



TRABAJO DE FIN DE GRADO DE MEDICINA

**“PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA
PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA PATOFISIOLOGÍA DE LA
ESTEATOSIS HEPÁTICA METABÓLICA”**

CARMEN DEL OLMO PUEBLA

TUTORAS: ROCÍO ALLER DE LA FUENTE,
MARTA MARTÍN-FERNÁNDEZ

Universidad de Valladolid
Curso 2022-2023

ÍNDICE

I.	RESUMEN -----	4
II.	INTRODUCCIÓN -----	5
	1. Características generales de la enfermedad -----	5
	2. Métodos diagnósticos en la NAFLD -----	5
	3. Mecanismos patogénicos -----	6
III.	HIPÓTESIS -----	10
IV.	OBJETIVOS -----	10
V.	MATERIALES Y MÉTODOS -----	10
	1. Diseño del estudio -----	10
	2. Criterios de inclusión y exclusión -----	10
	3. Aspectos éticos -----	11
	4. Biopsia hepática -----	11
	5. Elastografía de transición -----	12
	6. Parámetros bioquímicos -----	12
	7. Métodos no invasivos de esteatosis -----	12
	8. Métodos no invasivos de fibrosis -----	12
	9. Características antropométricas -----	12
	10. Determinaciones de moléculas de estrés oxidativo -----	12
	11. Análisis estadístico -----	13
VI.	RESULTADOS -----	13
	1. Características clínicas -----	13
	2. Niveles de las moléculas de estrés oxidativo en NAFLD -----	16
	3. Evaluación del riesgo de NASH score en función de los niveles de LPO -----	18
VII.	DISCUSIÓN -----	19
VIII.	CONCLUSIONES -----	21
IX.	BIBLIOGRAFÍA -----	22
X.	ANEXOS -----	24

ABREVIATURAS/SIGLAS

8-OHdG: 8-hidroxi-2-guanosina

AGL: ácidos grasos libres

APRI score: AST to Platelet Ratio Index (índice de los niveles de plaquetas y aspartato aminotransferasa)

ABTS: ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos

FADH₂: flavín adenín dinucleótido

FDA: *Food and Drug Administration*

FLI score: *Fatty liver index* (índice de hígado graso)

FIB4 score: *Fibrosis-4* (índice de hígado fibrótico)

FRAP: poder antioxidante reductor férrico

GOT: transaminasa glutámico-oxalacética

GGT: gamma-glutamil transpeptidasa

GPT: glutamato-piruvato transaminasa

HFS score: *Hepamet Fibrosis Score*

HNE: 4-hidroxi-alqueno

HOMA: índice de resistencia a la insulina

HSI score: *Hepatitis Steatosis Index* (índice de esteatosis hepática)

IL-8: interleucina-8

IMC: índice de masa muscular

LPO: lipoperoxidación

LXR: receptor X hepático

MDA: malondialdehído

MAFLD/NAFLD: *Metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease* (Enfermedad de hígado graso asociada a disfunción metabólica)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NAFLD score: *Non Alcoholic Fatty Liver Disease Score*

NASH: *Non-alcoholic steatohepatitis* (Esteatohepatitis no alcohólica)

NF-κB: factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OOP: *optimal operating point* (punto óptimo de operación)

PUFAs: *polyunsaturated fatty acids* (ácidos grasos poliinsaturados)

RE: retículo endoplasmático

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas del oxígeno)

SOD: superóxido dismutasa

SREBP-1c: proteína de unión al elemento regulador del esteroide

TNF-α: factor de necrosis tumoral α

I. RESUMEN

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD) se caracteriza por un exceso de grasa en el hígado (>5%), que puede progresar a esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma. La alteración del metabolismo lipídico es un factor crucial, existiendo un desequilibrio entre la producción de lípidos y su degradación en el hígado. Debido a la falta de métodos no invasivos lo suficientemente fiables para el diagnóstico de esteatohepatitis (NASH), es fundamental encontrar marcadores analíticos capaces de discriminar aquellos pacientes con NASH. Se han obtenido muestras sanguíneas de 152 individuos caucásicos con NAFLD diagnosticada mediante biopsia hepática, en las que hemos estudiado diferentes metabolitos representativos del estrés oxidativo. Los resultados indican que los pacientes con NAFLD con un NASH score ≥ 4 (diagnóstico de NASH) tienen niveles mayores de lipoperoxidación (LPO). De hecho, un valor de peroxidación lipídica por encima del punto de corte de 315,39 μM , es un factor de riesgo independiente de una puntuación en el NASH score ≥ 4 (OR: 4,71, CI 95% 1,68-13,19, $p=0,003$). El área bajo la curva (AUC = 0,81; IC 95% = 0,73-0,89; $p < 0,001$) muestra la buena capacidad de discriminación del modelo (Figura 2).

Por lo tanto, la interpretación de los mecanismos moleculares ligados a la inflamación basal presente en los pacientes con NASH se postularía como una fuente tanto de biomarcadores como de dianas terapéuticas en esta patología.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by an excess of fat in the liver, which can lead to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and hepatocarcinoma. The disturbance of lipid metabolism is a crucial feature, there being an disparity between the production of hepatic lipids and its degradation. Due to the lack of dependable methods for the non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), we sought to identify serum markers that could be used to identify NASH patients. For that, we have analyzed the molecular activity underlying the basal inflammation that causes the disease. Blood samples have been obtained from 152 Caucasian individuals with NAFLD diagnosed by liver biopsy, in which we studied representative metabolites of oxidative stress. The results indicate that NAFLD patients with a NASH score ≥ 4 (NAH diagnosis) have higher levels of lipid peroxidation. In fact, a lipid peroxidation value above the cut-off point of 315.39 μM is an independent risk factor for a NASH score ≥ 4 (OR: 4.71; 95% CI 1.68-13.19; $p=0.003$). The area under the curve (AUC = 0.81; IC 95% = 0.73-0.89; $p < 0.001$) shows the good discrimination capacity of the model (Figure 2).

For this reason, interpreting the molecular mechanisms underlying inflammation in

NASH patients could be considered as a source of biomarkers and therapeutic targets in this pathology.

II. INTRODUCCIÓN

1. Características generales de la enfermedad

La esteatosis hepática metabólica, también denominada enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD, -de sus siglas en inglés-), es una enfermedad del hígado de carácter crónico e inflamatorio, caracterizada por la presencia de un porcentaje de grasa en los adipocitos mayor del 5% (1–3), habiendo descartado para su diagnóstico otras causas como la ingesta de alcohol, la toma de fármacos esteatogénicos y otras causas de hepatopatía crónica.

Forma parte de un espectro más amplio de enfermedades que pueden ir desde una simple esteatosis, hasta el estado final de cirrosis y hepatocarcinoma, habiendo pasado por la esteatohepatitis y la fibrosis (4). La progresión de una etapa a otra de la enfermedad se ve favorecida por la inflamación, y el daño celular y mitocondrial, que es causado por distintos mediadores inflamatorios y en el que juegan un papel importante los radicales libres y el estrés oxidativo.

Su prevalencia global es de alrededor de un 25% (3), con una incidencia en aumento, simultánea al cambio en el estilo de vida y al incremento de la obesidad, Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 y del síndrome metabólico en la población general. La presencia concomitante de DM tipo 2 incrementa el riesgo de progresión del daño hepático, constituyendo además un riesgo significativo para enfermedades cardiovasculares (4). La obesidad central es un factor de riesgo conocido para NAFLD, sin embargo, también podemos encontrar esta enfermedad en pacientes con un índice de masa muscular (IMC) dentro de los límites de la normalidad. La prevalencia difiere también en cuanto al sexo y etnia de los pacientes, lo que sugiere que otros factores genéticos, epigenéticos y ambientales puedan estar también implicados en la patogenia (1).

Diversas alteraciones intrahepáticas se pueden observar en la NAFLD como son el daño inflamatorio, muerte de células parenquimatosas, angiogénesis, fibrosis, o depósitos de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos.

