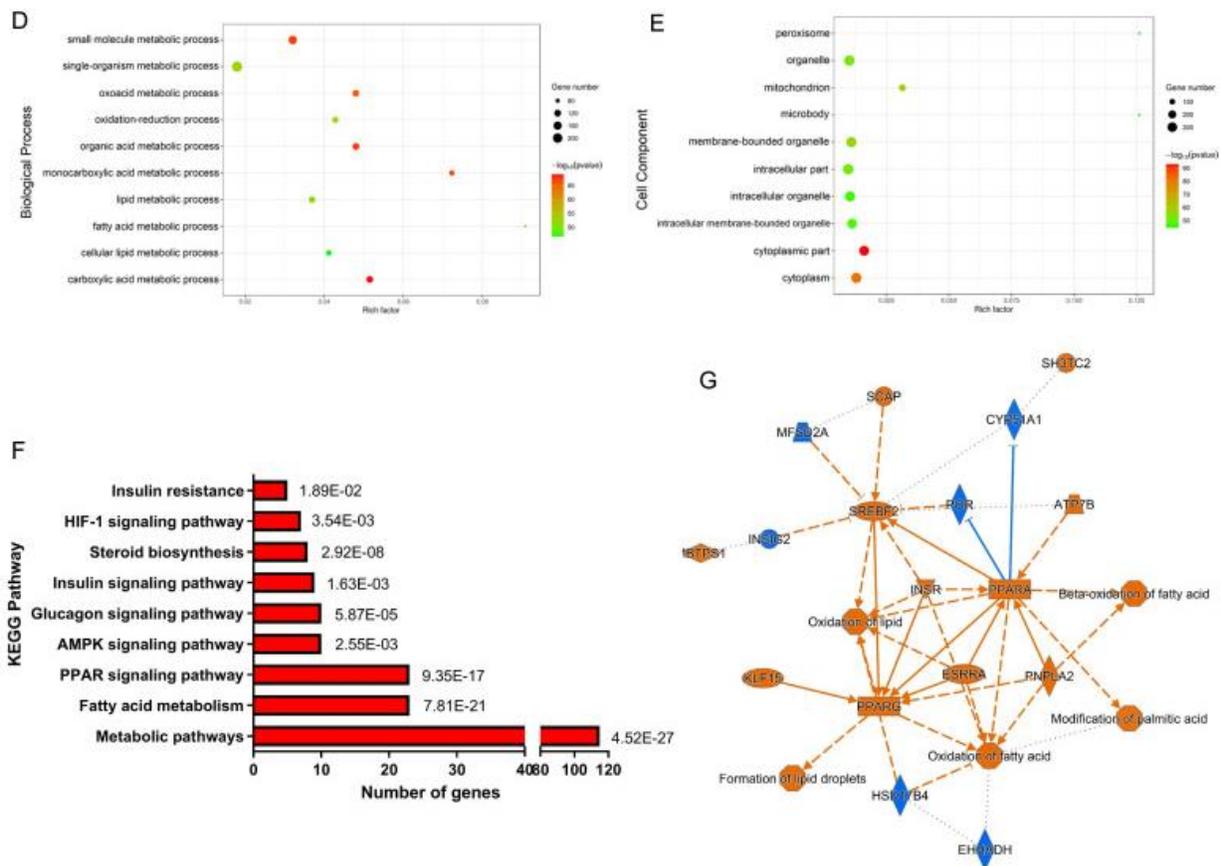


Figura 4.2. Proteómica de cuantificación de hígados de ratones alimentados con DRG y dieta normal. (D) Las proteínas altamente enriquecidas se asociaron con el proceso metabólico de lípidos, el proceso metabólico de ácidos grasos, el proceso metabólico de ácidos orgánicos y el proceso de oxidación-reducción (E) Los PED se enriquecieron significativamente en la mitocondria, el peroxisoma donde tuvo lugar la catálisis metabólica de los orgánulos (F) El análisis de enriquecimiento de la vía demostró que las vías relacionadas con el metabolismo, incluidas la señalización de PPAR, la señalización de AMPK, la señalización de insulina y la señalización metabólica de ácidos grasos, eran principalmente vías enriquecidas. (G) Con base en los PED la red que muestra que el exceso de lípidos podría activar PPAR- α , PPAR- γ , SREBP, ESRR e INSR en los hepatocitos, lo que resulta en la activación de oxidación de ácidos grasos y formación de gotitas de lípidos. El azul representa la inhibición de la proteína/proceso biológico, el naranja representa la activación de la proteína/proceso biológico. Tomada de Zhi, et al, 2022

Para la función molecular, el 69% de las PED eran proteínas con actividad catalítica (**Figura 4.3A**), entre las cuales *Acly*, *Acox1*, *Acc1*, *Hadha* y *Acadm* fueron las 5 enzimas catalíticas de alto peso en los resultados del análisis de distribución de peso. Otras funciones moleculares altamente enriquecidas en el grupo de la DRG incluyeron la unión de iones, la unión de ATP y la unión de ácidos nucleicos (**Figura 4.3A**), lo que indica que la alteración del metabolismo de los hepatocitos fue el principal desencadenante de la EHGNA. Además, en este estudio se observó que 56 PED tenían capacidad de unión a ácidos nucleicos, incluidos factores de transcripción (FT) y proteínas de unión a ARN. Teniendo en cuenta el papel crucial de los FT en la regulación de la expresión génica y la transducción de señales, se seleccionó 11 FT expresados diferencialmente para un análisis adicional (**Figura 4.3B y Tabla 4.2**). Luego se construyó la red de procesos biológicos, que reveló las interacciones de estos 11 FT con proteínas clave en el metabolismo de los lípidos, como SREBP1, AMPK, PPAR α , FASN y *Acc1* (**Figura 4.3C**). Este resultado sugiere que estos 11 TF pueden regular los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos.

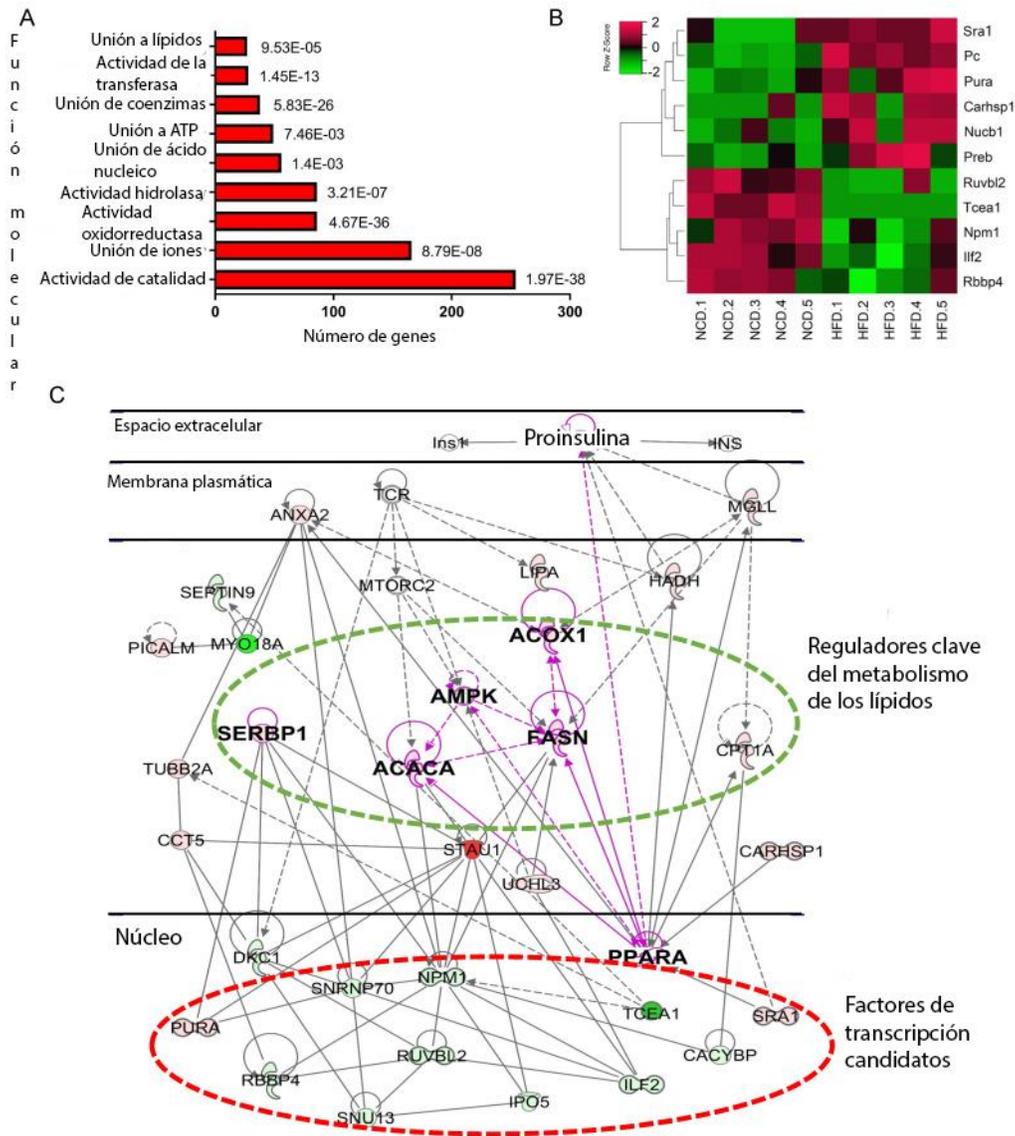


Figura 4.3. Análisis bioinformático de los PED que reveló los FT relacionados con la disfunción metabólica. (A) Funciones moleculares altamente enriquecidas que incluyó la unión de iones, la unión de ATP y la unión de ácidos nucleicos, lo que indica que la alteración del metabolismo de los hepatocitos fue el principal desencadenante de EHGNA. (B) Mapa de calor de TF de abundancia diferencial, los cuales tienen un papel crucial en la regulación de la expresión génica y la transducción de señales. (C) Red de interacción proteína-proteína sugiere que estos 11 TF pueden regular los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos. El verde representa los PED regulados a la baja, el rojo representa los PED regulados al alza, el gris representa los reguladores aguas arriba de los PED. Tomado de Zhi, et al, 2022.

Como se muestra a partir de la Figura 4.3C los factores de transcripción candidatos relacionados con EHGNA son: TCEA1, RBBP4, ILF2, NPM1, RUVBL2, PURA, SRA1, CACYBP, IPO5, SNU13 y SRNP70 los cuales se encuentran en los mismos grupos relacionados con proteínas asociadas con la EHGNA previamente descritas. En particular, RUVBL2 y SRA1 fueron dos factores de transferencia que se encontraron regulados a la alza en el tejido hepático con EHGNA lo que confirma su regulación en la acumulación de lípidos en los hepatocitos (Zhi, et al, 2022).

Tabla 4.2. Factores de transcripción diferencialmente expresados.

<i>Nombre de genes</i>	<i>Nombre de proteínas</i>	<i>Función</i>	<i>Efecto sobre EHGNA</i>
<i>Tcea1</i>	Factor de la elongación de la transcripción A-1	Habilita la actividad de la unión al ADN	Progresión de la enfermedad
<i>Ruvbl2</i>	RuvB-like 2	Esencial para la recombinación homóloga y la reparación de roturas de doble cadena de ADN	Aumento de la esteatosis
<i>Npm1</i>	Nucleofosmina 1	Varios procesos celulares como la duplicación del centrosoma, el acompañamiento de proteínas y la proliferación celular	Progresión de la enfermedad
<i>Nucb1</i>	Nucleobindina-1	Homeostasis del calcio del aparato de Golgi y en los eventos de transducción de señales regulados por Ca ²⁺	Progresión de la enfermedad
<i>Pc</i>	Piruvato carboxilasa	Codifica la piruvato carboxilasa, que requiere biotina y ATP para catalizar la carboxilación de piruvato a oxaloacetato. Se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial	Aumento de la esteatosis
<i>Pura</i>	Proteína A de unión a elementos ricos en purinas	Control tanto de la replicación como de la transcripción del ADN	Progresión de la enfermedad

Continuación Tabla 4.2.			
Sra1	Activador de ARN del receptor de esteroides 1	Regulación de actividades como el metabolismo, la adipogénesis y la organización de la cromatina	Aumento de la esteatosis
Preb	Proteína de unión al elemento regulador de la prolactina	Unión a un elemento de unión a Pit1 del promotor de la prolactina (PRL). También puede actuar como un regulador transcripcional.	Progresión de la enfermedad
Carhsp1	Proteína termoestable regulada por calcio 1	Regulación de la estabilidad del ARNm	Progresión de la enfermedad
Rbbp4	Proteína de unión al factor de remodelación de la cromatina RB	Remodelación de la cromatina y la represión transcripcional	Protección contra esteatosis
Ilf2	Factor de unión al potenciador de interleucina 2	Factor de transcripción necesario para la expresión de células T del gen de la interleucina 2	Protección contra LDN

De los 11 FT previamente mencionados, se determinó que la deficiencia de Rbbp4, Tcea1 e ILF2 promueve la acumulación de lípidos en los hepatocitos observando que, en comparación con el control, la eliminación de estos factores aumentó significativamente la acumulación de lípidos celulares. Se puede concluir que estos tres FT regulan la expresión de los genes del metabolismo de los lípidos ejerciendo efectos benéficos al suprimir la acumulación de lípidos.

El hallazgo más importante de este estudio fue el descubrimiento de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-13 (17 β -HSD13) como una nueva proteína asociada a LDN la cual puede estar involucrada en la patogénesis de la EHGNA. Dentro de este estudio se validaron los hallazgos proteómicos de 17 β -HSD13 en un modelo de ratones donde se confirmó su participación en la lipogénesis hepática en el hígado de ratón sano, por lo tanto, se puede deducir que la enzima 17 β -HSD13 se podría considerar como un candidato terapéutico para la enfermedad del hígado graso.

Perakakis y colaboradores indicaron que la proteómica en biopsias de hígado identificó casi 220 proteínas cuyos niveles difieren significativamente en pacientes con EHGNA en comparación con individuos obesos metabólicamente sanos. Las áreas localizadas con proteínas reguladas al alza (Grupo A) incluyen la región extracelular (28 %), el citoplasma (22 %), el núcleo (22 %) y la membrana plasmática (11 %). Dentro de estas proteínas reguladas al alza que se localizaban en la región extracelular contenían a la proteína FBLN5, la proteína de unión a ácidos grasos (FBP5), la cadena alfa de fibrinógeno (FGA), la cadena beta de fibrinógeno (FGB), la cadena de colágeno alfa-1 (XVIII) (COL18A1). Mientras que las proteínas reguladas negativamente (Grupo B) se localizaron principalmente en las mitocondrias (44 %), el citoplasma (28 %) y la región extracelular (11 %). Dentro de las proteínas reguladas a la baja localizadas en las mitocondrias contenían DHRS2, la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PCK2), la alfa-aminoadípico semialdehído sintasa (AASS), la D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa (D2HGDH), la acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena corta/ramificada (ACADSB). Muchas de las proteínas en las que sus niveles aumentaron en EHGNA participan en la señalización de PPAR α , la cual es una proteína de aproximadamente 56 kDa que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares. Esta proteína desempeña un papel central en la homeostasis de los lípidos, regulando las vías anabólicas y catabólicas de los mismos. También se encontró un aumento en los niveles de las interacciones matriz extracelular-receptor, mientras que las proteínas en las que sus niveles se redujeron se localizaron principalmente en las mitocondrias y participaron en la fosforilación oxidativa (**Figura 4.4**).

