




ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis doctoral

**Estudio de biomarcadores de riesgo de fibrosis hepática
y de respuesta precoz a la cirugía bariátrica en un
contexto de Enfermedad del hígado graso asociado a
disfunción metabólica y obesidad severa**

Pablo Gabriel Medina

Directores:

Dra. Roser Ferrer Costa Dr. David Martínez Selva Dra. Andreea Ciudin Mihai

Tutor:

Dr. Joaquín Ariño Carmona

**Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona
Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus**

2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores toda la labor de orientación y enseñanza en el mundo científico y su aplicación a la asistencia. A la Dra. Andreea Ciudin, a la Dra. Roser Ferrer y al Dr. David Martínez, muchas gracias por haber dirigido esta tesis, que combina la investigación básica en la búsqueda de nuevos biomarcadores y su aplicación en el laboratorio clínico, para así alcanzar un impacto clínico. Los tres, cada uno desde su experiencia, han logrado combinar tres ámbitos del mundo de las Ciencias de la Salud estrechamente relacionados y dar como resultado esta tesis doctoral.

Agradecer con especial cariño al tutor inicial de esta tesis, el Dr. Francisco Rodríguez, por ser capaz de abrir caminos y generar nuevas ideas. Gracias, Paco, por dar ese impulso que siempre hace falta. También agradecer, al tutor Joaquín Ariño, por su compromiso con la labor científica y toda la ayuda proporcionada. Igualmente, me gustaría agradecer la implicación de la comisión de seguimiento, a la Dra. Josefina Mora, al Dr. Mario Marotta y al Dr. David Tabernero, por supervisar el trabajo realizado y aconsejar durante estos cuatro años, que han hecho mejorar esta tesis.

Agradecer a la ya Dra. Laura Briansó, que junto con el Dr. David Martínez, han hecho del laboratorio 114 de investigación un lugar donde aprender, reflexionar y generar ideas que han dado pie a esta y otras líneas de investigación.

Agradecer a los compañeros de hepatología el Dr. Salva Agustín, el Dr. Juan Manuel Pericàs y el Dr. Jesús Rivera por su implicación en la investigación en la enfermedad hepática y por toda la ayuda que me han brindado para completar este trabajo.

Al Servicio de Bioquímica Clínica, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi labor investigadora, ofrecer los recursos necesarios y generar un espacio donde aprender y discutir las ideas que han sido el motor de esta tesis.

Me gustaría agradecer a los compañeros del laboratorio clínico su ánimo y ofrecimiento para hacer más fácil este camino. No me olvido de todo el soporte realizado por el equipo de técnicos, cuya labor diaria es esencial.

También me gustaría recordar a los profesores y compañeros de la universidad, que me abrieron un mundo nuevo, el de la Biología. No hay nada más bonito y a la vez desafiante como el mismo estudio de la Vida.

Agradecer a todos mis amigos de Getafe, Barcelona y cómo no, Horcajada de la Torre, por estar siempre ahí y hacer que la vida esté llena de buenos momentos.

A mi familia, mi madre y mi padre, Encarna y Andrés, por cuidarme, quererme y educarme tan bien; sin vosotros nada de esto sería posible. A mi hermano Miguel, por estar en todos los momentos vividos, los buenos y también los malos, y que han hecho de mí la persona que soy.

Y por supuesto a Silvia, mi compañera de vida. Gracias por tu apoyo incondicional y por formar parte de mi vida. Y finalmente a mi hijo Leo, por haber traído la magia y la ilusión por descubrir el mundo, que has hecho de él un lugar mejor.

RESUMEN

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de desórdenes metabólicos que incluyen resistencia a la insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y obesidad entre otras entidades, cuya manifestación hepática es la Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD), causa más frecuente de enfermedad hepática crónica en la actualidad. La fase más avanzada del MAFLD incluye la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que implica degeneración necroinflamatoria, fibrosis y cirrosis hepática. En este sentido, la fibrosis hepática es el principal signo de mal pronóstico en la hepatopatía crónica. Existen factores de riesgo metabólicos, como la RI y la DM2, que interaccionan con factores genéticos, como los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 (p.I148M) y *TM6SF2* rs58542926 (p.E167K), que determinan el grado de progresión del NASH y fibrosis hepática. Esta tesis estudia la influencia de la DM2 y la RI sobre los polimorfismos p.I148M y p.E167K en el riesgo de fibrosis avanzada. Los resultados de este estudio muestran que la DM2 y la RI severa, y la presencia de los polimorfismos mencionados, son factores de riesgo independientes de fibrosis avanzada por NASH, que cuando se combinan, multiplican el riesgo de ésta. Así, un estudio genético puede ser acertado en pacientes con DM2 o con RI severa para centrar los esfuerzos en un tratamiento y seguimiento personalizado.

Debido a que la fibrosis hepática es el principal signo de mal pronóstico en el MAFLD, es necesario el uso de pruebas no invasivas basadas en biomarcadores sanguíneos, como el “Fibrosis index 4” (FIB-4) y el “Enhanced Liver Fibrosis” (ELF), con el fin de estratificar a los pacientes según el riesgo de fibrosis avanzada. Esta tesis desarrolla y evalúa un algoritmo basado en la medida combinada del FIB-4 y ELF para el diagnóstico de fibrosis hepática en pacientes con MAFLD, y propone su aplicación en atención primaria. Los resultados muestran una alta sensibilidad diagnóstica de fibrosis no significativa (F0-1) y fibrosis avanzada (F3-4), además de un alto valor predictivo de fibrosis significativa (F2-4). Se ha observado, además, una alta correlación con la elastografía de transición. La aplicación de este algoritmo en atención primaria permitiría priorizar la derivación de pacientes con alto riesgo de F3-4 con diagnóstico previo de esteatosis hepática, presencia de DM2 u otras causas de hepatopatía crónica, donde el abordaje completo de la hepatopatía es limitado, facilitando así el acceso a nuevos tratamientos y a un control más individualizado.

La obesidad está estrechamente relacionada con el SM, la cual implica una disfunción del tejido adiposo central, y supone un factor de riesgo de DM2 y MAFLD. La cirugía bariátrica

(CB) representa la mejor solución en términos de reducción de peso sostenida y remisión de las comorbilidades metabólicas en pacientes con obesidad severa, además de restaurar la homeostasis metabólica, donde se produce un aumento de la concentración de la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), cuya expresión se ve disminuida por el desequilibrio de adipoquinas que se produce en la obesidad. Dado que la respuesta a la CB puede ser variable, y la reganancia de peso se produce en un número significativo de pacientes, existe la necesidad de encontrar un biomarcador fiable que prediga el éxito de la CB. Esta tesis estudia el papel potencial de la SHBG como biomarcador para predecir la respuesta a la CB en términos de pérdida de peso total (TWL) y reganancia de peso (WR). Este estudio demuestra que existe un mayor incremento de SHBG en el primer mes tras la CB cuando se produce una buena respuesta a los 2 años, y que este aumento es proporcional al TWL y se correlaciona inversamente con la WR. Estos resultados apuntan al papel de la SHBG como un biomarcador precoz de la respuesta a la CB, dando un papel relevante a la recuperación de la función hepática y del control metabólico en la pérdida sostenida de peso tras la CB.

RESUM

La síndrome metabòlica (SM) és un conjunt de desordres metabòlics que inclouen resistència a la insulina (RI), diabetis mellitus tipus 2 (DM2) i obesitat entre altres entitats. La manifestació hepàtica de la SM és la Malaltia del fetge gras associada a disfunció metabòlica (MAFLD), causa més freqüent de malaltia hepàtica crònica actualment. La fase més avançada del MAFLD inclou l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), que implica degeneració necroinflamatòria, fibrosi i cirrosi hepàtica. En aquest sentit, la fibrosi hepàtica és el principal signe de mal pronòstic en l'hepatopatia crònica. Existeixen factors de risc metabòlics que interaccionen amb factors genètics, com els polimorfismes *PNPLA3* rs738409 (p.I148M) i *TM6SF2* rs58542926 (p.E167K), que determinen el grau de progressió del NASH i fibrosi hepàtica. Aquesta tesi estudia la influència de la DM2 i la RI sobre els polimorfismes p.I148M i p.E167K en el risc de fibrosi avançada. Els resultats d'aquest estudi mostren que la DM2 i la RI severa, i la presència dels polimorfismes esmentats, són factors de risc independents de fibrosi avançada per NASH, que quan es combinen, multipliquen el risc d'aquesta. Per la qual cosa, un estudi genètic pot ser encertat en pacients amb DM2 o amb RI severa per centrar els esforços en una atenció personalitzada.

Degut al fet que la fibrosi hepàtica és el principal signe de mal pronòstic al MAFLD, es necessari l'ús de proves no invasives basades en biomarcadors sanguinis, com el "Fibrosi index 4" (FIB-4) i "l'Enhanced Liver Fibrosis" (ELF), per a estratificar els pacients segons el risc de fibrosi avançada. Aquesta tesi desenvolupa i avalua un algorisme basat en la mesura combinada del FIB-4 i ELF pel diagnòstic de fibrosi hepàtica en pacients amb MAFLD, i proposa la seva aplicació en l'àmbit de l'atenció primària. Els resultats mostren una alta sensibilitat diagnòstica de fibrosi no significativa (F0-1) i fibrosi avançada (F3-4), a més d'un valor predictiu elevat de fibrosi significativa (F2-4). L'aplicació d'aquest algorisme a l'atenció primària permetria prioritzar la derivació de pacients amb alt risc de F3-4 i amb diagnòstic previ d'esteatosi hepàtica, presència de DM2 o altres causes d'hepatopatia crònica, on l'abordatge complet de l'hepatopatia és limitat, facilitant així l'accés a nous tractaments i un control més individualitzat.

L'obesitat està estretament relacionada amb la SM, la qual implica una disfunció del teixit adipós central i suposa un factor de risc de DM2 i MAFLD. La cirurgia bariàtrica (CB) representa la millor solució en termes de reducció de pes sostinguda i remissió de les comorbiditats metabòliques en pacients amb obesitat severa, a més de restaurar l'homeòstasi metabòlica produint un augment de la concentració de la globulina lligadora

d'hormones sexuals (SHBG), l'expressió de la qual es veu disminuïda pel desequilibri d'adipoquines ocasionat a l'obesitat. Atès que la resposta a la CB pot ser variable, i el reguany de pes es produeix en un nombre significatiu de pacients, existeix la necessitat de trobar un biomarcador fiable que predigui l'èxit de la CB. Aquesta tesi estudia el paper potencial de la SHBG com a biomarcador per predir la resposta a la CB en termes de pèrdua de pes total (TWL) i reguany de pes (WR). Aquest estudi demostra que existeix un major increment de SHBG el primer mes després de la CB quan es produeix una bona resposta als 2 anys, i que aquest augment és proporcional al TWL i es correlaciona inversament amb la WR. Aquests resultats assenyalen el paper de la SHBG com un biomarcador precoç de resposta a la CB, donant un paper rellevant a la recuperació de la funció hepàtica i del control metabòlic en la pèrdua sostinguda de pes després de la CB.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS) is a set of metabolic disorders that include insulin resistance (IR), type 2 diabetes mellitus (T2D) and obesity among other entities, whose hepatic manifestation is the Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD), the most frequent cause of chronic liver disease nowadays. The most advanced stage of MAFLD includes non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which involves necroinflammatory degeneration, fibrosis and liver cirrhosis. In this regard, liver fibrosis is the main sign of poor prognosis in the chronic liver disease. There are metabolic risk factors, such as IR and T2D, which interact with genetic factors, as *PNPLA3* rs738409 (p.I148M) and *TM6SF2* rs58542926 (p.E167K) polymorphisms, which determine the degree of NASH progression and liver fibrosis. This thesis evaluates the influence of T2D and IR on p.I148M and p.E167K polymorphisms on the risk of advanced fibrosis. The results of this study show that T2D and severe IR, and the presence of the aforementioned polymorphisms, are independent risk factors for NASH advanced fibrosis, which when combined, multiply the risk of NASH. Thus, a genetic study may be appropriate in patients with T2D or those with severe IR in order to focus efforts on personalized treatment and follow-up.

Because liver fibrosis is the main sign of poor prognosis in MAFLD, the use of non-invasive tests based on blood biomarkers, such as Fibrosis index 4 (FIB-4) and Enhanced Liver Fibrosis (ELF), is necessary in order to stratify patients according to the risk of advanced fibrosis. This thesis develops and evaluates an algorithm based on the combined measurement of FIB-4 and ELF for the diagnosis of liver fibrosis in patients with MAFLD, and propose its application in primary care. The results show a high diagnostic sensitivity for non-significant fibrosis (F0-1) and advanced fibrosis (F3-4), as well as a high predictive value for significant fibrosis (F2-4). A high correlation with transient elastography has also been observed. The application of this algorithm in primary care would allow to prior the referral of patients at high risk of F3-4 with a previous diagnosis of liver steatosis, presence of T2D or other causes of chronic liver disease, where the complete approach to liver disease is limited, thus facilitating access to new treatments and a more individualized control.

Obesity is closely related to MetS, which involves central adipose tissue dysfunction, and is a risk factor for T2D and MAFLD. Bariatric surgery (BS) represents the best solution in terms of sustained weight reduction and remission of metabolic comorbidities in patients with severe obesity, in addition to restoring metabolic homeostasis, where there is an increase in the concentration of sex hormone-binding globulin (SHBG), whose expression

is diminished by the adipokine imbalance that occurs in obesity. Since the response to BS can be variable, and weight regain occurs in a significant number of patients, there is a need to find a reliable biomarker that predicts the success of BS. This thesis studies the potential role of SHBG as a biomarker to predict response to BS in terms of total weight loss (TWL) and weight regain (WR). The results show that the increase in SHBG in the first month after BS predicts the response at 2 years. Thus, this SHBG increase is proportional to TWL and correlates inversely with WR. These findings point to the role of SHBG as an early biomarker predictor of response to BS, giving a relevant role to the recovery of liver function and metabolic control in sustained weight loss after BS.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 El hígado	28
1.1.1 Estructura	28
1.1.2 Regulación del metabolismo glucídico y lipídico	29
1.1.3 Síntesis de proteínas plasmáticas	30
1.1.3.1 Globulina ligadora de hormonas sexuales	30
1.2 El tejido adiposo	32
1.3 Epidemiología del MAFLD y la obesidad	32
1.4 Factores de riesgo del MAFLD y la obesidad.....	35
1.4.1 Diabetes Mellitus Tipo 2	37
1.4.2 Factores genéticos	38
1.4.3 Factores epigenéticos.....	40
1.4.4 Edad y sexo.....	40
1.4.5 Dieta	41
1.4.6 Microbiota	41
1.4.7 Actividad física.....	42
1.4.8 Factores socioeconómicos	42
1.5 Gasto sanitario y políticas públicas	42
1.6 Bases moleculares y fisiopatología del MAFLD y su relación con la obesidad...44	
1.6.1 Esteatosis hepática.....	44
1.6.1.1 Lipogénesis de novo.....	45
1.6.1.2 Lipólisis del tejido adiposo	46
1.6.2 Obesidad y MAFLD	46
1.6.2.1 Inflamación del tejido adiposo.....	46
1.6.3 NASH y fibrosis hepática	47
1.6.3.1 Lipotoxicidad de los ácidos grasos	48
1.6.3.2 Inflamación del tejido hepático.....	48
1.6.3.3 Fibrosis hepática	49
1.6.3.4 Síntesis de SHBG.....	50
1.7 Diagnóstico del MAFLD	51
1.7.1 Diagnóstico de esteatosis por imagen	52
1.7.2 Diagnóstico histológico	52
1.7.3 Diagnóstico de fibrosis por imagen	54

1.7.4	Biomarcadores séricos del MAFLD.....	55
1.7.4.1	Fatty liver index	55
1.7.4.2	Fibrosis index 4	55
1.7.4.3	NAFLD fibrosis score.....	56
1.7.4.4	Enhanced Liver Fibrosis	56
1.7.4.5	Otros índices de fibrosis	57
1.7.5	Polimorfismos en <i>PNPLA3</i> y <i>TM6SF2</i>	57
1.7.6	Estratificación del riesgo.....	58
1.7.7	Algoritmos diagnósticos.....	59
1.8	Diagnóstico de la obesidad.....	61
1.8.1	Biomarcadores séricos de la obesidad	62
1.8.1.1	Citoquinas	62
1.8.1.2	Adipoquinas.....	63
1.8.1.3	Hepatoquinas	63
1.8.1.4	Nuevos biomarcadores.....	64
1.9	Tratamiento y manejo clínico del MAFLD y la obesidad.....	64
1.9.1	Tratamiento farmacológico	65
1.9.2	Cambio del estilo de vida.....	66
1.9.3	Cirugía bariátrica	66
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	73
3.	RESULTADOS.....	77
3.1	Influencia de la diabetes tipo 2 en la asociación de los polimorfismos <i>PNPLA3</i> rs738409 y <i>TM6SF2</i> rs58542926 en la fibrosis avanzada por NASH	77
3.2	Aplicación de un algoritmo secuencial basado en el FIB-4 y ELF para identificar alto riesgo de fibrosis avanzada en atención primaria	91
3.3	Aumento precoz de la SHBG como predictor de la respuesta a la cirugía bariátrica en la obesidad severa.....	105
4.	DISCUSIÓN.....	119
4.1	Influencia de la diabetes tipo 2 en la asociación de los polimorfismos <i>PNPLA3</i> rs738409 y <i>TM6SF2</i> rs58542926 en la fibrosis avanzada por NASH	119
4.2	Aplicación de un algoritmo secuencial basado en el FIB-4 y ELF para identificar alto riesgo de fibrosis avanzada en atención primaria	124
4.3	Aumento precoz de la SHBG como predictor de la respuesta a la cirugía bariátrica en la obesidad severa.....	129

5. CONCLUSIONES.....	137
6. BIBLIOGRAFÍA.....	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatología del MAFLD como un continuo entre la obesidad, DM2 y SM.....	27
Figura 2: Funciones del hígado.....	29
Figura 3: Mecanismos moleculares que regulan la producción de SHBG.....	31
Figura 4: Variación geográfica de la prevalencia de MAFLD y de la disponibilidad diaria de energía per cápita.....	33
Figura 5: Fallecimientos anuales totales por cirrosis según etiología.....	35
Figura 6: Heterogeneidad en la presentación clínica del MAFLD.....	36
Figura 7: Relación entre diabetes tipo 2 y el NAFLD.....	37
Figura 8: Papel de las variantes genéticas en el MAFLD.....	39
Figura 9: Factores implicados en la patogénesis del MAFLD.....	44
Figura 10: Desequilibrio del almacenamiento y eliminación de lípidos en el MAFLD.....	45
Figura 11: Disfunción de los adipocitos en la obesidad.....	47
Figura 12: Los ácidos grasos libres en la patogénesis del NASH.....	49
Figura 13: Intermediarios en la fibrosis hepática.....	51
Figura 14: Diagrama de flujo para el diagnóstico de MAFLD.....	52
Figura 15: Estadios de fibrosis según el sistema de estadificación NASH CRN.....	53
Figura 16: Algoritmo para evaluar de forma no invasiva a pacientes con MAFLD y fibrosis avanzada mediante reglas de predicción y biomarcadores en sangre.....	61
Figura 17: Cambios metabólicos derivados de la CB que permiten mejorar el perfil de MAFLD y daño hepático.....	67
Figura 18: Metabolismo lipídico hepático en un contexto de RI y el papel de PNPLA3 y TM6SF2.....	121
Figura 19: Algoritmo de diagnóstico de fibrosis avanzada en la cohorte de NASH.....	126
Figura 20. Aumento porcentual de la SHBG en cada seguimiento respecto al valor pre-CB.....	132

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AASLD	American association for the study of liver diseases	Asociación americana para el estudio de enfermedades hepáticas
ACC	Acetyl Coenzyme A carboxylase	Acetil Coenzima A carboxilasa
ACoA	Acetyl Coenzyme A	Acetil Coenzima A
AGL / FFA	Free fatty acids	Ácidos grasos libres
ALT	Alanine transaminase	Alanina aminotransferasa
AMPK	AMP activated protein kinase	Proteína quinasa activada por AMP
Apo B-100	Apolipoprotein B-100	Apolipoproteína B-100
APRI	AST to Platelet Ratio Index	Índice del ratio AST plaquetas
AST	Aspartate transaminase	Aspartato aminotransferasa
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase	Triglicérido lipasa adiposa
CAP	Controlled attenuation parameter	Parámetro de atenuación controlada
CB / BS	Bariatric surgery	Cirugía bariátrica
CCR	CC chemokine receptor	Receptor C-C de quimiocina
CHC / HCC	Hepatocellular carcinoma	Carcinoma hepatocelular
ChREBP	Carbohydrates response element binding protein	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CLIA	Chemiluminescence Immunoassay	Inmunoensayo por quimioluminiscencia
CYP 2E1	Cytochrome P450 2E1	Citocromo P450 2E1
DAG	Diacylglycerol	Diácil glicerol
DGAT2	Diacylglycerol acyltransferase 2	Diácilglicerol aciltransferasa 2
DM2 / T2D	Type 2 Diabetes	Diabetes mellitus tipo 2
DPP4	Dipeptidyl peptidase 4	Dipeptidil peptidasa 4
EASL	European association for the study of the liver	Asociación europea para el estudio del hígado
ECM	Extracellular matrix	Matriz extracelular
ECV / CVD	Cardiovascular disease	Enfermedad cardiovascular
EFLM	European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine	Federación Europea de Química Clínica y Medicina de Laboratorio
ELF	Enhanced liver fibrosis	Índice de fibrosis hepática mejorado
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

ET / TE	Transient elastography	Elastografía de transición
EWL	Excess weight loss	Exceso de peso perdido
FAS	Fatty acid synthase	Ácido graso sintasa
FATP	Fatty acid transport protein	Proteína transportadora de ácidos grasos
FGF21	Fibroblast growth factor 21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
FIB-4	Fibrosis index 4	Índice de fibrosis 4
FLI	Fatty liver index	Índice de hígado graso
FRET	Fluorescent resonance energy transfer	Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia
FXR	Farnesoid X receptor	Receptor farnesoide X
GCKR	Glucokinase Regulator	Regulador de glucoquinasa
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase	Gamma-glutamyl transferasa
GK	Glucokinase	Glucoquinasa
GLP-1AR	Glucagon-like peptide-1 receptor agonist	Agonista del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1
Glu / E	Glutamate	Glutamato
GLUT-2	Glucose transporter 2	Transportador de glucosa 2
GWAS	Genome-wide association study	Estudio de asociación de genoma completo
HA	Hyaluronic acid	Ácido hialurónico
HBV	Hepatitis B virus	Virus de la hepatitis B
HCV / VHC	Hepatitis C virus	Virus de la hepatitis C
HNF4α	Hepatocyte nuclear factor 4 α	Factor nuclear 4 alfa del hepatocito
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance	Modelo de evaluación homeostático de la resistencia a la insulina
HSD17B13	Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 13	17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 13
HTA	Arterial hypertension	Hipertensión arterial
IGF	Insulin-like growth factor	Factor de crecimiento similar a la insulina
IKK-NFκB	Inhibitor kappa B kinase-Nuclear factor kappa B	Inhibidor de la quinasa kappa B-factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas
IL1β	Interleukin 1 β	Interleuquina 1 beta
IL6	Interleukin 6	Interleuquina 6

Ile / I	Isoleucine	Isoleucina
IMC / BMI	Body mass index	Índice de masa corporal
JNK-AP-1	Jun N-terminal kinase-activator protein-1	Quinasa c-Jun N- terminal- proteína activadora 1
LPK	Liver pyruvate kinase	Piruvato quinasa hepática
LPL	Lipoprotein lipase	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacárido
LSN	Upper normal limit	Límite superior de normalidad
LXRs	Liver X receptors	Receptores hepáticos X
Lys / K	Lysine	Lisina
MAFLD	Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease	Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica
MASH	Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis	Esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease	Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica
MBOAT7	Membrane-bound O-acyltransferase 7	O-aciltransferasa de unión a membrana 7
Met / M	Methionine	Metionina
MMP	Matrix metalloproteinase	Metaloproteinasa de matriz
MRE	Magnetic Resonance Elastography	Elastografía por resonancia magnética
NAFLD / EHGA	Non-alcoholic fatty liver disease	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NAS	NAFLD activity score	Índice de actividad NAFLD
NASH / EHNA	Non-alcoholic steatohepatitis	Esteatohepatitis no alcohólica
NASH CRN	Clinical Research Network in NASH	Red de Investigación Clínica del NASH
NFS	NAFLD fibrosis score	Índice de fibrosis por NAFLD
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	Inhibidor-1 del activador del plasminógeno
PCR	C reactive protein	Proteína C reactiva
PIIINP	Procollagen III N-terminal peptide	Péptido aminoterminal del procolágeno tipo III
PKCε	Protein kinase C epsilon	Proteína quinasa C epsilon
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3	Fosfolipasa similar a la patatina que contiene el dominio 3
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas

pSWE	Point shear wave elastography	Elastografía de onda de corte puntual
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids	Ácidos grasos poliinsaturados
RCV	Cardiovascular risk	Riesgo cardiovascular
RE / ER	Endoplasmic reticulum	Retículo endoplásmico
RI / IR	Insulin resistance	Resistencia a insulina
RMN / NMR	Nuclear magnetic resonance	Resonancia magnética nuclear
ROS	Reactive oxygen species	Especies reactivas de oxígeno
RYGB	Roux-en-Y-gastric bypass	Bypass gástrico en Y de Roux
SCD1	Stearoyl-CoA-desaturase-1	Estearoil CoA desaturasa 1
SGLT2	Sodium-glucose transporter 2	Cotransportador sodio-glucosa 2
SHBG	Sex hormone-binding globulin	Globulina ligadora de hormonas sexuales
SNP	Single nucleotide polymorphism	Polimorfismo de un solo nucleótido
SM / MetS	Metabolic Syndrome	Síndrome metabólico
SOC	Standard of care	Atención sanitaria convencional
SOPC / PCOS	Poly quistic ovarian syndrome	Síndrome de ovario poliquístico
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein 1c	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c
2D-SWE	Shear wave elastography-2D	Elastografía de onda de corte 2D
TC / CT	Computed tomography	Tomografía computarizada
TGFβ	Transforming grow factor beta	Factor de crecimiento transformador beta
TIMP-1	Tissular inhibitor of the metalloprotease 1	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2	Miembro 2 de la superfamilia 6 transmembrana
TNFα	Tumoral necrosis factor alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
TWL	Total weight loss	Pérdida de peso total
VIH / HIV	Human immunodeficiency virus	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	Very low-density lipoproteins	Lipoproteínas de muy baja densidad
WR	Weight regain	Reganancia de peso

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de desórdenes metabólicos que incluyen resistencia a la insulina (RI) con o sin diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipemia, obesidad central e hipertensión, los cuales predisponen al desarrollo de Enfermedad Cardiovascular (ECV). La patogénesis del SM también engloba factores genéticos y otra serie de entidades adquiridas, que resultan en un estado crónico de RI y la inflamación de diversos tejidos. [1]. En esta desregulación metabólica, el hígado y el tejido adiposo juegan un papel central, cuya disfunción explican gran parte de las manifestaciones clínicas del SM [2].