2. Métodos diagnósticos en la NAFLD

Para realizar el diagnóstico de estos pacientes, la biopsia sigue siendo actualmente el “*gold standard*”, ya que permite identificar tanto inflamación como fibrosis en cualquiera de sus cuatro estadios (F0 a F4) (4), siendo el principal factor que impacta en el pronóstico de estos pacientes. Sin embargo, el riesgo de complicaciones (dolor y

sangrado principalmente) y su invasividad limitan su uso. Otros métodos que intentan sustituirla en la práctica clínica son la ultrasonografía con elastografía, la metabolómica, las técnicas basadas en la resonancia magnética nuclear y la aplicación de índices clínico-analíticos no invasivos. No obstante, estas técnicas permiten identificar fibrosis o cirrosis, pero no esteatohepatitis, lo cual impide hacer un diagnóstico temprano de la NAFLD. La elastografía de transición tiene buena precisión para discriminar entre fibrosis moderada y severa, pero no es capaz de detectar niveles de esteatohepatitis (5). En cuanto a los índices no invasivos, son fórmulas generadas mediante la integración de parámetros clínicos y analíticos, siendo económicos y eficientes para evaluar la extensión de la fibrosis hepática y la esteatosis en la NAFLD. Un estudio reciente demostró que en relación con la biopsia, los índices de esteatosis son más sensibles y los de fibrosis más específicos (6). Lo más utilizados y a los que haremos referencia en este estudio son: el FLI score, HSI score, NAFLD score, FIB-4 score, HFS score y APRI score. La exactitud diagnóstica de estos todavía no está bien definida (6), aunque se cree que pueden ser de gran utilidad por su alto valor predictivo negativo a la hora de estudiar pacientes con fibrosis y el riesgo de progresión (7). Por todo ello, se están investigando nuevos marcadores que permitan identificar la enfermedad en todos sus estadios ya que la detección y tratamiento en fases precoces condiciona el pronóstico de la enfermedad, puesto que es un problema de salud pública de primera magnitud (8).

3. Mecanismos patogénicos

En cuanto al sustrato patogénico de la enfermedad, la resistencia a la insulina es el factor implicado mejor conocido. Se considera que juega un papel imprescindible en el origen de la enfermedad al favorecer que se produzca un acúmulo de lípidos fuera del tejido adiposo, principalmente en músculo e hígado, consecuencia de la liberación de ácidos grasos libres (AGL) desde el tejido adiposo al torrente sanguíneo (9).

Actualmente, la hipótesis del doble impacto ha sido dejada atrás por la hipótesis de múltiple impacto "*multiple parallel-hit*" (1,2), la cual postula, que debido principalmente a la presencia de una cantidad significativa de grasa acumulada en los hepatocitos y a la resistencia hepática a la insulina, se producen diversas alteraciones que dan lugar a un desequilibrio entre los sistemas de protección frente a la lipotoxicidad y la producción de radicales libres en el tejido adiposo. Esto deriva en estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático y apoptosis de los hepatocitos.

La alteración del metabolismo lipídico es decisiva en la NAFLD. La esteatosis resulta de un desequilibrio entre la producción de lípidos y su degradación por parte del hígado. La

gran mayoría de los AGL que participan en la acumulación de lípidos proceden de ácidos grasos no esterificados y de reacciones de lipólisis periféricas (10).

La lipólisis de los triglicéridos fuera del hígado está regulada además por la presencia de insulina en el tejido adiposo. Por ello, la resistencia a la insulina es un factor importante en la patogénesis. Esta disminución de la sensibilidad a la insulina es la causante de una lipólisis desmesurada, produciéndose una gran cantidad de ácidos grasos no esterificados que van al hígado, contribuyendo también la síntesis *de novo* y los lípidos de la dieta. Los hepatocitos sintetizan ácidos grasos a partir del exceso de glucosa y fructosa de la dieta. La resistencia a la insulina en el músculo esquelético genera hiperglucemia e hiperinsulinemia que van a inducir la activación tanto de la proteína de unión al elemento regulador del esteroide (SREBP-1c), como de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) y el receptor X hepático (LXR) (10). Estas proteínas tienen un papel esencial en la regulación de la homeostasis glucídica y lipídica, así como en la presencia de inflamación. Al ser activadas, incrementan la expresión de múltiples enzimas lipogénicas con la consiguiente síntesis hepática *de novo* de ácidos grasos a partir de glucosa. Gran parte de estos ácidos grasos libres en el citoplasma de los hepatocitos son convertidos en Acyl-CoA que entra en la mitocondria, donde se lleva a cabo la β -oxidación, convirtiéndose en Acetil-CoA (10). El gran incremento de AGL hace que el hígado se sature y que la beta-oxidación (β -oxidación) que se produce en el hepatocito sea insuficiente. Como consecuencia, estos se acumulan y pueden ser utilizados como sustratos para generar especies lipotóxicas que inducirán estrés metabólico con posterior inflamación y muerte celular. Se ha demostrado una relación entre el grado de severidad de la esteatosis y el riesgo de aparición y progresión de la NAFLD, asociada también a los niveles de lipoperoxidación (9).

Un hallazgo importante en la patogenia de la NAFLD es la disfunción mitocondrial. Las mitocondrias son las principales encargadas de mantener la homeostasis de las grasas, al llevar a cabo la β -oxidación lipídica en su interior, así como la transferencia de electrones y la producción de ATP y de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ROS son indispensables para la señalización celular y juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos como la proliferación y diferenciación celular, expresión de genes, modificación oxidativa post-traducciona de proteínas, defensa frente a patógenos o adaptación frente a la hipoxia y, por lo tanto, un cierto nivel de estas especies es necesario para mantener la homeostasis. A pesar de ello, pueden también afectar a la función normal de la célula, ocasionando una disfunción metabólica y generando vías de señalización inflamatorias. Esto ocurre cuando se produce un desequilibrio entre

estas moléculas prooxidantes y los sistemas antioxidantes. Este sistema protector está formado tanto por compuestos no enzimáticos (vitaminas y sus análogos: vitamina A y E (α -tocoferol), ascorbato, coenzima Q10, minerales: selenio, zinc, ...), como por enzimas: superóxido dismutasa, catalasa, y glutathion peroxidasa son las principales (11). La enzima superóxido dismutasa cataliza la reacción del radical superóxido (O_2^-) a agua y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último, participa en la reacción de Fenton (11): en presencia de Fe^{2+} , el H_2O_2 se reduce parcialmente a radical hidroxilo, un compuesto excesivamente tóxico, de modo que, antes de que esto ocurra, la catalasa promueve la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular. En situación de estrés oxidativo continuo, la glutathion oxidasa es esencial para neutralizar el H_2O_2 en agua y alcohol (12). Estudios han demostrado que el aumento en la expresión de estas tres enzimas está en relación directa con los niveles de ROS (11).

El exceso de ROS por encima de su nivel basal produce modificaciones patológicas en lípidos, ADN y proteínas, esto es lo que conocemos como estrés oxidativo. El daño al ADN produce, además de mutaciones en los genes e inestabilidad de microsatélites, productos como 8-hidroxiguanina (8-OHdG) y 8-hidroxiadenina, al modificar las bases nitrogenadas. Los fosfolípidos de las membranas celulares son especialmente sensibles a este daño oxidativo debido a su gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), originándose la peroxidación lipídica. Es un proceso en el cual los radicales libres retienen electrones de los ácidos grasos y, por consiguiente, generan reactivos lipídicos intermediarios que continúan estas cadenas de reacciones dañinas. Los productos finales de la lipoperoxidación son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-alqueno (HNE) (12). De esta manera, se activan vías de señalización de muerte celular.

Alteraciones en las mitocondrias, como el desequilibrio en favor de las moléculas prooxidantes, originan un aumento de ácidos grasos no metabolizados en el citosol, resultado del bloqueo de la β -oxidación y, en consecuencia, un aumento de producción de ROS. Este acúmulo de AGL confiere un aumento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, disipando así el potencial de membrana y disminuyendo la capacidad de síntesis de ATP. Esto promueve que se generen radicales libres, como el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno. Así mismo, la β -oxidación genera nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$) que transfieren sus electrones a la cadena transporte de electrones (9). El aumento de la oxidación de los ácidos grasos produce un incremento en el flujo de electrones en la cadena de transporte, proporcionando un mayor contacto entre estos y el oxígeno y aumentando una vez más la producción de especies reactivas. Todo ello contribuye a un ambiente de estrés oxidativo en los hepatocitos, generándose un círculo vicioso.