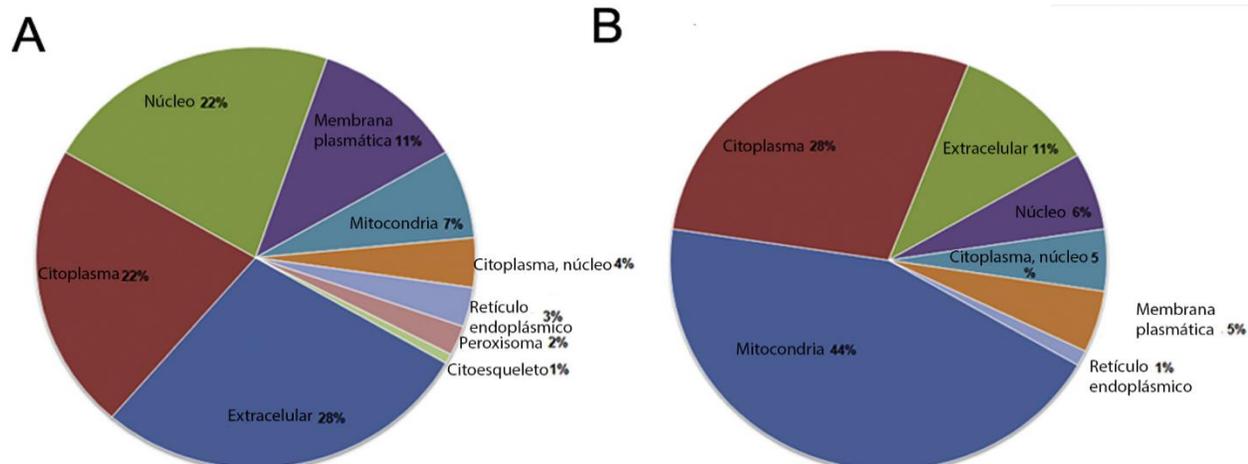


Figura 4.4. Localización subcelular de las 220 proteínas expresadas diferencialmente. Tomada de Perakakis, Stefanakis, & Mantzoros, 2020

De la misma manera Perakakis y colaboradores (2020), indicaron que han sido investigadas las diferencias proteómicas entre los tejidos hepáticos de pacientes obesos con DM-2 vs sin DM-2. El análisis identificó 850 proteínas, de las cuales 27 eran significativamente diferentes entre los dos grupos. Los niveles de proteínas implicadas en el metabolismo de la metionina y especialmente del glutatión se redujeron mientras que los niveles de otras proteínas implicadas en el estrés oxidativo aumentaron en el grupo de DM2 (Perakakis et al., 2020). Younossi y colaboradores (2018) realizaron un análisis combinado de fosfoproteoma hepático y proteoma sérico de 67 sujetos con EHGNA diagnosticada por biopsia en la cual se reconoce que la vía de la quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos ASK1-MAPK, la cual es activada por IL-10, es importante para la fibrosis hepática ya que se observa una fuerte asociación entre esta vía y un porcentaje más alto de colágeno hepático (**Figura 4.5**). Esta vía está involucrada en enfermedades humanas graves que incluyen patologías inflamatorias, cáncer y enfermedades hepáticas. Además, en la muestra de suero de este estudio, la alfa-2 macroglobulina y

el factor de coagulación V se asociaron fuertemente con el colágeno hepático, por lo tanto, se ha sugerido que estas vías podrían servir como potenciales dianas terapéuticas.

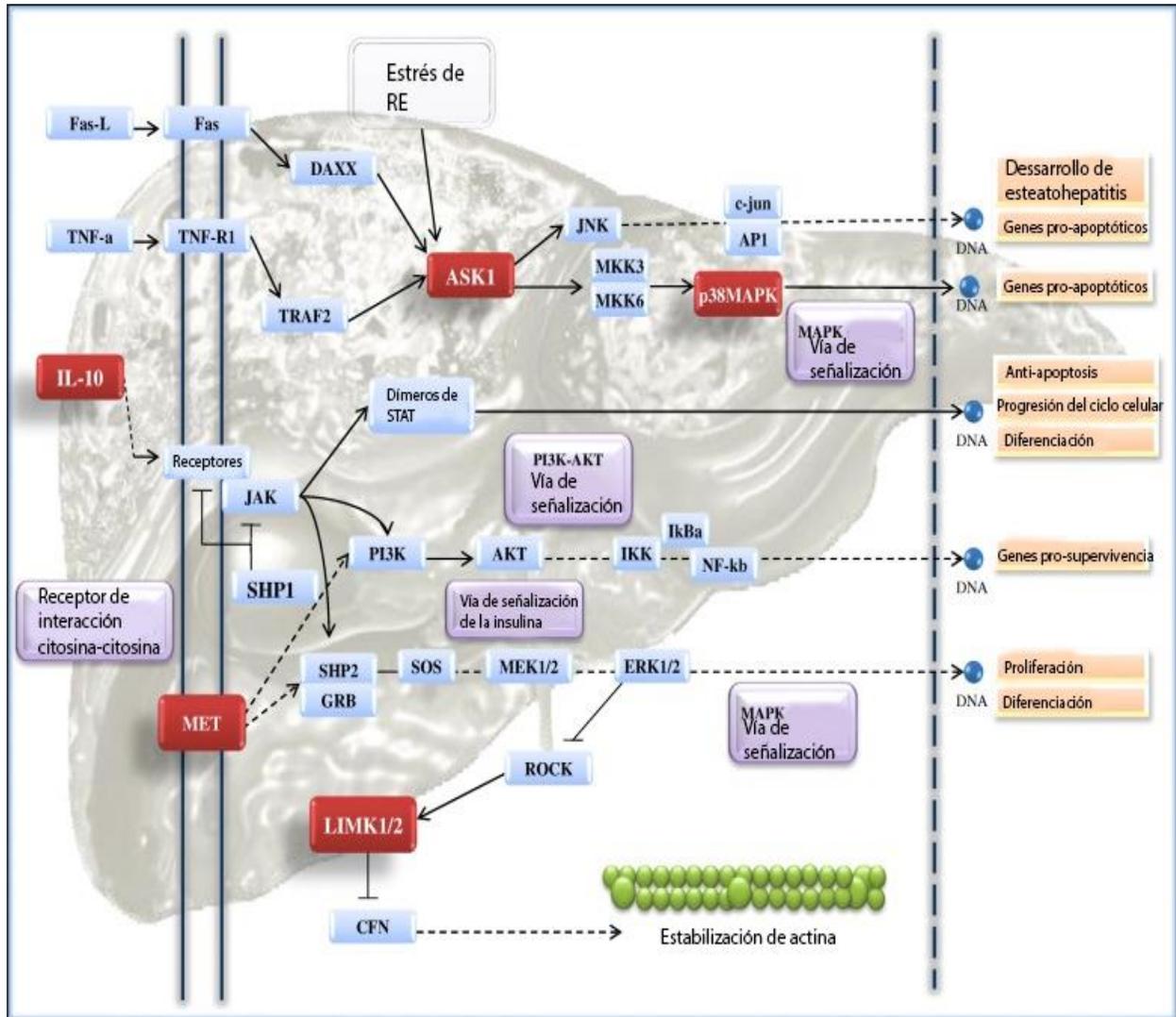


Figura 4.5. Vía compuesta de IL-10, ASK1. Las proteínas de señalización fosforiladas en el tejido hepático que se correlacionan con una mayor deposición de colágeno se dirigen a la vía ASK1-MAPK. Además, se observó la activación de p38 MAPK T180/Y182 que son miembros de la familia MAPK. En particular, la fosforilación de p38 MAPK T180/Y182 participa en una cascada de señalización que controla las respuestas celulares a las citocinas inflamatorias y al estrés. También es importante tener en cuenta que ASK1 S83 es una proteína inmunorreguladora que desempeña un papel fundamental en la señalización de la apoptosis, la inflamación y la fibrosis en el contexto de un aumento del estrés oxidativo, asociado con la patogenia de la EHGNA. La expresión de IL-10 en el hígado se asoció con la presencia de una mayor deposición de colágeno hepático en EHGNA. De hecho, la vía de señalización de IL-10 implica la fosforilación y activación de una serie de vías que pueden ser importantes en la patogenia de la EHNA y la fibrosis relacionada con la EHNA, estas incluyen la vía ASK1-MAPK, la transcripción del activador del transductor 3 y otras vías de supervivencia (sustrato del receptor de insulina 2 a través de la fosfoinositida-3 quinasa clase IA y sus efectores aguas abajo, la proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositida, el polipéptido 1 de la proteína S6 quinasa ribosomal y homólogo del oncogén v-Akt). Por otra parte, la α 2M sérica y el factor V de la coagulación se asociaron de forma independiente con un mayor % de depósito de colágeno hepático, lo que sugiere su papel potencial en el depósito de colágeno hepático en EHNA. Además, α 2M se correlaciona fuertemente con los factores de transcripción posteriores Met Y1234/1235 y LIMK1 T508/LIMK2. Estas fosfoproteínas hepáticas se han asociado de forma independiente con un aumento del colágeno hepático, conectando aún más el proteoma sérico con el fosfoproteoma hepático y sus funciones potenciales en el depósito de colágeno y la fibrosis hepática. Tomado de Younossi, et al., 2018.

En otro estudio, Yuan y colaboradores (2020), evaluaron el proteoma de tejidos hepáticos de ratones con EHGNA que desarrollaron HCC. Se observaron diferencias en los genes supresores de tumores entre ellos la proteína S100A11, que es secretada por las células cancerosas y estimula la proliferación y migración celular, se identificó y se asoció con hepatocarcinoma (HCC) de alto grado y mal pronóstico.

Más recientemente Wang y colaboradores en el 2022 usando silibinina (SIL), el cual es el principal componente de la silimina (extracto estandarizado de cardo marino), en un modelo de ratones con la EHGNA inducida por una dieta rica en grasas, ratones con una dieta normal y un grupo de ratones con dieta rica en grasas + SIL. Sus resultados indicaron que SIL puede inhibir el aumento de peso inducido por la dieta sin afectar la ingesta de alimentos, reducir la deposición de lípidos en el hígado y regular el metabolismo de la glucosa (**Figura 4.6**). Esto indicó que SIL desempeñó un papel importante en la supresión del "primer golpe" de la EHGNA.

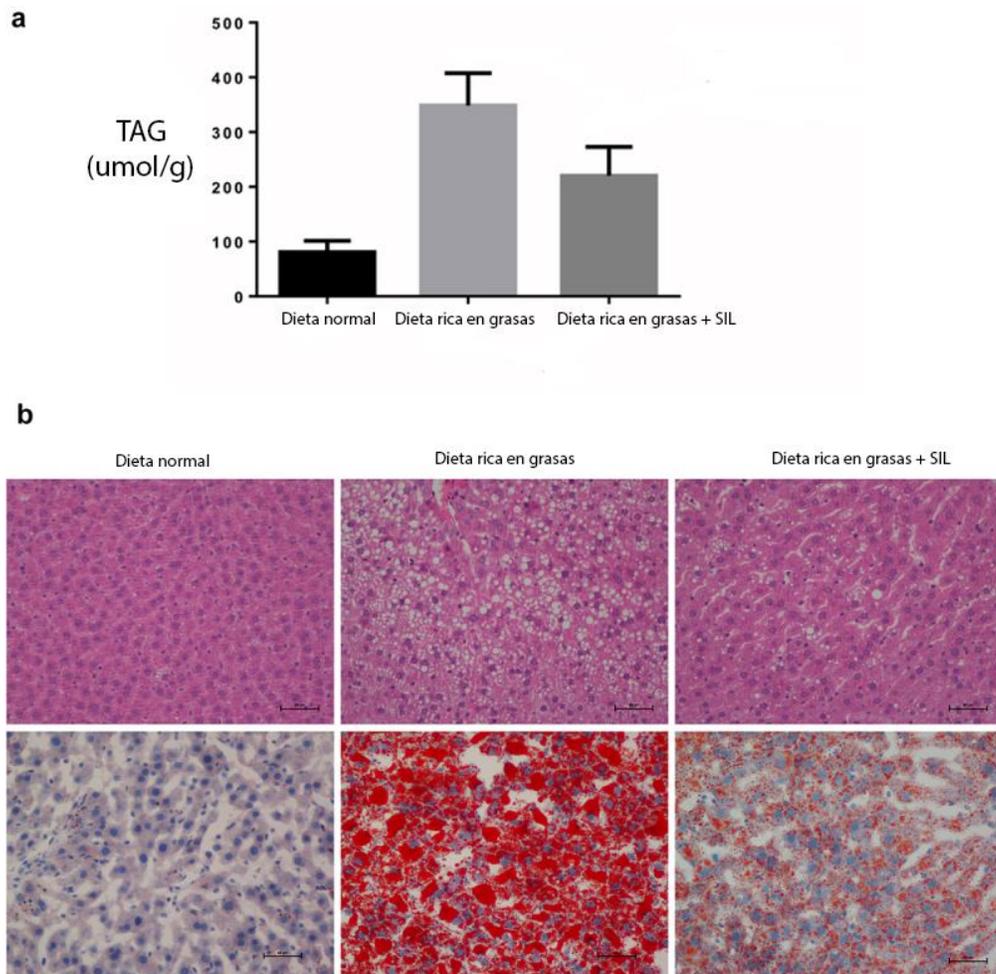


Figura 4.6. Comparación del contenido de TAG en el hígado de ratones con diferentes tipos de dieta. a) El contenido hepático de TAG aumentó significativamente en el grupo con una DRG en comparación con el grupo con una dieta normal ($P < 0,01$). El contenido hepático de TAG en el grupo DRG+SIL (silibilina) se redujo significativamente en comparación con el del grupo con una DRG ($P < 0,01$). b) La estructura del tejido hepático en el grupo de dieta normal estaba intacta, los hepatocitos estaban bien dispuestos, los lóbulos hepáticos eran regulares, el citoplasma era uniforme y no se observaron células inflamatorias ni esteatosis. En el grupo con una DRG, la estructura del lóbulo hepático estaba desordenada, los hepatocitos estaban hinchados, se observó una gran cantidad de OL y vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos. Había un gran número de infiltración de células inflamatorias en el área de los lóbulos. En el grupo DRG+SIL, la infiltración de células inflamatorias de los hepatocitos se redujo y el grado de esteatosis se redujo significativamente. En la segunda columna, se realizó la tinción con aceite rojo O. No se encontraron OL significativas en el grupo de dieta normal. Se encontró un gran número de OL y una disminución significativa de OL en el grupo DRG y el grupo DRG+SIL, respectivamente. Tomada de Wang y colaboradores, 2022.

En este estudio se identificaron 30 PED superpuestas, que estaban reguladas al alza o a la baja encontrando cuatro para un análisis más detallado, incluyendo la

perilipina 2 (PLIN2) la cual recubre los orgánulos intracelulares de almacenamiento de lípidos donde su aumento de la expresión en el hígado provoca esteatosis hepática e intolerancia a la glucosa, y su desactivación específica reduce la esteatosis hepática acompañada con una dieta rica en grasas y mejorar la IR. Sus resultados fueron consistentes con estudios previamente reportados, lo que sugiere que PLIN2 podría ser un objetivo potencial para el tratamiento de la EHGNA (Wang, et al, 2022) **(Figura 4.7)**.

Otra proteína que mostró diferencias significativas es la lipina 1 (LPIN1), una enzima fosfolipasa del ácido fosfatídico dependiente de iones magnesio que cataliza el penúltimo paso en la síntesis de triacilglicéridos. En el hígado de ratones con obesidad inducida por dieta y resistentes a la insulina, se incrementó la expresión del gen LPIN1, el cual codifica para esa proteína, lo que se relaciona con la activación de su transcripción regulada por el factor TORC2 el cual tiene como función regular la transcripción de genes de la gluconeogénesis hepática (Wang, et al, 2022). Wang indica que “la eliminación de la expresión de LPIN1 puede reducir los niveles de TAG en el hígado para regular el metabolismo de los lípidos” demostrando con su estudio que en el hígado de los ratones con una DRG, hay un incremento en la expresión de LPIN1 mientras que después del tratamiento con SIL, LPIN1 aumentó en el hígado **(Figura 4.7)**.