La manifestación hepática del SM se ha denominado históricamente como Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA, en inglés NAFLD), la cual es actualmente la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica. Está asociada no solo con el incremento mundial del SM, sino también con el aumento de la obesidad y la DM2 [3,4]. Dada su estrecha relación con el conjunto de enfermedades que componen el SM, se actualizó su nomenclatura a Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD en inglés). La manifestación fenotípica de este síndrome refleja la suma de la dinámica y compleja interacción entre factores ambientales y genéticos [5-7] (**Figura 1**).

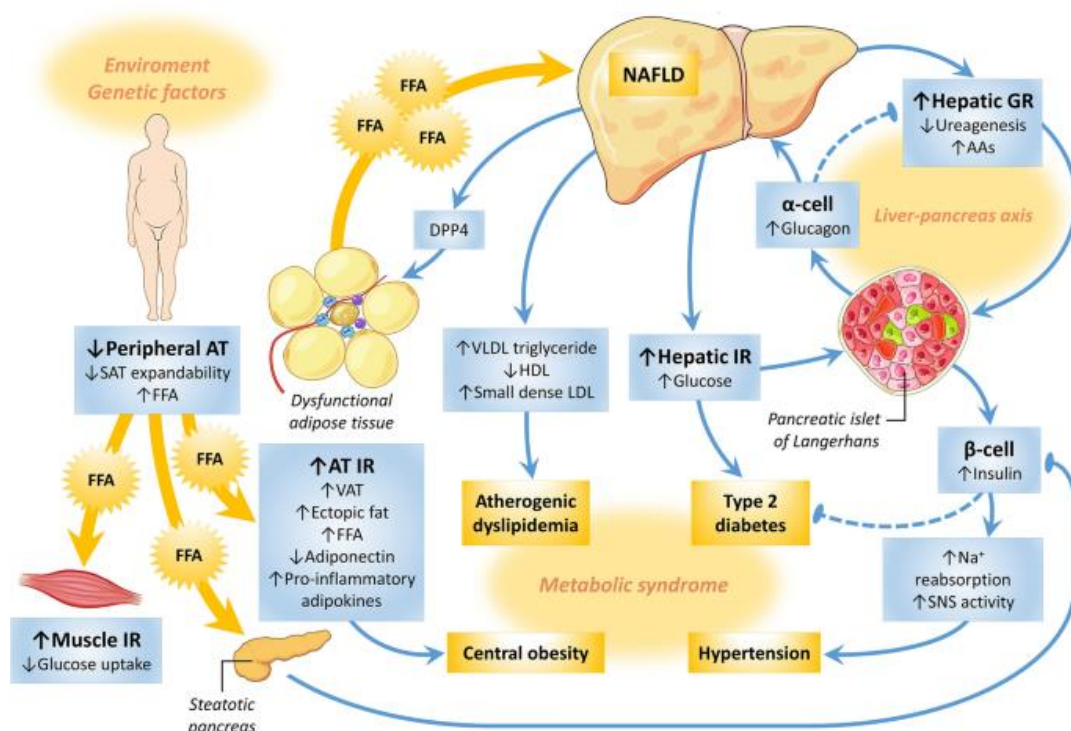


Figura 1. Fisiopatología del MAFLD como un continuo entre la obesidad, DM2 y SM. Los factores ambientales y la predisposición genética inducen la expansión del tejido adiposo y la movilización de ácidos grasos libres (AGL), cuyo depósito en el hígado y tejido muscular favorecen la RI, la cual promueve la acumulación de triglicéridos en el hígado, lo que desencadena el desarrollo de MAFLD. La RI también ocasiona la disfunción e inflamación del tejido adiposo presentes en la obesidad. Figura obtenida de: Godoy-Matos AF, et al. *Diabetol Metab Syndr*. 2020 Jul 14;12:60.

El MAFLD abarca un amplio espectro de estadios clínicos, que van desde una acumulación zonal de triglicéridos en vacuolas de hepatocitos, principal característica de la esteatosis hepática, a fases más avanzadas de la enfermedad, como la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, en inglés NASH), que implica degeneración necroinflamatoria, pudiendo conllevar al desarrollo de fibrosis y eventualmente cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) [8].

Recientemente se ha promovido el cambio de terminología de MAFLD por MASLD (Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, en inglés). Esta nueva denominación también refleja la historia natural de la enfermedad hepática, que comienza con la esteatosis, junto con alteraciones características del SM, como el aumento del índice de masa corporal (IMC) o del perímetro abdominal, hiperglucemia y dislipemia, entre otras. De la misma manera, la progresión de esta enfermedad se define como esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (en inglés MASH), la cual implica mayor riesgo de fibrosis hepática [9].

La obesidad es otra enfermedad que compone el SM, y se define como la acumulación excesiva y ectópica de lípidos, tanto a nivel global como regional, que ocasiona un aumento del IMC $>30 \text{ kg/m}^2$, como consecuencia de un desequilibrio entre la calorías consumidas y gastadas [10]. Esta enfermedad implica una disfunción del tejido adiposo a nivel central, y es a su vez un factor de riesgo de las enfermedades del SM, como la DM2 y el MAFLD [11] (**Figura 1**).

Aún se desconocen las bases moleculares del desarrollo del MAFLD y su interacción con la obesidad, de tal modo que la interrelación entre el hígado y el tejido adiposo resulta de gran interés.

1.1 El hígado

El hígado es el principal órgano de regulación del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos, y es el órgano secretor de la bilis. Tiene una elevada actividad de síntesis de proteínas plasmáticas y del metabolismo de numerosas drogas [12].

1.1.1 Estructura

El parénquima hepático está formado por los hepatocitos, que se disponen en cordones de varias capas formando una red tridimensional. Los hepatocitos son células plurinucleadas con un retículo endoplásmico (RE) muy desarrollado, debido a la gran actividad de síntesis de glucoproteínas y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Forman los llamados

lobulillos hepáticos con forma hexagonal, en el que desde la vena central irradian los hepatocitos a la periferia. En los vértices se encuentran los espacios portales, formado por una rama de la vena porta, otra de la arteria hepática y un conducto biliar, rodeados por tejido conjuntivo [13].

Otra estructura presente en el hígado son los sinusoides hepáticos, paralelos a los cordones de hepatocitos. Es un tipo de capilar sanguíneo formado por endotelio con mayor espacio entre las células. Aquí se encuentran también las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado) y las células estrelladas, responsables de la síntesis de matriz extracelular (ECM) que implica la fibrosis hepática [13,14].

Todas las sustancias absorbidas por el intestino se dirigen al hígado mediante la vena porta, a excepción de los lípidos, que viajan en forma de quilomicrones por el sistema linfático hasta el torrente sanguíneo a nivel del conducto torácico.

1.1.2 Regulación del metabolismo glucídico y lipídico

El hígado es muy importante en el mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre. Es capaz de almacenar la glucosa en forma de glucógeno tras la ingesta de alimentos. En situaciones de ayuno, libera esta glucosa almacenada al resto del organismo, y mediante la gluconeogénesis sintetiza glucosa a partir de lactato, glicerol y aminoácidos [15,16] (**Figura 2**).

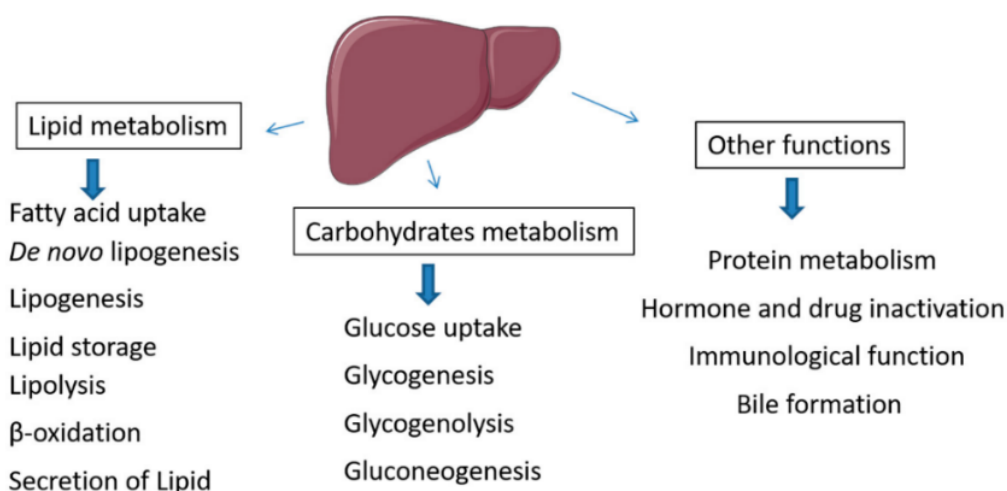


Figura 2. Funciones del hígado. El hígado es el principal órgano de la regulación del metabolismo de hidratos de carbono, en la que se incluyen la captación de glucosa y la gluconeogénesis, y de los lípidos, donde se encuentran la captación de ácidos grasos, lipogénesis y secreción de triglicéridos. Además, interviene en el metabolismo proteico, regulación hormonal e inmune, metabolismo de drogas y formación de bilis. Figura obtenida de: Mastoor Z, et al. *Metabolites*. 2022 May 3;12(5):411.

Además, es el principal responsable de la síntesis endógena de lípidos, mecanismo activado y regulado por la insulina. Estos lípidos son distribuidos por todo el organismo,

siendo el tejido adiposo el principal aceptor de éstos ya que se encargará de almacenarlos a modo de reserva energética. Los lípidos sintetizados se organizan en VLDL, ricas en triglicéridos y ésteres de colesterol. Antes de ser secretadas por los hepatocitos, se ensamblan junto con la apolipoproteína B-100 (apo B-100), que dirige su transporte a los tejidos periféricos, principalmente el adiposo. El exceso de hidratos de carbono en el interior celular es transformado a acetil coenzima A (ACoA), precursor de ácidos grasos [15,16] (**Figura 2**).

La glucosa, a través del transportador de glucosa 2 hepático (GLUT-2), y los ácidos grasos de cadena larga estimulan la glucólisis para la formación de ACoA y consecuentemente la lipogénesis. La vía de señalización celular por acción de la glucosa está transcripcionalmente regulada por la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP). Por otro lado, cuando la insulina se une a su receptor hepático, con actividad tirosina quinasa, se activa la cascada de transducción celular lo que provoca una disminución en la gluconeogénesis y en la concentración plasmática de glucosa y una estimulación de la lipogénesis, proceso regulado por los receptores hepáticos X (LXRs) y la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c). Los tres factores de transcripción (ChREBP, LXRs y SREBP-1c) activan la síntesis de la glucosa quinasa (GK), piruvato quinasa hepática (LPK), ACoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS) y estearoil CoA desaturasa 1 (SCD1), entre otras [17,18].

1.1.3 Síntesis de proteínas plasmáticas

El hígado es el responsable de la síntesis de numerosas proteínas plasmáticas, como la albúmina, prealbúmina o transtiretina, alfa-1 antitripsina, ceruloplasmina y la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG) [15] (**Figura 2**). Tienen diversas funciones, como transporte de hormonas y nutrientes, regulación de la respuesta inmune, protección frente daños exógenos, etc. Entre ellas, la SHBG destaca por sus funciones paracrinas, por este motivo forma parte de las llamadas hepatoquinas [19].

1.1.3.1 Globulina ligadora de hormonas sexuales

La SHBG es un transportador de hormonas sexuales, tanto andrógenos como estrógenos, que regula su biodisponibilidad. Su concentración en sangre está asociada al metabolismo glucídico y cantidad de tejido adiposo [19]. Se considera un biomarcador de SM y es predictor de la DM2 y riesgo cardiovascular (RCV) [20,21]. La presencia de esteatosis hepática es un factor que disminuye su síntesis, pero la introducción de terapias frente a la obesidad de modificación del estilo de vida favorece la recuperación de su concentración

circulante a la vez que disminuyen la grasa hepática [19].

La síntesis de SHBG está regulada por nutrientes y mediadores inflamatorios. Por un lado, las hormonas tiroideas y ácido oleico presentes en el aceite de oliva estimulan su síntesis, además de la adiponectina, citoquina antiinflamatoria sintetizada por el tejido adiposo, que activa su síntesis mediante el factor de transcripción nuclear 4 alfa del hepatocito (HNF4 α). Por otro lado, dietas ricas en hidratos de carbono y las citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleuquina 1 beta (IL1 β) inhiben la síntesis de SHBG [20,22,23] (**Figura 3**).

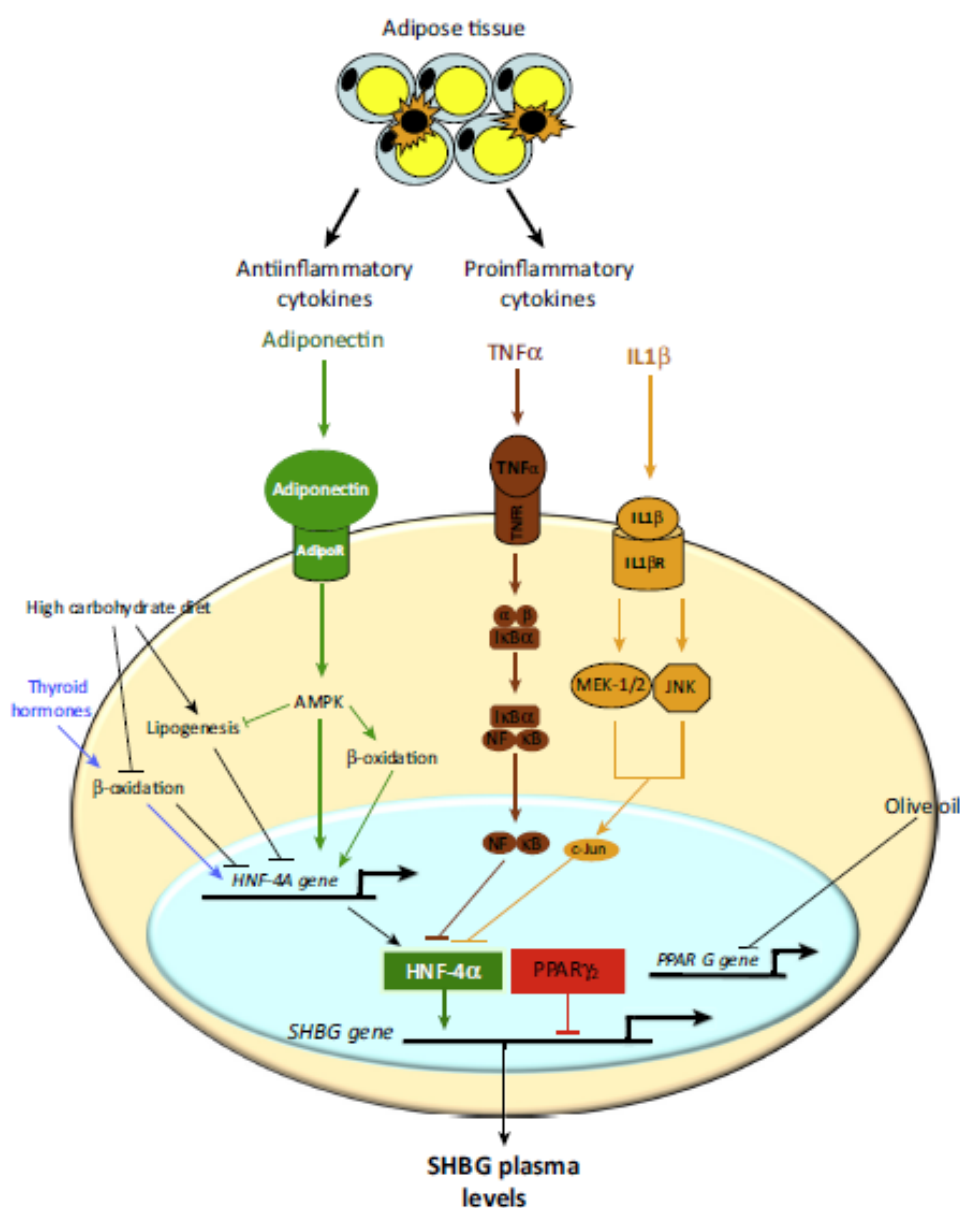


Figura 3. Mecanismos moleculares que regulan la producción de SHBG. Las citoquinas TNF α , IL1 β y la adiponectina regulan la expresión de SHBG al interactuar con sus receptores y activar varias cascadas de señalización que modifica la concentración de la proteína HNF4 α , principal factor de transcripción. Los factores dietéticos como los carbohidratos o el aceite de oliva son capaces de regular la expresión de SHBG mediante el HNF4 α o el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), respectivamente. Figura obtenida de: Simó R, et al. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015 Jul;26(7):376-83.

1.2 El tejido adiposo

El tejido adiposo está formado por los adipocitos, cuya función principal es el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos en el citoplasma, formando una inclusión lipídica. El origen de éstos puede ser exógeno, procedentes de la dieta, y endógeno, procedentes del hígado en forma de VLDL, donde la lipoproteína lipasa (LPL) se encarga del intercambio de triglicéridos entre el tejido y el torrente sanguíneo, proceso regulado por la insulina [12]. El crecimiento y distribución corporal de este tejido depende de diversos factores metabólicos y endocrinos. Alteraciones, tanto en la función como el crecimiento ectópico se relacionan con la obesidad, el MAFLD y el SM [24].

A su vez, el tejido adiposo tiene funciones endocrinas, ya que sintetiza hormonas como la leptina y adiponectina, que forman parte de las denominadas adipoquinas. Están implicadas en la homeostasis del peso corporal, inflamación, coagulación, fibrinolisis, RI, diabetes, aterosclerosis y cáncer [25].

La leptina regula la captación y liberación de compuestos de gran energía. Actúa principalmente en el hipotálamo, donde controla la ingesta de alimentos favoreciendo la sensación de saciedad; su concentración en sangre se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo [12].

La adiponectina, por su parte, tiene un efecto antigluconeogénico y antilipogénico, estimula la captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético e hígado, mediante la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), y la inhibición de las citoquinas proinflamatorias $TNF\alpha$ e interleuquina 6 (IL6). También mejora la RI por su acción hepática y muscular y tiene efectos antiinflamatorios y antifibróticos [25].

1.3 Epidemiología del MAFLD y la obesidad

La prevalencia mundial del MAFLD se estima en un 33% [4]. Las tasas más altas de prevalencia se reportan de América del Sur (31%) y Oriente Medio (32%), seguido de Asia (27%), EE.UU. (24%) y Europa (23 %) [26,27] (**Figura 4**). No obstante, la hepatopatía crónica por MAFLD puede estar infradiagnosticada a nivel mundial [4].

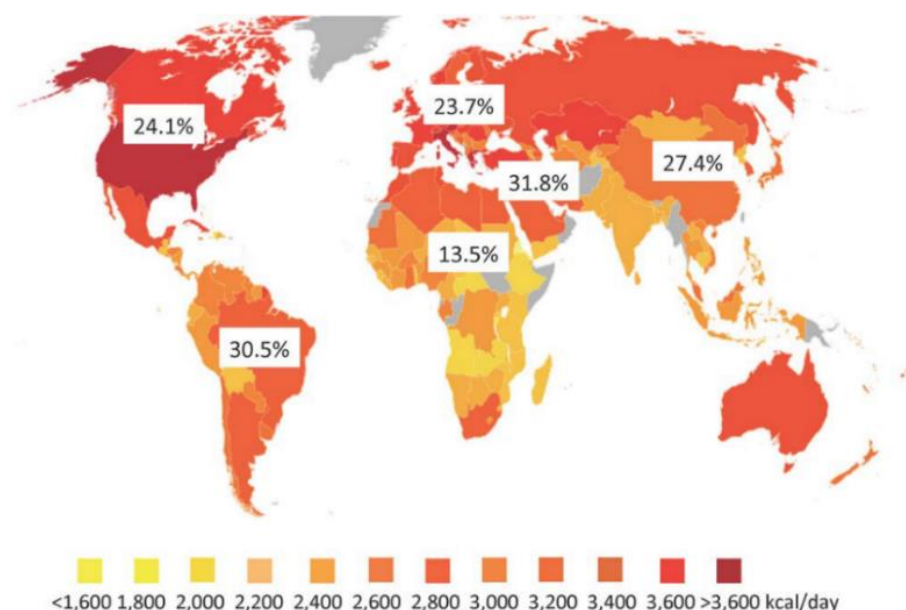


Figura 4. Variación geográfica de la prevalencia de MAFLD y de la disponibilidad diaria de energía per cápita (kilocalorías/día). Figura obtenida de: *Rinella M and Charlton M. Hepatology. 2016 Jul;64(1):19-22.*

Se estima que la prevalencia del NASH es del 1,5-6,5% en la población general, a partir de diagnósticos por biopsia hepática [28]. Sin embargo, entre las personas con MAFLD, la prevalencia de NASH es de al menos el 30%, pudiendo alcanzar el 60% en situaciones clínicas determinadas [26,29].

Se trata de un fenómeno creciente, ya que la prevalencia de MAFLD ha aumentado del 15% al 25% entre los años 2005 y 2010. Por otro lado, el número de casos nuevos de NASH se ha duplicado en el mismo periodo de tiempo [26]. Diversos estudios realizados en países europeos han detectado un aumento de la incidencia de MAFLD, con 19 casos por cada 1000 habitantes al año y mayor riesgo de ECV en personas con MAFLD [26]. Los jóvenes adultos (18-39 años) son el grupo de edad donde el aumento de la incidencia ha sido mayor, de hasta 7 veces, entre 1997 y 2014 [30]. La mayor incidencia de MAFLD ha supuesto un incremento de la mortalidad del 57% derivada de la hepatopatía y ECV; también se ha reportado un aumento de la enfermedad renal crónica derivada del MAFLD [29,31-33]. Así, se estima que los casos de MAFLD se incrementen en hasta un 30% y los de NASH hasta un 56% para el año 2030, acompañado del aumento de obesidad y DM2; además, la mortalidad asociada a la hepatopatía será del doble a la actual [34].

En cuanto a la obesidad, se ha estimado una prevalencia del 13% en la población adulta a nivel mundial, siendo el 39% la población con sobrepeso [35]. En Europa y EEUU, la prevalencia de la obesidad alcanza el 24% [36]. Por otro lado, la prevalencia de MAFLD en personas con obesidad se estima del 70-80% en función de la población estudiada, alcanzando incluso el 90%. En población adolescente con obesidad, la prevalencia de

MAFLD es del 34% [37].

En los últimos años, la prevalencia de obesidad se ha incrementado tanto en adultos como personas jóvenes, independientemente del área geográfica, etnia o nivel socioeconómico. Por otro lado, la epidemia actual de obesidad está favoreciendo el aumento de diversas enfermedades derivadas de ésta, como la DM2, MAFLD, ECV, alteraciones musculares y de salud mental [36]. Así pues, el manejo de la obesidad supone un gasto sanitario y socioeconómico en países industrializados y en aquellos en vías de desarrollo [38].

La severidad de la obesidad se relaciona tanto con el IMC como el perímetro abdominal, donde se ha reportado una mayor mortalidad con el incremento de cintura para un mismo IMC [39]. En los casos de obesidad más severa, además, existe un incremento de la prevalencia de NASH, que puede ser del 18%, donde la presencia de fibrosis hepática alcanza el 42% de estos pacientes [37].

En los próximos años, el MAFLD, acompañado o no de obesidad, se convertirá en la causa más prevalente de hepatopatía crónica en nuestro medio [3]. La prevalencia del MAFLD está estrechamente relacionada con la ingesta calórica y los cambios de hábitos de vida. Es más común en edades más avanzadas y el estadio de la enfermedad también aumenta con la edad y la presencia de obesidad [28] (**Figura 4**). Se ha reportado que hasta el 46% de las personas con MAFLD pueden sufrir un progreso a NASH y fibrosis, un porcentaje mayor al estimado, y que la propia fibrosis hepática puede avanzar en el 30% de los casos en un periodo de 5 años [28].

Dentro del espectro de manifestaciones y estadios clínicos del MAFLD, la fibrosis hepática es el factor clínico más relevante en el pronóstico de la enfermedad, con un aumento de los eventos relacionados con el hígado (cirrosis y CHC) y mayor morbilidad y mortalidad, llegando a tasas de 26 muertes/1000 personas cada año en caso del NASH [4,28,29,40]. Actualmente, el MAFLD representa la segunda causa más común de trasplante hepático, y a igualdad de edad y sexo, los pacientes con MAFLD presentan mayor mortalidad [41].