El retículo endoplasmático (RE), tiene un rol bien establecido en la patogenia de enfermedades metabólicas y cardiacas, en la que tiene especial participación el citocromo P450 (9,13), en especial CYP2E1, habiéndose demostrado una sobreexpresión de este complejo en la NAFLD (14). Cambios en el balance del estrés oxidativo del RE tienen influencia sobre la función de las mitocondrias.

En general, tres estrategias son frecuentemente utilizadas para determinar los niveles de estrés oxidativo: la detección directa de los niveles de ROS, la medición de moléculas que participan en este daño oxidativo, y la evaluación del estado antioxidante de las células (10). La detección directa de ROS es difícil debido a su corta vida media y su rápida reactividad con otros componentes. Por ello, la medición del estrés oxidativo evaluando el daño que estas especies causan en lípidos, ácidos nucleicos y proteínas es una buena alternativa. Los productos más frecuentemente medidos en este caso son el MDA y el HNE. La peroxidación lipídica genera como producto esos dos componentes que son aldehídos reactivos (formados por la interacción del oxígeno y H₂O₂ junto con los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados). Tienen una vida media mayor, lo que aumenta el daño oxidativo que producen. Además de esto, la oxidación de ácidos nucleicos puede dar lugar a la rotura de hebras simples o dobles y la alteración de las bases. El 8-OHdG es un marcador del daño oxidativo en el ADN. Por último, se puede evaluar el estado antioxidante mediante la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes (como la enzima superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa) o la capacidad antioxidante total.

Por otro lado, se encuentran los mecanismos que dan lugar a la inflamación y fibrosis, provocando la progresión de la enfermedad. Los peróxidos lipídicos, MDA y HNE y las especies reactivas derivadas del CYP2E1 activan a las células estrelladas hepáticas, principales encargadas de la producción de colágeno y generación de fibrosis (14). Además, el estrés oxidativo se ha relacionado con la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleucina 8 (IL-8). Hasta un 40% de los pacientes con NASH, tiene niveles de hierro ligeramente elevados, que promueven la formación de ROS, la activación de las células de Kupffer (macrófagos hepáticos), así como la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), produciendo apoptosis de las células (14). Todo lo anterior favorece un estado de inflamación crónica con el consiguiente desarrollo de fibrosis y posterior cirrosis.

III. HIPÓTESIS

El estudio del perfil de estrés oxidativo en pacientes con NAFLD puede ser de utilidad para la identificación de biomarcadores que permitan un diagnóstico no invasivo de estos pacientes en fases precoces de la enfermedad.

IV. OBJETIVOS

1. Realizar una evaluación completa del perfil de estrés oxidativo en lo referente a las enzimas antioxidantes, la capacidad antioxidante total y el daño celular oxidativo, en la NAFLD.
2. Identificar biomarcadores de estrés oxidativo que puedan servir como herramientas de diagnóstico no invasivo para detectar en pacientes que padecen NAFLD, fases precoces de la enfermedad (NASH).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio unicéntrico de cohortes, prospectivo. En total se incluyeron 152 individuos caucásicos, con NAFLD diagnosticada mediante biopsia hepática, que han sido divididos en dos grupos en función de la puntuación en el NASH score (NASH score ≥ 4). Este índice valora la esteatohepatitis no alcohólica (siglas de *non-alcoholic steatohepatitis* en inglés). En nuestro estudio, determinamos el punto de corte de NASH teniendo en consideración un NASH score ≥ 4 (con al menos un punto para inflamación lobulillar y otro para balonización de los hepatocitos). Este límite se basa en los criterios de inclusión de la mayoría de los ensayos clínicos aprobados por la FDA para el desarrollo de fármacos para NAFLD. Además, se han evaluado diferentes factores de riesgo como la DM tipo 2, obesidad, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, así como el hábito tabáquico y de consumo de alcohol. Se han tenido en cuenta también características antropométricas como la talla, el peso, el IMC, los perímetros de cintura y cadera, y la tensión arterial sistólica y diastólica.

2. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

1. NAFLD diagnosticada mediante biopsia hepática.
2. Individuos con edades comprendidas en el rango de 18 a 80 años.
3. IMC entre 25 y 40 kg/m².

Criterios de exclusión:

1. Alteración hepática secundaria a hepatitis autoinmunes, virales, hepatotoxicidad, enfermedad de Wilson, hemocromatosis o déficit de α -1 antitripsina.
2. Consumo significativo de alcohol.
3. Hepatocarcinoma o cirrosis en estadio 3 o 4.
4. Participación en un programa de peso activo, toma de fármacos para perder peso o pioglitazona y pérdida de peso >5% previo a la intervención.
5. Cirugía bariátrica previa.
6. Diabetes Mellitus tipo 1 o en tratamiento con antidiabéticos orales tipo tiazolidinedionas o análogos de GLP-1.
7. Enfermedad tiroidea no controlada.
8. Enfermedad renal crónica.
9. Embarazo o lactancia.

3. Aspectos éticos

El Comité Ético de Investigación Clínica de HCUV aprobó este estudio (PI 23-3146 TFG). Primeramente, se comunicó a los integrantes del estudio los riesgos y beneficios del mismo, así como su derecho a abandonarlo en cualquier momento si así lo desearan. Todos ellos firmaron un consentimiento informado, y se recogieron los datos de forma anónima de acuerdo con la Ley Orgánica de Protección de Datos 3/2018. La investigación se llevó a cabo siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki.

4. Biopsia hepática

Todos los individuos de la muestra han sido diagnosticados de NAFLD confirmada mediante biopsia hepática percutánea con al menos 11 espacios porta. En ella, se tuvieron en cuenta algunas características como la presencia de esteatosis, inflamación, balonización y fibrosis.

Para diagnosticar histológicamente la enfermedad fue necesaria la presencia de esteatosis en un porcentaje superior al 5%. En función del grado de esteatosis se asignaron unos valores: 1 (5-33%), 2 (34-66%) y 3 (>66%). El grado de inflamación se clasificó en 0 (sin inflamación), 1 (<2 focos por campo x200), 2 (2-4 focos por campo x200) o 3 (>4 focos por campo x200). La balonización se puntuó con 0 (ausencia de células con balonización), 1 (pocas células balonizadas) o 2 (muchas células balonizadas). La fibrosis se clasificó en 0 (sin fibrosis), 1 (fibrosis perisinusoidal o pericentral), 2 (fibrosis portal o periportal), 3 (fibrosis portal con formación de puentes) y 4 (cirrosis). La suma del grado de esteatosis, inflamación y balonización determinan el NASH score. Un NASH score ≥ 4 indica esteatohepatitis.

5. Elastografía de transición

La fibrosis además fue valorada mediante elastografía de transición (Fibroscan®): es una técnica rápida, segura y reproducible que permite cuantificar la rigidez hepática (es decir, el grado de fibrosis hepática) a través de un sistema de ultrasonidos (Anexo I).

6. Parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos se obtuvieron mediante un análisis sanguíneo en ayunas de cada uno de los pacientes.

Se determinaron el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL), perfil hepático (GOT, GPT, GGT, bilirrubina, albúmina), perfil glucídico (glucosa sérica, insulina, HOMA-IR, HbA1 basal) así como ácido úrico, fosfatasa alcalina, proteína C reactiva, ferritina, hemoglobina, leucocitos, plaquetas, INR.