La tercera proteína de interés de este estudio fue la farnesil difosfato sintasa (FDPS) que codifica una enzima que cataliza la producción de pirofosfato de geranilo y pirofosfato de farnesilo a partir de pirofosfato de isopentenilo y pirofosfato de dimetilalilo y su producto resultante, farnesil pirofosfato (FPP). Esta enzima es un intermediario clave en la biosíntesis de colesterol y esteroides; un sustrato para la farnesilación y geranilgeranilación de proteínas y, un ligando o agonista para ciertos receptores de hormonas y receptores de crecimiento que, trabajando en conjunto con el glutatión S-transferasa alfa 1 (GSTA1) logran tener un papel particular en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno y los productos de la peroxidación especulando de estamanoera que SIL usaba FDPS como objetivo para regular el contenido de FPP in vivo, reduciendo así de manera efectiva la deposición de lípidos en el hígado. **(Figura 4.7)**.

Finalmente la cuarta proteína que generó un interés mayor dentro de este estudio fue la FPP la cual es una de las enzimas clave en la vía del mevalonato y cataliza la síntesis de FPP. Inicialmente se encontró que FPP puede inhibir efectivamente la acumulación de TAG en el hígado, lo que indica que la vía del mevalonato puede estar asociada con la regulación del metabolismo de los lípidos en el hígado (Wang, et al., 2022). Posteriormente se estudió el mecanismo molecular de acción de FPP. Y se observó que FPP promueve la farnesilación de quinasa hepática B1 (LKB1), activando así la vía de señalización de proteína quinasa activada por AMP (LKB1/AMPK) e inhibe la síntesis de ácidos grasos (Liu, et al., 2018). Por otra parte, FPP activa la vía de señalización del receptor farnesoide x (FXR)/ polímero hiperramificado supramolecular (SHP), inhibiendo así la activación de SREBP-1 y la LDN (Wang, et al., 2022). El nivel de FPP juega un papel importante en la regulación del metabolismo de los lípidos en el hígado por lo que si se pudiera aumentar el nivel de FPP, esto podría ser un mecanismo de gran importancia para el tratamiento de la EHGNA.

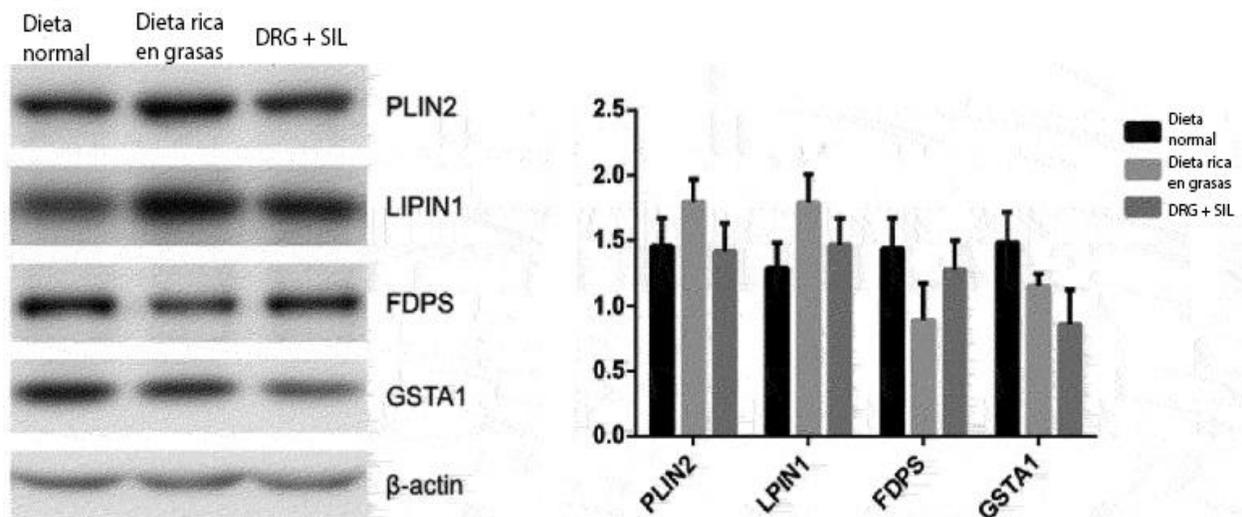


Figura 4.7. La expresión proteica relativa de PLIN2, LPIN1, FDPS y GSTA1 en el hígado. Para verificar las expresiones de proteínas diferenciales en el análisis de proteómica Wang realizó un Western Blot en gel SDS-PAGE, posterior lo transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno para detectarlo mediante quimioluminiscencia mejorada. Los resultados mostraron que las expresiones de PLIN2 ($P < 0,05$) y LPIN1 ($P < 0,01$) aumentaron significativamente en el grupo DRG, mientras que la expresión de FDPS disminuyó significativamente ($P < 0,01$). Después del tratamiento con SIL, la expresión de estas proteínas se invirtió ($P < 0,05$). La expresión de GSTA1 ($P < 0,05$) disminuyó significativamente en el grupo DRG. La expresión de GSTA1 no fue significativamente diferente entre el grupo DRG+SIL y el grupo DRG ($P > 0,05$). Tomada de Wang, et al, 2022.

En otro estudio Nardo y colaboradores (2022) usando ratones con una DRG y ratones entrenados para hacer ejercicio se demostró que el entrenamiento físico induce una marcada remodelación del proteoma de los hepatocitos, y que los factores secretados por los hepatocitos de los ratones ejercitados mejoran el metabolismo de los ácidos grasos y la acción de la insulina en los tejidos glucorreguladores (como el hígado, los músculos, el páncreas y el tejido adiposo).

Una proteína que despertó su interés fue Syndecan-4 (SDC4) que aumenta en el plasma durante el ejercicio en humanos (Lee, Kolset, Birkeland, A., & Reine, 2019) y los polimorfismos existentes están asociados con la grasa abdominal (De Nardo, et al, 2022). En particular, la expresión de SDC4 aumentó significativamente en los hígados de los ratones entrenados en ejercicio en comparación con los ratones con una DRG. Durante la evaluación del número y tamaño de las OL se encontró una reducción general del área total de gotas de lípidos con SDC4, que se asoció con un cambio en la distribución del tamaño de los OL.

La sobreexpresión de SDC4 aumentó el número de OL "más pequeñas" sin alterar el número de OL más grandes (**Figura 4.8**). Sin embargo, en relación con el número total de OL, hubo una reducción del 40% en los OL con un área mayor a $50 \mu\text{m}^2$ en ratones que sobreexpresaban SDC4 en el hígado y, lo que es más importante, el área promedio de OL "más grandes" ($>50 \mu\text{m}^2$) se redujo en SDC4 en comparación con el grupo control (**Figura 4.9**). A pesar de la remodelación significativa de las OL, no observó ninguna diferencia en los niveles totales de triacilglicéridos hepáticos según lo determinado por la evaluación bioquímica (**Figura 4.10**). En conjunto, esta remodelación del tamaño y el número de OL indicó un papel plausible para SDC4 en la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos.

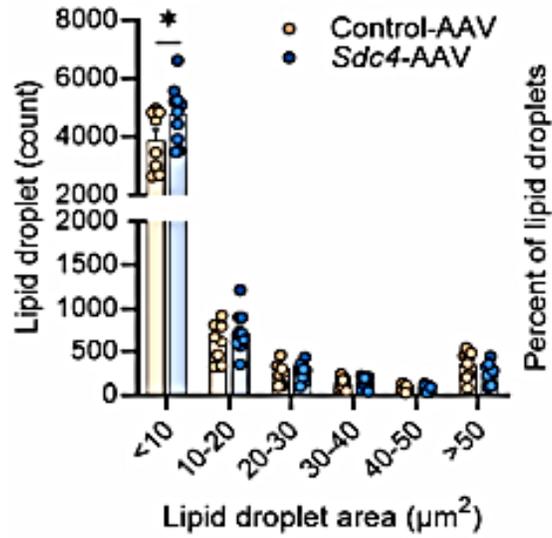


Figura 4.8. Número de OL en hígados presentado en función del tamaño de las OL.

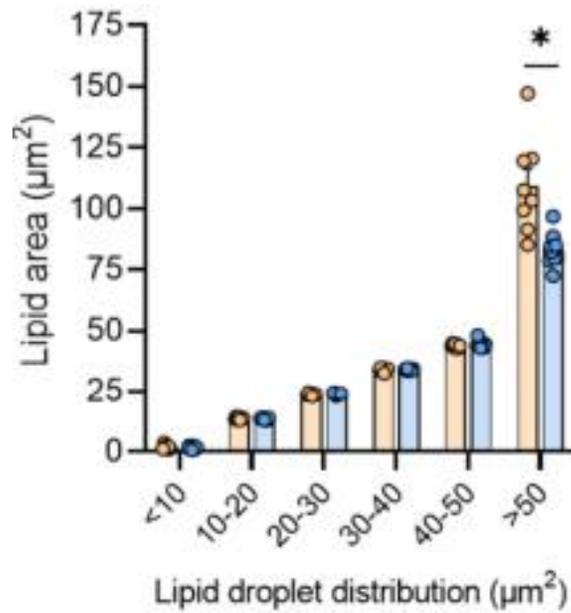


Figura 4.9. Área promedio de OL que destaca una reducción en el área de OL más grandes en ratones SDC4 frente a Control.

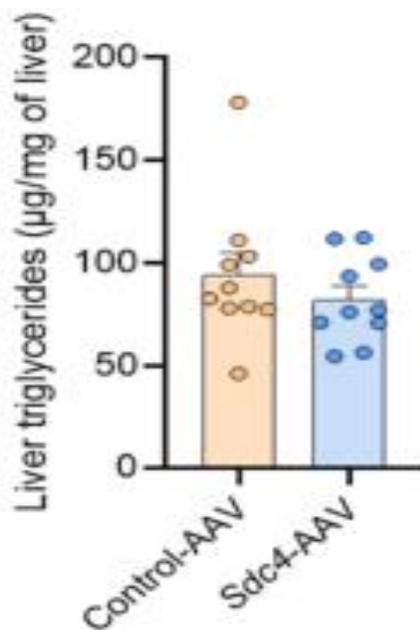


Figura 4.10. Contenido de triacilglicéridos hepáticos.

De acuerdo a la literatura, los OL más pequeños son considerados "más saludables" que las OL más grandes (Daemen, et al, 2018), tal y como lo demuestra la evidencia de Gemmink y colaboradores (2021) en su estudio, donde se observa que el entrenamiento físico reduce el tamaño de OL en las células musculares pero sin alterar la cantidad de los OL en aquellos pacientes con DM-2 y que los atletas, en comparación con las personas con obesidad y DM-2, tienen una reducción en el área de los OL y el tamaño de las OL "más grandes", independientemente de los cambios en el número total de OL.

Los estudios proteómicos han tenido una contribución bastante limitada en el desarrollo de fármacos en contra de la EHGNA hasta ahora. La mayoría de los objetivos de tratamiento se han identificado mediante estudios en animales respaldados por estudios epidemiológicos o de fisiología humana. Independientemente de la identificación de nuevos objetivos terapéuticos en el futuro, la proteómica también puede ayudar potencialmente al desarrollo de fármacos a través de otros enfoques. Por

ejemplo, la proteómica dirigida ha logrado identificar cambios (en la mayoría de los casos) en las concentraciones de transportadores de fármacos hepáticos en personas con EHNA en comparación con las personas sanas. La reducción de los transportadores de fármacos hepáticos puede tener un impacto importante en la farmacocinética y puede impulsar las decisiones de desarrollo clínico, así como las recomendaciones posológicas (Vildhede et al., 2020).

CAPÍTULO V: LA METABOLÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EHGNA

La metabolómica se refiere a la investigación de moléculas pequeñas y productos metabólicos por medio de la identificación y cuantificación sistemática de todos ellos en un organismo o muestra biológica. Gracias a la resolución proporcionada por la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), apoyado con un potente software quimiométrico, permite la determinación y comparación simultáneas de miles de entidades químicas.

Hablar de metabolómica necesariamente nos incluirá en la lipidómica al considerarse parte de la metabolómica y se refiere a la investigación de los lípidos contenidos en una célula bajo condiciones determinadas. En este apartado, nos centraremos especialmente en los cambios robustos y extensos que se observan tanto en el hígado, así como en el lipidoma circulante, lo que ha llevado al desarrollo de numerosos modelos de diagnóstico para la EHGNA, así como a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

El aumento de la acumulación de triacilglicéridos en el hígado se asocia con la formación de intermediarios tóxicos (**Figura 5.1**) que son los principales responsables del inicio de procedimientos inflamatorios y posteriormente de cambios fibróticos en la EHGNA (Perakakis, et al., 2019). Específicamente, la acumulación de ácidos grasos saturados (AGS) se asocia positivamente con la gravedad de la enfermedad hepática. En los hepatocitos, los AGS estimulan la secreción de citocinas proinflamatorias mediante la activación de la vía del receptor 4 tipo toll, aumentan el estrés del retículo endoplásmico, aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS), disminuyen la beta-oxidación mitocondrial y de peroxisomas mediante la activación de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) e inducen la apoptosis mediante la activación de la vía de señalización TRAIL-2 (Win, et al., 2018) (Musso, Cassader, Paschetta, & Gambino, 2018).

Los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) también participan en la patogénesis de EHGNA (**Figura 5.1**). Los AGM mejor estudiados y abundantes son el ácido palmitoleico (C16:1) y el ácido oleico (C18:1). Los

AGP consisten en dos clases, los AG ω -3 y ω -6 que reciben su nombre de la posición del primer doble enlace del extremo metilo del ácido graso. Los ω -3 que se consideran importantes son el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y los ω -6 más importantes son el ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n-6) y ácido araquidónico (AA, 20:4n-6). La mayoría de los AG ω -3 y ω -6 se reciben a través de la dieta donde el 5-10% derivan de ácidos grasos de 18 carbonos, mientras que en la síntesis de AG altamente insaturados como EPA, DHA y AA están involucradas diferentes enzimas, como las enzimas elongasa y desaturasa (ácido graso desaturasa-1 o 2; FADS1 o FADS2, y la Δ 9 desaturasa SCD-1) (Gormaz, Rodrigo, Videla, & Beems, 2010). En EHGNA, se observa una desregulación importante en los procesos de desaturación de ácidos grasos de cadena larga hepática, lo que da como resultado una proporción elevada de ω -6 a ω -3 y un aumento del flujo en la vía ω -6. Las concentraciones aumentadas de ω -6 conducen a la síntesis de eicosanoides por su oxidación enzimática con propiedades proinflamatorias como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que inducen inflamación hepática. Esto ocurre a expensas de la síntesis de SPM que actúan principalmente para restaurar la función celular normal y, por lo tanto, reducen la inflamación crónica y la fibrosis (Chiappini, et al, 2017). Finalmente, la alta proporción de ω -6 a ω -3 se asocia con una actividad FADS1 deteriorada que puede afectar la composición de fosfolípidos de la membrana celular, lo que resulta en una deficiencia de la membrana, necrosis celular y depósito extracelular de lípidos lipotóxicos que pueden agravar la lesión hepática (Chiappini, Desterke, Bertrand-Michel, Guettier, & Le Naour, 2016).

Las lisofosfatidilcolinas (LPC) tienen efectos hepáticos desfavorables al estimular el estrés del RE (**Figura 5.1**), causan disfunción mitocondrial y aumentan la apoptosis. Además, estimulan la liberación de vesículas extracelulares hepáticas de los hepatocitos que desencadenan procesos inflamatorios (Perakakis, Stefanakis, & Mantzoros, 2020). Además, el aumento de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) que cataliza la formación de LPC a partir de fosfatidilcolina (FDC), conduce al rápido agotamiento de FDC que afecta la integridad de la membrana de los hepatocitos y da como resultado la apoptosis de los hepatocitos, una alta liberación de lípidos lipotóxicos y un aumento de la inflamación (Sánchez-Vinces, et al., 2023). Además, la deficiencia de FDC reduce la

secreción de VLDL, lo que da como resultado una mayor degradación de lípidos intrahepáticos y la formación de intermediarios tóxicos. Además, la baja relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamida afecta la estabilidad de OL, lo que conduce a la formación de OL más grandes. Finalmente, la LPC es metabolizada por la enzima autotaxina a ácido lisofosfatídico fosfolípido que estimula la fibrosis hepática y el desarrollo de HCC (Kaffe, et al, 2017).