Una de las consecuencias de la cronicidad del NASH y el desarrollo de fibrosis, es la aparición de cirrosis hepática. Se ha proyectado un incremento de cirrosis descompensada por NASH del 168% y de defunciones derivadas de la hepatopatía del 178% en EE. UU. entre los años 2015 y 2030, datos que podrían estar infraestimados ante la falta de terapias farmacológicas específicas y el aumento imparable de la obesidad [28]. Los trasplantes hepáticos causados por cirrosis descompensada derivada del NASH aumentaron del 3% al 12% entre los años 1995 y 2013 en Reino Unido [26]. A nivel global, tanto el consumo

de alcohol como el NASH liderarán las etiologías de enfermedad hepática crónica y las muertes derivadas de la cirrosis hepática en los próximos años [42] (**Figura 5**).

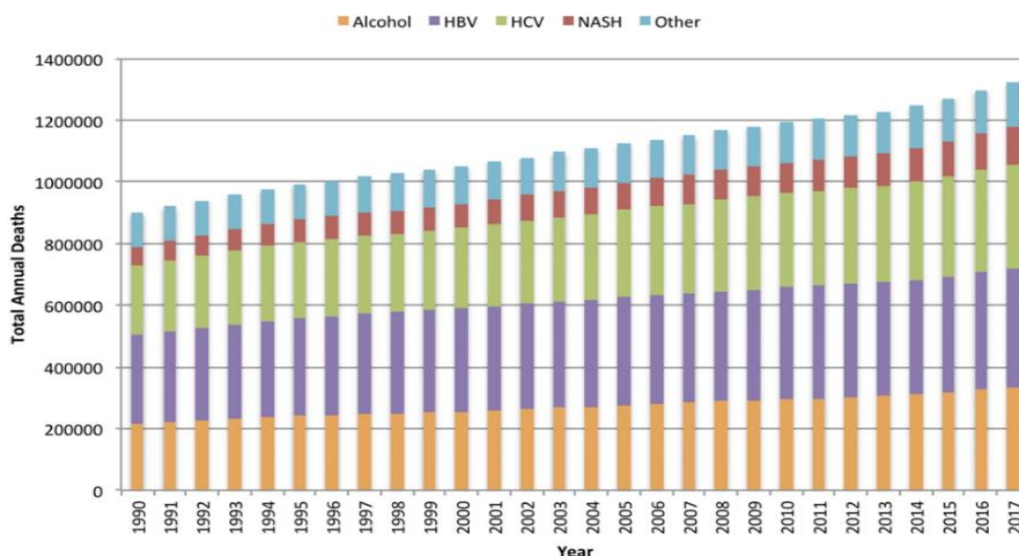


Figura 5. Fallecimientos anuales totales por cirrosis según etiología. En los últimos años se ha producido un incremento de más del doble de fallecimientos por cirrosis hepática a causa de NASH. Los fallecimientos por cirrosis hepática ocasionada por hepatitis B (HBV) y hepatitis C (HCV) se han mantenido más estables. Figura obtenida de: *Cheemerla S and Balakrishnan M. Clin Liver Dis (Hoboken). 2021 Jun 4;17(5):365-70.*

El desarrollo de CHC es una consecuencia del progreso del NASH y la fibrosis avanzada. A nivel europeo, se contabilizó que más de un tercio de los casos de CHC eran derivados del MAFLD en el año 2010, lo que supuso un incremento de 10 veces en 10 años [26]. En EE.UU., se estima que la incidencia de CHC aumentará un 137% entre el 2015 y 2030 [28]. Por otro lado, la creciente prevalencia de la obesidad ha ocasionado un incremento del 9% de la tasa anual de CHC derivado del MAFLD [29].

1.4 Factores de riesgo del MAFLD y la obesidad

Tanto el MAFLD como la obesidad comparten factores de riesgo debido a su estrecha relación en un contexto de desorden metabólico. A su vez, ambas entidades son factores de riesgo la una de la otra.

El aumento de IMC se asocia a una mayor presencia de MAFLD, de hasta el 90% en personas con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ [26,29]. Se considera uno de los principales factores de riesgo de MAFLD, derivado de la RI y que predispone a la progresión de la hepatopatía [43]. Y en sentido contrario, la prevalencia de obesidad en personas con MAFLD supera el 50%, siendo del 80% al considerar las personas con NASH [7]. Así mismo, la obesidad favorece el desarrollo de DM2, dislipemia y ECV, por lo que se considera un componente clave del SM [6,37].

La obesidad conlleva a la inflamación del tejido adiposo, donde existe un desbalance de

adipoquinas, lo que favorece el desarrollo de RI hepática y consecuentemente de MAFLD [44,45]. No obstante, la presencia de obesidad abdominal es un factor desencadenante de MAFLD mayor que el IMC. A mayor cantidad de tejido adiposo visceral, mayor riesgo de NASH y fibrosis avanzada [28,46]. En este sentido, se ha descrito que la composición corporal es determinante en la presencia de MAFLD, ya que personas con IMC normal (18,5-25 kg/m²) y una proporción elevada de grasa corporal o adiposidad, tienen mayor riesgo de MAFLD; así pues, la caracterización metabólica resulta esencial en el diagnóstico de MAFLD [47]. Además, este fenotipo de MAFLD en personas no obesas, suele ir acompañado de sedentarismo, alteración de la sensibilidad a la insulina, incremento del RCV y aumento de la concentración de lípidos circulantes e intrahepáticos [26].

Por otro lado, el MAFLD es consecuencia y precursor de comorbilidades metabólicas y su incidencia aumenta con el incremento de criterios que definen el SM, donde la RI juega un papel fundamental [8,29,30,48]. La presencia de SM favorece la probabilidad del desarrollo de NASH en un 41% entre las personas con MAFLD [28].

Las manifestaciones clínicas del MAFLD son muy variadas, además, la progresión a NASH y fibrosis es dinámica, existiendo una serie de factores ambientales y genéticos que modulan dicha progresión [28]. Esto explica la heterogeneidad clínica del MAFLD, en la que incluso el perfil lipídico hepático es diferente según los factores de riesgo presentes y los mecanismos fisiopatológicos implicados [6] (**Figura 6**).

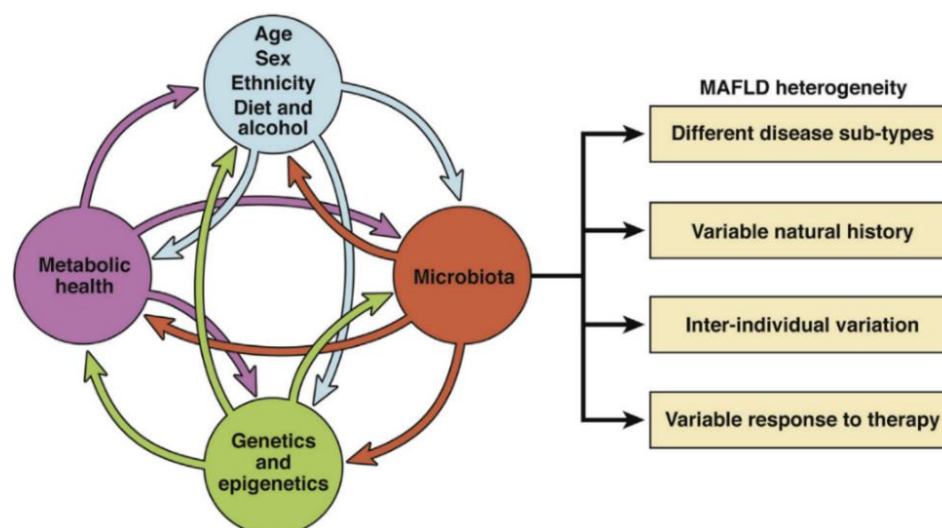


Figura 6. Heterogeneidad en la presentación clínica del MAFLD. Está influenciada por una multitud de factores, incluyendo edad, sexo, consumo de alcohol, hábitos dietéticos, predisposición genética, la microbiota y el estado metabólico, que engloba los factores de riesgo del SM. El impacto diferencial en la contribución de cada uno de los factores a lo largo del tiempo determina el fenotipo y curso de la enfermedad. Figura obtenida de: *Eslam M, et al. Gastroenterology. 2020 May;158(7):1999–2014.e1.*

El enfoque del MAFLD como un continuo entre la obesidad, el SM y la DM2 puede contribuir a la identificación temprana de estos pacientes, con el fin de proporcionar un tratamiento

dirigido e individualizado [7,49]. La nueva terminología, MASLD, también aboga por considerar la manifestación de la enfermedad hepática como resultado de la interacción de diversos factores, donde las características del SM son fundamentales, sobre todo la obesidad y la DM2 [9].

1.4.1 Diabetes Mellitus Tipo 2

La DM2 es una enfermedad heterogénea cuya presentación clínica y progresión puede ser muy variable. El riesgo de desarrollar DM2 aumenta con la edad, obesidad y falta de actividad física. Alrededor de 463 millones de personas en todo el mundo tenían diabetes en 2019, y se estima que para 2045, la población con diabetes aumente en un 50% [7]. El perfil metabólico de estos pacientes obliga a identificar y tratar el resto de factores de RCV [50].

La RI es común en la obesidad y el MAFLD, siendo mayoritaria en los pacientes diagnosticados de NASH. Las alteraciones en las vías de señalización de la insulina explican gran parte de los acontecimientos hepáticos y progresión de la enfermedad a NASH y fibrosis avanzada [28,31,51] (**Figura 7**).

La asociación entre MAFLD y DM2 ha sido ampliamente reportada y es bidireccional. En este contexto, ambas enfermedades pueden desarrollarse simultáneamente [29]. Se ha reportado un aumento del doble el riesgo de desarrollar DM2 a partir de MAFLD. Por otro lado, las formas más severas de MAFLD, especialmente NASH, están más asociadas a la presencia de DM2 [31,52]. Ambas condiciones clínicas comparten mecanismos fisiopatológicos subyacentes que se exacerban entre sí y promueven un empeoramiento de la enfermedad y las comorbilidades asociadas [53] (**Figura 7**).

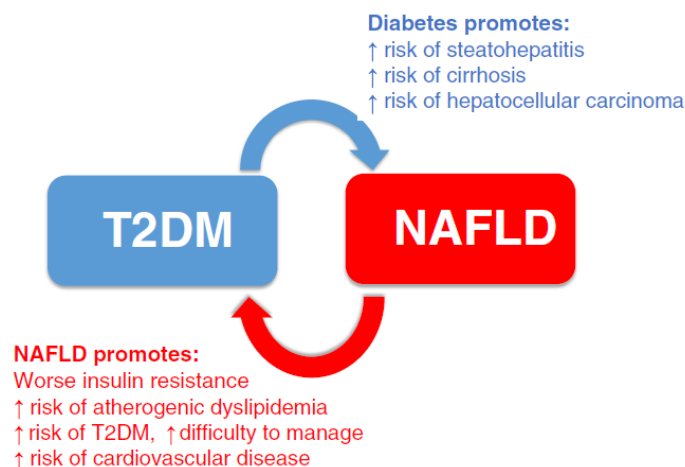


Figura 7. Relación entre diabetes tipo 2 y el NAFLD. La presencia de DM2 promueve el riesgo de NASH, cirrosis y CHC. Por otro lado, el NAFLD aumenta la resistencia a insulina, la dislipemia aterogénica, el riesgo de DM2 y su peor manejo clínico y la enfermedad cardiovascular. Figura obtenida de: *Budd J and Cusi K. Curr Diab Rep. 2020 Oct 5;20(11):59.*

La DM2 se ha asociado a un incremento en la prevalencia de MAFLD, que puede ser del 60-70% [26,54]. En este sentido, la DM2 se considera como el predictor más fuerte de progresión de MAFLD. Los pacientes afectados de diabetes tienen un mayor riesgo de desarrollo de NASH así como un incremento de 2 a 4 veces el riesgo de complicaciones derivadas de la esteatosis hepática [8,43] (**Figura 7**).

Se han reportado un 40% de casos con NASH y un 17% de fibrosis avanzada en personas afectas de diabetes con MAFLD, siendo clínicamente relevante en el manejo de los pacientes, ya que la fibrosis es el estadio clínico más asociado a un peor pronóstico a largo plazo [51,55] (**Figura 7**).

Por otro lado, la DM2 es habitualmente asociada al sobrepeso y la obesidad, sin embargo, esta asociación también puede ser bidireccional. El exceso de glucosa y otros azúcares y de insulina, conllevan a aumento de peso y obesidad, y a largo término, a la RI a nivel periférico, intolerancia a hidratos de carbono y DM2. Por otro lado, personas con DM2, tienen un mayor riesgo de desarrollar obesidad, debido a la RI ya instaurada (afecta principalmente al músculo esquelético), que favorece la síntesis y almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, mediante exportación de triglicéridos hepáticos vía VLDL. Además, la RI de estas personas, interfiere la acción de la LPL, dificultando el crecimiento del tejido adiposo y favoreciendo el desarrollo de tejido adiposo ectópico, que implica una mayor severidad de la obesidad [56].

1.4.2 Factores genéticos

Se ha reportado una mayor prevalencia de NASH y cirrosis en población latinoamericana, mientras que los americanos con ascendencia africana tienen menores tasas de hepatopatía avanzada [8]. Mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se han descrito una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados a diferentes fenotipos o grados de severidad del MAFLD [28] (**Figura 6**).

La familia genética *PNPLA3* o adiponutrina (fosfolipasa similar a la patatina que contiene el dominio 3, en inglés patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) está implicada en el remodelado lipídico intracelular, muy expresado en hígado y en tejido adiposo. La variante *PNPLA3* rs738409 implica la transversión C>G, que resulta en un cambio del aminoácido isoleucina (Ile, I) por metionina (Met, M) en la posición 148 (I148M). Este cambio conlleva una pérdida de función en el metabolismo de lípidos, hecho que implica un aumento de los triglicéridos hepáticos, inflamación, mayor progresión a fibrosis y desarrollo de CHC [57-59] (**Figura 8**). La implicación de esta variante se ha estudiado

también en la hepatopatía alcohólica y vírica, influyendo en el fenotipo de la enfermedad y en su carácter hereditario [60].

El gen *TM6SF2* (miembro 2 de la superfamilia 6 transmembrana, en inglés transmembrane 6 superfamily member 2) codifica una proteína reguladora del metabolismo lipídico, cuya función principal es la secreción hepática de triglicéridos en forma de VLDL. La variante *TM6SF2* rs58542926 implica la transición C>T, que resulta en un cambio del aminoácido glutámico (Glu, E) por lisina (Lys, K) en la posición 167 (E167K). Este cambio conlleva una reducción en la exportación de VLDL por parte del hígado, favoreciendo la formación de gotas intracelulares de triglicéridos y aumentando la concentración plasmática de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST); sin embargo, se ha dado un papel cardioprotector a esta variante [59,61,62]. En pacientes con MAFLD, los portadores de este polimorfismo tienen esteatosis más severa, mayor grado de necroinflamación y fibrosis avanzada o cirrosis [58] (**Figura 8**).

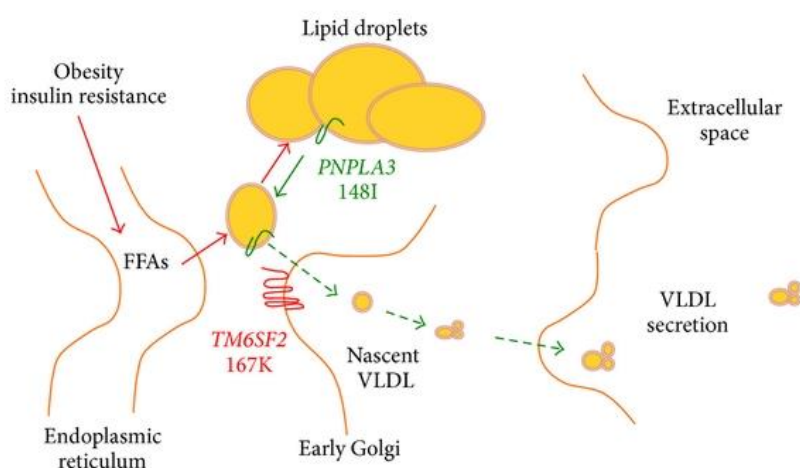


Figura 8. Papel de las variantes genéticas en el MAFLD. La variante PNPLA3 I148M ocasiona una reducción en la descomposición de los triglicéridos y conduce a la retención de lípidos en el hepatocito. La variante TM6SF2 E167K reduce la secreción de triglicéridos a través de VLDL, lo que lleva a la retención hepato celular de lípidos. Figura adaptada de: Dongiovanni P, et al. *Biomed Res Int.* 2015;2015:460190.

El efecto combinado de ambos polimorfismos confiere un riesgo de cirrosis de hasta 12 veces mayor y un riesgo de CHC de hasta 29 veces en población general [63]. Incluso favorecen el deterioro de la función hepática en otras patologías, como la colangitis esclerosante primaria, mediante diferentes mecanismos de daño hepático [64]. Además, estas variantes se han asociado a mayor uso de recursos sanitarios, como las visitas hospitalarias y tiempo de hospitalización [65].

Junto a estas, se han descrito otras variantes, como la de los genes *MBOAT7* (O-aciltransferasa de unión a membrana 7) rs641738, que favorece el desarrollo de fibrosis y daño hepático [66]; *GCKR* (Regulador de glucoquinasa) rs1260326 y rs780094, asociadas

a mayor acumulación de grasa en el hígado; *HSD17B13* (17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 13) rs72613567, que incrementa el riesgo de cirrosis y CHC [63]. La presencia de los polimorfismos estudiados está asociada a un mayor grado de inflamación y fibrosis, detectado histológicamente, y por tanto, condicionan la variabilidad fenotípica del MAFLD [62,67].

Respecto a variantes genéticas que se asocian o predisponen a la obesidad, se han descrito mutaciones en el gen de la leptina, las cuales inhiben su función de regulación de la homeostasis energética. Por otro lado, existen síndromes monogénicos que cursan con obesidad como el de Prader-Willi [68].

En la mayoría de los casos, la obesidad se debe a la interrelación de un conjunto de factores, donde se han descrito hasta 870 polimorfismos asociados al aumento del IMC, pero solo explican el 5% de esta variación en el IMC. Estos genes están implicados en los circuitos neuronales de apetito y saciedad, secreción de la insulina, adipogénesis y metabolismo lipídico [10,68].

1.4.3 Factores epigenéticos

Los factores epigenéticos también podrían ser un mecanismo por el que la exposición a un ambiente determinado ejerce un efecto hereditario en el riesgo de enfermedad. Se han observado patrones de metilación del ADN en los mismos genes en pacientes con fibrosis leve por NASH, sugiriendo que las firmas epigenéticas presentes en ADN circulante podría servir como biomarcador potencial de la gravedad de la enfermedad [26] (**Figura 6**). Por otro lado, metabolitos presentes en la microbiota pueden cambiar el patrón de metilación de ciertos genes aumentando la susceptibilidad a obesidad [69]. En este sentido, se ha investigado la relación entre la metilación de ciertos genes, como el de la leptina, adiponectina, citoquinas proinflamatorias y otros genes implicados en la regulación de la ingesta, con la predisposición a la obesidad [10].

1.4.4 Edad y sexo

La prevalencia de MAFLD se incrementa con la edad, desde el 20% en personas de hasta 20 años, a superar el 40% en mayores de 60 años. La incidencia de NASH y cirrosis también es mayor en personas de más de 50 años, en comparación con grupos de edad más jóvenes [8,29]. Por otro lado, también se ha descrito el MAFLD en población pediátrica, asociada a la obesidad infantil [70] (**Figura 6**).

En cuanto al sexo, no existen datos que muestren una clara tendencia. Sí se ha reportado que la esteatosis hepática es más común en hombres que en mujeres hasta los 50 años, a partir de la cual, la incidencia en mujeres es mayor con una mayor severidad del NASH, según estudios histológicos [8].

El síndrome de ovario poliquístico (SOPC) es un desorden endocrinológico que afecta a mujeres en edad reproductiva, y está caracterizado por la presencia de RI y obesidad, que a su vez son factores de riesgo del MAFLD [8,10].

Las formas más severas de obesidad se asocian a edades más avanzadas, donde la disfunción del tejido adiposo es mayor, ocasionando un fenotipo proinflamatorio. Además, con la edad, se favorece la distribución de grasa del tejido subcutáneo a la región abdominal, favoreciendo el desarrollo de DM2 y ECV [71]. Finalmente, en edad infantil y adolescente se están reportando aumentos en la prevalencia de obesidad [72].

1.4.5 Dieta

La ingesta calórica y los hábitos dietéticos son determinantes en el desarrollo del MAFLD y la obesidad, y su asociación con el SM. Se ha reportado que estos pacientes tienden a residir en áreas con exceso de fuentes de alimentos, incluyendo restaurantes de comida rápida. Los alimentos procesados y con alto contenido en grasa y azúcares son más habituales en personas con obesidad y/o MAFLD [26,69] (**Figura 6**).

Una elevada ingesta de alimentos ricos en fructosa y grasa favorece la disfunción metabólica, RI y el desarrollo de MAFLD, en la que se puede encontrar un perfil de lípidos anormal. Por el contrario, la dieta mediterránea favorece la eliminación de grasa en pacientes con MAFLD [6,32]. El consumo de bebidas ricas fructosa y glucosa está asociado a acumulación de grasa en el hígado y a nivel abdominal, además de NASH [49].

La ingesta de alcohol es un factor de confusión para la mayoría de las personas con MAFLD y resulta un reto a nivel clínico medir el grado en que el consumo de alcohol afecta a la lesión hepática, teniendo en cuenta las diferencias genéticas y el perfil metabólico del individuo [28]. Sin embargo, sí está definido que la ingesta leve de alcohol en un contexto de MAFLD favorece el desarrollo de la hepatopatía y el desarrollo de fibrosis significativa [73].

1.4.6 Microbiota

Los hábitos dietéticos pueden modificar rápidamente la composición de la microbiota,

hecho ampliamente estudiado en modelos animales. En personas con obesidad, está demostrada esta variación en la composición, lo que puede ocasionar una alteración en los metabolitos liberados, los cuales regulan los mecanismos de la saciedad y termogénesis [44,69].

Por otro lado, estos metabolitos están implicados en la fibrosis y cirrosis en el MAFLD, además de la modificación de la permeabilidad intestinal (común en la obesidad), ocasionando la presencia de productos bacterianos circulantes que inducen la inflamación hepática y la activación de procesos fibróticos [6] (**Figura 6**).

1.4.7 Actividad física

La actividad física juega un papel importante en el desarrollo del MAFLD y la obesidad. Aproximadamente la mitad de estos pacientes son inactivos y no practican ningún ejercicio físico [74]. En los últimos años ha ido aumentando el reconocimiento de la eficacia del ejercicio físico en la reducción de la grasa hepática, mejora de la RI y disminución de la inflamación hepática. Por tanto, se recomienda de forma rutinaria para el manejo del MAFLD, además de sus implicaciones en la modificación del RCV [32]. Por otro lado, la pérdida de peso derivada del ejercicio físico de moderada intensidad en personas con obesidad, también se ha asociado a la reducción de la severidad de las comorbilidades asociadas, incluyendo inflamación, enfermedad respiratoria y el resto de componentes del SM [75].

1.4.8 Factores socioeconómicos

El estatus socioeconómico, medido como nivel educativo e ingresos económicos, es un factor influyente en el MAFLD, la obesidad y en el resto de enfermedades crónicas más prevalentes de nuestro entorno; muy ligado, además, con el tipo de dieta y la actividad física. Se ha reportado una disminución del riesgo de MAFLD en personas con mayor nivel educativo, mediado por dieta de alta calidad y actividad física regular [10,76]. Otro factor socioeconómico, como un menor acceso a atención sanitaria, predicen el desarrollo de NASH [77]. Finalmente, diferentes estudios europeos han reportado un aumento de la prevalencia de obesidad en los últimos 30 años en personas con un estatus socioeconómico más bajo [72].

1.5 Gasto sanitario y políticas públicas

El aumento de gasto sanitario derivado del manejo de pacientes con MAFLD y su

asociación con otras enfermedades de elevada prevalencia como DM2 y la obesidad, obligan a los gobiernos, administraciones públicas y sociedades científicas a trazar un plan común de acción para reducir y minimizar el impacto de estas enfermedades en la sociedad. En 2016 se publicó un modelo poblacional de MAFLD, en el que se estimó un gasto sanitario anual de 35.000 millones de euros en cuatro países de Europa occidental (hasta 1.163 euros/paciente), el cual podría incrementarse hasta los 334.000 millones de euros en 2026 con el aumento en paralelo de la obesidad [78]. Se calcula que la obesidad representa entre el 0,7 y el 2,8% de los costes sanitarios y que las personas con esta enfermedad tienen unos costes médicos un 30% superiores al resto. Se prevé que los costes sanitarios totales se dupliquen cada década [37].

Debido al gran volumen de pacientes con MAFLD dentro de las hepatopatías crónicas, hace que el enfoque principal de la atención sanitaria sea distinguir aquellos con mayor riesgo de progresión y presencia de fibrosis hepática [26,43].

Existen evidencias que apuntan a que el sobrepeso en la niñez y la adolescencia está asociado con un mayor riesgo de MAFLD. Así, el umbral de morbilidad y/o mortalidad relacionada con el hígado se alcanza a una edad más temprana. Además, el hecho de estar asociado a otras comorbilidades metabólicas podría ejercer una presión creciente sobre los sistemas de atención sanitaria, donde el aumento de los eventos cardiovasculares en el marco del SM es claro [30].

La política de prevención es la mejor herramienta para combatir el MAFLD y la obesidad, que ha de enfocarse en la atención primaria y en el ámbito educativo, en el que la dieta equilibrada, actividad física y hábitos de vida saludables han de ser los pilares centrales en estas políticas de salud [26,37].