7. Métodos no invasivos de esteatosis

Índices no invasivos: (detallados en Anexo II)

- Hepatitis Steatosis Index (HSI)
- Fatty Liver Index (FLI)

8. Métodos no invasivos de fibrosis

Índices no invasivos: (detallados en Anexo II)

- NAFLD Fibrosis Score (NFS)
- Fibrosis-4 (FIB-4)
- Hepamet Fibrosis Score (HFS)
- AST to Platelet Ratio Index (APRI)

9. Características antropométricas

Peso, Altura, IMC, Perímetro de cintura, Perímetro de cadera, Tensión arterial sistólica y Tensión arterial diastólica.

10. Determinaciones de moléculas de estrés oxidativo

Las moléculas relacionadas con el estrés oxidativo fueron analizadas a partir de las muestras de plasma sanguíneo.

Se determinó la actividad de enzimas antioxidantes como son las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, y la capacidad antioxidante total, medida mediante las técnicas FRAP y ABTS.

Además, se llevó a cabo una medición de los tioles, moléculas reductoras de

compuestos oxidantes, y del marcador de daño del DNA, el 8-OHdG. Este compuesto procede de la oxidación de la guanina de los ácidos nucleicos.

Se estudiaron los marcadores de peroxidación lipídica: MDA y HNE. Estos dos compuestos son productos de la peroxidación de lípidos en las células, y por tanto, son marcadores de estrés oxidativo.

11. Análisis estadístico

Las variables categóricas están representadas en número de individuos y porcentaje, y las variables cualitativas mediante la mediana y el rango intercuartílico. Se han utilizado las pruebas de U-Mann Whitney y Chi-cuadrado para evaluar las diferencias entre grupos, utilizando para ello el programa estadístico SPSS 22.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA), considerando un nivel de significancia igual o menor a 0,05.

Se calculó el punto de corte u optimal operating point (OOP) de la peroxidación lipídica como el valor para el que el punto de la curva ROC tenía la mínima distancia a la esquina superior izquierda (donde sensibilidad = 1 y especificidad = 1). Según el teorema de Pitágoras, esta distancia es: $\text{Optimal Operating Point} = \sqrt{(1-\text{sensitivity})^2 + (1-\text{specificity})}$. Para poder evaluar la asociación independiente de un NASH score ≥ 4 y los niveles de lipoperoxidación, se realizó una regresión logística binaria multivariante mediante un modelo automático de Wald de pasos hacia atrás. Las variables que mostraron un valor $p < 0,1$ y no mostraron colinealidad en el análisis de regresión univariante se incluyeron en el análisis multivariante como variables de ajuste. La capacidad de discriminación del modelo se evaluó mediante un análisis de la curva ROC (Receiving Operating Characteristic).

IV. RESULTADOS

1. Características clínicas

En la tabla 1, se representan las características basales de los 152 pacientes de la muestra, dividiéndolos en dos grupos en función de la presencia de esteatohepatitis (NASH score ≥ 4). La mediana de la edad del grupo con un NASH score < 4 es de 49 años con un porcentaje de hombres del 69,5%. En el grupo NASH score ≥ 4 , la mediana de la edad es de 51,5 años habiendo un 48,6% de hombres.

Si tenemos en cuenta la edad, no hay diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes, sin embargo, si se observaron diferencias en relación con el sexo, habiendo más hombres con un NASH score < 4 .

En cuanto a las comorbilidades presentes, un 16,5% de los 152 pacientes estudiados presentaba DM tipo 2, siendo mayoritarios en el grupo con NASH score ≥ 4 . No se han

visto diferencias en cuanto a presencia de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ni obesidad.

En las variables antropométricas, al analizar la talla, peso, IMC, y perímetros de cintura y cadera tampoco se han visto diferencias, pero sí cabe destacar que los pacientes con un NASH score ≥ 4 presentaban valores más elevados de tensión arterial tanto sistólica como diastólica.

Asimismo, estos últimos presentan cifras más elevadas de la glucemia, mayor insulina y resistencia a dicha insulina. No se han encontrado diferencias significativas en el valor de la hemoglobina glicosilada, ni tampoco en los niveles de ácido úrico. En cuanto a proteínas como la creatinina y la albúmina, se ha comprobado que se encuentran más elevadas en pacientes con un NASH score ≥ 4 . Asimismo, las enzimas hepáticas como GOT, GPT o la fosfatasa alcalina muestran valores más elevados en los pacientes con NASH score ≥ 4 . No hay diferencias significativas en los niveles de bilirrubina total, ni de triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL.

Por último, en cuanto a los valores analíticos, no hay diferencias en los niveles de hemoglobina, leucocitos, plaquetas ni en el INR.

En cuanto a las características histológicas obtenidas a través de la biopsia, los pacientes con un NASH score ≥ 4 , tienen mayores índices de esteatosis, inflamación, balonización y fibrosis, al igual que mayor fibrosis valorada mediante el Fibroscan®.

En el análisis de los índices no invasivos de esteatosis y fibrosis, los únicos que han mostrado asociación estadísticamente significativa han sido el NFS score, el HSI score, HFS score y el APRI score, todos ellos con valores superiores en el grupo de pacientes con un NASH score ≥ 4 . No se han encontrado diferencias significativas ni en el FLI score, ni en el FIB4 score.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con NAFLD segregados por un NASH score de 4. Las variables continuas se representan como [mediana, rango intercuartílico (RQ)], las variables categóricas como (n, %). HOMA: índice de resistencia a la insulina, GOT: transaminasa glutámico-oxalacética, GPT: glutamato-piruvato transaminasa, GGT: gamma-glutamil trans-peptidasa, FLI score: *Fatty liver index*, HSI score: *Hepatitis Steatosis Index*, NFS: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease fibrosis score, FIB4: Fibrosis-4, HFS: Hepamet Fibrosis Score, APRI: AST to Platelet Ratio Index.

Características	NASH score<4 N=82	NASH score ≥ 4 N=70	p-valor
Edad (años, mediana)	49 (18,5)	51,5 (23)	0,930
Hombre (n, %)	57 (69,5)	34 (48,6)	0,009
COMORBILIDADES (n, %)			
<u>Diabetes Mellitus tipo 2</u>	7 (11,3)	18 (28,6)	0,016

Hipercolesterolemia	39 (49,4)	33 (47,8)	0,852
Hipertrigliceridemia	26 (34,2)	25 (38,5)	0,602
Obesidad (IMC>30)	50 (61,7)	48 (68,6)	0,381
Fumador	10 (16,4)	10 (15,9)	0,937
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS (mediana, RQ)			
Talla (m)	1,67 (0,13)	1,62 (0,17)	0,09
Peso (kg)	86,31 (21,95)	87,6 (29,35)	0,881
IMC (kg/m ²)	31,05 (36,91)	32,3 (16,02)	0,237
Perímetro cintura (cm)	104 (19,5)	105 (20,65)	0,669
Perímetro cadera (cm)	107 (16,38)	108,25 (15,65)	0,898
<u>Tensión arterial sistólica (mmHg)</u>	120 (35)	140 (28,75)	<0,001
<u>Tensión arterial diastólica (mmHg)</u>	75 (30)	90 (16)	<0,001
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS (mediana, RQ)			
<u>Insulina (mg/dL)</u>	13 (12,96)	19,9 (13,58)	0,002
<u>HOMA (resistencia insulina)</u>	3,42 (4,44)	5,37 (5,08)	<0,001
<u>Glucemia (ml/dL)</u>	103 (25)	109 (32,5)	0,011
HbA1c (mg/dL)	6,05 (1,18)	5,9 (0,7)	0,182
Ácido úrico (mg/dL)	5,9 (1,5)	5,8 (2,03)	0,548
<u>GOT (AST) (U/L)</u>	30 (17,5)	41 (27)	<0,001
<u>GPT (ALT) (U/L)</u>	52,5 (29)	65 (51)	0,002
GGT (U/L)	82,5 (97,25)	68 (73)	0,452
Bilirrubina total (mg/dL)	0,62 (0,5)	0,6 (0,4)	0,365
<u>Albúmina (g/dL)</u>	4,6 (0,7)	4,4 (0,7)	0,005
<u>Fosfatasa alcalina (mg/dL)</u>	72 (32,25)	80 (32,25)	0,039
Triglicéridos (mg/dL)	134 (96,75)	133 (99)	0,623
Colesterol total (mg/dL)	183 (50)	192 (59,25)	0,583
HDL (mg/dL)	43,5 (12,25)	46,7 (12,8)	0,593
LDL (mg/dL)	106,6 (31,38)	116 (51)	0,486
Ferritina (ng/mL)	186 (164,2)	174 (180,2)	0,934
Proteína C Reactiva	3,7 (3,05)	2,6 (2,03)	0,21
Hemoglobina total	15,1 (1,75)	15,15 (5,17)	0,884
INR	1,01 (0,15)	1,02 (0,07)	0,665
Leucocitos absolutos (células/mL)	6 760 (5 750)	5 740 (5 170)	0,284