Las ceramidas son un tipo de esfingolípidos cuyos niveles hepáticos aumentan en la EHGNA (**Figura 5.1**) y se correlacionan positivamente con la gravedad de la enfermedad (Chiappini, et al., 2017). En los hepatocitos, la ceramida promueve la resistencia a la insulina al inhibir la señalización de la insulina mediada por Akt, altera la beta-oxidación, induce la producción de ROS, estrés RE y secreción de citocinas proinflamatorias, aumenta la lipogénesis de *novo*, la síntesis de colesterol y la acumulación de triglicéridos induciendo de esta manera la apoptosis (Musso, Cassader, Paschetta, & Gambino, 2018).

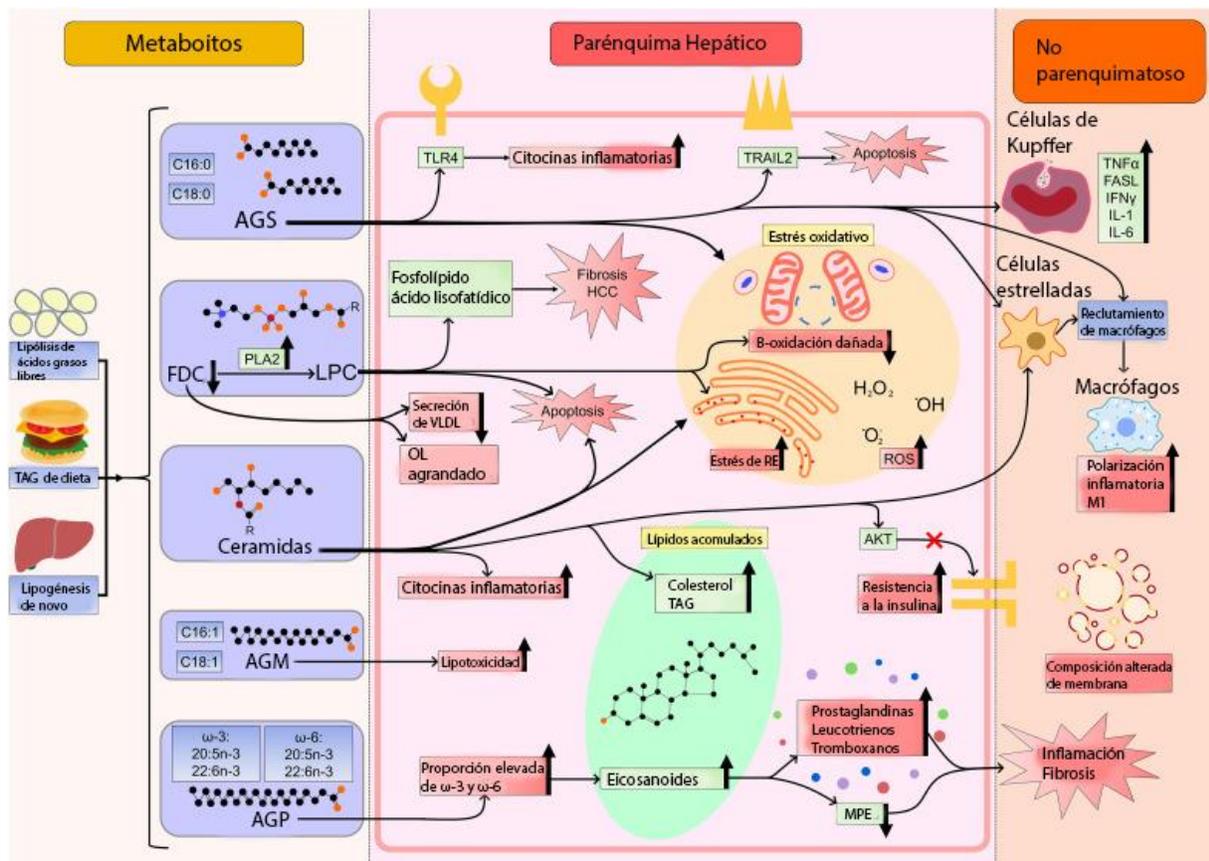


Figura 5.1. Alteraciones en el perfil lipídico relacionadas con la fisiopatología de EHGNA.

La lipólisis descontrolada del tejido adiposo, el aumento de la ingesta dietética de TAG y la lipogénesis de novo regulada al alza observada en EHGNA conduce a una proporción elevada de AGS, LPC, ceramidas y AGP $\omega 6/\omega 3$. Los AGS estimulan la secreción de citocinas inflamatorias a través de TLR4 y la apoptosis a través de TRAIL2, mientras que aumentan el estrés oxidativo, el estrés del RE y alteran la β -oxidación en las mitocondrias de los hepatocitos. En las células estrelladas estimulan el reclutamiento de macrófagos, mientras que en las células de Kupffer y macrófagos los AGS inducen su polarización al estado proinflamatorio M1. El aumento de la activación de la enzima PLA2 conduce a la formación de LPC y al agotamiento de PC. Las PC son importantes para la estabilidad de los OL y su deficiencia conduce a la formación de gotas grandes y a una secreción inadecuada de VLDL. Los LPC elevados también desencadenan mecanismos de alteración de la β -oxidación, apoptosis, fibrosis y HCC. Las altas concentraciones de ceramida hepática aumentan la síntesis de colesterol y la acumulación de TAG, promueven la resistencia a la insulina al bloquear la señalización de insulina mediada por Akt, inducen la secreción de citocinas proinflamatorias y estimulan la apoptosis al aumentar la generación de ROS, el estrés del RE y el deterioro de la β -oxidación. En las células estrelladas, aumentan el depósito de matriz extracelular y la secreción de factores proangiogénicos que promueven la fibrogénesis. Finalmente, la alta relación $\omega 6/\omega 3$ conduce a una mayor síntesis de moléculas proinflamatorias, como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos a expensas de la síntesis de AGS antiinflamatorios, lo que resulta en un resultado neto proinflamatorio y profibrótico. MPE: mediadores proresolutivos especializados. Modificada de Perakakis, Stefanakis, & Mantzoros, 2020.

En el 2017 Dong, et al., investiga las correlaciones de sus estudios cuantitativos entre las etapas de la enfermedad y la metabolómica para determinar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de EHGNA. Se analizaron 45 pacientes con EHNA, 33 pacientes con EHGNA y un grupo control de 30 pacientes sanos donde se concluyó que se destacan 32 metabolitos con diferencia, según los estándares de bibliotecas metabolómicas, de los cuales encontraron que el ácido indoleláctico, ácido 3-indolacético, L-carnitina y el ácido piroglutámico se ven enriquecidos en cinco vías metabólicas: vía de las pentosas fosfato, biosíntesis de hormonas esteroideas, secreción de bilis, metabolismo del carbono y metabolismo del glutatión. Tres de estas vías (pentosas fosfato, metabolismo del carbono y metabolismo del glutatión) podrían estar estrechamente asociados a los procesos patológicos de EHGNA.

En este estudio de Dong et al., se diferencia en los metabolitos de aminoácidos y ácidos nucleicos con los pacientes sanos y con la enfermedad en la cual la hipoxantina es menor en aquellos pacientes con la enfermedad en cualquier nivel de progresión. La hipoxantina y xantina caracterizan a la EHGNA en los trastornos del metabolismo ya que conducen a la peroxidación de lípidos y al estrés oxidativo conllevando a una presencia

mayor de radicales libres; las concentraciones de hipoxantina y xantina pueden utilizarse para estimar el grado de lesión de los hepatocitos.

Este estudio también demostró que la concentración de carnitina era mucho menor en los pacientes con EHGNA que en los pacientes sanos. El trabajo de la carnitina, aparte de aportar energía por la vía β -oxidación de ácidos grasos al formar una micela para transportar el triglicérido por la sangre hasta el interior de la mitocondria, es eliminar los radicales libres que pueden desestabilizar las membranas celulares al ser un secuestrador (*scavenger*) o mediante el incremento de las enzimas antioxidantes.

Yang et al., en el 2018 sugiere que alteraciones en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada como la leucina, isoleucina y valina se han pueden conducir al desarrollo de resistencia a la insulina en el catabolismo de estos aminoácidos activa las vías que causan la disfunción mitocondrial, pero no está claro si la disfunción mitocondrial causa resistencia a la insulina. Por lo tanto, se necesitan más estudios para verificar si los niveles elevados de estos aminoácidos en la obesidad y la DM2 causan resistencia a la insulina, que se ha demostrado que es estrechamente asociado con EHGNA en pacientes adultos, mientras que en adolescentes muchos estudios nos dan resultados contradictorios.

Más recientemente en el 2021 Masarone, et al., estudió 78 pacientes con EHGNA, 23 pacientes con EHNA y 43 con cirrosis informando que encontró 15 metabolitos cuya concentración fue mayor en pacientes con cirrosis relacionada a la EHGNA: galactosa, ácido úrico, ribitol, ácido glicérico, ácido butanoico, histidina, fenilalanina, ácido esteárico, treonina y ácido palmítico (**Figura 5.2**). La isoleucina, la valina y la asparagina mostraron gran relevancia al concluir que el aumento de aminoácidos esenciales conlleva a una mayor tasa de acumulación de proteínas, que puede ser indicativa de un aumento de la tasa de procesos catabólicos, que, a su vez, puede estar relacionado con la inflamación y la progresión de la enfermedad a fibrosis y cirrosis. Además, los aminoácidos de cadena ramificada y, en particular, la isoleucina se ha asociado con la gluconeogénesis, resistencia a la insulina y mayor riesgo en el desarrollo de DM-2, así como el riesgo cardiometabólico (Gaggini, et al., 2018).

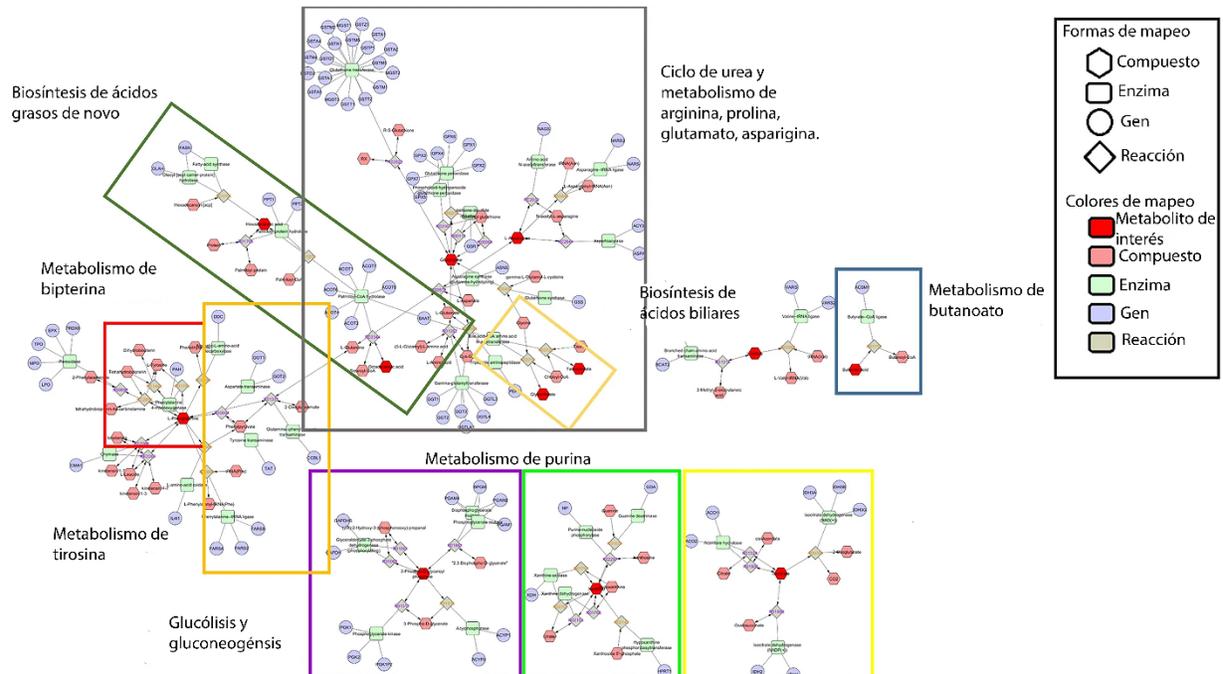


Figura 5.2. Mapa de sistemas metabólicos. Se resume la ruta más corta que puede explicar las interacciones entre los 15 metabolitos. Existe una clara interacción de varias vías que implican: biosíntesis de ácidos grasos de novo; ciclo de la urea y metabolismo de la arginina, prolina, glutamato, aspartato y asparagina; metabolismo de bipterina; síntesis de ácidos biliares; metabolismo del butanoato; metabolismo de la tirosina; glucólisis y gluconeogénesis; metabolismo de las purinas. Tomada de Masarone, et al., 2021.

También informó una reducción de la cantidad de xantina en sueros de pacientes durante la progresión de EHGNA. La oxidación de la xantina es una reacción limitante en la producción de ácido úrico y ya se ha informado como un candidato entre EHGNA e hiperuricemia (Xu, et al., 2015). Fisiológicamente la xantina oxida a urato y peróxido de hidrógeno, permitiendo la producción de ROS, al haber un nivel sérico bajo de xantina puede asociarse con niveles altos de ROS acertando lo que informó Dong, et al., (Gaggini, et al., 2018).

Muchos estudios han reportado varios modelos de diagnóstico basados en metabolómica, lipidómica sola o combinada con otros parámetros bioquímicos y clínicos para el diagnóstico y estadificación de EHGNA (**Tabla 5.1**). Los modelos tienen como objetivo diagnosticar la fibrosis avanzada (≥ 3) (en la mayoría de los estudios), diferenciar la EHGNA del estado de salud, distinguir entre EHNA y EHGNA o EHNA frente a no EHNA (en muchos estudios) o detectar la presencia de fibrosis independientemente de su estadio. (en pocos estudios). Los avances en los métodos de espectrometría de

masas y los esfuerzos por estandarizar la forma de reportar los lípidos identificados han ayudado a mejorar la metodología en los últimos años.

Tabla 5.1. Estudios metabolómicos y lipidómicos para el diagnóstico de EHGNA.

<i>Comparaciones</i>	<i>Metabolitos de predicción</i>	<i>Sensibilidad</i>
Esteatosis vs. cualquier tipo de EHGNA		
a) Eh ≤ 5% frente a EH > 6%	α-cetoglutarato	80%
b) Eh ≤ 5% frente a EH 6–30%		
c) eh ≤ 5% frente a EH 31–60% (Rodríguez-Galleg, et al., 2015)		
a) Control vs. EHGNA	a) TAG 16: 0/18: 0/18: 1, PC 18:	a) 69%
b) Predicción del porcentaje de grasa hepática (Perakakis, et al, 2019)	1/22: 6, PC (O-24: 1/20: 4)	b) 73%
Pediátrico vs. adolescente C vs. EHGNA (Khusial, et al, 2019)	b) TAG (48: 0), PC (18: 1 / 22: 6), PC (O-24: 1/20: 4)	73%
	11 metabolitos y 3 variables clínicas (Índice de sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo, TAG)	
HGNA vs. EHNA		
No EHNA vs. EHNA (Zhou, et al, 2016)	AST, insulina, genotipo PNPLA3, glutamato, isoleucina, glicina	86%
HGNA vs. EHNA (Perakakis et al., 2020).	Perfil metabólico dependiente del IMC de 292 metabolitos y 51 variables no identificadas	62%

A) Control vs. HGNA	a) Ácido indoxilsulfúrico en orina	No presenta
b) Control vs. EHNA	b) Ácido indolacético en orina	
c) HGNA vs. EHNA (Dong et al., 2017)	c) Ácido piroglutámico en orina	
A) Control vs. EHGNA	a) 11 especies de TAG e IMC	a) 88%
		b) 88%
b) HGNA vs. EHNA	b) 20 especies de TAG e IMC	

HGNA vs. EHNA vs fibrosis

A) Control vs HGNA vs. EHNA	a) 19 modelos con 10-29 variables (lípidos, glucanos, hormonas)	a) 91% b) 97%
b) F0 frente a F1-F4 (Perakakis et al., 2020)		
a) F0-F2 vs. F3-F4	a) 10 metabolitos	a) 90%
		b) no
b) Sin EHNA vs. EHNA (Caussy, et al, 2019)	b) 31 metabolitos	indicada

Fibrosis

a) EHNA 1-4 frente a EHNA ≥5	a) C15: 0, C18: 1n7c, AST, ferritina	a) 73% b) 82%
b) F0-F1 frente a F2-F4 (Yoo, et al, 2017)	b) C15: 0, C16: 1n7t, C18: 1n7c, C22: 5n3, edad, ferritina.	
a) F0-F2 vs F3-F4	Los 10 principales metabolitos de esteroides urinarios, IMC y edad	No indicada
b) Control vs F3-F4		

Baloncín hepatocelular

Baloncín (Yang, Vijayakumar, & Kahn, 2018)	Colágeno IV 7 s, colina plasmática, LPE (e-18: 2)	89%
---	---	-----

Estudios de validación					
a)	Control	vs.	EHGNA	a) Panel de 11 especies de TAG e IMC	No indicada
b)	HGNA	vs.	HENA	b) Panel de 20 especies de TAG e IMC	

La sensibilidad representa los valores de cohorte elegido por los autores, cuando no se especifican puntos de cohorte óptimos, se incluyeron los valores con mayor sensibilidad.