Así pues, el abordaje sanitario ha de venir desde diferentes puntos [26,72]:

- Análisis de la evolución de la obesidad y MAFLD a nivel poblacional.
- Control de comorbilidades que implican una mayor prevalencia y progresión del MAFLD y la obesidad.
- Identificación de personas de alto riesgo de fibrosis avanzada, cirrosis hepática y CHC mediante sistemas de cribado coste-efectivos.
- Prevención en población joven a través de la educación y atención primaria.
- Aplicar medidas de vigilancia que permitan predecir las poblaciones sufrirán estas enfermedades y poder emplear medidas preventivas.

1.6 Bases moleculares y fisiopatología del MAFLD y su relación con la obesidad

Actualmente, en la patogénesis del MAFLD, se acepta la hipótesis de los múltiples golpes (en inglés multi-hit hypothesis), la cual considera que la influencia ambiental puede afectar a la expresión de genes, aumento de peso, incremento de la movilización de ácidos grasos libres (AGL), depósito ectópico de grasa y RI [7,79] (**Figura 9**).

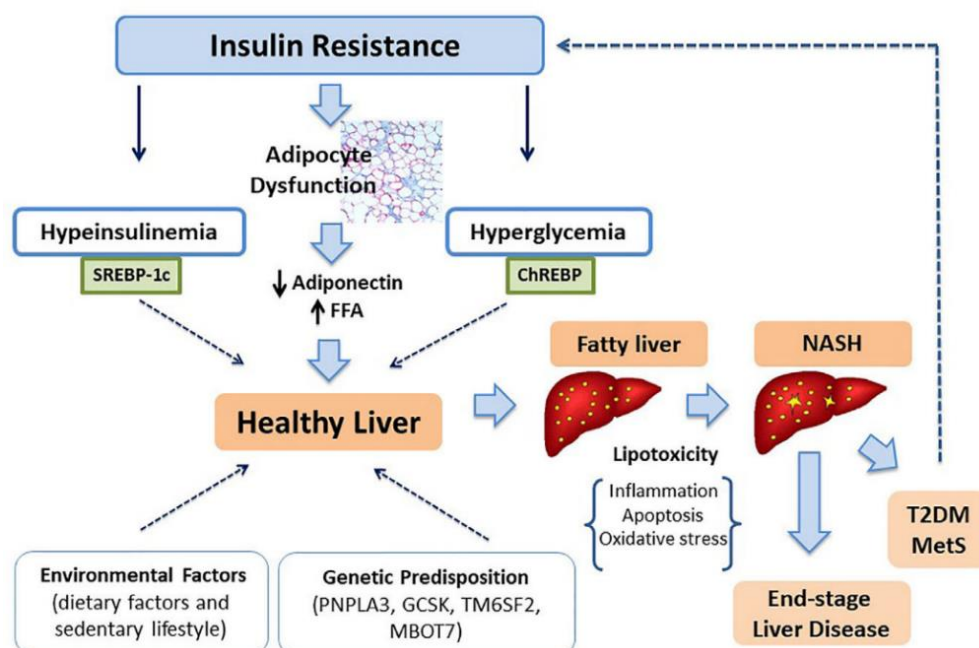


Figura 9. Factores implicados en la patogénesis del MAFLD. La presencia de hiperinsulinemia e hiperglicemia, acompañadas de una disfunción del tejido adiposo en un contexto de RI, favorecen el desarrollo de esteatosis hepática. Por otro lado, otros factores ambientales y genéticos juegan un papel esencial en el transcurso de la enfermedad. A partir de la acumulación de lípidos en el hígado y la lipotoxicidad que provocan, se desencadena el NASH, avanzando en la hepatopatía y empeorando las comorbilidades metabólicas. Figura obtenida de: Scapaticci S, et al. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Apr 6;12:639548.

1.6.1 Esteatosis hepática

El MAFLD comienza con la acumulación de lípidos en el hígado en forma de triglicéridos, denominada esteatosis hepática. Este proceso es consecuencia del aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y de la mayor captación de AGL circulantes del plasma procedentes de la lipólisis del tejido adiposo, principal fuente de ácidos grasos. Ambos orígenes contribuyen a aumentar el pool de ácidos grasos en el interior del hepatocito para su esterificación con el glicerol y formar los triglicéridos, mediante la Diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2), sobreexpresada en el MAFLD. La captación hepática de AGL depende de su concentración plasmática y de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP y CD36), las cuales están sobreexpresadas en el MAFLD [25] (**Figura 10**).

1.6.1.1 Lipogénesis de novo

La lipogénesis *de novo* está estimulada por la acción de la insulina ante el aumento de glucosa, y especialmente fructosa. La exposición continuada a azúcares por parte del hígado, junto con el hiperinsulinismo y RI, provocan una sobreactivación del ChREBP y SREBP-1c, los cuales estimulan diversas enzimas lipogénicas, como LPK, ACC, FAS y SCD [21,80]. El aumento de ácidos grasos y consecuentemente de triglicéridos en el hepatocito estimula la síntesis de apo B-100, sin embargo, la insulina la inhibe (**Figura 10**).

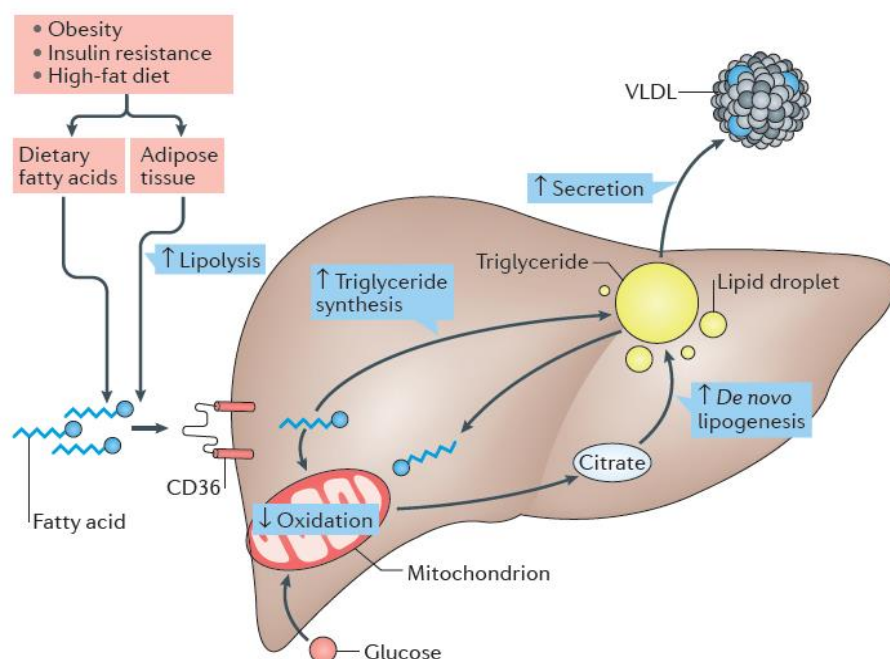


Figura 10. Desequilibrio del almacenamiento y eliminación de lípidos en el MAFLD. El contenido de lípidos hepáticos está regulado por la compleja interacción entre el suministro de lípidos al hígado y la captación hepática, síntesis, oxidación y secreción de lípidos. Una dieta rica en grasas, la obesidad y la RI pueden aumentar el flujo a través de estas vías, lo que conduce a una mayor captación y acumulación de triglicéridos intracelulares en los hepatocitos. Por otro lado, la β -oxidación mitocondrial está disminuida y lipogénesis *de novo* aumentada por exceso de carbohidratos e hiperinsulinemia, aumentando la cantidad de triglicéridos almacenados, pudiendo aumentar también su exportación en VLDL en situaciones de marcada RI. Figura obtenida de: Meex RCR and Watt MJ. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Sep;13(9):509-20.

Así, con la hiperinsulinemia y RI hepática, los ácidos grasos y triglicéridos se mantienen en el interior del hepatocito, induciendo la esteatosis hepática; en este contexto, la movilización de triglicéridos y la oxidación de ácidos grasos se encuentran disminuidas [80] (**Figura 10**).

Cuando se produce una RI marcada, la síntesis de VLDL puede no estar inhibida, favoreciendo su liberación al mismo tiempo que progresa la acumulación hepática de lípidos [49,81]. Por otro lado, en la exportación de VLDL participa el transportador TM6SF2, cuya variante E167K ocasiona una pérdida de función, favoreciendo así la acumulación de triglicéridos hepáticos [58] (**Figura 10**).

1.6.1.2 Lipólisis del tejido adiposo

El tejido adiposo juega un papel fundamental en el desarrollo de la esteatosis hepática. El almacenamiento de ácidos grasos se produce tras la ingesta de alimentos, en la que los triglicéridos presentes en los quilomicrones son hidrolizados y los AGL entran en los adipocitos y se reesterifican en triglicéridos. Durante el ayuno, situación en la que la síntesis de VLDL es mayor y cuyos triglicéridos son hidrolizados en el tejido adiposo para captar los ácidos grasos y sintetizar nuevamente triglicéridos en los adipocitos. En ambos procesos, la LPL es la encargada de hidrolizar dichos triglicéridos, cuya actividad está aumentada cuando la disponibilidad de AGL es mayor [21,25,49] (**Figura 10**).

1.6.2 Obesidad y MAFLD

En la obesidad la actividad de la LPL en el tejido adiposo es mayor. Cuando se desarrolla RI y hay una sobrecarga de lípidos circulantes, la lipólisis aumenta en el tejido adiposo por acción de la LPL, sin embargo, los ácidos grasos generados no son reesterificados en triglicéridos en los adipocitos, sino que son liberados al torrente sanguíneo en forma de AGL unidos a la albúmina. Estos serán recaptados por el hígado, aumentando el pool de AGL en los hepatocitos [25,49] (**Figura 10**).

Aunque la obesidad está fuertemente asociada con la esteatosis hepática, no es una condición obligatoria para desarrollar MAFLD. Los pacientes con lipodistrofia tienen marcada RI y comúnmente desarrollan esteatosis hepática y DM2, por lo que la disfunción del tejido adiposo es un contribuyente clave a la patogénesis del MAFLD [31].

1.6.2.1 Inflamación del tejido adiposo

El tejido adiposo está en continuo remodelado, el cual está patológicamente acelerado en la obesidad, lo que favorece su inflamación y la infiltración de macrófagos, que envían señales mediante la producción de citoquinas y quimioquinas. Dicha inflamación, a pesar de su naturaleza leve, afecta negativamente la función del resto de órganos como el hígado, hecho que se considera causante de las complicaciones de la obesidad [82].

Ante el mayor almacenamiento de energía en forma de triglicéridos y la sobrecarga de AGL, que implica mayor síntesis, transporte y transformación de estos mediante la participación del hígado, los adipocitos experimentan una expansión anormal, lo que resulta en hipoxia y senescencia, manteniendo una inflamación crónica de bajo grado. En estas condiciones, los adipocitos experimentan estrés en el RE y una mayor producción de

especies reactivas de oxígeno (ROS) [82] (**Figura 11**).

Con el crecimiento disfuncional del tejido adiposo, en especial de la grasa visceral, la producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL6 es mayor, mientras que la síntesis de adiponectina está disminuida; esta situación conlleva a la resistencia hepática a la adiponectina, muy común en el MAFLD. La resistencia a leptina también es común en la obesidad y el MAFLD [25,31,83] (**Figura 11**).

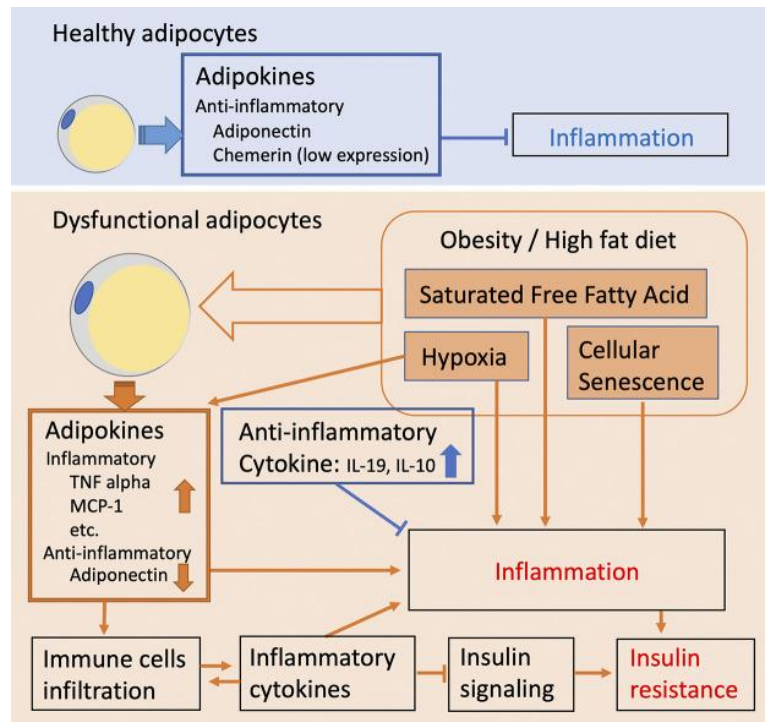


Figura 11. Disfunción de los adipocitos en la obesidad. Existe un aumento en la carga de AGL, acompañado de hipoxia y senescencia celular, que favorece la liberación de citoquinas proninflamatorias y disminución de adiponectina, proceso acompañado de una infiltración de células inmunes, que incrementan el daño en el tejido y favorecen la RI. Figura obtenida de: Kawai T, et al. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021 Mar;320(3):C375-91.

Otro de los mediadores inflamatorios presentes es el factor de crecimiento transformador beta ($\text{TGF}\beta$), que activa a las células estrelladas para la síntesis de colágeno y ECM, favoreciendo los procesos fibróticos [81]. Así, el desbalance de adipoquinas contribuye a la acumulación hepática de triglicéridos, inflamación, menor respuesta a insulina y NASH, conllevando además, a un fenotipo más severo de obesidad [84,85].

1.6.3 NASH y fibrosis hepática

Se conocen varias vías moleculares que contribuyen al desarrollo de NASH, además, no es seguro que la esteatosis preceda siempre al NASH. Esto explica que los mecanismos que conducen a la enfermedad como sus manifestaciones clínicas sean muy heterogéneos [49].

La esterificación de ácidos grasos en forma de triglicéridos es un proceso reversible y puede prevenir inicialmente el efecto lipotóxico de los AGL en el hígado [17]. Este hecho podría explicar que en estadios avanzados del NASH, la esteatosis a menudo disminuye (NASH quemado) debido a una capacidad limitada de almacenamiento de triglicéridos [84]. Sin embargo, una marcada acumulación de grasa en el hígado es un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad [31].

1.6.3.1 Lipotoxicidad de los ácidos grasos

La acumulación de AGL en el hígado tiene un efecto lipotóxico en los hepatocitos, destacando los ácidos grasos de cadena larga, contribuyendo a alteración de vías de señalización y causando disfunción celular [84]. Además, el aumento de intermediarios lipídicos en el hígado, como el diacil glicerol (DAG), bloquea la cascada de señalización de la insulina mediante la activación de la proteína quinasa C epsilon (PKCε), favoreciendo el desarrollo de RI hepática [17,86]. En este contexto de RI, los triglicéridos almacenados en el hígado pueden hidrolizarse aumentando los AGL de los hepatocitos. La enzima PNPLA3 participa en este remodelado lipídico y la variante I148M ocasiona una pérdida de función, impidiendo así el catabolismo de los AGL y favoreciendo la acumulación de intermediarios lipídicos y la progresión de la enfermedad [87] (**Figura 12**).

El NASH está caracterizado por la activación de la respuesta inflamatoria tanto a nivel hepático como sistémico, mediado por la interrelación entre el hígado, tejido adiposo e intestino [25]. En esta progresión juegan un papel fundamental los AGL, que implica estrés oxidativo, aumento de ROS por activación del citocromo P450 2E1 (CYP 2E1), peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que inducen al estrés del RE y activación del inflammasoma [49,86,88]. Además, se produce una pérdida de ATP y poder reductor celular, por lo que aumenta el daño en el DNA y proteínas, alterando la estructura y función de la membrana plasmática y favoreciendo la apoptosis celular. La disfunción mitocondrial derivada de este daño celular va acompañada de procesos de oxidación alternativa de ácidos grasos mediante la activación del receptor asociado al proliferador de peroxisomas tipo γ (PPARγ) en peroxisomas y microsomas [81,84,89,90]. Como consecuencia del estrés y disfunción celular, se activan vías apoptóticas que promueven inflamación y fibrosis hepática [25,85] (**Figura 12**).

1.6.3.2 Inflamación del tejido hepático

La inflamación es uno de los factores clave que distingue el NASH de la esteatosis. Las vías de la quinasa c-Jun N-terminal-proteína activadora 1 (JNK-AP-1) y del inhibidor de la

quinasa kappa B-factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (IKK-NFκB) están implicadas en la inflamación crónica del hígado, contribuyendo a la RI y la supresión de la síntesis de proteínas hepáticas. Las consecuencias de la acumulación de AGL, como el estrés oxidativo y de RE favorecen la activación de estas vías inflamatorias, lo que lleva a las células de Kupffer, linfocitos T y neutrófilos a producir las citoquinas proinflamatorias TNFα, IL1β e IL6 [49,83,84,88] (**Figura 12**).

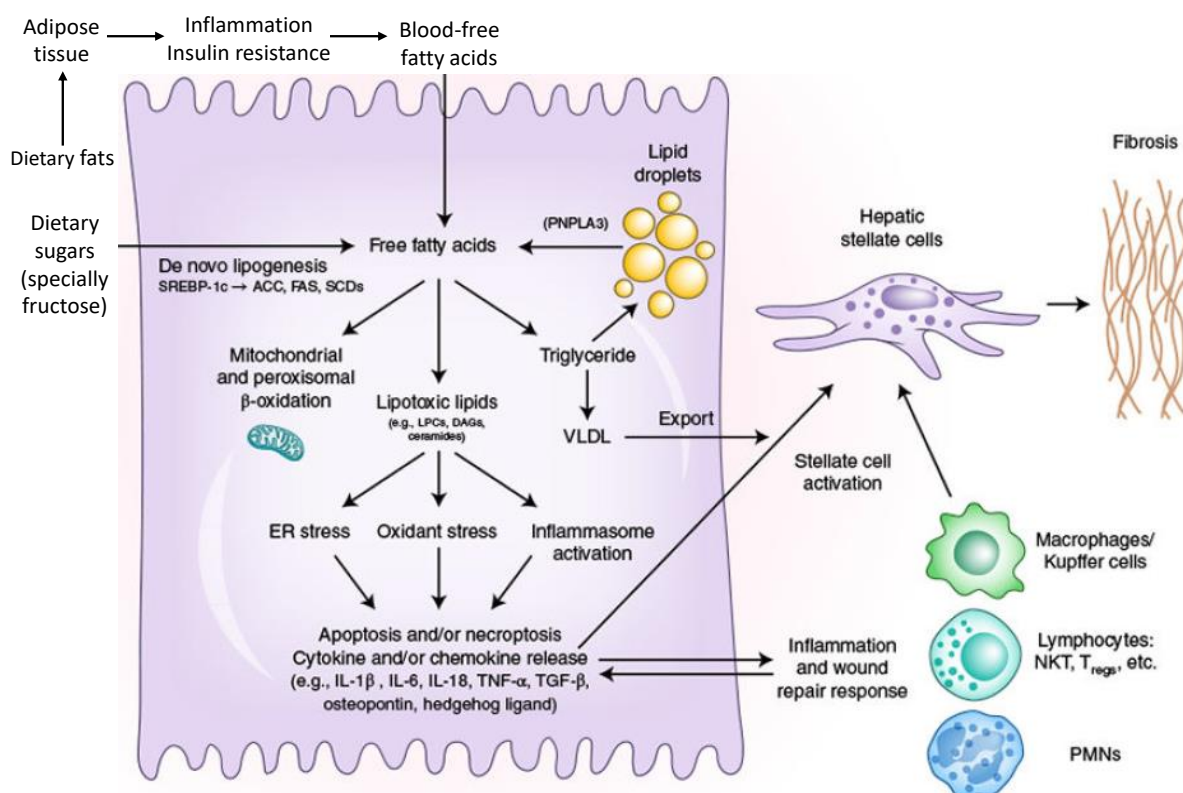


Figura 12. Los ácidos grasos libres en la patogénesis del NASH. Los AGL se originan de la lipólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo o se sintetizan *de novo* en los hepatocitos a partir de carbohidratos, especialmente fructosa. Cuando se sobrepasa la eliminación de los ácidos grasos, mediante la beta-oxidación mitocondrial y la reesterificación para formar triglicéridos y exportarse como VLDL, estos pueden contribuir a la formación de especies lipotóxicas que provocan estrés del RE, estrés oxidativo y activación del inflammasoma. Estos procesos son responsables del NASH con lesión hepatocelular, inflamación, activación de células estrelladas y acumulación progresiva de ECM. Figura modificada de: Friedman SL, et al. *Nat Med.* 2018 Jul;24(7):908-22.

Por otro lado, la alteración de la microbiota intestinal o disbiosis a consecuencia de la dieta, puede ocasionar la producción y liberación de ácidos grasos de cadena corta y de lipopolisacárido (LPS) hacia la circulación portal, ya que la permeabilidad intestinal se encuentra aumentada; de esta manera, se generan estímulos hepáticos proinflamatorios, lo que incrementa el riesgo de NASH [31].

1.6.3.3 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es la respuesta al daño crónico, a modo de cicatrización del tejido.

Consiste en la síntesis de ECM de gran densidad, compuesta por colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas y glicosoaminoglicanos [84]. Comienza con la activación de las células estrelladas por la acción del $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$, liberadas por las células de Kupffer y el estrés oxidativo, todo ello consecuencia de la inflamación hepática crónica. La degeneración celular y apoptosis del parénquima hepático son estímulos de activación de las células estrelladas. Estas células se diferencian a miofibroblastos, que sintetizan colágeno y e inhibidores de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), favoreciendo el remodelado de la ECM. A su vez, liberan citoquinas proinflamatorias, principalmente $\text{TGF}\beta$, generando un feedback positivo de amplificación de la fibrosis [14,42,85] (**Figura 13**).

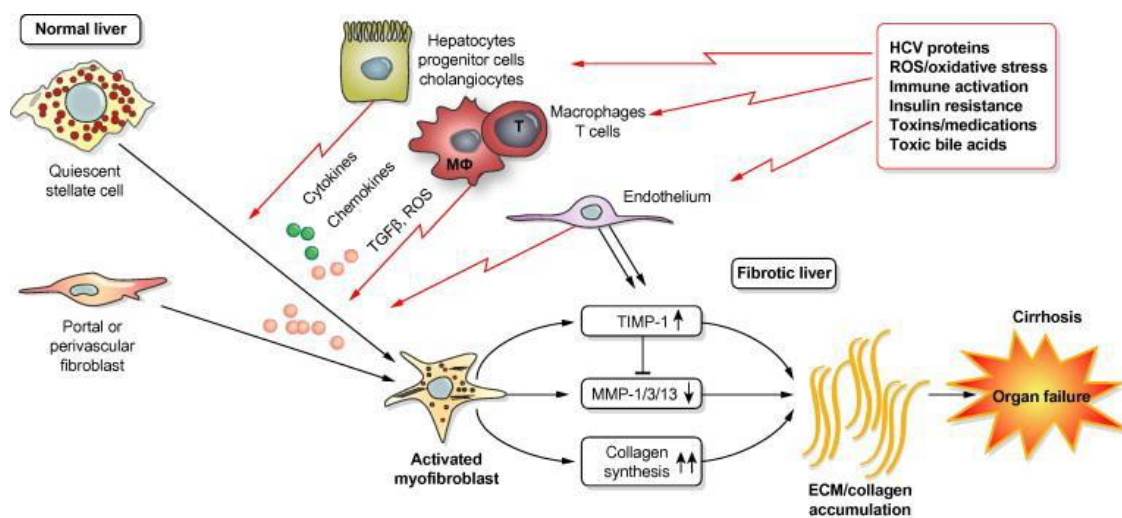


Figura 13. Intermediarios en la fibrosis hepática. Los activadores de las células estrelladas, como diversas citoquinas, factores quimiotácticos, ROS y $\text{TGF}\beta$, son sintetizados por macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer). Los miofibroblastos aumentan la síntesis de colágeno, de inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-1) y disminuyen la síntesis de MMP, por lo que se acumula ECM que conlleva al fallo de órgano por cirrosis. Figura obtenida de: Berenguer M and Schuppan D. *J Hepatol.* 2013 May;58(5):1028-41.

La insulina, ácidos grasos, adipocinas como la leptina y adiponectina influyen en los procesos fibrogénicos. El hiperinsulinismo estimula la fibrogénesis por activación directa de las células estrelladas, lo que explica que la severidad de la RI, presente en la DM2, se asocia a una progresión mayor del NASH y la fibrosis y, por tanto, a un peor pronóstico. La leptina también favorece la liberación de $\text{TGF}\beta$ en las células de Kupffer y otros eventos profibrogénicos. Por otro lado, la disminución de la concentración de adiponectina resta su capacidad inhibitoria sobre las células estrelladas [84] (**Figura 13**).

1.6.3.4 Síntesis de SHBG

El estado inflamatorio y fibrogénico característico del NASH, favorecido por el aumento de $\text{TNF}\alpha$, IL6 e $\text{IL1}\beta$ y la disminución de la adiponectina, principal activador, ocasiona una reducción en la síntesis de SHBG [20].

La reducción de la SHBG, además de testosterona, en personas obesas con MAFLD ha sido descrita previamente, dando un papel relevante al tejido adiposo visceral, la RI y la dislipemia, haciendo de la SHBG, y ciertos polimorfismos estudiados, factores predictores de DM2 [19,91-93].

Existen modelos animales que explican esta relación entre grasa visceral, RI y concentración plasmática de SHBG, relacionando así el MAFLD y el SM con la síntesis hepática de la SHBG. En este sentido, la SHBG podría modular la lipogénesis hepática, pudiendo ser una diana terapéutica para prevenir el desarrollo de MAFLD, en un contexto de obesidad y DM2 [93].