Plaquetas (células/mL)	254 000 (95 000)	242 000 (122 250)	0,346
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS (n, %)			
<u>Esteatosis leve (<33%)</u>	60 (73,2)	9 (12,9)	<0,001
<u>Esteatosis moderada/severa (≥33%)</u>	22 (26,8)	61 (87,1)	<0,001
<u>NASH (Inflamación + Balonización)</u>	17 (20,7)	62 (88,6)	<0,001
<u>Fibrosis severa (≥F3)</u>	8 (9,8)	18 (25,7)	0,009
Cirrosis	3 (3,7)	8 (11,4)	0,06
<u>Fibroscan® (kPa)</u>	8,1 (6,4)	10,35 (7,55)	0,033
ÍNDICES NO INVASIVOS (mediana, RQ)			
FLI score	85,26 (84,03)	81,36 (73,23)	0,68
<u>HSI score</u>	42,07 (33,22)	45,8 (28,73)	0,033
<u>NFS score (NAFLD score)</u>	-3,59 (3,46)	-2,05 (2,92)	0,005
FIB4 score	0,85 (0,64)	1,06 (1,15)	0,074
<u>HFS score</u>	0,019 (0,06)	0,12 (0,36)	<0,001
<u>APRI score</u>	-3,48 (6,72)	0,33 (10,55)	<0,001

2. Niveles de las moléculas de estrés oxidativo en NAFLD

De las moléculas de estrés oxidativo evaluadas, solo las referentes a la peroxidación lipídica: MDA y HNE han mostrados valores significativamente más elevados en el grupo de NASH score ≥ 4 (Tabla 2 y Figura 1).

No se han encontrado diferencias destacables ni para la capacidad antioxidante total, medida mediante las técnicas FRAP y ABTS, ni para los niveles de la actividad de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa y catalasa. Tampoco en relación con los toles ni con el 8-OHdG (Tabla 2 y Figura 1).

Tabla 2. Niveles de moléculas de estrés oxidativo en pacientes segregados por un NASH score de 4. Los datos están representados como mediana y rango intercuartílico (RQ). FRAP: poder antioxidante reductor férrico, ABTS: ácido 2,2'-azinobis, SOD: superóxido dismutasa, 8-OHdG: 8-hidroxi-2-guanosina, MDA: malondialdehído, HNE: 4-hidroxiacetaldehído.

	NASH Score <4. N=82	NASH Score ≥ 4. N=70	p-valor
FRAP (μM)	409,64 (110,65)	392,71 (130,14)	0,826
ABTS (μM)	548,43 (477,99)	540,09 (556,05)	0,496

SOD (U/ μ M)	0,12 (0,06)	0,13 (0,06)	0,518
Catalasa (U/ μ L)	42,4 (45,84)	34,02 (39,65)	0,384
Tioles (μ mol/L)	0,15 (0,18)	0,17 (0,17)	0,734
8-OHdG (pg/mL)	17 710 (24974)	19 935 (33 234)	0,370
<u>MDA + HNE (μM)</u>	120,48 (280,6)	230,14 (355,89)	0,024

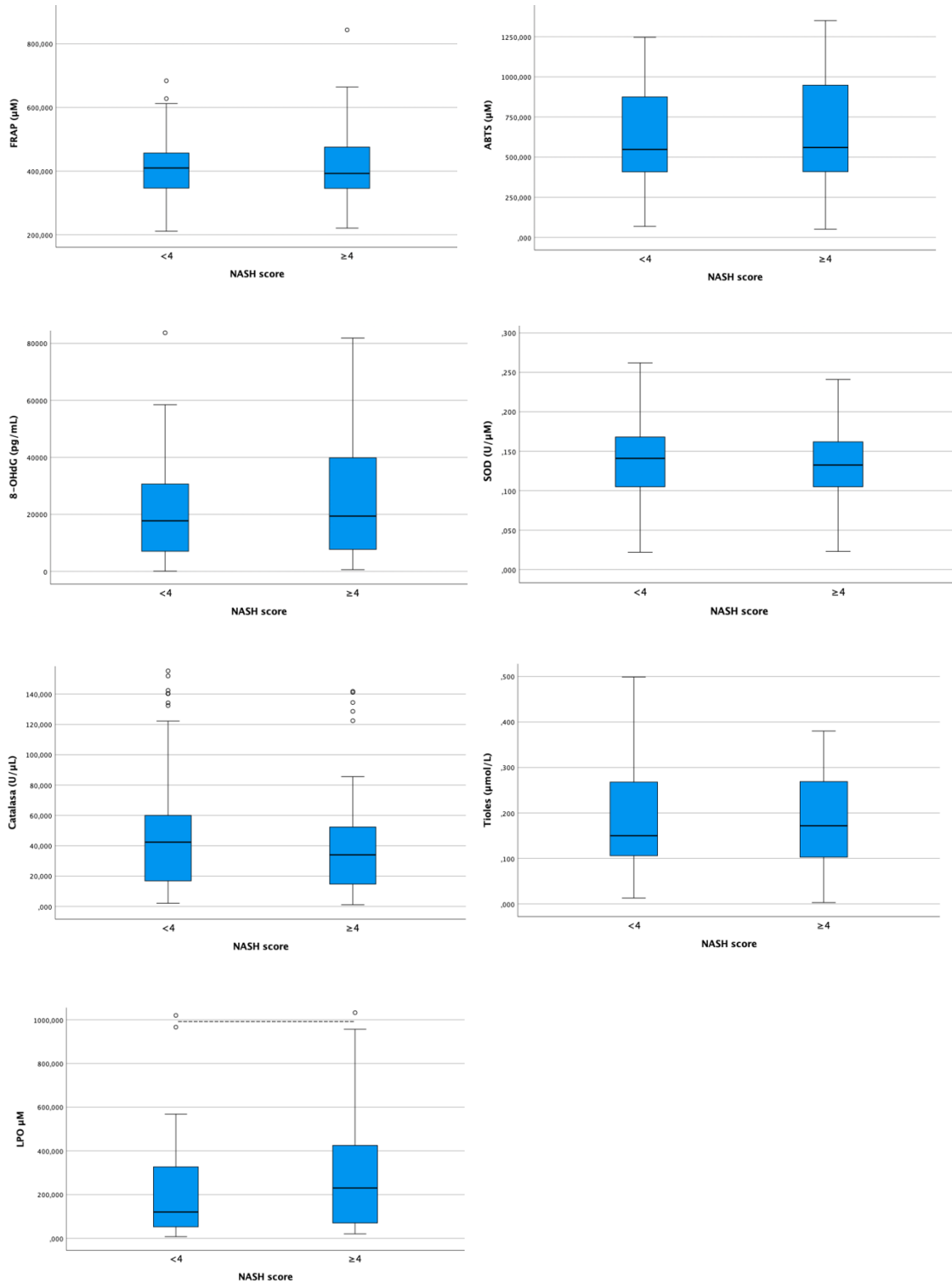


Figura 1. Diagrama de cajas mostrando las moléculas de estrés oxidativo en los diferentes grupos de pacientes.

3. Evaluación del riesgo de NASH score en función de los niveles de LPO

Posteriormente, se determinó cuál es el valor para el cual los niveles de peroxidación lipídica se asocian a la presencia de esteatohepatitis, definida por un NASH score ≥ 4 . Se calculó el punto de corte, que resultó ser de 315.39 μM .