CAPÍTULO VI: BIOLOGÍA DE SISTEMAS

La EHGNA es una enfermedad que depende de muchos factores tanto internos como externos del ser humano que conjuntamente van desarrollando el avance de la enfermedad que preocupa cada vez más a la salud pública.

La biología de sistemas es una rama computacional de la biología que se basa en suposiciones donde el estudio del todo el cuerpo, o sistema del organismo vivo, es más poderoso que sus sistemas individuales (Funuyet-Salas J. , Martín-Rodríguez, Conrad, & Pérez-San-Gregorio, 2020). Integra una recopilación de múltiples disciplinas científicas (tales como bioinformática, biología, informática, física) que se ocupan de un sistema biológico en el que su comportamiento se vuelve predecible y al momento de tener condiciones que llegaran a modificar sus condiciones poder tener una pronta respuesta a este. Gracias a esto podemos obtener una construcción de modelos predictivos multi escala, facilitando a los investigadores el descubrir nuevos biomarcadores de enfermedades y diseñar estrategias terapéuticas que estén orientadas a la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica.

La aparición de las tecnologías "ómicas" ha generado los datos necesarios para describir las redes en una escala mucho mayor de lo que era posible anteriormente. Esto ha llevado al desarrollo de enfoques que infieren relaciones entre los componentes de la red que cambian de la misma manera después de la perturbación del sistema de interés.

A la fecha se ha tenido una creciente en los avances tecnológicos proporcionando una recopilación de muchos datos que no fueron analizados conjuntamente llevando a una transición de la "ómica" a "multi-ómicas" por lo cual su análisis es necesario, ofreciendo una ventana más amplia en la fisiopatología de la enfermedad dándonos como resultado diferentes puntos de vista (**Figura 6.1**). Se han desarrollado herramientas de biología de sistemas que integran datos "ómicos" como las redes metabólicas a escala genómica. Estas herramientas son ampliamente utilizadas por los investigadores para revelar las causas de las enfermedades humanas (Funuyet-Salas J. , Martín-Rodríguez, Conrad, & Pérez-San-Gregorio, 2020). La investigación de EHGNA

incluye, en su mayor parte, estudios de modelos humanos y animales para tener como resultado la aplicación de nuevas estrategias en la biología de sistemas lo cual podría ser beneficioso en la explicación de la fisiopatología y algún tratamiento de EHGNA, ayudando al desarrollo de nuevos diagnósticos que no sean invasivos o menos invasivos. La fisiopatología de EHGNA tiende a variar de un paciente a otro por lo que el estudio de la enfermedad por medio de un análisis de biología de sistemas nos ayuda a que la naturaleza de EHGNA tenga un enfoque personalizado de la salud del paciente obteniendo una "firma molecular" de la fisiopatología en el paciente.

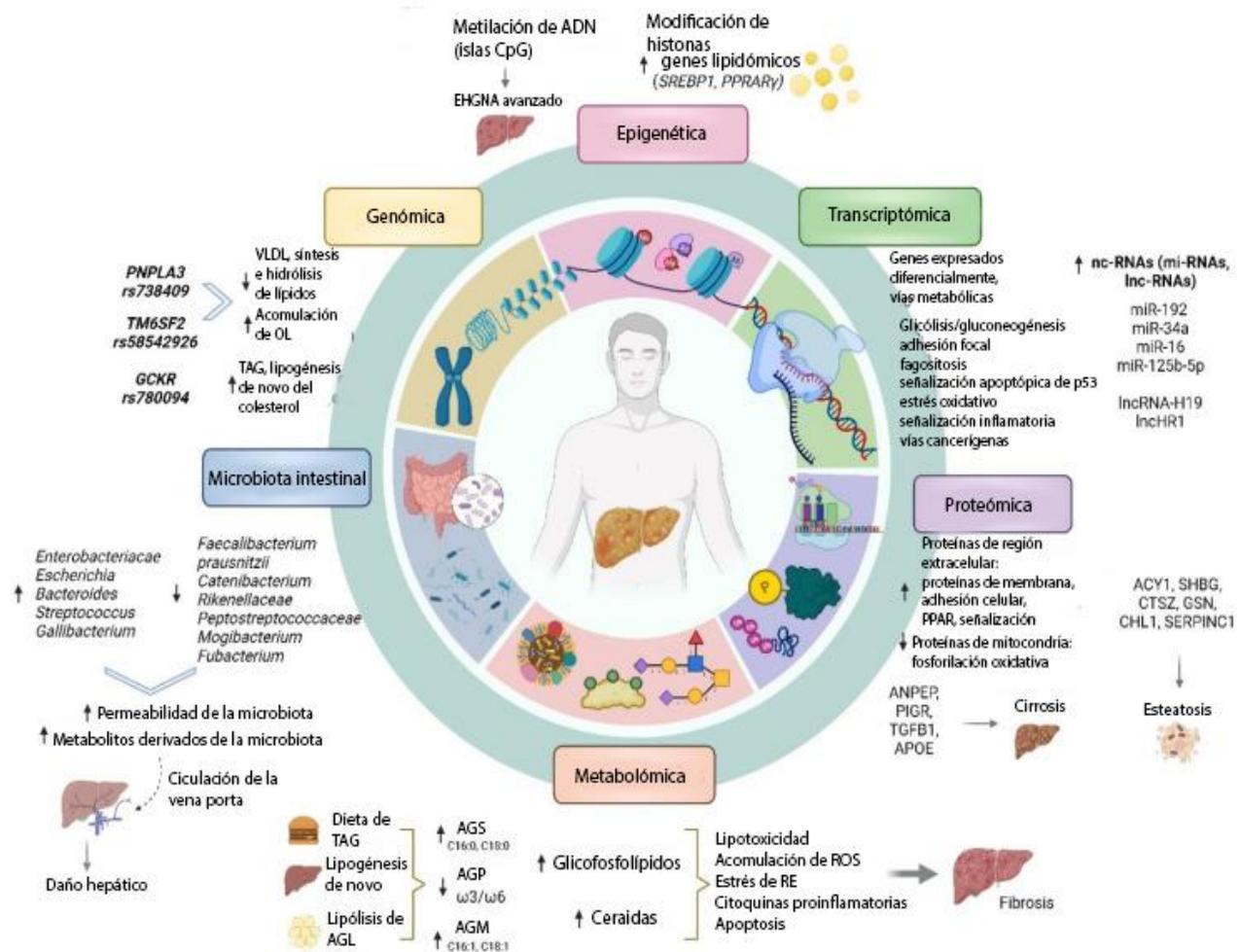


Figura 6.1 Descripción general de las modificaciones ómicas en la patogénesis de EHGNA y su papel potencial como biomarcadores de diagnóstico. ACY1: aminoacilasa 1, ANPEP: alanil aminopeptidasa, APOE: apolipoproteína E, CHL1: molécula de adhesión celular similar a L1, CTSZ: catepsina Z, RE: retículo endoplásmico, AGL: ácido graso libre, GSN: gelsolina, GCKR: gen regulador de la glucoquinasa, HDAC: histona desacetilasas, HAT: histona acetiltransferasas, IGF: factor de crecimiento similar a la insulina, lncRNA: ARN largo no codificante, mi-ARN: microARN, AGM: ácido graso monoinsaturado, nc-ARN: ácidos ribodesoxinucleicos no codificantes, PPRARY: receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas, PIGR: receptor polimérico de inmunoglobulina, AGP: ácido graso polisaturado, PNPLA3: fosfolipasa similar a la patatina que contiene el dominio 3, ROS: especies reactivas de oxígeno, SREBP1: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1, SERPINC1: miembro 1 de la familia de serpinas C, AGS: ácido libre saturado, SHBG: globulina transportadora de hormonas sexuales, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido, TGFB1: factor de crecimiento transformante beta 1, TAG: triacilglicéridos, TM6SF2: miembro 2 de la superfamilia transmembrana 6, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. Modificado de Martinou, Pericleous, Stefanova, Kaur, & Angelidi, 2022.

A pesar del enorme éxito que ha sido GWAS al mostrarnos cientos de variantes genéticas comunes que están asociadas con enfermedades humanas (Buniello *et al.*, 2019), los genes, vías diana y las variantes asociadas a la enfermedad no están completamente claras. En uno de las primeras aplicaciones de la biología de sistemas (Mäkinen *et al.*, 2014) se integraron 16 GWAS humanos, que vivían con enfermedad cardiovascular que se ha comprobado que tiene alta relevancia en la EHGNA, con datos de transcriptomas de tejido y la expresión de loci de rasgos cuantitativos (eQTL) del hígado, el tejido adiposo, la sangre y las células endoteliales vasculares para de esta manera vincular variantes genéticas con posibles genes basado en la regulación génica específica de tejido. Al hacerlo, este estudio recapituló todas las vías previamente conocidas involucradas en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (como el colesterol y el metabolismo de los lípidos, la disfunción vascular y la inflamación), a su vez, revelaron nuevas vías: la neuroprotección mediada por eritropoyetina a través de NF- κ B, el ciclo celular, el estrés celular y la espliceosoma. Otro enfoque para integrar y explotar una gran cantidad de datos heterogéneos para poder proporcionar predicciones es la presentación de modelos metabólicos y genómicos a escala (GEMs). La clave es que los datos de proteómica, transcriptómica, metabolómica y genómica junto con el conocimiento de las vías biológicas se puede integrar para permitir el cálculo de las modulaciones de flujo de la enfermedad. Por ejemplo, utilizando datos de secuenciación de ARN apropiados del hígado, podemos inferir miles de cambios en la naturaleza del

flujo hepático que ocurren entre hígado con alimento y en ayunas, o entre tejido hepático tratado y no tratado.

En la era del descubrimiento de biomarcadores no invasivos, la “ómica” es un enfoque revolucionario prometedor, ya que proporciona el beneficio de un análisis a gran escala de las muestras de los pacientes (Niu, et al., 2021). El avance en la tecnología “ómica” ha permitido la identificación de nuevos biomarcadores prometedores en un enfoque libre de hipótesis. Además, las metodologías basadas en el aprendizaje automático evolucionan constantemente para descubrir paneles de marcadores “multiómicos” y explorar su precisión diagnóstica (Wong, Adams, de Lédinghen, Wong, & S., 2018). Los estudios pioneros ahora están investigando la integración de datos “multiómicos” con características clínicas para construir clasificadores de componentes múltiples para diagnosticar EHGNA.

El propósito final de reemplazar la biopsia hepática con biomarcadores no invasivos precisos y altamente específicos permanece (Perakakis, Stefanakis, & Mantzoros, 2020). A pesar de los notables avances en las tecnologías “multiómicas”, los modelos “multiómicos” de diagnóstico aún no han alcanzado el nivel deseado de rendimiento para incorporarse a la práctica clínica debido a los desafíos existentes, como el alto costo y la disponibilidad reducida (Perakakis, Stefanakis, & Mantzoros, 2020).

Sin duda, con el avance de las tecnologías de secuenciación “ómica”, el software de biología computacional y la inteligencia artificial, en el futuro se llevarán a cabo estudios “ómicos” a mayor escala para ayudar al descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico en EHGNA. En la era del descubrimiento personalizado de biomarcadores no invasivos, la integración de datos “ómicos”, características clínicas e información de imágenes facilitará el diagnóstico, la estratificación y el pronóstico de los pacientes con EHGNA (**Figura 6.2**).

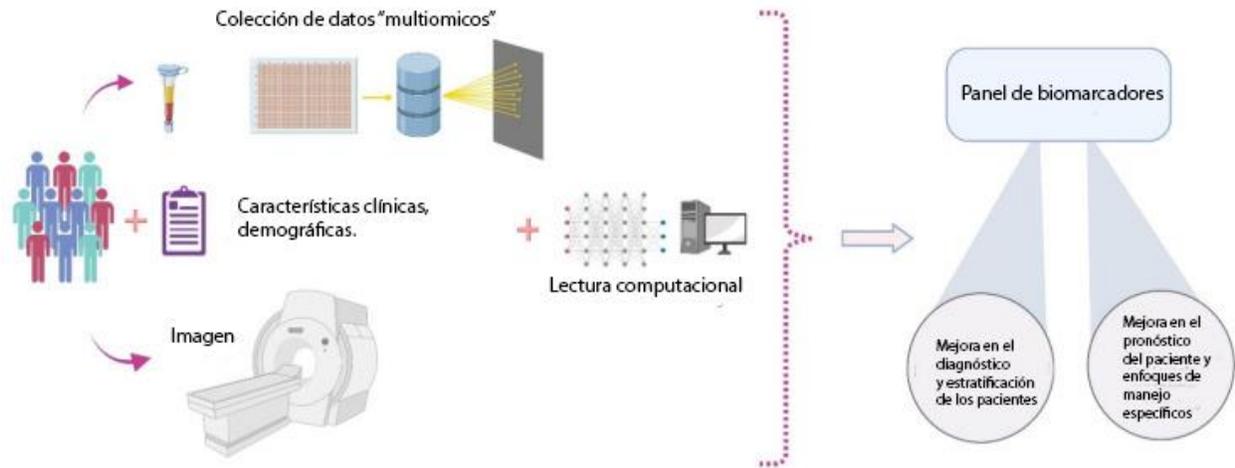


Figura 6.2. Direcciones futuras en la era del diagnóstico no invasivo de EHGA mediante la integración de grandes datos “ómicos” con información e imágenes clínicas. Modificado de Martinou, Pericleous, Stefanova, Kaur, & Angelidi, 2022.

En el futuro el diagnóstico personalizado podría ser una combinación de todos los datos recopilados del estudio de las ciencias “ómicas” en las redes metabólicas mencionadas en capítulos anteriores conduciendo a medicamentos y tratamientos personalizados. El diagnóstico personalizado podría mejorar nuestro conocimiento científico detrás de la biología de la enfermedad, permitiendo mejores intervenciones.

CONCLUSIONES

En conclusión, las “ómicas” están contribuyendo al gran avance que se ha observado en la investigación de salud hepática en los últimos años, que se caracteriza por el uso de grandes y diversos datos analizados por herramientas matemáticas y computacionales avanzadas para identificar nuevas formas de entender la biología humana y su salud. El poder de estas tecnologías crea oportunidades significativas para abordar necesidades clínicas no satisfechas, como el diagnóstico y tratamientos no invasivos de EHGNA. En este contexto, parece razonable considerar los primeros estudios de prueba de concepto en esta área de la investigación como contribuciones a la comprensión y establecimiento de la metodología de las herramientas necesarias para lograr grandes avances en el tratamiento en el futuro cercano de nuestros semejantes que sufren esta enfermedad.