1.7 Diagnóstico del MAFLD

El diagnóstico del MAFLD abarca un amplio abanico de pruebas de imagen, estudio histológico y biomarcadores sanguíneos, en un contexto de alteración metabólica. Así, las recomendaciones actuales para el diagnóstico de MAFLD incluyen la presencia de esteatosis hepática junto con al menos uno de los criterios metabólicos: DM2, obesidad o evidente desregulación metabólica (**Figura 14**) [6]. La detección de esteatosis, NASH o fibrosis requiere en muchos casos la combinación de varias de ellas con el fin de estratificar el riesgo de enfermedad avanzada. A raíz de la nueva nomenclatura, MASLD, se han simplificado los criterios clínicos y bioquímicos relacionados con el SM, de tal manera que la combinación de esteatosis hepática junto con sobrepeso o aumento de perímetro abdominal, hiperglucemia, aumento de presión arterial, hipertrigliceridemia o disminución del colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad), conlleva un diagnóstico de MASLD [9].

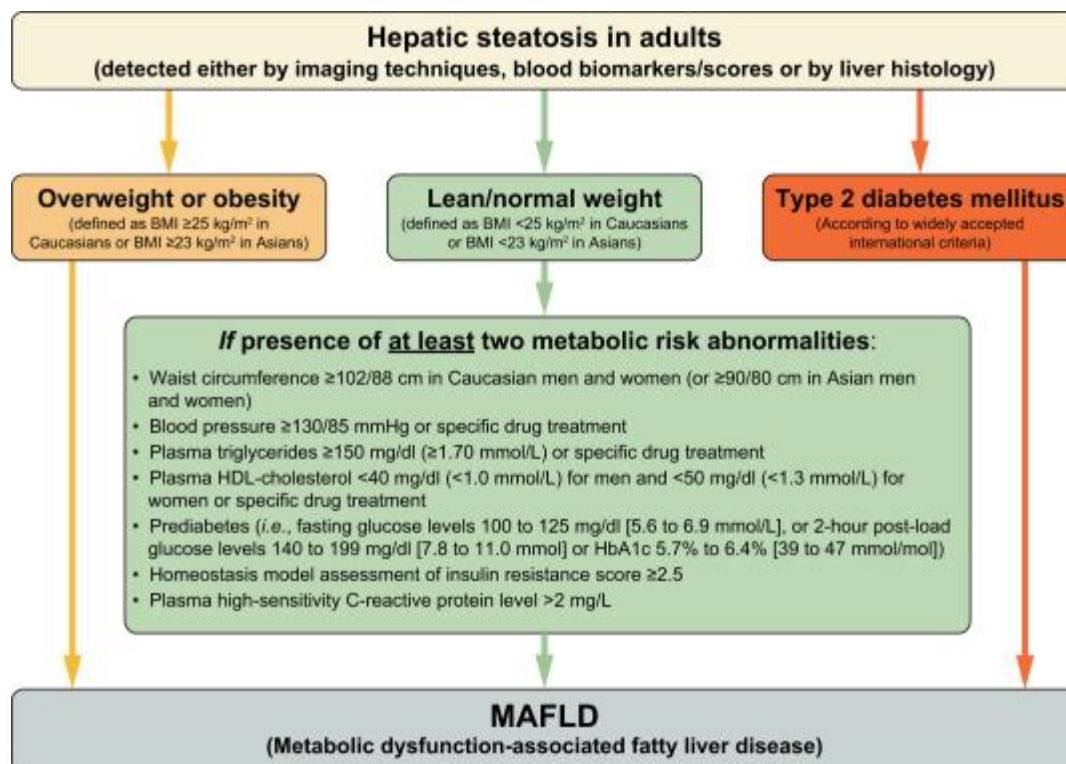


Figura 14. Diagrama de flujo para el diagnóstico de MAFLD. Combina la detección de esteatosis hepática por técnicas de imagen, estudio de biopsia hepática o biomarcadores, con la presencia de sobrepeso/obesidad, DM2 o disfunción metabólica/SM (aumento del perímetro abdominal, hipertensión arterial, dislipemia, prediabetes, presencia de RI o aumento de proteína C reactiva). Figura obtenida de: *Eslam M, et al. J Hepatol. 2020 Jul;73(1):202-9.*

1.7.1 Diagnóstico de esteatosis por imagen

La esteatosis hepática se define como la presencia de gotas lipídicas que afectan a >5% del tejido hepático. Se puede identificar de forma fiable mediante pruebas de imagen, destacando la ecografía abdominal. Es una técnica ampliamente utilizada y presenta gran disponibilidad en los centros sanitarios y un bajo coste. Sin embargo, tiene una sensibilidad limitada y detecta de forma fiable la esteatosis cuando comprende ≥20% de la masa hepática. Además, en pacientes con NASH, la capacidad de detección de esteatosis es menor por la presencia de fibrosis avanzada [94]. Otras técnicas de imagen para el diagnóstico de la esteatosis son la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Esta última detecta esteatosis con tan solo un 5% de afectación hepática, pero tiene un mayor coste [3,49].

1.7.2 Diagnóstico histológico

La prueba *gold standard* para el diagnóstico de NASH es el estudio histológico en biopsia hepática. Se deben cumplir una serie de características, como la presencia de esteatosis o gotas lipídicas en el interior de los hepatocitos, presencia de infiltrado inflamatorio y

balonización de los hepatocitos; además, pueden existir diferentes grados de fibrosis en diversas localizaciones del tejido [8].

Existen dos sistemas de gradación del NASH, el “NAFLD Activity Score” (NAS), de la Red de Investigación Clínica del NASH (NASH CRN) [95] y el “Steatosis Activity Fibrosis” del Consorcio europeo para la inhibición de la progresión del hígado graso [96]. El NAS diferencia esteatosis (grados 0-3), inflamación lobular (0-3), balonización celular (0-2) y fibrosis (0-4); además, informa del grado de actividad NASH como la suma de los grados de esteatosis, inflamación y balonización [28].

La balonización de los hepatocitos puede ser causada por el estrés oxidativo que afecta a microtúbulos y filamentos intermedios, retención de líquidos y acumulación anómala de grasa y dilatación del RE. Con frecuencia, pueden detectarse en el NASH cuerpos de Mallory-Denk, núcleos glucogenados, megamitocondrias, fibrosis pericelular y cuerpos acidófilos. La fibrosis suele distinguirse inicialmente en la zona perisinusoidal, y conforme progresa, se desarrolla en las áreas periportal y pericelular [8] (**Figura 15**).

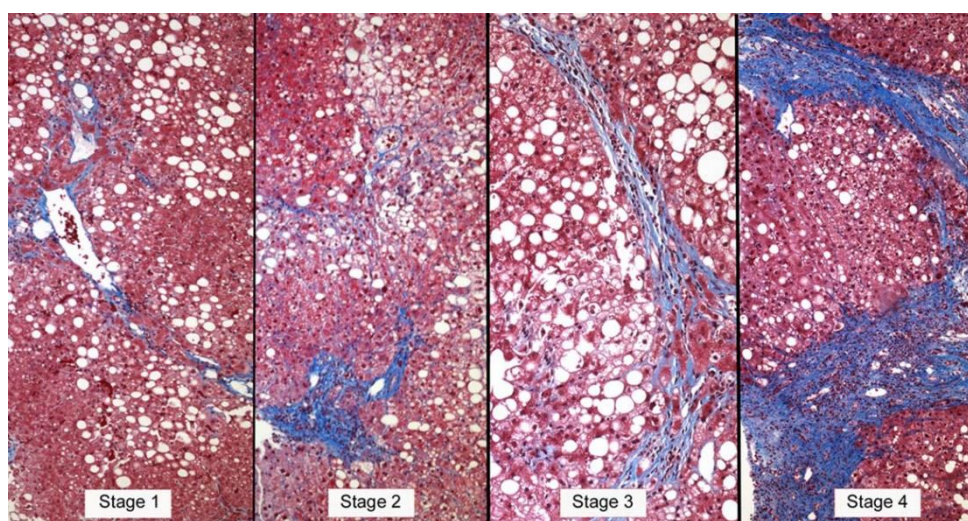


Figura 15. Estadios de fibrosis según el sistema de estadificación NASH CRN. Estadios F1 a F4 de izquierda a derecha. Las fibras de colágeno teñidas de azul ocupan inicialmente los sinusoides (F1), para después avanzar a fibrosis periportal (F2) y ocupar el parénquima hepático (F3), y finalmente desarrollar cirrosis (F4), donde los nódulos de hepatocitos están rodeados por tabiques fibrosos. Imagen obtenida de: *Younossi ZM, et al. Hepatology. 2018 Jul;68(1):349-60.*

Sin embargo, el estudio anatomopatológico no permite informar sobre la progresión de la enfermedad, ya que existen casos de evolución a estadios más graves, mientras otros en los que la lesión hepática puede estabilizarse o revertir. Actualmente, existe un debate si los pacientes con esteatosis aislada y un componente inflamatorio leve tienen un curso tan benigno de la enfermedad como aquellos únicamente con esteatosis [8].

El estudio de biopsia hepática solo puede aplicarse en casos de alta sospecha de

enfermedad hepática y no como método de *screening* o cribado, requiere la participación de personal especializado e instalaciones sanitarias adecuadas. Además, es un proceso invasivo que puede implicar complicaciones clínicas en los pacientes [97]. Es un método dependiente del observador, en el que puede haber hasta un 20% de discrepancias, pudiendo subestimar la cirrosis hepática. Finalmente, el error de muestreo asociado al método puede ocasionar errores diagnósticos en muestras no representativas [98,99].

1.7.3 Diagnóstico de fibrosis por imagen

La técnica principal de diagnóstico no invasivo de fibrosis hepática es la elastografía de transición (ET) o Fibroscan®. Evalúa la rigidez hepática (medida en kPa) según la velocidad de propagación de ondas de ultrasonido, en la que se requieren 10 medidas válidas para valorar correctamente la rigidez hepática, debido a la variabilidad de cada medida. La grasa abdominal en personas obesas interfiere en la onda de propagación, por lo que es necesario el uso de la sonda XL, en vez de sonda M [94,100]. La definición actual de MAFLD permite identificar de manera más eficiente los grupos con fibrosis significativa medida por ET, donde la desregulación metabólica, el sobrepeso/obesidad y la presencia de DM2 se utilizan como criterios clínicos esenciales en su diagnóstico [73].

Se ha reportado un área bajo la curva ROC (AUROC) de 0,83 y un valor predictivo negativo (VPN) del 90% y una precisión diagnóstica del 80,8% para diferentes grados de fibrosis [28]. Según el interés en descartar fibrosis o detectar fases avanzadas, se han descrito diferentes puntos de corte. Para la detección de fibrosis significativa (F2-4), se ha reportado un valor discriminante o cut-off de **7,0** kPa, con una sensibilidad del 79,2% y especificidad del 75,9% [101]. Otros estudios, proponen **≥8,0** kPa, que necesita confirmación mediante estudio histológico [102]. Para la detección de fibrosis avanzada (F3-4) se ha reportado un cut-off de 9,9 kPa con una sensibilidad del 95% y especificidad del 77% [29]. En caso de cirrosis hepática, la ET presenta gran reproducibilidad con un AUROC de 0,90 marcando un valor discriminante de **12,1** kPa [103,104].

Actualmente, la ET va acompañada de la medida del parámetro de atenuación controlada (CAP), que informa del grado de esteatosis según la atenuación de la onda de ultrasonidos (medida en dB/m). Los cut-offs **281-310** dB/m alcanzan una sensibilidad del 64-100% y una especificidad del 53-92% para la detección de esteatosis en grado 3 [28]. Según un metaanálisis reciente, el AUROC alcanzada fue de **0,87** para grados 2-3 de esteatosis frente a grados 0-1 [94,105].

Como limitaciones de la ET, destacan la necesidad de ayuno del paciente, menor

aplicabilidad en obesidad y ascitis y dependencia de la experiencia del operador [100,103]. Otras técnicas de imagen para la detección de la fibrosis hepática son la elastografía de onda de corte puntual (pSWE), elastografía de onda de corte 2D (2D-SWE) y elastografía por resonancia magnética (MRE) [94].

1.7.4 Biomarcadores séricos del MAFLD

La principal necesidad aún no resuelta es el desarrollo de biomarcadores que puedan diagnosticar NASH y determinar la gravedad de la enfermedad con precisión. Sin embargo, la naturaleza dinámica de la enfermedad e incluso la variación significativa del estadio de fibrosis en cortos períodos de tiempo, limitan la interpretación de cualquiera de ellos [28].

Se han desarrollado diferentes índices basados en la combinación de datos clínicos y antropométricos con biomarcadores séricos para la evaluación no invasiva, tanto de la esteatosis hepática, como la fibrosis. Sin embargo, los biomarcadores de fibrosis hepática son los que tienen mayor interés clínico, por su elevado valor pronóstico en el MAFLD. Tienen un elevado VPN para descartar fibrosis avanzada, por lo que se usan como cribado inicial de fibrosis. Sin embargo, requieren la confirmación de un resultado positivo mediante otros tests [3,105].

1.7.4.1 Fatty liver index

Para el diagnóstico de esteatosis, destaca el “Fatty liver index” (FLI), conformado por la concentración de triglicéridos (TG) (mg/dL), gamma-glutamyl transferasa (GGT) (UI/L), IMC (kg/m²) y perímetro abdominal (PA) (cm) según la fórmula:

$$\frac{e^{0,953 \times \ln(TG) + 0,139 \times IMC + 0,718 \times \ln(GGT) + 0,053 \times PA - 15,745}}{1 + e^{0,953 \times \ln(TG) + 0,139 \times IMC + 0,718 \times \ln(GGT) + 0,053 \times PA - 15,745}} \times 100$$

Tiene una buena sensibilidad diagnóstica de esteatosis (sensibilidad del 87% cuando FLI ≥ 60) valorada por ecografía, pero no distingue entre grados de esta [94]. Se ha propuesto como método de cribado de MAFLD en población de riesgo, previo a la realización de fibroscan, lo que permite realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad [106].

1.7.4.2 Fibrosis index 4

El “Fibrosis index 4” (FIB-4) está conformado por la concentración de AST (UI/L), ALT (UI/L), recuento de plaquetas (10⁹/L) y edad (años) y se calcula por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Edad} \times \text{AST}}{\text{Plaquetas} \times \sqrt{\text{ALT}}}$$

Fue desarrollado inicialmente para la detección de fibrosis en pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis C (VHC) [107]. Tiene un VPN >90% para la exclusión de la fibrosis avanzada (F3-4), por lo que su uso está extendido en poblaciones con baja prevalencia de fibrosis hepática. Se han descrito dos cut-offs para la interpretación del índice en el MAFLD: FIB-4<1,30 (exclusión de F3-4 con alta fiabilidad) y FIB-4>2,67 (alto valor predictivo positivo [VPP] y especificidad del 96% para F3-4) [105]. Sin embargo, se ha reportado un uso limitado del FIB-4 en población afecta de diabetes debido a una tasa de falsos negativos (FIB-4<1,30) del 21%, frente al 6% en no diabéticos [108].

1.7.4.3 NAFLD fibrosis score

El “NAFLD fibrosis score” (NFS) ha sido desarrollado y validado en una cohorte de pacientes con MAFLD diagnosticado por biopsia. Está conformado por la edad (años), IMC (kg/m²), presencia de DM2 o RI (sí=1; no=0), ratio AST/ALT, recuento de plaquetas (PLT) (10⁹/L) y concentración de albúmina (Alb) (g/dL) según la fórmula:

$$-1,675 + 0,037 \times \text{edad} + 0,094 \times \text{IMC} + 1,13 \times \text{DM2/RI} + 0,99 \times \text{AST/ALT} - 0,013 \times \text{PLT} - 0,66 \times \text{Alb}$$

Se han descrito dos valores discriminantes para la interpretación del índice: NFS<-1,455 (descarta fibrosis avanzada con un VPN del 88%) y NFS>0,676 (confirma fibrosis avanzada con un VPP del 82%) [29,109]. El NFS, junto con el FIB-4, aportan valor pronóstico, ya que son capaces de predecir mortalidad global, mortalidad cardiovascular y mortalidad de causa hepática [3,110].

1.7.4.4 Enhanced Liver Fibrosis

El “Enhanced Liver Fibrosis” (ELFTM) es un panel patentado que combina los resultados de la medida de tres componentes implicados en la síntesis y degradación de ECM, procesos clave en la fibrosis hepática: inhibidor de la metaloproteinasa de matriz tipo 1 (TIMP-1), ácido hialurónico (HA) y péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) (**Figura 13**). Se calcula mediante la fórmula:

$$\text{ELF} = 2,278 + 0,851 \times \ln(\text{HA}) + 0,751 \times \ln(\text{PIIINP}) + 0,394 \times \ln(\text{TIMP-1})$$

Tiene un AUROC de 0,90 con una sensibilidad global del 80% y especificidad del 90% para la detección de fibrosis avanzada [29,111]. Se han descrito diferentes cut-offs para

estratificar los pacientes en diferentes grados de fibrosis: $ELF < 7,7$ (ausencia de fibrosis o no significativa, F0-1) y $ELF \geq 9,8$ (presencia de fibrosis avanzada, F3-4). Los valores intermedios ($7,7 \leq ELF < 9,8$) corresponderían a fibrosis moderada, F2 [103,112]. Otros cut-offs propuestos han sido $ELF \leq 8,4$, exclusión de fibrosis avanzada con una sensibilidad del 95%, $ELF \geq 10,8$ para confirmar fibrosis avanzada con una especificidad del 92%, y $ELF > 11,3$ como discriminador de cirrosis [113,114].

El ELF es una herramienta útil para la detección de NASH y fibrosis avanzada en estadios tempranos en población con obesidad y MAFLD [115]. Además, es un buen predictor de eventos clínicos derivados de la hepatopatía crónica [116]. Sin embargo, la edad incrementa los valores normales de este índice, por lo que ha de tenerse en cuenta su interpretación con el envejecimiento [114].

La medida del ELF puede realizarse mediante las plataformas automatizadas de inmunoensayo por quimioluminiscencia (CLIA) ADVIA Centaur o Atellica® IM Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics), en las que se obtiene simultáneamente la concentración individual de cada analito y el cálculo resultante [117].

1.7.4.5 Otros índices de fibrosis

Se han descrito otros índices de fibrosis, como el BARD (conformado por la AST, ALT, IMC y la presencia de DM2), el índice del ratio AST/plaquetas (APRI), el ratio AST/ALT (especificidad para F3-4 del 80%) y el Hepamet (conformado por sexo, edad, presencia de DM2, glucosa, insulina, HOMA-IR, AST, albúmina y plaquetas) [94,118].

Además, existen paneles específicos de fibrosis patentados, como el Fibrotest®, conformado por la GGT, bilirrubina total, alfa-2 macroglobulina, apolipoproteína AI y haptoglobina; o el Fibrometer NAFLD™, conformado por la edad, peso, recuento de plaquetas, ALT, AST, ferritina y glucosa [94].

1.7.5 Polimorfismos en *PNPLA3* y *TM6SF2*

El estudio de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926 permite evaluar el riesgo de padecer una enfermedad más severa, debido a la asociación de estos con mayor grado de esteatosis, NASH y fibrosis [57,61,103,119]. Aunque no formen parte de los protocolos de diagnóstico no invasivo, sí se recomienda su estudio en población de riesgo, para predecir el curso de la enfermedad y la posible respuesta a tratamientos, incluidos los trasplantes hepáticos [3,58,65].

El incremento en el número de alelos mutados de ambos genes ocasiona un mayor riesgo de MAFLD, de hasta casi 5 veces con la presencia de tres alelos de riesgo [120]. Por otro lado, se ha reportado un Odds ratio (OR) = 5,5 y un OR = 2,2 para F2-4, frente a F0-1, en pacientes con mutación en homocigosis de las variantes I148M y E167K, respectivamente [66]. Además, el efecto combinado de la variante I148M con la RI, ocasiona un incremento de esteatosis hepática >50%, y en presencia de DM2 aumenta al doble el riesgo de fibrosis y enfermedad coronaria [121,122].

El estudio de ambos polimorfismos puede realizarse mediante genotipado alelo-específico por técnicas de PCR cuantitativa (qPCR), en las que se analizan curvas de fusión o *melting* por el uso de sondas de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) [123]. Actualmente existen kits comerciales (LightSNiP, TIB MOLBIOL) adaptados para su uso directo en termocicladores de qPCR (LightCycler, Roche Molecular Systems®).

1.7.6 Estratificación del riesgo

La mayoría de los pacientes con MAFLD son asintomáticos sin resultados clínicamente relevantes en pruebas rutinarias, aunque progresen rápidamente. En muchos casos, el diagnóstico es casual, e incluso una vez identificado, es difícil apreciar el grado de avance de la enfermedad [4,49].

Dada la dificultad diagnóstica, las guías clínicas de la Sociedad europea del estudio del hígado (EASL) y la Asociación americana del estudio de las enfermedades hepáticas (AASLD) recomiendan que la detección de MAFLD en la atención primaria o comunitaria debe ser dirigida a la población de riesgo, debido a los altos costes directos e indirectos de las pruebas, el limitado valor predictivo de las pruebas no invasivas, los riesgos de la biopsia hepática y la falta de tratamientos efectivos. En personas obesas o con SM, el cribado de MAFLD, mediante ecografía o medida de las enzimas hepáticas, debe formar parte de la práctica asistencial. Además, en población con edad >50 años o DM2, la detección precoz de NASH y fibrosis avanzada resulta aconsejable [29,43].

En este sentido, la DM2 puede considerarse el principal factor de riesgo metabólico para NASH en personas con esteatosis confirmada. Se han desarrollado modelos predictivos de NASH y fibrosis que incluyen enzimas hepáticas, IMC, etnia y el cálculo del HOMA-IR (modelo de evaluación homeostático de la resistencia a la insulina) [124]. Este índice evalúa indirectamente la RI hepática [125] mediante la fórmula:

$$\frac{\text{glucosa (mg/dL)} \times \text{insulina (\mu U/mL)}}{405}$$

Se han descrito diferentes valores de referencia que fluctúan en función de la edad, sexo e IMC. Por ejemplo, el límite superior de normalidad (LSN) de **3,02** en población caucásica (correspondiente al percentil 75), como marcador de RI hepática (especificidad del 83%). Sin embargo, se han de tener en cuenta otros factores de riesgo metabólicos, como la obesidad, en cuyo caso, el LSN más adecuado es **3,42** (especificidad del 81%) [126].

Por otro lado, las personas con esteatosis hepática deben someterse a pruebas de detección de características de SM (estudio de dislipemia, hipertensión arterial [HTA], metabolismo glucídico y RI, y valoración antropométrica), independientemente de las enzimas hepáticas. Además, todas las personas con enzimas hepáticas persistentemente anormales deben someterse a pruebas de detección de MAFLD, ya que es la razón principal del aumento inespecífico de las enzimas hepáticas [43].

A la hora de estratificar el riesgo de hepatopatía avanzada y fibrosis, se ha de combinar el uso de biomarcadores no invasivos, junto con pruebas más específicas. Este ejercicio requiere la asociación y el trabajo coordinado entre la atención sanitaria primaria y la especializada o secundaria, teniendo en cuenta también la heterogeneidad clínica de los pacientes con MAFLD, y así evitar retrasos diagnósticos y permitir la selección del mejor tratamiento [127].

1.7.7 Algoritmos diagnósticos

Los algoritmos diagnósticos reportados se basan en el uso combinado de biomarcadores de alto VPN de fibrosis avanzada, como el FIB-4 o NFS, y pruebas más sensibles, como paneles séricos de fibrosis como el ELF, o pruebas de imagen como la ET. Según se defina el marco clínico o la población diana, los biomarcadores pueden discriminar entre pacientes con NASH o fibrosis avanzada, predecir cambios dinámicos a lo largo del tiempo y proporcionar información pronóstica a largo plazo [4,128].

El entorno sanitario donde se utilicen los diferentes algoritmos, por ejemplo en atención primaria o en una consulta especializada de diabetes, requiere el uso de diferentes cut-offs para los distintos biomarcadores o pruebas de imagen que puedan aplicarse de manera secuencial, ya que la prevalencia y severidad del NASH y fibrosis pueden variar, y por tanto el coste/efectividad de las pruebas es distinto [105]. De esa manera, los pacientes son clasificados en alto o bajo riesgo de enfermedad avanzada, en base a su perfil clínico y la

predicción basada en biomarcadores. Los pacientes identificados como bajo riesgo de NASH o fibrosis no significativa, pueden ser tratados en atención primaria, evaluando periódicamente el riesgo, y aquellos con elevado o alto riesgo, requerirían un seguimiento en la consulta del especialista y la evaluación continuada de la rigidez hepática en base a tratamientos más específicos [28,129].

La guía de la EASL ha propuesto un algoritmo para su aplicación en atención primaria o comunitaria, que se centra en personas de riesgo de enfermedad hepática crónica con factores de riesgo metabólicos. En él, se calcularía inicialmente el FIB-4, y aquellos pacientes con valores intermedios ($\text{FIB-4} \geq 1,3$), se realizaría una medida de la ET. Aquellos valores ≥ 8 kPa podrían confirmarse con test séricos patentados, como el ELF, Fibrometer o Fibrotest, y ante una concordancia de resultados, se confirmaría alto riesgo de F3-4; en caso de discordancia, se requeriría la confirmación por biopsia hepática [103] (**Figura 16**).

Como alternativa al FIB-4, también puede utilizarse el NFS en población con esteatosis diagnosticada por ecografía y factores metabólicos, como obesidad y DM2. Aquellos con FIB-4 o NFS con valores intermedios, se mediría el ELF, u otros tests similares. En caso de un valor superior al cut-off definido, $\text{ELF} \geq 10,35$ por ejemplo, se clasificarían como alto riesgo de F3-4, con un VPP del 75-90% y una prevalencia estimada del 12-15% [128] (**Figura 16**).