El análisis de regresión multivariable identificó los niveles de LPO por encima del OOP (LPO $>315.39 \mu\text{M}$) como un factor de riesgo independiente de una puntuación en el NASH score ≥ 4 (OR:4,71; CI 95% 1,68-13,19; $p=0,003$) en pacientes con NAFLD (Tabla 3).

En la figura 2 se muestra la curva ROC de probabilidad predicha para el modelo de regresión logística multivariante realizado. El área bajo la curva (AUC = 0,81; IC 95% = 0,73-0,89; $p < 0,001$) muestra la buena capacidad de discriminación del modelo.

Tabla 3. Análisis de regresión logística multivariable para evaluar la asociación de los niveles de LPO y el riesgo asociado a NASH ≥ 4 . HSI score: *Hepatitis Steatosis Index*, FIB4: Fibrosis-4, APRI: AST to Platelet Ratio Index, LPO: lipoperoxidación.

	OR	IC 95%	p-valor
HSI	1,05	1,02-1,09	<0,001
FIB4	1,68	1,05-2,68	0,030
APRI	1,08	1,02-1,13	0,005
<u>LPO > 315.39 μM</u>	4,71	1,68-13,19	0,003

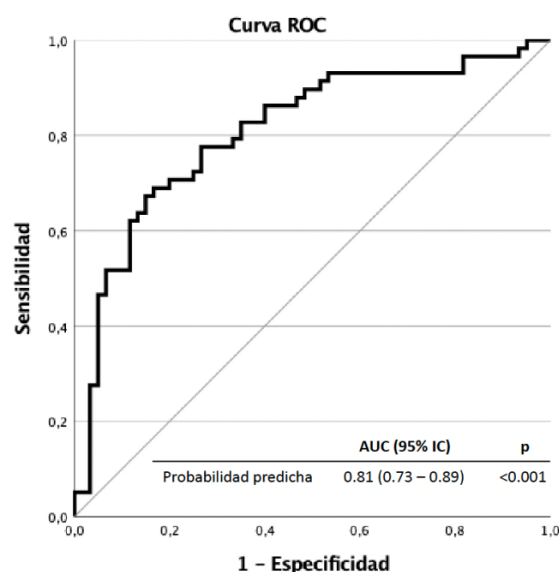


Figura 2. Curva ROC para la probabilidad de predicción del método NASH score ≥ 4 .

V. DISCUSIÓN

Este estudio ha evaluado diferentes marcadores de estrés oxidativo en pacientes con NAFLD. Los hallazgos derivados de este trabajo revelaron que los pacientes con NAFLD con una puntuación NASH score ≥ 4 (esteatohepatitis) mostraban niveles significativamente más altos de peroxidación lipídica. De hecho, los niveles de LPO superiores a 315,39 μM son un factor de riesgo independiente para presentar una puntuación de NASH score ≥ 4 .

El estrés oxidativo es considerado uno de los principales factores en la fisiopatología de numerosas enfermedades inflamatorias crónicas del hígado, entre ellas la NAFLD. El deterioro crónico del metabolismo de los lípidos está estrechamente relacionado con alteraciones del equilibrio oxidante/antioxidante, que afecta a los orgánulos relacionados con el metabolismo, ocasionando lipotoxicidad celular, peroxidación lipídica, estrés del RE y disfunción mitocondrial (15).

El aumento del almacenamiento de lípidos en los hepatocitos induce la producción de altos niveles de ROS, que se unen a los PUFAs formando peróxidos lipídicos, generándose así una reacción biológica en cadena de radicales libres. Los peróxidos lipídicos inestables se descomponen fácilmente en 4-HNE y MDA activos, lo que provoca daño celular (16).

Este aumento de ROS desencadena las vías de estrés de los hepatocitos, favoreciendo la inflamación y la fibrogénesis, que contribuyen en la progresión a NASH (17).

La disfunción mitocondrial que tiene lugar en los hepatocitos en pacientes con NAFLD, afecta al equilibrio lipídico en el hígado. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) desempeña un papel importante en la homeostasis mitocondrial. La apertura excesiva del mPTP conduce al estrés mitocondrial, incluyendo el deterioro de la función de la cadena de transporte de electrones, la inflamación mitocondrial y la generación de ROS (16). Los fosfolípidos de la membrana mitocondrial se oxidan, lo que reduce la fluidez y dificulta la entrada de glutatión en la mitocondria, provocando un desequilibrio entre antioxidantes y ROS.

Todo esto induce estrés oxidativo, que conduce a una reducción de la síntesis de ATP mitocondrial. En consecuencia, los pacientes con NAFLD tienen menos reservas de ATP (18), lo que hace que las células sean más susceptibles a la necrosis y desencadena una respuesta inflamatoria cuando el hígado se lesiona por isquemia e hipoxia (19). Asimismo, la producción de ROS, la lipoperoxidación y la liberación de citoquinas, conducirá en última instancia a la muerte celular (20).

Numerosos estudios han demostrado un estado redox alterado en la mayoría de los pacientes con NAFLD, detectando niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo y productos de peroxidación lipídica en plasma (21).

En la patogénesis, los ROS también oxidan las proteínas, sobre todo las enzimas antioxidantes, viéndose la capacidad antioxidante muy afectada tras la oxidación. Aunque la mayoría de los estudios exponen niveles disminuidos de enzimas antioxidantes hepáticas en los pacientes con NAFLD, algunos han mostrado resultados discordantes en modelos animales, encontrando tanto niveles aumentados como disminuidos de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o incluso el glutatión reducido (22). Aunque estas observaciones son contradictorias, podrían explicarse por la fisiopatología de la NAFLD en la que inicialmente una respuesta antioxidante adaptativa a la excesiva producción de ROS es seguida por el agotamiento del sistema antioxidante, lo que resulta en menores niveles de enzimas antioxidantes.

En los estudios de Ampuero et al., una proporción relativamente alta de pacientes no mostró hallazgos relacionados con NASH bien definida (en particular, la mitad de los pacientes cirróticos y un tercio de los que presentaban fibrosis avanzada no pudieron ser diagnosticados de NASH) (23). Además, un reciente estudio italiano (24) demostró que hasta el 33% de los pacientes con una fibrosis significativa relacionada con NAFLD no presentaban NASH (hasta el 10% no tenían inflamación). Por lo tanto, los resultados de nuestro trabajo demuestran que, mediante la determinación de marcadores de LPO, podríamos identificar a dichos pacientes evitando los riesgos y la variabilidad de la biopsia con una alta precisión diagnóstica, lo que también podría ser útil como herramienta terapéutica.

Estudios muy recientes han revelado una posible implicación del RNA no codificante (ncRNAs) en esta patología, así como la posibilidad de que sea utilizado como un biomarcador no invasivo (25). Los ncRNA regulan la fisiología y las funciones celulares a través del silenciamiento epigenético de genes mediante la regulación postranscripcional, y su expresión anormal se ha asociado con NAFLD. Otros marcadores circulantes relacionados con la inflamación, incluidas las citocinas, las quimiocinas o los receptores de células inmunitarias, y los exosomas circulantes relacionados con la inflamación se han propuesto como herramientas de puntuación de NAFLD, pero carecen de estudios de validación (25).

Como vieron en su estudio Puri et al. (26) comparando controles normales con un grupo de pacientes con NAFLD y un tercer grupo con NASH, estos dos últimos tenían niveles mayores de GOT y GPT, menor cantidad de HDL y niveles mayores de LDL y triglicéridos. Como era de esperar, una proporción significativa de sujetos con NAFLD y NASH tenían características de síndrome metabólico. El estudio de la metabolómica de los lípidos circulantes puede dar información sobre el estado metabólico del hígado, pero no proporciona información directa sobre los cambios fisiopatológicos e histológicos que se están produciendo. Por ello, es necesario encontrar marcadores que definan mejor los cambios que están teniendo lugar, basándonos entre otros, en los datos de peroxidación lipídica (27).