ANEXOS

Anexo 1: Metodología de microarreglos.

Una microarreglo contiene de miles a millones de fragmentos de ADN complementario (ADNc) u oligonucleótidos (llamados sondas) que se hibridan con moléculas de ARN específicas en una muestra. Se usa ampliamente para examinar la expresión génica perfiles de multitud de células y tejidos. Esta tecnología se basa en la hibridación de ARN de tejidos o células a ADNc inmovilizado en un chip de vidrio o, en casos cada vez más raros, en una membrana de nailon.

En un esfuerzo por estandarizar los miles de experimentos de microarreglos, La sociedad Microarray Gene Expression Database (MIAME) estableció pautas que requieren que los investigadores se ajusten a ellas. MIAME describe la información mínima sobre un experimento de microarreglos que se requiere interpretar los resultados del experimento y compararlo con otros experimentos de otros grupos. En resumen, estas pautas incluyen:

1. Diseño del arreglo: se refiere a la información sobre la plataforma del arreglo, descripción del clones y oligómeros, y números de catálogo para arreglos comerciales. Esto también debería incluya la ubicación de cada característica, así como las explicaciones de la anotación de características.

2. Diseño experimental: una descripción y los objetivos del experimento, justificación para células/tejidos y tratamiento utilizado, pasos de control de calidad y enlaces a cualquier bases de datos necesarias.

3. Selección de muestras: criterios para la selección de muestras, descripción de los procedimientos utilizados para la extracción de ARN y etiquetado de muestras.

4. Hibridación: condiciones de hibridación, incluido el bloqueo y lavado de portaobjetos.

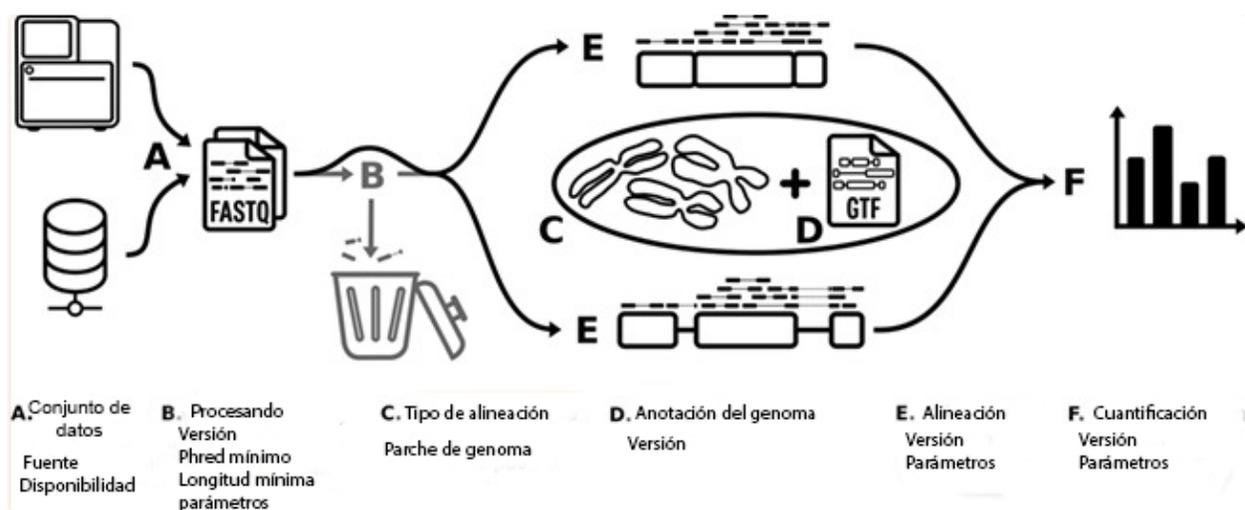
5. Análisis de datos: descripción de los datos en bruto, así como de las imágenes originales, hardware y software utilizados, así como los criterios utilizados para el procesamiento y normalización de los datos.

Anexo 2: Metodología ARN-seq.

La secuenciación de ácido ribonucleico (RNA-seq) permite la identificación y cuantificación de moléculas de ARN a partir de una muestra biológica. En un experimento de RNA-seq, se introduce una anotación del genoma después del paso de secuenciación, lo que permite volver a analizar el mismo conjunto de datos utilizando diferentes software y referencias, manteniendo la relevancia de los conjuntos de datos después de las actualizaciones de anotaciones genómicas y del genoma (Simoneau, Dumontier, Gosselin, & Scott, 2021).

Los resultados de cuantificación en RNA-seq están sujetos a diferentes tipos de ruido que generalmente se clasifican como de naturaleza técnica o biológica. El ruido técnico representa variaciones debidas a las manipulaciones de laboratorio, desde la extracción de ARN hasta la secuenciación mientras que el ruido biológico incluye una gama más amplia de fuentes, según el diseño experimental. Para una canalización de análisis computacional de RNA-seq se realiza conforme a la Figura siguiente:

Figura A.2. Secuenciación de metodología ARN-seq.



GLOSARIO DE TÉRMINOS

Cohorte: el término se refiere a “un grupo de personas con características definidas que son objeto de seguimiento para determinar la incidencia o la mortalidad por alguna enfermedad específica, todas las causas de muerte o algún otro resultado” (Wang & Kattan, 2020).

Un estudio de cohorte observa a las personas como dos o más grupos, desde la exposición hasta el resultado. Una característica clave del diseño del estudio de cohorte es que los sujetos son objeto de seguimiento a lo largo del tiempo. Comienza con sujetos que están expuestos y no expuestos a un factor y luego evalúa la ocurrencia posterior de un resultado. A diferencia de los estudios transversales, que a menudo se utilizan para determinar la prevalencia, los estudios de cohortes se utilizan para estudiar la incidencia, las causas y el pronóstico (Belbasis & Bellou, 2018). En la investigación clínica, los estudios de cohortes son apropiados cuando existe evidencia que sugiere una asociación entre una exposición y un resultado, y el intervalo de tiempo entre la exposición y el desarrollo del resultado es razonable. Los estudios de cohortes son el diseño de elección para determinar la incidencia y la historia natural de una afección.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AASS: alfa-aminoadípico semialdehído sintasa.

ABCA1: miembro 1 de la subfamilia de transportadores ABCA.

ACADSB: acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena corta/ramificada.

ACC1: acetil-CoA carboxilasa 1.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADH1B: deshidrogenasa alcohólica.

AGM: ácidos grasos monoinsaturados.

AGP: ácidos grasos poliinsaturados

AEBP1: proteína 1 de unión a AE.

AGCC: ácido graso de cadena corta.

AGL: ácidos grasos libres.

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos.

AMPK: cinasa dependiente de adenosina monofosfato.

BCAA: aminoácidos de cadena ramificada.

CAGE: cap analysis of gene expression

CAP: parámetro de atenuación controlada.

ChREBP: proteína de unión a elementos respuesta a carbohidratos.

CHI3L1: quitinasa 3 similar a 1.

COL1A1: colágeno tipo 1, cadena α 1.

COL1A2: tipo colágeno 1, cadena α 2.

COL3A1: colágeno tipo III, cadena α 1.

CREBH: proteína H de unión a elementos sensible al monofosfato de adenosina cíclico.

CPT1A: carnitina palmitoiltransferasa 1A.

CROT: carnitina O-octanoiltransferasa.

CYP8B1: citocromo P450 12 α -hidroxilasa B1.

C7: complemento C7.

DAG: diacilglicerol.

DCDC2: proteína 2 que contiene el dominio Doublecortin.

DGAT2: diacilglicerol acetiltransferasa.

DHRS4: deshidrogenasa/reductasa 4.

DM: diabetes mellitus.

DM-2: diabetes mellitus tipo 2.

DNMT: ADN metiltransferasas.

DPT: dermatopontina.

DRG: dieta rica en grasas.

D2HGDH: D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa.

E: glutamato.

ECV: enfermedad cardiovascular.

EFEMP1: proteína 1 de matriz extracelular tipo fibulina contenedora de EGF.

EH: ecografía hepática.

EHG: enfermedad de hígado graso.

EHGNA: enfermedad del hígado graso no alcohólico.

EHNA: esteatosis hepática no alcohólica.

EPHA3: receptor A3 de EPH.

ERC: enfermedad renal crónica.

ERM: espectroscopía de resonancia magnética.

FAP: proteína de activación de fibroblastos α .

FASN: ácido graso sintasa.

FBLN5: fibulina-5.

FBP5: proteína de unión a ácidos grasos.

FDC: fosfatidilcolina.

FDPS: farnesil difosfato sintasa.

FGA: cadena alfa de fibrinógeno.

FGB: cadena beta de fibrinógeno.

FGF19: factor de crecimiento de fibroblastos 19.

FMO: flavin monooxigenasas.

FPP: farnesil pirofosfato.

FT: factores de transcripción.

FXR: receptor X farnesoide del receptor nuclear.

GCKR: glucocinasa.

GCKRP: proteína reguladora de la glucoquinasa.

GEM: proteína de unión a GTP sobreexpresada en el músculo esquelético.

GGPR41: receptores acoplados a proteína G.

GLP1: péptido 1 similar al glucagón.

GPR43: receptores acoplados a proteína.

GSTA1: glutatión S-transferasa alfa 1.

GWAS: estudio de asociación de genoma completo.

HADHB: hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa.

HAT: histonas acetiltransferasas.

HCC: hepatocarcinoma.

HDAC: histonas desacetilasas.

HDL: lipoproteína de alta densidad.

HGNA: hígado graso no alcohólico.

HNE: 4-hidroxinenal.

HSL: hormona sensible a lipasas.

HTAG: hipertriacilgliceridemia.

IL-1: interleucina-1.

IL-6: interleucina-6.

IL-8: interleucina-8.

IMC: índice de masa corporal.

IgA: inmunoglobulina A.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

IRS-2: receptores de insulina-2.

ITGBL1: subunidad β de la integrina 1.

JNK: quinasas c-Jun N-terminal.

K: lisina.

LAMA2: subunidad de laminina α 2.

LBP: proteína de unión a LPS.

LDN: lipogénesis de novo.

LncRNA: ARN largos no codificantes.

LKB1: quinasa hepática B1.

LKB1/AMPK: vía de señalización de proteína quinasa activada por AMP.

LPC: lisofosfatidilcolinas.

LPIN1: lipina 1.

LPS: lipopolisacáridos.

LRAT: lecitina retinol aciltransferasa.

LUM: proteína de matriz extracelular codificada por el gen Lum.

MBOAT7: O-aciltransferasa unido a membrana 7.

MDA: monodialdehído.

MT-ND6: gen deshidrogenasa 6 codificado mitocondrialmente.

MPSS: massively parallel signature sequencing.

MS: espectrometría de masas.

OL: orgánulo lipídico.

PAI-1: inhibidor 1 del activador del plasminógeno.

PCK2: fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PED: proteínas expresadas diferencialmente.

PFK: fosfofructoquinasa.

PLA2: fosfolipasa A2.

PLIN2: perilipina 2.

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa.

PNPLA3: fosfolipasa 3 similar a patatina.

PPAR- α : receptor alfa activado por proliferación de peroxisoma.

PPAR γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma.

POMC: proopiomelancortina.

PYY: péptido YY.

RBP: proteína fijadora de retinol.

RDH10: retinol deshidrogenasa 10.

RDH11: retinol deshidrogenasa 11.

RE: retículo endoplásmico.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RNA-seq: secuenciación de ácido ribonucleico.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RPD: respuesta proteica desplegada.

SAH: S-adenosilhomocisteína.

SAGE: serial analysis of gene expression.

SAM: S-adenosilmetionina.

SCD1: estearoil-CoA desaturasa 1.

SDC4: sydecán-4.

SHP: polímero hiperramificado supramolecular.

SIL: silibina.

SIRT1: desacetilasa sirtuina-1.

SIRT6: sirtuina 6.

SM: Síndrome metabólico.

SNS: sistema nervioso simpático.

SPP1: osteopontina.

SP1: proteasa del sitio 1.

SP2: proteasa del sitio 2.

SREBF: factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides.

SREBP-1: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides-1.

STAT3: vía de señalización de transcripción-3.

STMN2: estatmina 2.

S100A6: proteína A6 de unión al calcio S100.

TAG: triacilglicerol.

TC: tomografía computarizada.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformador β -1.

TGR5: receptor de ácidos biliares acoplado a la proteína G Takeda.

TLR4: receptor 4 tipo toll.

TMA: trimetilamina.

TMAO: N-óxido de trimetilamina.

TMC4: gen tipo canal transmembranal 4.

TM6SF2: gen miembro 2 de la superfamilia transmembranal 6.

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α .

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

17 β -HSD13: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-13.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasalizad Farhangi, M., Mohseni, F., Farajnia, S., & Jafarabadi, M. A. (2016). Major components of metabolic syndrome and nutritional intakes in different genotype of UCP2 -866G/A gene polymorphisms in patients with NAFLD. *J Transl Med*.
- Alisi, A., Ceccarelli, S., Panera, N., Prono, F., Petrini, S., De Stefanis, C., . . . Nobili, V. (2013). Association between Serum Atypical Fibroblast Growth Factors 21 and 19 and Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PloS one*.
- Anstee, Q. M., Darlay, R., Cockell, S., Meroni, M., Govaere, O., Tiniakos, D., . . . Kechagias, S. (2020). Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort. *Journal of Hepatology*.
- Ao, R., Guan, L., Wang, Y., & Wang, J. N. (2019). Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3k-Akt signaling pathway. *J Cell Biochem.*, 4420-4434.
- Arab, J. P., Karpen, S. J., Dawson, P. A., Arrese, M., & M., T. (2017). Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology*, 350-362.
- Arias, N., Arboleya, S., Allison, J., Kaliszewska, A., Higarza, S. G., Gueimonde, M., & Arias, J. L. (2020). The Relationship between Choline Bioavailability from Diet, Intestinal Microbiota Composition, and Its Modulation of Human Diseases. *Nutrients*.
- Aron-Wisnewsky, J., Vigliotti, C., Witjes, J., Le, P., Holleboom, A. G., Verheij, J., . . . Clément, K. (2017). Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Atanasovska, B., Rensen, S. S., van der Sijde, M. R., Marsman, G., Kumar, V., Jonkers, I., . . . Fu, J. (2017). A liver-specific long noncoding RNA with a role in cell viability is elevated in human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 794-808.
- Barrios-Correa, A. A., Estrada, J. A., & Contreras, I. (2018). Leptin Signaling in the Control of Metabolism and Appetite: Lessons from Animal Models. *Journal of Molecular Neuroscience*.
- Bastian, W. P., Hasan, I., Lesmana, C., Rinaldi, I., & Gani, R. A. (2019). Gut Microbiota Profiles in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Its Possible Impact on Disease

Progression Evaluated with Transient Elastography: Lesson Learnt from 60 Cases. *Cases Reports in Gastroenterology*, 125-133.

- Belbasis, L., & Bellou, V. (2018). Introduction to Epidemiological Studies. *Methods Mol Biol*.
- Bellentani, S. (2017). The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 81-84.
- Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M., García-Juárez, I., . . . Castillo-Barradas, M. (2019). Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de Gastroenterología de México*, 69-99.
- Bhatt, S. P., & Guleria, R. (2021). Association of IRS1 (Gly972Arg) and IRS2 (Gly1057Asp) genes polymorphisms with OSA and NAFLD in Asian Indians. *PloS One*.
- Borén, J., Adiels, M., Björnson, E., Matikainen, N., Söderlund, S., Rämö, J., . . . Taskinen, M. R. (2020). Effects of TM6SF2 E167K on hepatic lipid and very low-density lipoprotein metabolism in humans. *JCI INSIGHT*.
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., . . . Diehl, A. M. (2016). The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*, 764-775.
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., . . . Diehl, A. M. (2016). The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*, 764-775.
- Boutari, C., & Mantzoros, C. S. (2019). Adiponectin and leptin in the diagnosis and therapy of NAFLD. *Metabolism*.
- Brea, Á., & Puzo, J. (2010). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. *Clínica e investigación en aterosclerosis*.
- Brea, Á., Pintó, X., Ascaso, J. F., Blasco, M., Díaz, Á., González-Santos, P., . . . Pedro-Botet, J. (2017). Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (II). Tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *Clínica e investigación en aterosclerosis*, 16.
- Bril, F., Barb, D., Lomonaco, R., Lai, J., & K., C. (2020). Change in hepatic fat content measured by MRI does not predict treatment-induced histological improvement of steatohepatitis. *Hepatology*, 401-410.
- Bril, F., McPhaul, M. J., Caulfield, M. P., Clark, V. C., Soldevilla-Pico, C., & Firpi-Morell, R. J. (2020). Performance of plasma biomarkers and diagnostic panels for

nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 290-297.