El paso de atención primaria a especializada es un elemento clave en el éxito de los algoritmos descritos, para un diagnóstico eficiente de la fibrosis avanzada. Se han reportado diferentes escenarios, mediante el uso combinado de biomarcadores séricos (FIB-4), paneles específicos (ELF), pruebas de imagen (ET) y atención sanitaria convencional (standard of care, SOC). De todos ellos, el cribado inicial de F3-4 mediante FIB-4 y SOC, y la medida del ELF (cut-off $\geq 9,5$) en valores intermedios de FIB-4 permitirían detectar hasta un 100% más la presencia de fibrosis avanzada, reducir en un 70% las derivaciones al especialista, seleccionando solo aquellos pacientes de alto riesgo, y una reducción global del 25% del gasto sanitario [4,130,131].

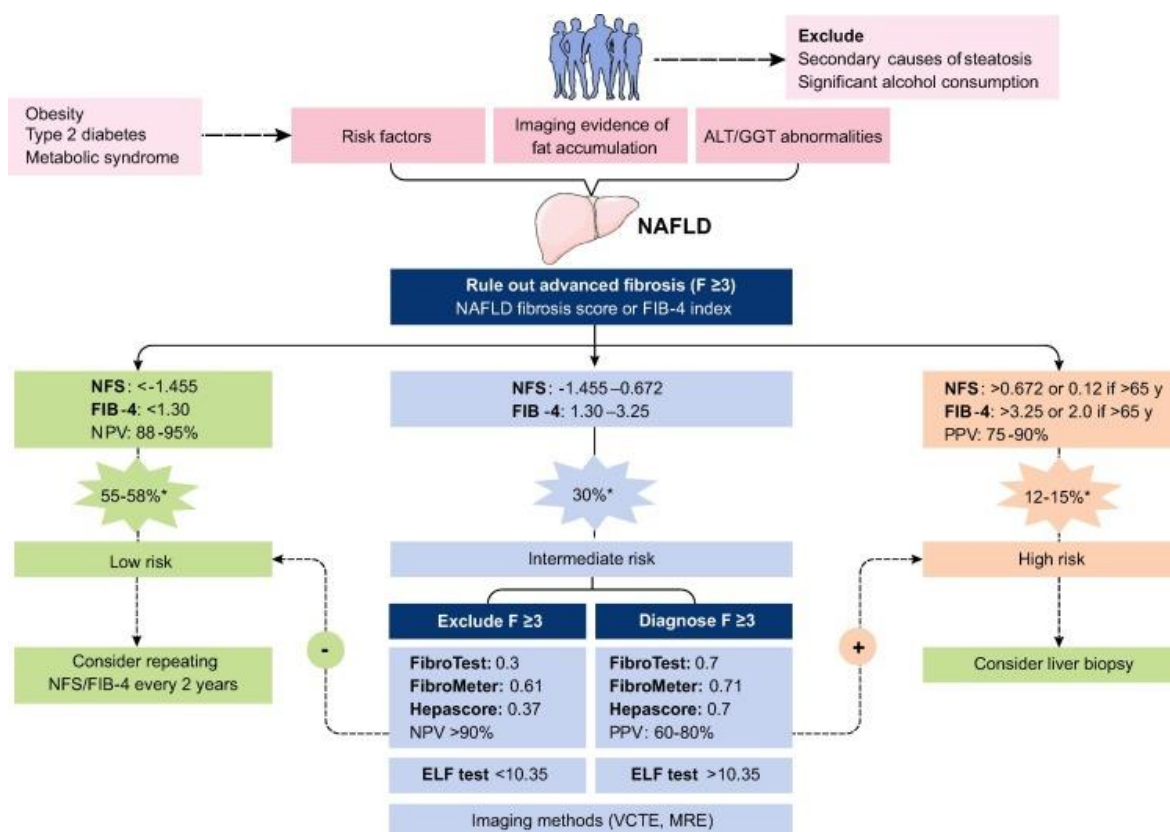


Figura 16. Algoritmo para evaluar de forma no invasiva a pacientes con MAFLD y fibrosis avanzada mediante reglas de predicción y biomarcadores en sangre. Los criterios para sospechar fibrosis hepática incluyen factores de riesgo metabólico, diagnóstico de esteatosis hepática por imagen y alteraciones en las enzimas hepáticas, excluyendo cualquier causa secundaria. Valores de FIB-4 o NFS por debajo del cut-off menor, o por encima del cut-off superior, excluyen o confirman F3-4 respectivamente. Para los valores intermedios, clasificados como riesgo intermedio, se utilizan paneles más específicos, como el ELF o la ET. *Prevalencia estimada para grupos de riesgo bajo, intermedio y alto. Figura obtenida de: Vilar-Gomez E and Chalasani N. *J Hepatol.* 2018 Feb;68(2):305-15.

1.8 Diagnóstico de la obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica compleja y heterogénea que no se presenta de la misma manera en todos los pacientes y que requiere tratamiento individualizado y apoyo a largo plazo. Además, las personas con obesidad enfrentan importantes prejuicios y estigmas, que contribuyen al aumento de la morbilidad y la mortalidad independiente del peso [132].

Se debe promover un enfoque holístico en su diagnóstico, valorando los comportamientos de salud en los pacientes y así abordar las causas fundamentales del aumento de peso. La medición directa de la altura, el peso y el perímetro abdominal, y el cálculo del IMC deben incluirse en el examen físico de rutina. Se debe evaluar el RCV de cada paciente con la medida de la presión arterial y el estudio del perfil lipídico. Debido a su estrecha relación con la RI y la DM2, el cálculo del HOMA-IR y la medida de HbA1c son necesarias. En el diagnóstico se tiene estudiar también el perfil hormonal de cada paciente [132].

Dentro de las pruebas de imagen utilizadas en el diagnóstico de la obesidad, la ecografía abdominal permite evaluar la presencia de esteatosis hepática y/o MAFLD [132]. Dada la estrecha relación entre ambas entidades, los algoritmos diagnósticos contemplan la valoración de ambas enfermedades, con el fin de clasificar o estratificar al paciente según la disfunción metabólica, probabilidad de complicaciones o RCV [43].

La evaluación de la composición corporal por técnicas no invasivas basadas en la resonancia magnética permite conocer la adiposidad visceral o el crecimiento de tejido adiposo ectópico en el músculo, implicados en la fisiopatología y severidad de la obesidad. Los estudios de densitometría y bioimpedancia ayudan a conocer el porcentaje de grasa corporal [133,134].

1.8.1 Biomarcadores séricos de la obesidad

La función endocrina del tejido adiposo y la secreción de diversas citoquinas y adipocinas, se han propuesto como un vínculo biológico entre la obesidad y las enfermedades crónicas. La medida de estos mediadores permite evaluar el grado de inflamación y disfunción del tejido adiposo, y sus consecuencias metabólicas [134]. El conocimiento de ciertos biomarcadores permitiría también la cuantificación del tejido adiposo metabólicamente activo y definir así un "fenotipo de obesidad", además de resultar útiles en todas las etapas de la gestión de la enfermedad: prevención, diagnóstico, pronóstico, tratamiento, etc [135].

1.8.1.1 Citoquinas

En el tejido adiposo de las personas con obesidad, la liberación de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL6 está aumentada, las cuales estimulan la secreción hepática de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR) [136,137]. La PCR es el biomarcador inflamatorio más estudiado, sin embargo, se necesitan ensayos de alta sensibilidad (hsPCR) para determinar la inflamación crónica de bajo grado. Las concentraciones más elevadas de PCR se han asociado a un mayor riesgo de ECV, ictus isquémico y mortalidad, además de sarcopenia [134,138]. Por otro lado, la obesidad abdominal se asocia con un aumento de IL6 , mientras que el IMC y el perímetro abdominal se relacionan con los niveles de $\text{TNF}\alpha$ [138]. Con respecto a este último, se ha reportado una mayor concentración en personas con DM2 frente a normoglicémicas, ambas con obesidad, lo que se asocia a mayor apoptosis y daño tisular [139]. Los efectos del $\text{TNF}\alpha$ son el aumento de la lipólisis (lo que contribuye a la sobrecarga de ácidos grasos en el citosol de los adipocitos y a la RI) y el incremento de la adhesión celular y quimiotaxis, activando citotoxicidad de macrófagos

[136]. Finalmente, en un metaanálisis reciente se describió que el aumento de IL6 y TNF α se asocian a mayor riesgo relativo de ECV [135].

1.8.1.2 Adipoquinas

Las adipoquinas más abundantes y mejor conocidas son la leptina y la adiponectina. La expresión de adiponectina está disminuida en el tejido adiposo en personas con obesidad, desempeña un papel en el metabolismo energético y ejerce un efecto antiinflamatorio y sensibilizador a la insulina [134]. La concentración de adiponectina se correlaciona inversamente con la obesidad y los niveles de citoquinas inflamatorias en la DM2; por otro lado, las citoquinas proinflamatorias reducen la expresión de adiponectina en los adipocitos, y viceversa, se ha demostrado en estudios *in vitro* la inhibición de TNF α al tratar macrófagos con adiponectina [140].

La leptina refleja la masa de tejido adiposo, la mayor concentración de leptina en personas con obesidad sugiere un estado de resistencia a esta. Se considera una adipoquina proinflamatoria, ya que se correlaciona con factores de RCV [134]. Otras adipoquinas que pueden actuar como biomarcadores de obesidad son el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1), la adiposina o la resistina [138,141].

1.8.1.3 Hepatoquinas

Las hepatoquinas engloban un conjunto de proteínas secretadas por el hígado, como factores de crecimiento, globulinas transportadoras y factores quimiotácticos, y tienen un papel esencial en la comunicación del hígado con otros tejidos y órganos. Se ha demostrado que las hepatoquinas regulan directamente la expansión del tejido adiposo, la inflamación y el metabolismo de los lípidos, orquestando así la homeostasis sistémica de la glucosa y los lípidos [142].

El metabolismo de la insulina está estrechamente relacionado con el sistema del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). La hiperinsulinemia conduce a una mayor biodisponibilidad de IGF-1 libre y activo, y a su mayor síntesis hepática, lo que tiene implicaciones en la proliferación, diferenciación y migración celular, influyendo en el riesgo de cáncer y RCV [134,135].

Como se ha comentado anteriormente, las personas con obesidad tienen una concentración menor de SHBG, y, por tanto, se considera un predictor de RI y riesgo cardiometabólico. El aumento de IL1 β , IL6 y TNF α presentes en las personas con obesidad,

y la disminución de adiponectina, ocasionan una reducción en la expresión hepática de esta proteína [21]. Tanto es así, que se ha descrito que la expresión hepática y la concentración sérica de SHBG son inversamente proporcionales al IMC, perímetro abdominal y la concentración de triglicéridos [93,143]. En este sentido, se ha reportado una reducción de más del 50% de la concentración de SHBG en personas con obesidad severa ($\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$) [144]. Además, el efecto mediador de la SHBG entre tejidos con función endocrina le otorga un rol esencial en los procesos fisiopatológicos de enfermedades como el cáncer de mama y próstata, osteoporosis, SOPC, además del SM y obesidad [145].

Otras hepatoquinas implicadas en la obesidad y remodelación del tejido adiposo son el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), adropina, dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) o selenoproteína P [142].

1.8.1.4 Nuevos biomarcadores

Los nuevos biomarcadores son las denominadas “ómicas”, donde se encuentran la genómica, transcriptómica, proteómica, lipidómica y metabolómica. En este contexto, se requieren herramientas bioinformáticas de alto rendimiento para identificar firmas de riesgo de la enfermedad; no obstante, su aplicación se encuentra aún en una fase incipiente [135].

1.9 Tratamiento y manejo clínico del MAFLD y la obesidad

El tratamiento del MAFLD y la obesidad tiene que ser abordado desde múltiples puntos de vista [9,29], desde la búsqueda de dianas terapéuticas localizadas en el hígado, tejido adiposo o intestino, implicadas en la patogénesis del NASH y fibrosis, a cambios en los hábitos de vida, destacando la dieta y ejercicio físico, o la cirugía bariátrica (CB). De tal manera que el conjunto de comorbilidades que conforman en SM sean tratadas, ya sea RI, DM2 o dislipemia [29,146].

El trasplante hepático también puede ser una opción de tratamiento en casos de cirrosis por NASH, por el riesgo asociado también al desarrollo de CHC [3]. Según las guías europeas, las enfermedades hepáticas en su conjunto son generalmente tratables si las medidas de prevención y detección precoz son debidamente implementadas, así, se podrían reducir la morbilidad y mortalidad prematuras, beneficiándose alrededor de 300000 personas al año en Europa [127].

Por otro lado, la atención de la obesidad debe basarse en principios basados en la evidencia de manejo de enfermedades crónicas, ir más allá de enfoques simplistas y

abordar las causas fundamentales. Las personas que viven con obesidad deberían tener acceso a información basada en evidencia y un abanico de intervenciones, incluyendo terapia de nutrición médica, actividad física, intervenciones psicológicas, farmacoterapia y cirugía [132].

1.9.1 Tratamiento farmacológico

Actualmente no existe un tratamiento farmacológico comercializado específico del NASH, sino que todos ellos están en fases clínicas 2 y 3. El paradigma del fármaco ideal es que trate el NASH y la fibrosis y mejore los factores de riesgo cardiometabólicos, pero aún no se ha podido encontrar una combinación de estos capaz de desentrañar las complejidades de esta enfermedad. Por otro lado, la variabilidad fenotípica y los distintos ritmos de progresión de la enfermedad complican la selección de pacientes y la fijación de objetivos en los diferentes ensayos. Así, la pérdida de peso y los cambios en el estilo de vida siguen siendo los tratamientos más seguros y efectivos, pero su efecto es limitado en la fibrosis avanzada o cirrosis, y la adherencia a largo plazo es difícil de alcanzar [147,148].

Las dianas terapéuticas incluyen aquellas que regulan la homeostasis de lípidos y glucosa, implicadas en el estrés oxidativo, cambios mitocondriales en hepatocitos, señales inflamatorias y de activación de células estrelladas para la fibrogénesis. Algunos de ellos son los agonistas del receptor farnesoide X (FXR) o antagonistas del receptor C-C de quimiocina (CCR). Otros, como los ligandos del PPAR γ , agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1AR) y antagonistas del cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT2) están implicados en la RI y DM2 [49,147-149]. Los GLP-1AR son actualmente los más prometedores al mejorar significativamente la sensibilidad hepática y del tejido adiposo a la insulina, y disminuir la lipogénesis *de novo*, la lipólisis del tejido adiposo, la producción hepática de glucosa y el estrés oxidativo [7]. La vitamina E, por ser un antioxidante, sí tiene un efecto positivo en la mejora de esteatosis e inflamación, pero no tiene efecto en presencia de DM2 y en la reducción de fibrosis hepática [3,29].

No está completamente dilucidado si las mejoras en el MAFLD pueden mejorar el riesgo de DM2 o mejorar el control glucémico en las personas con MAFLD que ya han desarrollado DM2. Sin embargo, sí es plausible que la resolución de la esteatosis hepática y una mejora en el metabolismo lipídico podrían modificar el riesgo de DM2 a través de un efecto específico del hígado, mediado por la secreción de múltiples hepatoquinas, como la SHBG, o citoquinas inflamatorias que influyen en el riesgo de DM2 [31].

La farmacoterapia enfocada en la pérdida de peso en personas con obesidad tiene que

utilizarse junto con terapia médica nutricional, actividad física e intervenciones psicológicas. El objetivo principal es mantener la pérdida de peso lograda mediante la farmacoterapia y prevenir la recuperación del peso. Los principales fármacos utilizados para la pérdida de peso son el orlistat (inhibidor de lipasa intestinal) y la liraglutida (GLP-1AR), cuyos efectos también influyen en el control glicémico [10,132]. Otros fármacos en fase de ensayo clínico tienen efectos en la lipólisis, hormonas intestinales o termogénesis. A nivel de sistema nervioso central, los fármacos más utilizados interfieren en la acción de diversos neurotransmisores, de la leptina y otros neuropéptidos [150].

1.9.2 Cambio del estilo de vida

En cuanto al manejo práctico del MAFLD y la obesidad mediante cambios en el estilo de vida, se recomienda reducir la ingesta calórica, dietas bajas en grasas saturadas e hidratos de carbono, evitar el consumo de refrescos azucarados y minimizar el consumo de comida rápida para decantarse por dieta mediterránea [150]. Las recomendaciones nutricionales se tienen que personalizar para satisfacer las preferencias y objetivos de tratamiento de cada persona, y así promover un enfoque dietético seguro, eficaz, nutricionalmente adecuado, culturalmente aceptable y asequible para el cumplimiento a largo plazo [132].

También se recomienda realizar ejercicio físico 2-3 veces por semana y evitar sedentarismo, con el fin de prevenir o reducir la esteatosis hepática. Los objetivos de pérdida de peso han de ser realistas y tienen que ir acompañados de mejora de autoestima para fijar la adherencia [3,29,150]. La pérdida significativa de peso, independientemente del mecanismo implicado, tiene un efecto positivo en el NASH, ya que una pérdida del 7-10% comporta una mejora en la esteatosis y reducción en la fibrosis hepática [29,49]. Desde el punto de vista de la obesidad, la reducción sostenida del peso permite una mejora de la calidad de vida, disminución del RCV y menor morbilidad [150].

1.9.3 Cirugía bariátrica

La CB representa una opción duradera para la pérdida de peso y mejora en las alteraciones metabólicas asociadas, además, está asociada con una reducción de la mortalidad en personas con obesidad [151]. Las guías europeas recomiendan la CB en pacientes entre 18 y 60 años con un IMC ≥ 40 kg/m² o un IMC ≥ 35 kg/m² además de otras comorbilidades. La pérdida de peso también ocasiona una mejora en el resto de desórdenes asociados, como la DM2, enfermedad cardiorrespiratoria o problemas psicológicos derivados de la obesidad [152].

Las principales técnicas de CB son el bypass gástrico en Y de Roux (RYGB), la gastroplastia vertical con banda y la gastrectomía en manga. En cuanto a las mejoras en el MAFLD, las diferentes técnicas pueden alcanzar un 90% de resolución de esteatosis, un 80% de mejora en la esteatohepatitis y un 40-60% de mejora en la fibrosis, valoradas mediante biopsia hepática [29,153]. De este modo, la CB se considera la mejor opción terapéutica para la resolución del NASH y regresión de la fibrosis hepática a largo plazo [154,155]. Se han propuesto diversos mecanismos que explican estos cambios metabólicos, los cuales incluyen recuperación de la homeostasis biliar y de las hormonas gastrointestinales, los cuales favorecen la mejora en los hábitos alimenticios, aumento de sensibilidad a la insulina y recuperación de la microbiota intestinal [156] (**Figura 17**).

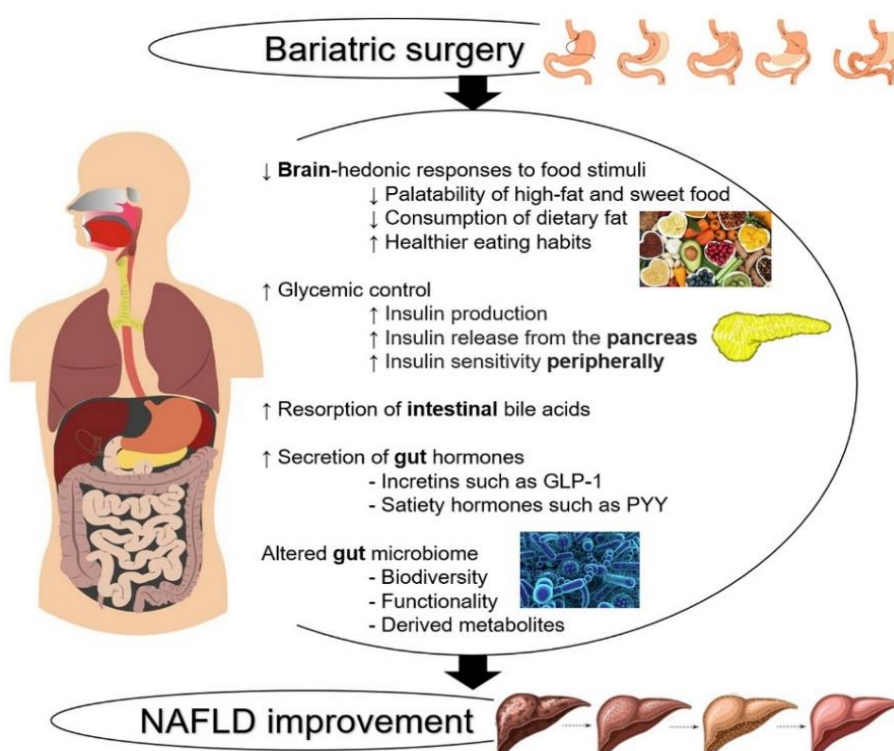


Figura 17. Cambios metabólicos derivados de la CB que permiten mejorar el perfil de MAFLD y daño hepático. Estos mecanismos incluyen la menor respuesta cerebral a estímulos de los alimentos grasos y azucarados que ayudan a mejorar los hábitos alimenticios, mejora del control glucémico, aumento de reabsorción de ácidos biliares, aumento de hormonas gastrointestinales como el GLP-1 y recuperación de la funcionalidad de la microbiota intestinal. Figura obtenida de: *Truong E and Nouredin M. Clin Liver Dis (Hoboken). 2022 Jul;20(1):13-7.*

Por otro lado, la pérdida de peso y perímetro abdominal tras la CB ocasiona un incremento rápido y prolongado de la concentración plasmática de SHBG y testosterona [157]. Aunque no se conocen los mecanismos implicados en el incremento de la síntesis hepática de SHBG, este aumento temprano podría reflejar la disminución de la RI con la rápida pérdida de peso y restricción calórica [151,158-160]. En este sentido, la restauración del balance de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias puede favorecer el aumento en la síntesis de SHBG y sus concentración en sangre [158,159,161]. La medida de SHBG, como

biomarcador de respuesta a la CB, puede realizarse en suero mediante el uso de kits comerciales, ya sean por métodos manuales como el ELISA o técnicas automatizadas (CLIA) en los laboratorios de diagnóstico clínico.

Los mecanismos implicados en los efectos metabólicos de la CB en el corto y medio plazo son desconocidos, pero pueden abarcar una interconexión hormonal entre diferentes órganos, como el hígado, y tejidos, como el adiposo y muscular, aumentando la secreción de factores antiinflamatorios, sensibilizantes a insulina y antilipémicos [136,160,162] (**Figura 17**).

No obstante, la respuesta a largo plazo a la CB puede ser variable. Existen dos índices (%) para la evaluación y seguimiento de la respuesta:

- Pérdida de exceso de peso (EWL en inglés), que se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Peso perdido}}{\text{Exceso de peso}} \times 100$$

- Pérdida de peso total (TWL en inglés), que se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Peso inicial} - \text{peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Se considera buena respuesta a la CB cuando el EWL es superior al 50% o el TWL es mayor al 25% [163].

Sin embargo, existe una proporción de pacientes que no responden a la CB según lo esperado y sufren un estancamiento de la pérdida de peso o una reganancia de peso (WR en inglés) en el medio plazo [164]. Esta respuesta se ve reflejada en el EWL y TWL, cuyos valores no superan los valores discriminantes establecidos (EWL<50% y TWL<25%), además de que las reintervenciones quirúrgicas son habituales [165]. En un metaanálisis reciente, se ha reportado que un 18% de los pacientes sometidos a CB sufrió WR >10%, destacando como factores asociados cambios anatómicos, hormonales, dietéticos, psicológicos y predisposición genética [166].

El cálculo de WR puede medirse mediante [167]:

- Recuperación absoluta de peso o de IMC.
- Porcentaje de peso respecto al previo a la cirugía.
- Porcentaje de peso recuperado respecto al nadir.

- Porcentaje de peso máximo perdido.

La reganancia de peso está asociada con un deterioro de la calidad de vida y la reaparición o empeoramiento de las comorbilidades asociadas, como HTA y DM2, lo que implica mayor control médico y un manejo apropiado. No se conocen con certeza qué factores previos a la CB pueden ser valorados para prevenir la reganancia ponderal y adaptar el seguimiento postquirúrgico. Sí ha de tenerse en cuenta el IMC previo a la intervención, a mayor IMC, mayor WR; la edad también es fundamental, ya que se asocia a mayor WR; las condiciones mentales y desórdenes psicológicos también podrían predecir la WR; y las comorbilidades asociadas, de tal manera, que a mayor número de comorbilidades peor es la respuesta a la CB. No obstante, la influencia de estos factores es muy variable según los estudios reportados [168]. Por otro lado, la presencia de ciertos SNPs también pueden explicar la respuesta diferencial a la CB [169]. En consecuencia, ninguno de los factores estudiados permite predecir completamente la respuesta a la CB y la reganancia de peso [170].

Las alternativas terapéuticas para dirigir la tendencia de reganancia de peso incluyen cambios profundos en el estilo de vida, siendo la dieta un factor determinante; intervenciones farmacológicas para la supresión del apetito; y reintervenciones quirúrgicas [164]. Así, la predicción oportuna de esta repuesta resulta del todo necesaria con el fin de optimizar la intervención quirúrgica y favorecer la mejora en la calidad de vida de los pacientes [171,172].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Diversos biomarcadores y polimorfismos genéticos permiten detectar la fibrosis hepática en la enfermedad del hígado graso asociado a disfunción metabólica y predecir de manera precoz la respuesta a la cirugía bariátrica como tratamiento quirúrgico de la obesidad severa.

La primera hipótesis de este estudio es que los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926 se asocian a fibrosis hepática avanzada y su interacción con la diabetes determinan el riesgo de esta.

Objetivo 1: Determinar la influencia de la DM2 y RI sobre el valor predictivo de riesgo de fibrosis avanzada por NASH de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926

La segunda hipótesis es que los biomarcadores FIB4 y ELF permiten estratificar el riesgo de fibrosis avanzada.