En la actualidad, se han creado más de cien índices para valorar el daño hepático o pronosticar eventos como infartos, cáncer u otros relacionados con la progresión de la cirrosis, el hepatocarcinoma o la descompensación de la cirrosis. Estos son típicamente combinaciones de parámetros antropométricos y bioquímicos semejantes, aunque se ha avanzado más en los marcadores de fibrosis que en los de NASH. La implementación de técnicas descubiertas a través de la investigación en transcriptómica, genómica, metabolómica o proteómica no parece mejorar significativamente el rendimiento (28). Como procedimientos de respaldo, se han sugerido OWLiver® (perfil metabolómico) (29) y ELF® (European Liver Fibrosis) (30). Sin embargo, faltan índices no invasivos basados en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, como los derivados del estrés oxidativo y la LPO, que permitan un mejor enfoque diagnóstico tanto en la vida real como en el contexto de los ensayos clínicos.

Este trabajo presenta varias limitaciones que deben tenerse en cuenta. Primeramente, la comparación de los marcadores de estrés oxidativo se realizó en un único punto temporal. Asimismo, el estudio se llevó a cabo en un solo centro sanitario y sería necesario evaluarlo en un diseño de tipo multicéntrico para poder valorar adecuadamente el posible papel de la lipoperoxidación en el diagnóstico de NASH.

VI. CONCLUSIONES

Los altos niveles de lipoperoxidación presentan una asociación independiente significativa con la presencia de esteatohepatitis valorada por un NASH score ≥ 4 . Asimismo, podemos decir que los niveles de peroxidación lipídica podrían ser una prometedora herramienta diagnóstica no invasiva a tener en cuenta a la hora de detectar NASH en pacientes con NAFLD.

Este estudio podría ayudar a sentar las bases de nuevos estudios clínicos para comprender la correlación entre la peroxidación lipídica y la inflamación basal en esta población, lo que guiará el desarrollo de nuevas terapias y el descubrimiento de nuevos biomarcadores.

VII. BIBLIOGRAFÍA

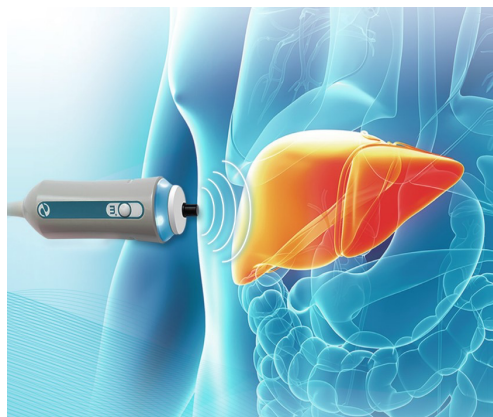
1. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev*. June 2018; 2018: 1-14.
2. Gonzalez A, Huerta-Salgado C, Orozco-Aguilar J, Aguirre F, Tacchi F, Simon F, et al. Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Cipak Gasparovic A, editor. *Oxid Med Cell Longev*. October 2020; 2020:1-16.
3. Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med J*. June 2018.
4. Pafili K, Roden M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Mol Metab*. August 2021; 50: 101122.
5. Di Mauro S, Scamporrino A, Filippello A, Di Pino A, Scicali R, Malaguarnera R, et al. Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD. *Int J Mol Sci*. November 2021; 22(21).
6. Tafur Sánchez CN, Durá Gil M, Alemán Domínguez del Río A, Hernández Pérez CM, Mora Cuadrado N, Gómez de la Cuesta S, et al. Utilidad práctica de los índices no invasivos en la esteatosis hepática metabólica. *Endocrinol Diabetes Nutr*. Junio de 2022; 69(6): 418-25.
7. Mózes FE, Lee JA, Selvaraj EA, Jayaswal ANA, Trauner M, Boursier J, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive tests for advanced fibrosis in patients with NAFLD: an individual patient data meta-analysis. *Gut*. May 2022; 71(5): 1006-19.
8. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. April 2020; 9(4).
9. Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Rev Esp Enfermedades Dig [Internet]*. Septiembre de 2008; 100(9).
Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082008000900007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
10. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. May 2020; 152: 116-41.
11. Carvajal CC. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: FORMACIÓN, FUNCION Y ESTRÉS OXIDATIVO. 36. Noviembre de 2018.
12. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. October 2019; 2019:1-13.
13. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. March 2018;122(6): 877-902.
14. Oneta C. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss Med Wkly [Internet]*. September 2002. Disponible en: <https://smw.ch/index.php/smw/article/view/208>
15. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. September 2018; 75(18): 3313-27.

16. Reiniers MJ, van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Steatotic Hepatocytes: A Molecular Perspective on the Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury in the Fatty Liver. *Antioxid Redox Signal*. September 2014;21(7):1119-42.
17. Hong T, Chen Y, Li X, Lu Y. The Role and Mechanism of Oxidative Stress and Nuclear Receptors in the Development of NAFLD. Pu J, editor. *Oxid Med Cell Longev*. October 2021;2021:1-25.
18. Zhang B, Pan C, Feng C, Yan C, Yu Y, Chen Z, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Rep*. December 2022; 27(1):45-52.
19. Shum M, Ngo J, Shirihai OS, Liesa M. Mitochondrial oxidative function in NAFLD: Friend or foe? *Mol Metab*. August 2021; 50: 101134.
20. Tang S ping, Mao X li, Chen Y hong, Yan L ling, Ye L ping, Li S wei. Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death. *Front Immunol*. April 2022;13:870239.
21. Arroyave-Ospina JC, Wu Z, Geng Y, Moshage H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants*. January 2021; 10(2): 174.
22. Ore A, Akinloye O. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Mex)*. January 2019; 55(2): 26.
23. Ampuero J, Aller R, Gallego-Durán R, Crespo J, Abad J, González-Rodríguez Á, et al. Definite and indeterminate nonalcoholic steatohepatitis share similar clinical features and prognosis: A longitudinal study of 1893 biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease subjects. *Liver Int*. September 2021; 41(9): 2076-86.
24. Pelusi S, Cespiati A, Rametta R, Pennisi G, Mannisto V, Rosso C, et al. Prevalence and Risk Factors of Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Without Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. October 2019; 17(11): 2310-2319.e6.
25. Nassir F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules*. June 2022; 12(6): 824.
26. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. December 2009; 50(6): 1827-38.
27. Martín-Fernández M, Arroyo V, Carnicero C, Sigüenza R, Busta R, Mora N, et al. Role of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in the Pathophysiology of NAFLD. *Antioxidants*. November 2022; 11(11): 2217.
28. Sanyal AJ, Shankar SS, Calle RA, Samir AE, Sirlin CB, Sherlock SP, et al. Non-Invasive Biomarkers of Nonalcoholic Steatohepatitis: the FNIH NIMBLE project. *Nat Med*. March 2022; 28(3): 430-2.
29. Mayo R, Crespo J, Martínez-Arranz I, Banales JM, Arias M, Mincholé I, et al. Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: Results from discovery and validation cohorts. *Hepatol Commun*. July 2018; 2(7): 807-20.
30. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology*. December 2004; 127(6): 1704-13.

VII. ANEXOS

ANEXO I. Interpretación de la elastografía de transición

La elastografía de transición hepática se realiza mediante el Fibroscan®. Se trata de una técnica no invasiva, sencilla y rápida cuyo principal factor limitante es el IMC de los pacientes. Se mide en kPa, y tiene un amplio rango de acción, entre 2.5 y 75 kPa, que se correlaciona con el grado de fibrosis hepática.



Valores Fibroscan®	Significación	Grado de fibrosis
0 kPa	Ausencia de fibrosis	FO
<7.6 kPa	Fibrosis leve	F1
7.7 – 9.4 kPa	Fibrosis significativa	F2
kPa9.5 – 14 kPa	Fibrosis grave	F3
>14 kPa	Cirrosis	F4

ANEXO II. Índices no invasivos para el diagnóstico de la NAFLD

Debido a la invasividad y alto coste de la biopsia hepática, se han creado fórmulas que combinan datos clínicos y analíticos para evaluar de forma rápida, sencilla y económica el grado de esteatosis y fibrosis hepática en la NAFLD.