Bril, F., Millán, L., Kalavalapalli, S., McPhaul, M. J., Caulfield, M. P., Martinez-Arranz, I., . . . Cusi, K. (2018). Use of a metabolomic approach to non-invasively diagnose non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*, 1702-1209.

Bril, F., Millán, L., Kalavalapalli, S., McPhaul, M. J., Caulfield, M. P., Martinez-Arranz, I., . . . Cusi, K. (2018). Use of a metabolomic approach to non-invasively diagnose non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.*, 1702-1709.

Buch, S., Stickel, F., Trépo, E., Way, M., Herrmann, A., Nischalke, H. D., . . . Datz, C. (2015). A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet*, 1443-1448.

Bungau, S., Behl, T., Tit, D. M., Banica, F., Bratu, O. G., Diaconu, C. C., . . . Vesa, C. M. (2020). Interactions between leptin and insulin resistance in patients with prediabetes, with and without NAFLD. *Experimental and therapeutic medicine*.

Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 1038-1040.

Cai, B., Dongiovanni, P., Corey, K. E., Wang, X., Shmarakov, I. O., Zheng, Z., . . . Tabas, I. (2020). Macrophage MerTK Promotes Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.*, 406-421.

Caron, A., Lee, S., Elmquist, J., & Gautron, L. (2018). Cruces entre leptina y cerebrotejido adiposo. *Reseñas de la naturaleza. Neurociencia*, 153-165.

Castro-Martínez, M., Banderas-Lares, D., Ramírez-Martínez, J., & Escobedo-de la Peña, J. (2012). Prevalencia de hígado graso no alcohólico en individuos con síndrome metabólico. *Cirujía y Cirujanos*, 128-132.

Catala, A. (2011). Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. *Frontiers in Bioscience*.

Caussy, C., Ajmera, V. H., Puri, P., Hsu, C. L., Bassirian, S., Mgdsyan, M., . . . Loomba, R. (2019). Serum metabolites detect the presence of advanced fibrosis in derivation and validation cohorts of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 1884-1892.

Chang, Y., He, J., Xiang, X., & Li, H. (2021). LUM is the hub gene of advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease patients. . *Clin Res Hepatol Gastroenterol*.

- Chen, J., & Vitetta, L. (2020). Gut Microbiota Metabolites in NAFLD Pathogenesis and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*.
- Chiappini, F., Coilly, A., Kadar, H., Gual, P., Tran, A., Desterke, C., . . . Le Naour, F. (2017). Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep*.
- Chiappini, F., Coilly, A., Kadar, H., Gual, P., Tran, A., Desterke, C., . . . Le Naour, F. (2017). Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep*.
- Chiappini, F., Desterke, C., Bertrand-Michel, J., Guettier, C., & Le Naour, F. (2016). Hepatic and serum lipid signatures specific to nonalcoholic steatohepatitis in murine models. *Sci Rep*.
- Choudhary, N. S., & Duseja, A. (2021). Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). *Transl Gastroenterol Hepatol*.
- Chung, T. J., Hsu, K. Y., Chen, J. H., Liu, J. S., Chang, H. W., Li, P. F., . . . Lee, C. H. (2016). Association of salivary alpha 2-macroglobulin levels and clinical characteristics in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*, 190-196.
- Cobbina, E., & Akhlaghi, F. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev.*, 197-211.
- Csak, T., Bala, S., Lippai, D., Satishchandran, A., Catalano, D., Kodys, K., & Szabo, G. (2015). microRNA-122 regulates hypoxia-inducible factor-1 and vimentin in hepatocytes and correlates with fibrosis in diet-induced steatohepatitis. *iver International*, 532-541.
- Daemen, S., Gemmink, A., Brouwers, B., Meex, R. C., Huntjens, P. R., Schaart, G., . . . Hesselink, M. K. (2018). Distinct lipid droplet characteristics and distribution unmask the apparent contradiction of the athlete's paradox. *Mol Metab*, 71-81.
- Datz, C., Müller, E., & Aigner, E. (2017). Iron overload and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol*.
- Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 842-845.
- de Conti, A., Ortega, J. F., Tryndyak, V., Dreval, K., Moreno, F. S., Rusyn, I., . . . Pogribny, I. P. (2017). MicroRNA deregulation in nonalcoholic steatohepatitis-associated liver carcinogenesis. *Oncotarget.*, 88517-88525.
- De Nardo, W., Miotto, P. M., Bayliss, J., Nie, S., Keenan, S. N., Montgomery, M. K., & Watt, M. J. (2022). Proteomic analysis reveals exercise training induced

remodelling of hepatokine secretion and uncovers syndecan-4 as a regulator of hepatic lipid metabolism. *Mol Metab.*

- Del Campo, J. A., Gallego-Durán, R., Gallego, P., & Grande, L. (2018). Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*.
- Del Chierico, F., Nobili, V., Vernocchi, P., Russo, A., De Stefanis, C., Gnani, D., . . . Putignani, L. (2017). Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*.
- Dong, S., Zhan, Z. Y., Cao, H. Y., Wu, C., Bian, Y. Q., Li, J. Y., . . . Sun, M. Y. (2017). Urinary metabolomics analysis identifies key biomarkers of different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.*, 2771-2784.
- Drouet, M., & Leon, P. (2017). *Polimorfismo del gen PNPLA3 en la enfermedad del hígado graso no alcohólico en estudiantes de la UCSG*. Ecuador: Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.
- Eslam, M., Valenti, L., & Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*, 268-279.
- Eslam, M., Valenti, L., & Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*, 268-279.
- Fan, X., Xing, Y., Liu, L., Zhao, C., Chen, Z., Khogali, M. K., . . . Gong, D. (2021). Screening of MicroRNAs with Potential Systemic Effects Released from Goose Fatty Liver. *J Poult Sci*, 263-269.
- Fouad, Y., Gomaa, A., Semida, N., Ghany, W. A., & Attia, D. (2020). Change from NAFLD to MAFLD increases the awareness of fatty liver disease in primary care physicians and specialists. *Journal of Hepatology*.
- Funuyet-Salas, J., Martín-Rodríguez, A., Conrad, R., & Pérez-San-Gregorio, M. A. (2020). Psychological biomarker profile in NAFLD/NASH with advanced fibrosis. En M. Romero-Gómez, *NAFLD and NASH. Biomarkers in Detection, Diagnosis and Monitoring*. Suiza: Springer Nature.
- Funuyet-Salas, J., Martín-Rodríguez, A., Rupert, C., & Pérez-San-Gregorio, M. Á. (2020). Psychological Biomarker Profile in NAFLD/NASH with Advanced Fibrosis. En *NAFLD and NASH* (págs. 205-223).
- Gaggini, M., Carli, F., Rosso, C., Buzzigoli, E., Marietti, M., Della Latta, V., . . . Gastaldelli, A. (2018). Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology*, 145-158.

- Gatselis, N. K., Azariadis, K., Lyberopoulou, A., & Dalekos, G. N. (2021). Programmed cell death-1 rs11568821 and interleukin-28B rs12979860 polymorphisms in autoimmune hepatitis. *J Transl Autoimmun.*
- Gemink, A., Daemen, S., Brouwers, B., Hoeks, J., Schaart, G., Knoop, K., . . . Hesselink, M. K. (2021). Decoration of myocellular lipid droplets with perilipins as a marker for in vivo lipid droplet dynamics: A super-resolution microscopy study in trained athletes and insulin resistant individuals. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.*
- Genoma. (17 de 02 de 2022). Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genoma>
- George, J., & Liddle, C. (2007). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Potential for Nuclear Receptors as Therapeutic Targets. *Molecular Pharmaceutics*, 49-59.
- Gerhard, G. S., & DiStefano, J. K. (2015). Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* , 226-234.
- Gerhard, G. S., Legendre, C., Still, C. D., Chu, X., Petrick, A., & DiStefano, J. K. (2018). Transcriptomic Profiling of Obesity-Related Nonalcoholic Steatohepatitis Reveals a Core Set of Fibrosis-Specific Genes. *Journal of the Endocrine Society*, 710-726.
- Gerhard, G. S., Malenica, I., Llaci, L., Chu, X., Petrick, A. T., D., S. C., & DiStefano, J. K. (2018). Differentially methylated loci in NAFLD cirrhosis are associated with key signaling pathways. *Clin Epigenetics.*
- Gjorgjieva, M., Sobolewski, C., Dolicka, D., Correia de Sousa, M., & Foti, M. (2019). miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut*, 2065-2079.
- Gormaz, J. G., Rodrigo, R., Videla, L. A., & Beems, M. (2010). Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res*, 407-419.
- Govaere, O., Cockell, S., Tiniakos, D., Queen, R., Younes, R., Vacca, M., . . . Marra, F. (2020). Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. *Science Translational Medicine.*
- Gugliucci, A., & Rodríguez-Mortera, R. (2020). Fructosa, un factor clave modificable en la patogenia del síndrome metabólico, la esteatosis hepática y la obesidad. *Revista Médica del Uruguay.*
- Gupta, A., Misra, R., Sakhuja, P., Singh, Y., Basir, S., & Sarin, S. (2012). Association of adiponectin gene functional polymorphisms (-11377C/G and +45T/G) with nonalcoholic fatty liver disease. *Gene.*

- Han, Q. A., Su, D., Shi, C., Liu, P., Wang, Y., Zhu, B., & Xia, X. (2020). Urolithin A attenuated ox-LDL-induced cholesterol accumulation in macrophages partly through regulating miR-33a and ERK/AMPK/SREBP1 signaling pathways. *Food Funct*, 3432-3440.
- Hannou, S. A., Haslam, D. E., McKeown, N. M., & Herman, M. A. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, 545–555.
- Harrison, S. A., Marri, S. R., Chalasani, N., Kohli, R., Aronstein, W., Thompson, G. A., . . . Traber, P. G. (2016). Randomised clinical study: GR-MD-02, a galectin-3 inhibitor, vs. placebo in patients having non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 1183-1198.
- Hazlehurst, J. M., Woods, C., Marjot, T., Cobbold, J. F., & Tomlinson, J. W. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*, 1096-1108.
- Heeren, J., & Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol Metab*.
- Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2011). Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutrition Review*, 245-258.
- Huang, Y. S., Chang, T. E., Perng, C. L., & Huang, Y. H. (2021). Genetic variations of three important antioxidative enzymes SOD2, CAT, and GPX1 in nonalcoholic steatohepatitis. *J Chin Med Assoc.* , 14-18.
- Hyun, J., & Jung, Y. (2020). DNA Methylation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*.
- IMSS. (2014). *GPC: Diagnóstico y tratamiento de enfermedad hepática grasa no alcohólica del adulto*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Ji, Y., Yin, Y., Sun, L., & Zhang, W. (2020). The Molecular and Mechanistic Insights Based on Gut-Liver Axis: Nutritional Target for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*.
- Juanola, O., Martínez-López, S., Francés, R., & Gómez-Hurtado, I. (2021). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *International journal of environmental research and public health*.
- Kaffe, E., Katsifa, A., Xylourgidis, N., Ninou, I., Zannikou, M., Harokopos, V., . . . Aidinis, V. (2017). Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology*, 1369-1383.

- Khan, A. A., Gupta, V., & Mahapatra, N. R. (2022). Key regulatory miRNAs in lipid homeostasis: Implications for cardiometabolic diseases and development of novel therapeutics. *Drug Discov Today*, 2170-2180.
- Khusial, R. D., Cioffi, C. E., Caltharp, S. A., Krasinskas, A. M., Alazraki, A., Knight-Scott, J., . . . Vos, M. B. (2019). Development of a Plasma Screening Panel for Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease Using Metabolomics. *Hepatol Commun.* , 1311-1321.
- Kim, H. S., Xiao, C., Wang, R. H., Lahusen, T., Xu, X., Vassilopoulos, A., . . . Deng, C. X. (2010). Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. . *Cell Metab*, 224-236.
- Kitabatake, H., Tanaka, N., Fujimori, N., Komatsu, M., Okubo, A., Kakegawa, K., . . . Tanaka, E. (2017). Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*.
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., Shibolet, O., & Elinav, E. (2019). The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Molecular Medicine*.
- Komaroff, M. (2016). For Researchers on Obesity: Historical Review of Extra Body Weight Definitions. . *Journal of obesity*.
- Kory, N., Thiam, A. R., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2015). Protein Crowding Is a Determinant of Lipid Droplet Protein Composition. *Dev Cell*, 351-363.
- Krahmer, N., Najafi, B., Schueder, F., Quagliarini, F., Steger, M., Seitz, S., . . . Mann, M. (2018). Organellar Proteomics and Phospho-Proteomics Reveal Subcellular Reorganization in Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Dev Cell*, 201-221.
- Kuivaniemi, H., & Tromp, G. (2019). Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene.*, 151-1711.
- Kurtovic, E., & Limaiem, F. (2021). *Mallory Bodies*. Túnez: University of Tunis El Manar, Tunis Faculty of Medicine.
- Lazaro, R., Wu, R., Lee, S., Zhu, N. L., Chen, C. L., French, S. W., . . . Tsukamoto, H. (2015). Osteopontin deficiency does not prevent but promotes alcoholic neutrophilic hepatitis in mice. *Hepatology*.
- Lee, J., Kim, Y., Friso, S., & Choi, S. W. (2017). Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Aspects Med*.
- Lee, S., Kolset, S., Birkeland, K. I., A., D. C., & Reine, T. M. (2019). Acute exercise increases syndecan-1 and -4 serum concentrations. *Glycoconjugate Journal*, 113-125.

- Li, Z., & Olzmann, J. A. (2018). A Proteomic Map to Navigate Subcellular Reorganization in Fatty Liver Disease. *Dev Cell*.
- Liu, J., Jiang, S., Zhao, Y., Sun, Q., Zhang, J., Shen, D., . . . Li, C. (2018). Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) regulates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-fibrosis progression by determining hepatic glucose/fatty acid preference under high-fat diet conditions. *J Pathol*, 277-288.
- Liu, Q., Sun, Y., Fei, Z., Yang, Z., Duan, K., Zi, J., . . . Xiong, W. (2019). Leptin promotes fatty acid oxidation and Liu, Q., Sun, Y., Fei, Z., Yang, Z., Duan, K., Zi, J., . . . Xiong, W. (2019). Leptin promotes fatty acid oxidation and OXPHOS via the c-Myc/PGC-1 pathway in cancer cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.*, 707-714.
- Liu, X. L., Pan, Q., Zhang, R. N., Shen, F., Yan, S. Y., Sun, C., . . . Fan, J. G. (2016). Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World journal of gastroenterology*.
- Lizardi-Cervera, J., Becerra, L., Chávez-Tapia, N., Ramos, O., & Uribe, E. (2006). Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática. *Revista de gastroenterología*, 453-459.
- Lustig, R. H., Sen, S., Soberman, J. E., & Velasquez-Mieyer, P. A. (2004). Obesity, leptin resistance, and the effects of insulin reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* .
- M., E., Sanyal, A. J., George, J., & Panel., I. C. (2020). MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 158.
- Ma, H. P., Chang, H. L., Bamodu, O. A., Yadav, V. K., Huang, T. Y., Wu, A. T., . . . H., L. W. (2019). Collagen 1A1 (COL1A1) Is a Reliable Biomarker and Putative Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinogenesis and Metastasis. *Cancers (Basel)*.
- Ma, J., Zhou, Q., & Li, H. (2017). Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients*.
- Manco, M., Putignani, L., & Bottazzo, G. F. (2010). Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr Rev*.
- Mariani, S., Fiore, D., Basciani, S., Persichetti, A., Contini, S., Lubrano, C., . . . Gnessi, L. (2015). Plasma levels of SIRT1 associate with non-alcoholic fatty liver disease in obese patients. *Endocrine*, 711-716.