Objetivo 2: Evaluar la capacidad diagnóstica de fibrosis avanzada mediante un algoritmo basado en la medida secuencial de ambos biomarcadores y valorar su implementación en población de riesgo.

La tercera hipótesis es que la SHBG se encuentra disminuida en la obesidad severa y aumenta después de la cirugía bariátrica de manera diferencial prediciendo la reducción de peso a los 24 meses.

Objetivo 3: Estudiar la capacidad predictora del aumento precoz de la SHBG en la respuesta a cirugía bariátrica y reganancia de peso.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Influencia de la diabetes tipo 2 en la asociación de los polimorfismos

PNPLA3 rs738409 y TM6SF2 rs58542926 en la fibrosis avanzada por NASH

El NASH es una de las principales causas de cirrosis en los países occidentales. A su vez, la fibrosis hepática es el principal signo de mal pronóstico en la hepatopatía crónica. La RI, la DM2 y los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 (p.I148M) y *TM6SF2* rs58542926 (p.E167K) son factores de riesgo independientes del NASH.

En este estudio se investigó la interacción entre la RI y la DM2 con estos polimorfismos en la patogénesis del NASH y el desarrollo de fibrosis avanzada.

Para ello, se diseñó un estudio transversal que incluyó pacientes diagnosticados de NASH mediante biopsia hepática y visitados en el servicio de hepatología del Hospital Universitari Vall d'Hebron. La evaluación histológica se realizó mediante los criterios CRN NASH. La cohorte fue subdividida según la presencia de DM2 siguiendo las guías de la Asociación Americana de Diabetes y la evaluación de la RI se realizó mediante la fórmula HOMA-IR, considerando el cut-off $\geq 3,02$ como indicador de RI. El análisis genético se realizó en toda la cohorte mediante técnicas de genotipado alelo-específico con el uso de qPCR y sondas fluorescentes FRET.

Se incluyeron un total de 140 pacientes, 93 de ellos afectados de DM2. La edad media de los pacientes con diabetes fue significativamente mayor que los no diabéticos. Se observó un valor medio de HOMA-IR=5,40 en el subgrupo de pacientes sin DM2, indicativo de RI, siendo superior en pacientes con DM2 (HOMA-IR=8,69).

El estudio histológico mostró ausencia de diferencias en el grado de esteatosis y actividad NASH entre pacientes con DM2 y sin ésta. Un 56% de toda la cohorte presentó fibrosis avanzada (F3-4), alcanzando el 68% en el subgrupo de DM2, frente al 34% de los pacientes sin diabetes.

La frecuencia de genotipos portadores del alelo menor (CG+GG) fue del 70% en *PNPLA3*, mientras que fue del 20% para los genotipos portadores del alelo menor (CT+TT) en *TM6SF2*. La distribución alélica entre pacientes con o sin diabetes no mostró diferencias significativas para ambos polimorfismos.

En el abordaje de factores de riesgo de F3-4, se realizó en primer lugar un análisis univariante. La DM2 fue la variable con más peso en la asociación con F3-4 (OR=4,01), y

la presencia de los polimorfismos, ya fuera de manera única (OR=2,20 para p.I148M y OR=2,79 para p.E167K) como combinada (OR=3,25), también se asoció significativamente con la fibrosis avanzada. Por otro lado, la edad también mostró ser una variable significativa (OR=1,07). Se realizó un análisis multivariante incluyendo la DM2 (OR=4,67) y la presencia de los polimorfismos p.I148M y p.E167K (OR=3,94), confirmando la independencia de ambas variables en el riesgo de F3-4.

En la subcohorte de pacientes afectados de DM2, la edad perdió significación estadística, y la presencia de ambos polimorfismos (p.I148M y/o p.E167K) (OR=6,14) fue la principal variable asociada a F3-4. De hecho, se observó que la DM2 multiplicaba el riesgo de fibrosis avanzada en presencia de cada uno de los polimorfismos (OR=14,69 para p.I148M y OR=11,45 para p.E167K).

En pacientes sin DM2, la edad (OR=1,12) y el HOMA-IR (OR=1,31) fueron las únicas variables asociadas a F3-4. Se realizó un análisis multivariante en el que además se añadió la presencia de los polimorfismos (p.I148M y/o p.E167K). Se observó que el cut-off de HOMA-IR ≥ 3.02 no alcanzó la significancia estadística en la asociación con la fibrosis avanzada. No obstante, se definió el cut-off de HOMA-IR ≥ 5.20 (OR=14,33), como significativo en el riesgo de fibrosis avanzada, y se confirmaron la edad (OR=1,14) y los polimorfismos p.I148M y/o p.E167K (OR=19,04) como variables independientes asociadas a F3-4.

En este estudio, se comprobó que la DM2 y la presencia de RI severa (definida como HOMA-IR ≥ 5.20) incrementan el riesgo de fibrosis avanzada en pacientes con NASH que portan los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926, y por tanto que un estudio genético puede ser acertado en pacientes afectados de diabetes o con RI severa para así centrar los esfuerzos en un tratamiento y seguimiento personalizado.



Article

Influence of Type 2 Diabetes in the Association of *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 Polymorphisms in NASH Advanced Liver Fibrosis

Pablo Gabriel-Medina ^{1,2,3,*}, Roser Ferrer-Costa ^{1,3,*}, Francisco Rodriguez-Frias ^{1,2,3,4}, Andreea Ciudin ^{5,6,7}, Salvador Augustin ^{4,8}, Jesus Rivera-Esteban ^{2,8}, Juan M. Pericàs ^{4,8} and David Martinez Selva ^{6,7,*}



Citation: Gabriel-Medina, P.; Ferrer-Costa, R.; Rodriguez-Frias, F.; Ciudin, A.; Augustin, S.; Rivera-Esteban, J.; Pericàs, J.M.; Selva, D.M. Influence of Type 2 Diabetes in the Association of *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 Polymorphisms in NASH Advanced Liver Fibrosis. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1015. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051015>

Academic Editor: François R. Jornayvaz

Received: 29 March 2022
Accepted: 26 April 2022
Published: 28 April 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Biochemistry Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; pgabriel@vhebron.net (P.G.-M.); frarodri@vhebron.net (F.R.-F.)
 - ² Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Barcelona, Spain; jrivera@vhebron.net
 - ³ Clinical Biochemistry Research Team, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), 08035 Barcelona, Spain
 - ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 28029 Madrid, Spain; saugusti@vhebron.net (S.A.); jpericas@vhebron.net (J.M.P.)
 - ⁵ Endocrinology and Nutrition Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; aciudin@vhebron.net
 - ⁶ Diabetes and Metabolism Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08035 Barcelona, Spain
 - ⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 28029 Madrid, Spain
 - ⁸ Liver Unit, Internal Medicine Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain
- * Correspondence: roferrer@vhebron.net (R.F.-C.); david.martinez.selva@vhir.org (D.M.S.); Tel.: +93-489-6805 (R.F.-C.); +93-489-4198 (D.M.S.); Fax: 93-489-4205 (D.M.S.)

Abstract: Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a leading cause of cirrhosis in western countries. Insulin resistance (IR), type 2 diabetes (T2D), and the polymorphisms patatin-like phospholipase domain-containing 3 (*PNPLA3*) rs738409 and transmembrane 6 superfamily member 2 (*TM6SF2*) rs58542926 are independent risk factors of NASH. Nevertheless, little is known about the interaction between IR and T2D with these polymorphisms in the pathogenesis of NASH and the development of advanced fibrosis. Thus, our study aimed to investigate this relationship. This is a cross-sectional study including NASH patients diagnosed by liver biopsy, at the Vall d'Hebron University Hospital. A total of 140 patients were included (93 T2D, 47 non-T2D). T2D (OR = 4.67; 95%CI 2.13–10.20; $p < 0.001$), *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 polymorphisms (OR = 3.94; 95%CI 1.63–9.54; $p = 0.002$) were independently related with advanced liver fibrosis. T2D increased the risk of advanced fibrosis on top of the two polymorphisms (OR = 14.69; 95%CI 3.03–77.35; $p = 0.001$ for *PNPLA3* rs738409 and OR = 11.45; 95%CI 3.16–41.55; $p < 0.001$ for *TM6SF2* rs58542926). In non-T2D patients, the IR (HOMA-IR ≥ 5.2 , OR = 14.33; 95%CI 2.14–18.66; $p = 0.014$) increased the risk of advanced fibrosis when the polymorphisms were present (OR = 19.04; 95%CI 1.71–650.84; $p = 0.042$). The T2D and IR status increase the risk of advanced fibrosis in patients with NASH carrying the *PNPLA3* rs738409 and/or *TM6SF2* rs58542926 polymorphisms, respectively.

Keywords: nonalcoholic steatohepatitis (NASH); advanced fibrosis; *PNPLA3* p.I148M; *TM6SF2* p.E167K; type 2 diabetes (T2D); homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR)

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the accumulation of fat in the hepatocytes and it is considered to be the major cause of chronic liver disease, affecting 25% of general population worldwide [1]. Although simple steatosis is considered a benign clinical state, the progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) involves

necroinflammatory degeneration, cellular ballooning, and may lead to the development of different degrees of fibrosis and eventually cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2,3]. Furthermore, advanced stages of fibrosis are associated with an increased risk of overall of cardiovascular and liver-related morbimortality [4–6].

NAFLD and metabolic syndrome (MetS) are intimately related entities. Due to their strong bidirectional association, recently the term “NAFLD” was proposed to change into “metabolic-dysfunction associated fatty liver disease-MAFLD” [7]. Insulin resistance (IR), one of major components of MetS [8], plays a key role in the pathophysiology of NAFLD, by promoting the progression of simple steatosis to liver inflammation and fibrosis [9]. Moreover, the presence of NASH can promote hepatic IR and, therefore, increases the risk of subsequent T2D [10]. The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) indirectly evaluates hepatic IR and has been widely used in the routine clinical practice and proposed in clinical algorithms of NASH and T2D [11–13].

Additionally, T2D is a well-known risk factor for NAFLD [1]. The prevalence of NAFLD among T2D patients raises up to 60–80% and has been consistently shown that T2D acts as a trigger by promoting the progression to NASH and advanced liver fibrosis [14].

In the last decade, several genetic risk factors have been associated with the susceptibility of NAFLD and the development of a progressive disease [15,16]. Among them, single nucleotide polymorphism (SNP) rs738409 of the patatin-like phospholipase domain containing protein 3 (*PNPLA3*) gene [17,18] and SNP rs58542926 of the transmembrane protein involved in molecule transport (*TM6SF2*) gene [19] have been identified in several genome-wide association studies (GWAS) as risk factors for progressive NASH and advanced fibrosis [20]. *PNPLA3*, or adiponutrin, participates in intracellular lipid remodeling, and the rs738409 polymorphism is associated with increased hepatocellular triglyceride accumulation by restricting substrate access to the enzyme’s catalytic site. Alternatively, *TM6SF2* plays a role in VLDL export from liver to serum, where SNP rs58542926 causes impairment in the lipid exportation and is associated with elevations in serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) [21].

Although the independent roles of T2D, IR, and the several polymorphisms in the pathogenesis and natural history of NASH have been widely investigated [22], to the best of our knowledge, there are no reports addressing the interaction of *PNPLA3* and *TM6SF2* gene variants with T2D and IR in the pathophysiology of NASH and their role in advanced liver fibrosis.

According to this evidence, the present study aimed to evaluate the interaction between the presence of *PNPLA3* and *TM6SF2* gene variants, T2D and IR with the presence of advanced fibrosis in a cohort of patients with NASH.

2. Materials and Methods

We performed a cross-sectional study, including consecutive subjects diagnosed with NASH from January 2016 to December 2019 at the Liver Unit of the Vall d’Hebron University Hospital, Barcelona, Spain. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee (PR(AG)601/2020). DNA, liver, and biochemical samples from patients included in this study were provided by the Vall d’Hebron University Hospital Biobank (PT17/0015/0047), integrated in the Spanish National Biobanks Network, and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. Serum samples were drawn at the same time that liver biopsy was performed, as per protocol. All participants had previously signed the informed consent.

Inclusion criteria: (a) age >18 years; (b) NASH diagnosis by liver biopsy.

Exclusion criteria: (a) high-risk alcohol consumption (>30 g/day for men and >20 g/day for women); (b) other causes of liver disease (viral or autoimmune hepatitis, hereditary hemochromatosis, alcoholic liver disease, liver transplantation, etc.); (c) hepatotoxic drugs; (d) uncontrolled endocrine diseases (hypothyroidism, hypercortisolism, etc.).

Liver histology evaluation according CRN NASH criteria [23]: (a) steatosis was scored 0–3; (b) lobular inflammation was scored 0–3; (c) ballooning (marker of cell injury) was scored 0–2; (d) NASH activity score corresponded to the unweighted sum of the scores for steatosis, lobular inflammation, and ballooning; finally, (e) fibrosis was staged 0–4. Advanced liver fibrosis was defined as the presence of fibrosis grade 3–4 in the histological evaluation.

Metabolic evaluation: T2D was defined according to ADA guidelines [24].

Hepatic IR was indirectly evaluated using the HOMA-IR, based on the formula: fasting glucose (mg/dL)* fasting insulin (μ U/L) mL/405 [25]. A cut-off ≥ 3.02 has been described as marker of IR in Caucasian population [26]. Patients with T2D on insulin treatment were excluded from the calculation of HOMA-IR.

Genetic analysis: DNA was extracted from serum samples by the MagNa Pure 24 system (Roche Molecular Systems, Inc. (Branchburg, NJ, USA)). The *PNPLA3* rs738409 C > G (I148M) and *TM6SF2* rs58542926 C > T (E167K) SNPs were assessed by allele-specific genotyping techniques with real-time polymerase chain reaction (qPCR) and fluorescent resonance energy transfer (FRET) specific probes [27] and melting peaks analysis (Light SNiP assay) (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany) on a capillary based LightCycler 2.0[®] thermocycler (Roche Molecular Systems, Inc. (Branchburg, NJ, USA)).

Statistical analysis: The distribution of data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. T Student and U Mann-Whitney tests were used to compare quantitative variables, which followed a Gaussian distribution or not, respectively. A chi-squared test was used to compare proportions. The genotype frequencies of the *PNPLA3* and *TM6SF2* polymorphisms were tested for consistency with Hardy-Weinberg equilibrium using exact tests (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>; accessed on 17 January 2022). Allele frequency differences were assessed by a chi-squared test and genotype frequencies were assessed under a dominant genetic model (due to the low number of homozygotes mutant alleles). Logistic regression analysis was performed to study the association of NASH development and degree of liver fibrosis according to clinical, biochemical variables, and *PNPLA3* and *TM6SF2* polymorphisms by the odds ratio calculate, and to create a predictive model of advanced liver fibrosis. All statistical analyses were performed with R-commander v.2.6–2.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Cohort

A total of 140 patients fulfilling inclusion criteria were identified. Baseline characteristics are shown in Table 1.

Table 1. Clinical characteristics of the study cohort and subdivided respect to T2D status.

Variable	Whole NASH Cohort (n = 140)	NASH Patients without T2D (n = 47)	NASH Patients with T2D (n = 93)	p Value
Age (years)	59 (10)	55 (12)	60 (9)	0.001
Female gender, n (%)	81 (58%)	25 (53%)	56 (60%)	0.542
BMI (kg/m ²)	32 (5)	31 (5)	32 (5)	0.209
Waist circumference (cm)	108 (12)	105 (13)	109 (11)	0.120
Fasting glucose (mg/dL)	129 (55)	94 (12)	147 (60)	<0.001
HbA1c (%)	6.5 (1.4)	5.5 (0.4)	7.1 (1.5)	<0.001
HOMA-IR	7.41 (6.40)	5.40 (2.99)	8.69 (6.08)	0.007
Triglycerides (mg/dL)	153 (113–206)	136 (114–170)	161 (113–216)	0.088
Cholesterol LDL (mg/dL)	116 (37)	130 (33)	109 (37)	0.001
Cholesterol HDL (mg/dL)	49 (12)	52 (12)	47 (11)	0.036
ALT (UI/L)	46 (31–71)	55 (34–103)	45 (30–63)	0.059
AST (UI/L)	42 (29–59)	44 (30–59)	41 (27–59)	0.615
GGT (UI/L)	73 (41–160)	58 (40–150)	74 (41–166)	0.681

Values are mean (standard deviation), number (%), or median (Q1–Q3). BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; GGT: Gamma-glutamyl transpeptidase. p values are obtained between “without T2D” and “with T2D” group’s comparison.

T2D was present in 93 patients (66.4%). T2D treatment approaches included metformin (77%), either as a single treatment (27%) or co-administered with insulin (23%), Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) analogues (9%), inhibitors of Sodium-glucose cotransporter-2 (iSGLT2) (12%), or inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV (iDPP-IV) (6%); insulin alone 9%, and diet only 14%.

Liver biopsy findings are shown in Table 2. No significant differences regarding the steatosis grade and NASH activity scored between T2D and non-T2D patients were found. Non-advanced fibrosis (stage 0–2) was present in 61 cases (44%), while 79 (56%) presented advanced fibrosis (stage 3–4). Patients with T2D showed a significantly higher proportion of advanced fibrosis than non-T2D patients (68% versus 34%, $p < 0.001$).

Table 2. Grade of steatosis; NASH activity score and fibrosis in the entire NASH cohort and subdivided respect to T2D status.

Biopsy Results	Whole NASH Cohort (<i>n</i> = 140)	NASH Patients without T2D (<i>n</i> = 47)	NASH Patients with T2D (<i>n</i> = 93)	<i>p</i> Value
Steatosis				
1	90 (64)	32 (68)	58 (62)	0.782
2	39 (28)	12 (25)	27 (29)	
3	11 (8)	3 (6)	8 (9)	
NASH activity score				
≤3	55 (39)	19 (40)	36 (38)	0.554
4	40 (29)	15 (32)	25 (27)	
5	27 (19)	6 (13)	21 (23)	
≥6	18 (13)	7 (15)	11 (12)	
Fibrosis ranges				
0–2	61 (44)	31 (66)	30 (32)	<0.001
3–4	79 (56)	16 (34)	63 (68)	

Values are number (%). *p* values are obtained between “without T2D” and “with T2D” group’s comparison.

3.2. Genetic Analysis

The *PNPLA3* and *TM6SF2* genes were analyzed in all 140 NASH patients (Table 3). No deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium for either the *PNPLA3* ($p = 0.497$) or *TM6SF2* ($p = 0.081$) genotypes was detected. The *PNPLA3* p.I148M minor allele was carried by 47% and the *TM6SF2* p.E167K minor allele was detected in 11% of NASH cohort. Of note, 24% of patients were homozygous carriers of the *PNPLA3* p.I148M allele, while we detected only 3% of homozygous for the *TM6SF2* p.E167K variant.

Table 3. Allelic distribution in the entire NASH cohort and subdivided respect to T2D status.

Variable	Whole NASH Cohort (<i>n</i> = 140)	NASH Patients without T2D (<i>n</i> = 47)	NASH Patients with T2D (<i>n</i> = 93)	<i>p</i> Value
<i>PNPLA3</i>				
CC	42 (30)	12 (26)	30 (32)	0.532
CG + GG	98 (70)	35 (74)	63 (68)	
<i>TM6SF2</i>				
CC	112 (80)	41 (87)	71 (76)	0.195
CT + TT	28 (20)	6 (13)	22 (24)	

Values are number (%). *PNPLA3*: patatin-like phospholipase domain containing protein 3; *TM6SF2*: transmembrane 6 superfamily member 2. *p* values are obtained between “without T2D” and “with T2D” group’s comparison.

The frequency of *PNPLA3* genotypes carrying the minor allele (CG + GG) was 70%, while for the *TM6SF2* genotypes carrying the minor allele (CT + TT) it was 20%. No significant differences were found in the allelic distribution between non-T2D and T2D patients.

3.3. Risk Factors of Advanced Liver Fibrosis

Among the entire cohort, the risk factors associated with advanced liver fibrosis in the univariate analysis were age, T2D, HbA1c, the G allele for the *PNPLA3* p.I148M variant, the presence of T allele for the *TM6SF2* p.E167K variant, as well as the presence of either of two polymorphisms (G allele in *PNPLA3* p.I148M variant and T allele in *TM6SF2* p.E167K variant), as reflected in Table 4. T2D alone was a strong independent risk factor of advanced liver fibrosis in the NASH cohort (OR = 4.01; 95%CI 1.93–8.56; $p < 0.001$).

In the sub cohort of T2D patients, the presence of G allele for the *PNPLA3* p.I148M variant (OR = 2.57; 95%CI 1.03–6.41; $p = 0.043$) and also the presence of at least one of two polymorphisms were associated with advanced fibrosis (OR = 3.53; 95%CI 1.31–9.56; $p = 0.013$) (Table 5). When T2D was combined with each of the two polymorphisms (G allele in *PNPLA3* p.I148M variant or T allele in *TM6SF2* p.E167K variant), the OR significantly increased (OR = 14.69; 95%CI 3.03–77.35; $p = 0.001$ and OR = 11.45; 95%CI 3.16–41.55; $p < 0.001$, respectively).

A multivariate model was performed in the entire cohort, combining T2D (OR = 4.67; 95%CI 2.13–10.20; $p < 0.001$) and presence of two polymorphisms variables (OR = 3.94; 95%CI 1.63–9.54; $p = 0.002$), improving the diagnostic performance of the variables treated individually.

Regarding non-T2D patients, the univariate analysis showed that only age and HOMA-IR were found to be associated with advanced fibrosis (OR = 1.12; 95%CI 1.04–1.20; $p = 0.004$ and OR = 1.31; 95% CI 1.06–1.74; $p = 0.034$, respectively). The multivariate analysis (including age, HOMA-IR and the presence of one of the G allele in *PNPLA3* p.I148M variant or T allele in *TM6SF2* p.E167K variant) showed that the classical cut-off used for IR (3.02) did not significantly influence the risk of advanced fibrosis. Nevertheless, when a more severe IR degree (HOMA-IR ≥ 5.20) was included in the model, a significant association with the likelihood of advanced fibrosis was found (Please confirm intended meaning has been retained), as shown in Table 5.

Table 4. Risk factors for developing advanced liver fibrosis in the entire NASH cohort and subdivided respect to T2D status.

Factor	Whole NASH Cohort (<i>n</i> = 140)				NASH Patients without T2D (<i>n</i> = 47)				NASH Patients with T2D (<i>n</i> = 93)			
	OR	95% CI	<i>p</i> Value	AUC	OR	95% CI	<i>p</i> Value	AUC	OR	95% CI	<i>p</i> Value	AUC
Univariate analysis												
Age	1.07	1.03–1.11	0.001	0.67	1.12	1.04–1.20	0.004	0.78	1.02	0.97–1.08	0.387	0.56
Sex	0.92	0.47–1.81	0.807	0.51	1.78	0.52–6.10	0.356	0.57	0.54	0.21–1.35	0.186	0.57
Presence of T2D	4.01	1.93–8.56	<0.001	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-
HOMA-IR	1.08	1.01–1.18	0.053	0.68	1.31	1.06–1.74	0.034	0.71	1.01	0.95–1.10	0.727	0.56
HbA1C	1.38	1.05–1.82	0.022	0.62	1.37	0.24–7.77	0.726	0.51	1.07	0.79–1.45	0.675	0.51
BMI	0.98	0.92–1.05	0.634	0.53	1.04	0.92–1.17	0.538	0.55	0.93	0.86–1.02	0.125	0.61
PNPLA3 p.II48M	2.20	1.06–4.64	0.036	0.58	3.33	0.63–17.57	0.156	0.60	2.57	1.03–6.41	0.043	0.61
TM6SF2 p.E167K	2.79	1.15–7.57	0.031	0.58	2.15	0.38–12.15	0.385	0.55	2.60	0.79–8.52	0.114	0.58
PNPLA3 p.II48M and TM6SF2 p.E167K *	3.25	1.44–7.65	0.005	0.60	6.14	0.70–53.24	0.101	0.61	3.53	1.31–9.56	0.013	0.62
T2D+PNPLA3 p.II48M	14.69	3.03–77.35	0.001	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-
T2D+TM6SF2 p.E167K	11.45	3.16–41.55	<0.001	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-
Multivariate analysis												
Presence of T2D	4.67	2.13–10.20	<0.001	0.71								
PNPLA3 p.II48M and TM6SF2 p.E167K *	3.94	1.63–9.54	0.002									

* At least one of the two polymorphisms.

Table 5. Multivariate analysis in non-diabetic NASH patients for developing advanced liver fibrosis.

	OR	95%CI	p Value	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Model 1 Age HOMA-IR PNPLA3 p.II48M and TM6SF2 p.EI67K *	1.11 1.56 31.29	1.03–1.23 1.09–2.50 2.16–2163.53	0.017 0.033 0.042	0.89	80	83
Model 2 Age HOMA-IR ≥ 3.02 PNPLA3 p.II48M and TM6SF2 p.EI67K *	1.11 2.79 8.77	1.03–1.22 0.48–22.43 1.12–193.81	0.013 0.275 0.074	0.85	87	83
Model 3 Age HOMA-IR ≥ 5.20 PNPLA3 p.II48M and TM6SF2 p.EI67K *	1.14 14.33 19.04	1.05–1.26 2.14–18.66 1.71–650.84	0.004 0.014 0.042	0.89	80	83

* At least one of the two polymorphisms.

4. Discussion

In the present study we showed that *PNPLA3* and *TM6SF2* gene polymorphisms significantly increased the risk of advanced fibrosis in patients with NASH, while more importantly, IR increased the risk of advanced liver fibrosis in non-diabetic patients.