La precisión diagnóstica de estos índices varía según la población a la que se aplique, con una exactitud diagnóstica (su área bajo la curva es aproximadamente 0.8) que oscila entre el 80-85%. La principal limitación de estos índices es que dejan una zona gris del 25% salvo para el HFS (Hepamet Fibrosis Score) que se reduce a un 9%.

Las tablas inferiores recogen las fórmulas a partir de las cuales se obtienen los índices y la interpretación de los valores que se pueden obtener.

ÍNDICES DE ESTEATOSIS NO INVASIVOS

TEST	FÓRMULAS	INTERPRETACIÓN	
FLI	$\frac{(e^{0.953 \times \ln(\text{TG})} + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \ln(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{CIN} - 15.745)}{1 + e^{0.953 \times \ln(\text{TG})} + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \ln(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{CIN} - 15.745}} \times 100$	< 30	No esteatosis
		≥ 30 - 60	Indeterminado
		≥ 60	Esteatosis
HSI	HSI = 8 x (ALT/AST) + BMI (Añadir: + 2 si mujer y + 2 si DM2)	< 30	No esteatosis
		≥ 30 - < 36	Indeterminado
		≥ 36	Esteatosis

Tabla 1. Índices de esteatosis no invasivos

ÍNDICES DE FIBROSIS NO INVASIVOS

TEST	FÓRMULAS	INTERPRETACIÓN	
NFS	$\text{NFS} = [-1,675 + 0,037 \times \text{edad (años)} + 0,094 \times \text{IMC (kg/m)} + 1,13 \times \text{IFG/diabetes (sí = 1, no = 0)} + 0,99 \times \text{cociente AST/ALT} - 0,013 \times \text{plaquetas (} \times 10^9/\text{l)} - 0,66 \times \text{albúmina (g/dl)}]$	< -1,455	Fibrosis leve
		≥ - 1,455 - 0,675	Indeterminado
		≥ 0.676	Fibrosis avanzada
FIB-4	$[\text{edad (años)} \times \text{AST (U/l)} / (\text{plaquetas (} \times 10^9/\text{l)} \times (\text{ALT (U/l)}^{1/2})]$	< 1.3	Fibrosis leve
		≥ 1,3 – 2,67	Indeterminado
		≥ 2,67	Fibrosis avanzada
HFS	$\frac{1}{1 + e^{(5.713 - 0.996 \times \text{Edad [45-64 años]} - 1.745 \times \text{Edad } [\geq 65 \text{ años}] + 0.907 \times \text{Sexo masculino} - 0.771 \times \text{Diabetes Mellitus} - 0.746 \times \text{AST [35-69 U/l/mL]} - 1.992 \times \text{AST } [\geq 70 \text{ U/l/mL}] - 0.044 \times \text{Albúmina [4-4,49 mg/dL]} - 0.944 \times \text{Albúmina } [< 4 \text{ mg/dL}] - 1.028 \times \text{HOMA [2-3,99]} - 2.087 \times \text{HOMA } [\geq 4] - 0.876 \times \text{plaquetas [155.000-219.999]} - 2.241 \times \text{plaquetas } [< 155.000])}}$	< 0.12	Fibrosis leve
		≥ 0.12 – 0.24	Indeterminado
		≥ 0.24	Fibrosis Avanzada
APRI	$[(\text{nivel AST / valor superior de la normalidad de la AST}) / \text{recuento de plaquetas (} 10^9/\text{L)}] \times 100$	< 0'5	Ausencia o fibrosis leve
		0,5 - < 1,5	Indeterminada
		≥ 1,5	Fibrosis avanzada

Tabla 2. Índices no invasivos de fibrosis hepática.

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA PATOFISIOLOGÍA DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA METABÓLICA



CARMEN DEL OLMO PUEBLA
Tutoras: ROCÍO ALLER, MARTA MARTÍN-FERNÁNDEZ



I. INTRODUCCIÓN

La esteatosis hepática metabólica (NAFLD) es una enfermedad crónica e inflamatoria, caracterizada por un porcentaje de grasa en hepatocitos > 5%. Su prevalencia global es del 25%, con una incidencia en aumento.

Puede progresar a esteatohepatitis (NASH), fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma: todo ello por inflamación, y daño celular y mitocondrial, causado por radicales libres y estrés oxidativo. En ella, se produce una alteración del metabolismo lipídico: un desequilibrio entre la producción y degradación de lípidos en el hígado.

II. OBJETIVOS

1. Realizar una evaluación completa del perfil de estrés oxidativo en la NAFLD: enzimas antioxidantes, capacidad antioxidante total y daño celular.
2. Identificar biomarcadores de estrés oxidativo que sirvan como herramientas de diagnóstico no invasivo para detectar, en pacientes que padecen NAFLD, fases precoces de NASH.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Muestras sanguíneas de 152 individuos caucásicos con NAFLD diagnosticada mediante biopsia hepática, divididos en dos grupos en función de la presencia de esteatohepatitis (NASH score ≥ 4). Se estudiaron metabolitos representativos de estrés oxidativo.
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:
 1. Pruebas de U-Mann Whitney y Chi-cuadrado para evaluar diferencias entre grupos (nivel de significancia igual o menor a 0,05)
 2. Regresión logística binaria multivariante para poder identificar la asociación independiente de un NASH score ≥ 4 y los niveles de lipoperoxidación.

IV. RESULTADOS

- Mediana de la edad y % de hombres en la muestra:
 - NASH score <4: 49 años; 69,5% hombres
 - NASH score ≥ 4 : 51,5 años; 48,6% hombres
- 16,5% de los pacientes presentaban DM tipo 2, siendo mayoritarios en el grupo con NASH score ≥ 4 .
- No se vieron diferencias en cuanto a edad, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ni obesidad.
- Los pacientes con NAFLD con un NASH score ≥ 4 , tienen niveles mayores de lipoperoxidación.
- Un valor de peroxidación lipídica por encima del punto de corte de **315,39 μM** , es un factor de riesgo independiente de una puntuación en el NASH score ≥ 4 (OR: 4,71, CI 95% 1,68-13,19, p=0,003).

	OR	IC 95%	p-valor
HSI	1,05	1,02-1,09	<0,001
FIB4	1,68	1,05-2,68	0,030
APRI	1,08	1,02-1,13	0,005
LPO > 315,39 μM	4,71	1,68-13,19	0,003

Tabla 1. Análisis de regresión logística multivariante para evaluar la asociación de los niveles de LPO y el riesgo asociado a NASH ≥ 4 .

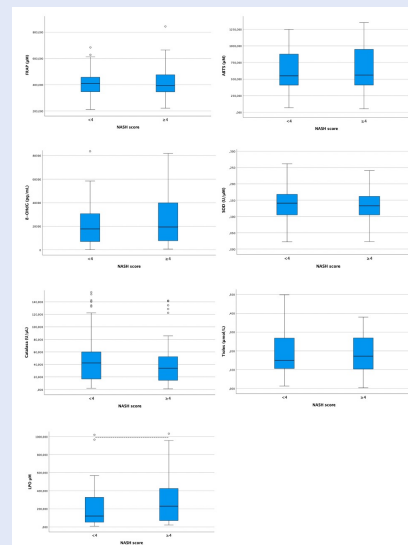


Figura 1. Diagrama de cajas mostrando las moléculas de estrés oxidativo en los diferentes grupos de pacientes.

V. CONCLUSIONES

- Los altos niveles de lipoperoxidación están independientemente asociados a un mayor riesgo de presentar un NASH score ≥ 4 , es decir, esteatohepatitis.
- Estos niveles de peroxidación lipídica podrían ser una prometedora herramienta diagnóstica no invasiva a tener en cuenta a la hora de detectar NASH en pacientes con NAFLD.
- Este estudio podría ayudar a sentar las bases de nuevos estudios clínicos para comprender la correlación entre la peroxidación lipídica y la inflamación basal en esta población, lo que guiará el desarrollo de nuevas terapias y el descubrimiento de nuevos biomarcadores.