- Martínez, L., Larrieta, E., Calva, J., Kershenobich, D., & Torre, A. (2017). The Expression of PNPLA3 Polymorphism could be the Key for Severe Liver Disease in NAFLD in Hispanic Population. *Annals of Hepatology*, 909-915.
- Martinou, E., Pericleous, M., Stefanova, I., Kaur, V., & Angelidi, A. M. (2022). Diagnostic Modalities of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Biochemical Biomarkers to Multi-Omics Non-Invasive Approaches. *Diagnostics (Basel)*.
- Masarone, M., Troisi, J., Aglitti, A., Torre, P., Colucci, A., Dallio, M., . . . Persico, M. (2021). Untargeted metabolomics as a diagnostic tool in NAFLD: discrimination of steatosis, steatohepatitis and cirrhosis. *Metabolomics*.
- Méndez-Sánchez, N., Zamarripa-Dorsey, F., Panduro, A., Purón-González, E., Coronado-Alejandro, E. U., Cortez-Hernández, C. A., . . . Ramírez-Pérez, O. (2018). Current trends of liver cirrhosis in Mexico: Similitudes and differences with other world regions. *World journal of clinical cases*, 922-930.
- Milić, S., Lulić, D., & Štimac, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World Journal of Gastroenterology*.
- Moolla, A., de Boer, J., Pavlov, D., Amin, A., Taylor, A., Gilligan, L., . . . Biehl, M. (2020). Accurate non-invasive diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease using the urinary steroid metabolome. *Aliment Pharmacol Ther*, 1188-1197.
- Mora, J., & Albán, R. (2018). Hígado graso no alcohólico. En C. Lee, Á. José, L. Zúñiga, V. Guillermo, C. Villacis, & S. Isaac, *Enfermedades metabólicas: punto de vista desde diferentes especialidades médicas*. (págs. 161-175). Machala: UTMACH.
- Mouzaki, M., Wang, A. Y., Bandsma, R., Comelli, E. M., Arendt, B. M., Zhang, L., . . . Allard, J. P. (2016). Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PloS one*.
- Mukhopadhyay, P., Horváth, B., Rajesh, M., Varga, Z. V., Gariani, K., Ryu, D., . . . Boulares, A. H. (2017). PARP inhibition protects against alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 589-600.
- Murli Krishna, M. D. (2014). Anatomía microscópica del hígado. *Clinical Liver Disease*, 109-112.
- Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., & Gambino, R. (2018). Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 282-302.
- N, K., Mikhailidis, D., & Mantzoros, C. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metabolism*.

- Nalbantoglu, I., & Jain, D. (2019). Cryptogenic cirrhosis: Old and new perspectives in the era of molecular and genomic medicine. *Semin Diagn Pathol*, 389-394.
- National Heart, Lung, and Blood Institute. (2021). *National Heart, Lung, and Blood Institute*. Obtenido de National Heart, Lung, and Blood Institute: <https://www.nhlbi.nih.gov/>
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*, 45.
- Niu, L., Geyer, P. E., Wewer Albrechtsen, N. J., Gluud, L. L., Santos, A., Doll, S., . . . Mann, M. (2019). Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Syst Biol*.
- Niu, L., Sulek, K., Vasilopoulou, C. G., Santos, A., Wewer Albrechtsen, N. J., Rasmussen, S., . . . Mann, M. (2021). Defining NASH from a Multi-Omics Systems Biology Perspective. *J Clin Med*.
- Palmer, N. D., Musani, S. K., Yerges-Armstrong, L. M., Feitosa, M. F., Bielak, L. F., Hernaez, R., . . . Smith, A. V. (2014). Characterization of European-ancestry NAFLD-Associated Variants in Individuals of African and Hispanic Descent. *Journal of Hepatology*, 966-975.
- Perakakis, N., Polyzos, S. A., Yazdani, A., Sala-Vila, A., Kountouras, J., Anastasilakis, A. D., & Mantzoros, C. S. (2019). Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis with the use of omics and supervised learning: A proof of concept study. *Metabolism*.
- Perakakis, N., Stefanakis, K., & Mantzoros, C. S. (2020). The role of omics in the pathophysiology, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*.
- Pettinelli, P., Arendt, B. M., Teterina, A., McGilvray, I., Comelli, E. M., Fung, S. K., . . . Allard, J. P. (2018). Altered hepatic genes related to retinol metabolism and plasma retinol in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*.
- Pettinelli, P., Arendt, B. M., Teterina, A., McGilvray, I., Comelli, E. M., Fung, S. K., . . . Allard, J. P. (2018). Altered hepatic genes related to retinol metabolism and plasma retinol in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*.
- Pimpin, L., Cortez-Pinto, H., Negro, F., Corbould, E., Lazarus, J., Webber, L., . . . Committee, E. H. (2018). Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol*, 718-735.
- Pirola, C. J., Fernández, G., Castaño, G. O., Mallardi, P., San Martino, J., Mora Gonzalez Lopez Ledesma, M., . . . Sookoian, S. (2015). Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *HHS Author Manuscripts*, 800-812.

- Pirola, C. J., Gianotti, T., Burgueno, A., Rey-Funes, M., Loidl, C., & Mallardi, P. (2013). Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*, 1356-1363.
- Polimorfismo*. (18 de 07 de 2021). Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismo>
- Polyzos, A. S., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2019). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*.
- Reshef, L., Niv, J., & Shapiro, B. (1967). Effect of propionate on lipogenesis in adipose tissue. *Journal Lipid Research* .
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*.
- Rodríguez Cubillos, A. E., Perlaza Jiménez, L., & Bernal Giraldo, A. J. (2014). ANALIZANDO DATOS DE RNA-Seq EN PROCARIOTAS: UNA REVISIÓN PARA NO EXPERTOS. *Acta Biológica Colombiana* , 131-142.
- Rodríguez-Gallego, E., Guirro, M., Riera-Borrull, M., Hernández-Aguilera, A., Mariné-Casadó, R., Fernández-Arroyo, S., . . . Joven, J. (2015). Mapping of the circulating metabolome reveals α -ketoglutarate as a predictor of morbid obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Obes*, 279-287.
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, B. A., Cohen, J., & Hobbs, H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*, 1461–1465.
- Saad, M. J., Santos, A., & Prada, P. O. (2016). Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology*, 283-293.
- Saltzman, E. T., Palacios, T., Thomsen, M., & Vitetta, L. (2018). Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol*.
- Saltzman, E. T., Palacios, T., Thomsen, M., & Vitetta, L. (2018). Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontier in Microbiology*.
- Sánchez-Vinces, S., Garcia, P. H., Silva, A. A., Fernandes, A. M., Barreto, J. A., Duarte, G. H., . . . Carvalho, P. O. (2023). Mass-Spectrometry-Based Lipidomics Discriminates Specific Changes in Lipid Classes in Healthy and Dyslipidemic Adults. *Metabolites*.

- Santos, A. S. (2016). *Participación de genes de la biosíntesis del colesterol en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis no alcohólica en sujetos con obesidad mórbida*. México.
- Sarin, S., Kumar, M., Eslam, M., George, J., Al Mahtab, M., Akbar, S., . . . Chen, D. (2020). Liver diseases in the Asia-Pacific region: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *Erratum in: Lancet Gastroenterol Hepatol*.
- Schoeler, M., & Caesar, R. (2019). Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*.
- Schreuder, T., Verwer, B., van Nieuwkerk, C., & Mulder, C. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World Journal Gastroenterology*.
- Schwarz, J.-M., Linfoot, P., Dare, D., & Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*, 43-50.
- Schwimmer, J. B., Johnson, J. S., Angeles, J. E., Behling, C., Belt, P. H., Borecki, I., . . . Sirlin, C. B. (2019). Microbiome Signatures Associated with Steatohepatitis and Moderate to Severe Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 1109-1122.
- Schwimmer, J. B., Johnson, J. S., Angeles, J. E., Behling, C., H., B. P., Borecki, I., . . . Sodergren, E. (2019). Microbiome Signatures Associated With Steatohepatitis and Moderate to Severe Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease.. *Journal of Gastroenterology*, 1109-1122.
- Secretaría de Salud. (2019). *Día Mundial de la Hipertensión Arterial: 17 de Mayo*. México.
- Shabalala, S. C., Dlodla, P. V., Mabasa, L., Kappo, A. P., Basson, A. K., Pheiffer, C., & Johnson, R. (2020). The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomed Pharmacother*.
- Shapiro, H., Kolodziejczyk, A. A., Halstuch, D., & Elinav, E. (2018). Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *The Journal of experimental medicine*, 383-396.
- Shih, D. M., Wang, Z., Lee, R., Meng, Y., Che, N., Charugundla, S., . . . Lusis, A. J. (2015). lavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 22-37.
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*.

- Simoneau, J., Dumontier, S., Gosselin, R., & Scott, M. S. (2021). Current RNA-seq methodology reporting limits reproducibility. *Brief Bioinform.*, 140-145.
- Sliz, E., Sebert, S., Würtz, P., Kangas, A. J., Soininen, P., Lehtimäki, T., . . . Kettunen, J. (2018). NAFLD risk alleles in PNPLA3, TM6SF2, GCKR and LYPLAL1 show divergent metabolic effects. . *Hum Mol Genet*, 2214-2223.
- Speliotes, E. K., Yerges-Armstrong, L. M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L. J., Palmer, C. D., . . . Tomas, M. (2011). Genome-Wide Association Analysis Identifies Variants Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits. *PLOS GENETICS*.
- Suganami, T., Nishida, J., & Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 2062.
- Suppli, M. P., Rigbolt, K. T., Veidal, S. S., Heebøll, S., Eriksen, P. L., Demant, M., . . . Jelsing, J. (2019). Hepatic transcriptome signatures in patients with varying degrees of nonalcoholic fatty liver disease compared with healthy normal-weight individuals. *Gastrointestinal and liver physiology*.
- Teufel, A., Itzel, T., Erhart, W., Brosch, M., Wang, X. Y., Kim, Y. O., . . . Schuppan, D. (2016). Comparison of Gene Expression Patterns Between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues From Patients. *Gastroenterology*, 513-525.
- Than, N. N., & Newsome, P. N. (2015). A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *A concise review of non-alcoholic fatty liver disease.*, 239.
- Tiwari-Heckler, S., Gan-Schreier, H., Stremmel, W., Chamulitrat, W., & Pathil, A. (2018). Circulating Phospholipid Patterns in NAFLD Patients Associated with a Combination of Metabolic Risk Factors. . *Nutrients*.
- Trépo, E., Romeo, S., Zucman-Rossi, J., & Nahon, P. (2016). PNPLA3 gene in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 399-412.
- Villani, R., Magnati, G. P., De Girolamo, G., Sangineto, M., Romano, A. D., Cassano, T., & Serviddio, G. (2021). Genetic Polymorphisms and Clinical Features in Diabetic Patients With Fatty Liver: Results From a Single-Center Experience in Southern Italy. . *Frontiers in Medicine*.
- Wang, M., Gong, Q., Zhang, J., Chen, L., Zhang, Z., Lu, L., . . . Zhang, X. (2017). Characterization of gene expression profiles in HBV-related liver fibrosis patients and identification of ITGEB1 as a key regulator of fibrogenesis. *Sci Rep*.
- Wang, M., Gong, Q., Zhang, J., Chen, L., Zhang, Z., Lu, L., . . . Zhang, X. (2017). Characterization of gene expression profiles in HBV-related liver fibrosis patients and identification of ITGEB1 as a key regulator of fibrogenesis. *Sci Rep*.

- Wang, W., Liu, X., Wei, P., Ye, F., Chen, Y., Shi, L., . . . Yang, X. (2022). SPP1 and CXCL9 Promote Non-alcoholic Steatohepatitis Progression Based on Bioinformatics Analysis and Experimental Studies. *Front Med (Lausanne)*.
- Wang, X., & Kattan, M. W. (2020). Cohort Studies: Design, Analysis, and Reporting. *Chest.*, 72-78.
- Wang, Y., Zhao, H., Yang, L., Zhang, H., Yu, X., Fei, W., . . . Ren, L. (2022). Quantitative proteomics analysis based on tandem mass tag labeling coupled with labeling coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry discovers the effect of silibinin on non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Bioengineered*, 6750-6766.
- Win, S., Than, T. A., Zhang, J., Oo, C., Min, R. W., & Kaplowitz, N. (2018). New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology*, 2013-2024.
- Wong, V., Adams, L. A., de Lédinghen, V., Wong, G., & S., S. (2018). Defining NASH from a multi-omics systems biology perspective. *Hepatology*, 461-478.
- Wood, G. C., Chu, X., Argyropoulos, G., Benotti, P., Rolston, D., Mirshahi, T., . . . Gerhard, G. S. (2017). A multi-component classifier for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on genomic, proteomic, and phenomic data domains. *Sci Rep*.
- Xiang, H., Sun, D., Liu, X., She, Z. G., & Chen, Y. (2022). The Role of the Intestinal Microbiota in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in endocrinology*.
- Xu, C., Wan, X., Xu, L., Weng, H., Yan, M., Miao, M., . . . Yu, C. (2015). Xanthine oxidase in non-alcoholic fatty liver disease and hyperuricemia: One stone hits two birds. *J Hepatol*.
- Xu, R.-h., Wei, W., Krawczyk, M., Wang, W., Luo, H., Flagg, K., . . . Li, G. (2017). Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nature Materials*, 1155-1161.
- Yang, Q., Vijayakumar, A., & Kahn, B. B. (2018). Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 654-672.
- YC, Z., Zhao, G., Chen, Z., She, Z., Cai, J., & Li, H. (2013). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Emerging Driver of Hypertension. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 389-393.
- Yoo, W., Gjuka, D., Stevenson, H. L., Song, X., Shen, H., Yoo, S. Y., . . . Beretta, L. (2017). Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS One*.

- Younossi, Z. M., Baranova, A., Ziegler, K., Del Giacco, L., Schlauch, K., Born, T. L., . . . Chandhoke, V. (2005). A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 665-674.
- Yu, J. (2018). *Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer*. Singapur: Springer.
- Zarrinpar, A., Gupta, S., Maurya, M. R., Subramaniam, S., & Loomba, R. (2016). Serum microRNAs explain discordance of non-alcoholic fatty liver disease in monozygotic and dizygotic twins: a prospective study. *Gut*, 1546-1554.
- Zeybel, M., Hardy, T., Robinson, S. M., Fox, C., Anstee, Q. M., Ness, T., . . . Mann, J. (2015). Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clin Epigenetics*.
- Zhang, S., Sousa, A., Lin, M., Iwano, A., Jain, R., Ma, B., . . . Wands, J. R. (2021). Role of Chitinase 3-Like 1 Protein in the Pathogenesis of Hepatic Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. . *Cells*.
- Zhao, F. (2018). Dysregulated Epigenetic Modifications in the Pathogenesis of NAFLD-HCC. *Adv Exp Med Biol.*, 79-93.
- Zhi, S., Congcong, Z., Zhiling, G., Yihan, Q., Yijing, X., Guanjie, L., . . . Yueqiu, G. (2022). Quantitative proteomics of HFD-induced fatty liver uncovers novel transcription factors of lipid metabolism. *Int J Biol Sci.*, 3298-3312.
- Zhong, Y., Qin, Y., Dang, L., Jia, L., Zhang, Z., Wu, H., . . . Li, Z. (2015). Alteration and localization of glycan-binding proteins in human hepatic stellate cells during liver fibrosis. *Proteomics*.
- Zhou, Y., Orešič, M., Leivonen, M., Gopalacharyulu, P., Hyysalo, J., Arola, J., . . . Yki-Järvinen, H. (2016). Noninvasive Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Clinical Markers and Circulating Levels of Lipids and Metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 1463-1472.