The demographic and metabolic characteristics of our cohort were similar to previous studies [28–31]. The severity of steatosis and NASH activity were similar between diabetic and non-diabetic patients, in accordance with previous studies [31]. Nevertheless, in our study, 64% of the patients presented mild steatosis and 56% advanced fibrosis in the histological analysis, a higher proportion than previously reported in similar cohorts [28–30,32]. One possible explanation is that our cohort is not based on general population, but on selected patients with a high suspicion of liver disease that were previously referred to a liver specialized clinic from a tertiary centre. In exchange, patients with T2D presented with higher proportion of advanced fibrosis than the non-diabetic patients, which is also consistent with prior reports [33–35]. Regarding the association between NAFLD and T2D, it has been shown that NASH represents the sole feature of liver damage in metabolic syndrome, driven mainly by insulin resistance [36].

PNPLA3 p.I148M and *TM6SF2* p.E167K variants have been previously associated with NAFLD and NASH and advanced fibrosis [32,37,38]. In our cohort, the frequency of the minor (G) allele at *PNPLA3* rs738409 was higher (47%) than that reported in other studies where NAFLD was diagnosed by liver biopsy [39,40]. Furthermore, a global frequency of 21% for this allele variant is estimated [41]. By contrast, minor allele frequency (MAF) (T) at *TM6SF2* rs58542926 (11%) was similar to previous data (9%) in NAFLD patients [42].

PNPLA3 p.I148M and *TM6SF2* p.E167K variants have been also associated to a higher risk of developing hepatic steatosis and advanced fibrosis [17,43–45]. Our results confirm those of previous studies, namely *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 alone (OR = 2.20; 95%CI 1.06–4.64; $p = 0.036$ and OR = 2.79; 95%CI 1.15–7.57; $p = 0.031$, respectively) or in combination (OR = 3.25; 95%CI 1.44–7.65; $p = 0.005$) were associated with significant risk of advanced fibrosis in our cohort. This agrees with previous reports showing an additive effect of risk alleles accumulation on liver injury in NAFLD [15,20,30,42]. Mechanistically, a plausible explanation for the synergistic effect of the combination of the two alleles could be that the two polymorphisms are increasing the liver lipid content in different pathways. Specifically, *PNPLA3* polymorphism is responsible for the increase and accumulation of liver lipids and the *TM6SF2* polymorphism is reducing the exportation of liver lipids.

When the presence of T2D was added to each gene variant model, the risk of presenting advanced fibrosis significantly increased (OR = 14.69; 95%CI 3.03–77.35; $p = 0.001$ and OR = 11.45; 95%CI 3.16–41.55; $p < 0.001$, respectively). Opposite to previous studies that pointed out age to be a risk factor for advanced liver fibrosis [29,46,47], our study in T2D patients showed that age was not associated with an increased risk of advanced fibrosis, suggesting that T2D alone is a very strong risk factor, exceeding the risk of age in liver fibrosis.

Meanwhile, amongst non-diabetic patients, either *PNPLA3* rs738409 or *TM6SF2* rs58542926 or in combination were not associated to the risk of advanced liver fibrosis, whereas age and HOMAR-IR, as biomarker of hepatic IR, were indeed risk factors of advanced fibrosis in the absence of T2D diagnosis. Previous data in the literature have linked the IR with progression of fibrosis in patients with obesity and NASH [48,49]. Boursier et al. included HOMA-IR in an algorithm to identify fibrosis and proposed a cut-off HOMA-IR > 10 to predict worsening in patients with NASH [50]. Classical HOMA-IR cut-off ≥ 3.02 was described in Caucasian young populations where a subset of patients with obesity showed a new HOMA-IR cut-off ≥ 3.42 [26]. Obesity is a metabolic risk factor that predisposes to IR [51]. Patients in our cohort had a mean BMI of 32 kg/m², while overall HOMA-IR mean value was 7.41, and 5.40 in non-T2D patients, defining significant IR regardless the cut-off for normality (either 3.02 or 3.42) [26].

The mechanistic relationship between the IR and the *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 polymorphisms is incompletely explored and warrants further studies. Data so far associated the presence of both variants with hepatic triglyceride content [15,52]. Furthermore, the liver triglycerides deposition has been found to be more pronounced with a high-sucrose diet, which is well-known risk factor for IR [53–55]. Increased synthesis of liver triglycerides is due to an imbalance between de novo synthesis, reuptake of free fatty acids, and hepatic oxidation. In a context of IR, lipid oxidation decreases considerably, compared to lipid synthesis processes. Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction are related with the progression from steatosis to NASH. Hyperinsulinemia can cause a greater synthesis of VLDL particles in fasting, which in addition to a lowered liver secretion, favors the development of liver steatosis [56]. Recently, Luukkonen et al. [22], suggested that IR and genetic factors independently relate to NASH, and advanced fibrosis. Nevertheless, in their study no combined score was developed.

In order to investigate the interaction between the presence of the studied polymorphisms and the IR, several models were explored for creating a combined score that included age, *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 polymorphisms and HOMA-IR. Interestingly, in the model that included the classical cut-off for IR for the Spanish population (HOMA-IR 3.02), the IR had no role in the risk of advanced fibrosis. In exchange, the third model that included the cut-off of HOMA-IR > 5.20 the presence of significant IR strongly predicted the risk of advanced fibrosis in the presence of age and the studied polymorphisms. We propose this new cut-off of HOMA-IR > 5.20 as biomarker of advanced liver fibrosis in non-T2D patients.

Our study has some limitations that should be noticed and restrict the extrapolation of our results to the general population, such as: (a) the sample size may have limited the interpretation of the role that T2D and *PNPLA3* p.I148M and *TM6SF2* p.E167K polymorphisms play in the development of advanced fibrosis; (b) T2D patients were predominant in the NASH cohort and may have disturbed the results regarding the effect of both polymorphisms in advanced fibrosis in the absence of diabetes. However, we consider this proportion as a reflection of real-life situations, being T2D the more frequent comorbidity in NAFLD patients; (c) finally, the low number of homozygote's mutant alleles made necessary the use of a dominant genetic model; therefore, the effect of mutated homozygotes versus heterozygotes in the development of advanced fibrosis has not been fully verified.

In summary, we found that the presence of T2D or significant IR, defined by a new proposed cut-off of HOMA-IR > 5.20, on top of *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 polymorphisms were associated to advanced liver fibrosis. Our results suggested that in patients with T2D and/or significant IR, a genetic study should be performed in order to identify those patients at higher risk of developing advanced liver fibrosis and center the efforts in a personalized follow-up and pharmacological treatments when available. Further studies are needed in order to validate and confirm our results, but it seems that IR mediates the risk of progression towards advanced liver fibrosis induced by *PNPLA3* rs738409 and *TM6SF2* rs58542926 polymorphisms.

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

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital (protocol code PR(AG)601/2020 signed on 17 March 2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this article are available from the corresponding authors on reasonable request.

Acknowledgments: The authors of the study thank the technical staff of the Biochemistry Department for the support offered in the processing of samples, DNA extraction and determination of polymorphisms.

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

References

1. Younossi, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease—A global public health perspective. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 531–544. [\[CrossRef\]](#)
2. Mazzolini, G.; Sowa, J.-P.; Atorrasagasti, C.; Kucukoglu, O.; Syn, W.-K.; Canbay, A. Significance of Simple Steatosis: An Update on the Clinical and Molecular Evidence. *Cells* **2020**, *9*, 2458. [\[CrossRef\]](#)
3. EASL. Guía de práctica clínica de la EASL-EASD-EASO para el tratamiento de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1388–1402.
4. Angulo, P.; Kleiner, D.E.; Dam-Larsen, S.; Adams, L.A.; Björnsson, E.S.; Charatcharoenwitthaya, P.; Mills, P.R.; Keach, J.C.; Lafferty, H.D.; Stahler, A.; et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 389.e10–397.e10. [\[CrossRef\]](#)
5. Dulai, P.S.; Singh, S.; Patel, J.; Soni, M.; Prokop, L.J.; Younossi, Z.; Sebastiani, G.; Ekstedt, M.; Hagstrom, H.; Nasr, P.; et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* **2017**, *65*, 1557–1565. [\[CrossRef\]](#)
6. Galiero, R.; Caturano, A.; Vetrano, E.; Cesaro, A.; Rinaldi, L.; Salvatore, T.; Marfella, R.; Sardu, C.; Moscarella, E.; Gragnano, F.; et al. Pathophysiological mechanisms and clinical evidence of relationship between Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease. *Rev. Cardiovasc. Med.* **2021**, *22*, 755–768. [\[CrossRef\]](#)
7. Eslam, M.; Newsome, P.N.; Sarin, S.K.; Anstee, Q.M.; Targher, G.; Romero-Gomez, M.; Zelber-Sagi, S.; Wong, V.W.-S.; Dufour, J.-F.; Schattenberg, J.M.; et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J. Hepatol.* **2020**, *73*, 202–209. [\[CrossRef\]](#)
8. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*, 12. [\[CrossRef\]](#)
9. Younossi, Z.M.; Golabi, P.; de Avila, L.; Paik, J.M.; Srishord, M.; Fukui, N.; Qiu, Y.; Burns, L.; Afendy, A.; Nader, F. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.* **2019**, *71*, 793–801. [\[CrossRef\]](#)
10. Tilg, H.; Moschen, A.R.; Roden, M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 32–42. [\[CrossRef\]](#)
11. Nasr, P.; Ignatova, S.; Kechagias, S.; Ekstedt, M. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A prospective follow-up study with serial biopsies. *Hepatol. Commun.* **2018**, *2*, 199–210. [\[CrossRef\]](#)
12. Blond, E.; Disse, E.; Cuerq, C.; Draï, J.; Valette, P.-J.; Laville, M.; Thivolet, C.; Simon, C.; Caussy, C. EASL–EASD–EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease in severely obese people: Do they lead to over-referral? *Diabetologia* **2017**, *60*, 1218–1222. [\[CrossRef\]](#)
13. Sheka, A.C.; Adeyi, O.; Thompson, J.; Hameed, B.; Crawford, P.A.; Ikramuddin, S. Nonalcoholic Steatohepatitis. *JAMA* **2020**, *323*, 1175–1183. [\[CrossRef\]](#)
14. Younossi, Z.; Anstee, Q.M.; Marietti, M.; Hardy, T.; Henry, L.; Eslam, M.; George, J.; Bugianesi, E. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 11–20. [\[CrossRef\]](#)
15. Míková, I.; Neřoldová, M.; Hubáček, J.A.; Dlouhá, D.; Jirsa, M.; Honsová, E.; Sticová, E.; Lánská, V.; Špičák, J.; Trunečka, P. Donor PNPLA3 and TM6SF2 Variant Alleles Confer Additive Risks for Graft Steatosis After Liver Transplantation. *Transplantation* **2020**, *104*, 526–534. [\[CrossRef\]](#)
16. Rinaldi, L.; Pafundi, P.C.; Galiero, R.; Caturano, A.; Morone, M.V.; Silvestri, C.F.; Giordano, M.; Salvatore, T.; Sasso, F.C. Mechanisms of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in the Metabolic Syndrome. A Narrative Review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 270. [\[CrossRef\]](#)
17. Valenti, L.; Al-Serri, A.; Daly, A.K.; Galmozzi, E.; Rametta, R.; Dongiovanni, P.; Nobili, V.; Mozzi, E.; Roviato, G.; Vanni, E.; et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2010**, *51*, 1209–1217. [\[CrossRef\]](#)
18. Friedman, S.L.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Rinella, M.; Sanyal, A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 908–922. [\[CrossRef\]](#)
19. Dongiovanni, P.; Petta, S.; Maglio, C.; Fracanzani, A.L.; Pipitone, R.M.; Mozzi, E.; Motta, B.M.; Kaminska, D.; Rametta, R.; Grimaudo, S.; et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* **2015**, *61*, 506–514. [\[CrossRef\]](#)

20. Gellert-Kristensen, H.; Richardson, T.G.; Smith, G.D.; Nordestgaard, B.G.; Tybjaerg-Hansen, A.; Stender, S. Combined Effect of *PNPLA3*, *TM6SF2*, and *HSD17B13* Variants on Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in the General Population. *Hepatology* **2020**, *72*, 845–856. [\[CrossRef\]](#)
21. Severson, T.J.; Besur, S.; Bonkovsky, H.L. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 6742–6756. [\[CrossRef\]](#)
22. Luukkonen, P.K.; Qadri, S.; Ahlholm, N.; Porthan, K.; Männistö, V.; Sammalkorpi, H.; Penttilä, A.K.; Hakkarainen, A.; Lehtimäki, T.E.; Gaggini, M.; et al. Distinct contributions of metabolic dysfunction and genetic risk factors in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2022**, *76*, 526–535. [\[CrossRef\]](#)
23. Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.-C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2005**, *41*, 1313–1321. [\[CrossRef\]](#)
24. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* **2021**, *44*, S15–S33. [\[CrossRef\]](#)
25. Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419. [\[CrossRef\]](#)
26. Shashaj, B.; Luciano, R.; Contoli, B.; Morino, G.S.; Spreghini, M.R.; Rustico, C.; Sforza, R.W.; Dallapiccola, B.; Manco, M. Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. *Acta Diabetol.* **2016**, *53*, 251–260. [\[CrossRef\]](#)
27. Didenko, V.V. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *BioTechniques* **2001**, *31*, 1106–1121. [\[CrossRef\]](#)
28. Lisboa, Q.C.; Nardelli, M.J.; Pereira, P.D.A.; Miranda, D.M.; Ribeiro, S.N.; Costa, R.S.N.; Versiani, C.A.; Vidigal, P.V.T.; Ferrari, T.C.D.A.; Couto, C.A. *PNPLA3* and *TM6SF2* polymorphisms in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Hepatol.* **2020**, *12*, 792–806. [\[CrossRef\]](#)
29. Pelusi, S.; Cespiati, A.; Rametta, R.; Pennisi, G.; Mannisto, V.; Rosso, C.; Baselli, G.A.; Dongiovanni, P.; Fracanzani, A.L.; Badiali, S.; et al. Prevalence and Risk Factors of Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Without Steatohepatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *17*, 2310.e6–2319.e6. [\[CrossRef\]](#)
30. Krawczyk, M.; Rau, M.; Schattenberg, J.M.; Bantel, H.; Pathil, A.; Demir, M.; Kluwe, J.; Boettler, T.; Lammert, F.; Geier, A. Combined effects of the *PNPLA3* rs738409, *TM6SF2* rs58542926, and *MBOAT7* rs641738 variants on NAFLD severity: A multicenter biopsy-based study. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 247–255. [\[CrossRef\]](#)
31. Goh, B.B.G.; Pagadala, M.R.; Dasarathy, J.; Unalp-Arida, A.; Sargent, R.; Hawkins, C.; Sourianarayanan, A.; Khiyami, A.; Yerian, L.; Pai, R.K.; et al. Clinical spectrum of non-alcoholic fatty liver disease in diabetic and non-diabetic patients. *BBA Clin.* **2014**, *3*, 141–145. [\[CrossRef\]](#)
32. Anstee, Q.M.; Darlay, R.; Cockell, S.; Meroni, M.; Govaere, O.; Tiniakos, D.; Burt, A.D.; Bedossa, P.; Palmer, J.; Liu, Y.-L.; et al. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort. *J. Hepatol.* **2020**, *73*, 505–515. [\[CrossRef\]](#)
33. Bazick, J.; Donithan, M.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Kleiner, D.; Brunt, E.M.; Wilson, L.; Doo, E.; Lavine, J.; Tonascia, J.; Loomba, R. Clinical Model for NASH and Advanced Fibrosis in Adult Patients With Diabetes and NAFLD: Guidelines for Referral in NAFLD. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 1347–1355. [\[CrossRef\]](#)
34. Lomonaco, R.; Leiva, E.G.; Bril, F.; Shrestha, S.; Mansour, L.; Budd, J.; Romero, J.P.; Schmidt, S.; Chang, K.-L.; Samraj, G.; et al. Advanced Liver Fibrosis is Common in Patients With Type 2 Diabetes Followed in the Outpatient Setting: The Need for Systematic Screening. *Diabetes Care* **2021**, *44*, 399–406. [\[CrossRef\]](#)
35. Bellan, M.; Colletta, C.; Barbaglia, M.N.; Salmi, L.; Clerici, R.; Mallela, V.R.; Castello, L.M.; Saglietti, G.; Schianca, G.P.C.; Minisini, R.; et al. Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes Mellitus: Relationship between Nongenetic Factors and *PNPLA3*/*HSD17B13* Polymorphisms. *Diabetes Metab. J.* **2019**, *43*, 700–710. [\[CrossRef\]](#)
36. Masarone, M.; Rosato, V.; Aglitti, A.; Bucci, T.; Caruso, R.; Salvatore, T.; Sasso, F.C.; Tripodi, M.F.; Persico, M. Liver biopsy in type 2 diabetes mellitus: Steatohepatitis represents the sole feature of liver damage. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178473. [\[CrossRef\]](#)
37. Wang, J.-Z.; Cao, H.-X.; Chen, J.-N.; Pan, Q. *PNPLA3* rs738409 underlies treatment response in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Clin. Cases* **2018**, *6*, 167–175. [\[CrossRef\]](#)
38. Dai, G.; Liu, P.; Li, X.; Zhou, X.; He, S. Association between *PNPLA3* rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) susceptibility and severity. *Medicine* **2019**, *98*, e14324. [\[CrossRef\]](#)
39. Romeo, S.; Kozlitina, J.; Xing, C.; Pertsemlidis, A.; Cox, D.; Pennacchio, L.A.; Boerwinkle, E.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Genetic variation in *PNPLA3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1461–1465. [\[CrossRef\]](#)
40. Kalia, H.S.; Gaglio, P.J. The Prevalence and Pathobiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients of Different Races or Ethnicities. *Clin. Liver Dis.* **2016**, *20*, 215–224. [\[CrossRef\]](#)
41. Phan, L.; Jin, Y.; Zhang, H.; Qiang, W.; Shekhtman, E.; Shao, D.; Revoe, D.; Villamarin, R.; Ivanchenko, E.; Kimura, M.; et al. “ALFA: Allele Frequency Aggregator.” National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 10 March 2020. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa> (accessed on 2 March 2022).

42. Wang, X.; Liu, Z.; Wang, K.; Wang, Z.; Sun, X.; Zhong, L.; Deng, G.; Song, G.; Sun, B.; Peng, Z.; et al. Additive Effects of the Risk Alleles of *PNPLA3* and *TM6SF2* on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in a Chinese Population. *Front. Genet.* **2016**, *7*, 140. [\[CrossRef\]](#)
43. Chandrasekharan, K.; Alazawi, W. Genetics of Non-Alcoholic Fatty Liver and Cardiovascular Disease: Implications for Therapy? *Front. Pharmacol.* **2020**, *10*, 1413. [\[CrossRef\]](#)
44. Tang, S.; Zhang, J.; Mei, T.-T.; Guo, H.-Q.; Wei, X.-H.; Zhang, W.-Y.; Liu, Y.-L.; Liang, S.; Fan, Z.-P.; Ma, L.-X.; et al. Association of *TM6SF2* rs58542926 T/C gene polymorphism with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1128. [\[CrossRef\]](#)
45. Eslam, M.; Valenti, L.; Romeo, S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J. Hepatol.* **2018**, *68*, 268–279. [\[CrossRef\]](#)
46. Koo, B.K.; Joo, S.K.; Kim, D.; Lee, S.; Bae, J.M.; Park, J.H.; Kim, J.H.; Chang, M.S.; Kim, W. Development and Validation of a Scoring System, Based on Genetic and Clinical Factors, to Determine Risk of Steatohepatitis in Asian Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *18*, 2592.e10–2599.e10. [\[CrossRef\]](#)
47. Kabarra, K.; Golabi, P.; Younossi, Z.M. Nonalcoholic steatohepatitis: Global impact and clinical consequences. *Endocr. Connect.* **2021**, *10*, R240–R247. [\[CrossRef\]](#)
48. Sorrentino, P.; Terracciano, L.; D'Angelo, S.; Ferbo, U.; Bracigliano, A.; Vecchione, R. Predicting Fibrosis Worsening in Obese Patients With NASH Through Parenchymal Fibronectin, HOMA-IR, and Hypertension. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105*, 336–344. [\[CrossRef\]](#)
49. Chatterjee, A.; Basu, A.; Das, K.; Singh, P.; Mondal, D.; Bhattacharya, B.; Roychoudhury, S.; Majumder, P.P.; Chowdhury, A.; Basu, P. Hepatic transcriptome signature correlated with HOMA-IR explains early nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Ann. Hepatol.* **2020**, *19*, 472–481. [\[CrossRef\]](#)
50. Boursier, J.; Anty, R.; Vonghia, L.; Moal, V.; Vanwolleghem, T.; Canivet, C.; Michalak, S.; Bonnafous, S.; Michielsen, P.; Oberti, F.; et al. Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2018**, *47*, 1387–1396. [\[CrossRef\]](#)
51. Gayoso-Diz, P.; Otero-González, A.; Rodríguez-Alvarez, M.X.; Gude, E.; García, F.; de Francisco, A.; Quintela, A.G. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: Effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr. Disord.* **2013**, *13*, 47. [\[CrossRef\]](#)
52. Barata, L.; Feitosa, M.F.; Bielak, L.F.; Halligan, B.; Baldrige, A.S.; Guo, X.; Yerges-Armstrong, L.M.; Smith, A.V.; Yao, J.; Palmer, N.D.; et al. Insulin Resistance Exacerbates Genetic Predisposition to Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals Without Diabetes. *Hepatol. Commun.* **2019**, *3*, 894–907. [\[CrossRef\]](#)
53. Kozlitina, J.; Smagris, E.; Stender, S.; Nordestgaard, B.G.; Zhou, H.H.; Tybjaerg-Hansen, A.; Vogt, T.F.; Hobbs, H.H.; Cohen, J.C. Exome-wide association study identifies a *TM6SF2* variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 352–356. [\[CrossRef\]](#)
54. Zhao, R.; Xiang, B.; Dolinsky, V.W.; Xia, M.; Shen, G.X. Saskatoon berry powder reduces hepatic steatosis and insulin resistance in high fat-high sucrose diet-induced obese mice. *J. Nutr. Biochem.* **2021**, *95*, 108778. [\[CrossRef\]](#)
55. Lovat, N.E.; Legare, D.J.; Lutt, W.W. An animal model of gestational obesity and prediabetes: HISS-dependent insulin resistance induced by a high-sucrose diet in Sprague Dawley rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2021**, *99*, 599–608. [\[CrossRef\]](#)
56. Scherer, T.; Lindtner, C.; O'Hare, J.; Hackl, M.; Zielinski, E.; Freudenthaler, A.; Baumgartner-Parzer, S.; Tödter, K.; Heeren, J.; Krššák, M.; et al. Insulin Regulates Hepatic Triglyceride Secretion and Lipid Content via Signaling in the Brain. *Diabetes* **2016**, *65*, 1511–1520. [\[CrossRef\]](#)

3.2 Aplicación de un algoritmo secuencial basado en el FIB-4 y ELF para identificar alto riesgo de fibrosis avanzada en atención primaria

La enfermedad hepática crónica a menudo se presenta de forma asintomática hasta fases avanzadas, cuando el daño hepático provocado por la fibrosis es irreversible. Debido a las limitaciones del diagnóstico por el estudio histológico de biopsia hepática, son necesarias pruebas no invasivas basadas en biomarcadores sanguíneos, como el FIB-4 y el ELF, que permitan estratificar a los pacientes según el riesgo de fibrosis avanzada, y a su vez complementen a la ET. Además, la implementación de algoritmos diagnósticos basados en el uso combinado de estos biomarcadores permitirá detectar pacientes de alto riesgo de fibrosis en atención primaria.

El objetivo de este estudio fue evaluar un algoritmo basado en el FIB-4 y ELF para el diagnóstico de fibrosis hepática en una cohorte de NASH y proponer su aplicación en dos cohortes de atención primaria con comorbilidades relacionadas con la hepatopatía.

Para ello, se diseñó un estudio transversal que incluyó pacientes diagnosticados de NASH mediante biopsia hepática y visitados en el servicio de hepatología del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Además, se incluyeron dos cohortes de pacientes de atención primaria atendidas de forma rutinaria en nuestro laboratorio clínico, una ellas conformada por pacientes diagnosticados de DM2 y la otra conformada por pacientes con seguimiento de hepatopatía crónica de diferentes etiologías (excluyendo la diabetes). Se evaluaron diferentes modelos de diagnóstico de fibrosis no significativa (F0-1) y avanzada (F3-4) en la cohorte de NASH, basados en la medida del FIB-4 solo, ELF solo, FIB-4 y ELF de manera simultánea mediante análisis multivariante y medida del FIB-4 y ELF en un algoritmo secuencial, el cual fue aplicado en las dos cohortes de primaria para estimar el grado de F3-4 de acuerdo con otras pruebas diagnósticas indicadas en la historia clínica.

Se incluyeron un total de 140 pacientes de la cohorte de NASH. Además, 141 pacientes diagnosticados de DM2 y 138 con hepatopatía crónica, ambas cohortes de atención primaria, completaron el estudio. Las variables antropométricas y relacionadas con el metabolismo de glucosa y lípidos fueron similares entre la cohorte de NASH y la de pacientes con DM2, y superiores a la corte de pacientes con hepatopatía crónica. Por otro lado, la cohorte de NASH presentó los valores más altos de las enzimas hepáticas y de FIB-4. El ELF no presentó diferencias entre grupos.

En cuanto al estudio histológico en la cohorte de NASH, un 27% mostró F0-1, un 17% F2 y un 56% F3-4. Además, los valores medios de FIB-4 y ELF aumentaron con el grado de fibrosis.

Sobre el rendimiento diagnóstico de los marcadores bioquímicos, el uso del FIB-4 como único marcador mostró los valores más altos de especificidad (98%) y VPP (97%) en la predicción de F3-4. Además, el ELF obtuvo la mayor especificidad (94%) en la predicción de F0-1. Por otro lado, el modelo multivariante no logró superar en ningún parámetro diagnóstico al modelo secuencial, pero sí presentó resultados más equilibrados que los modelos basados en los biomarcadores individuales.

El algoritmo secuencial presentó los valores más altos de sensibilidad diagnóstica de F0-1 (71%) y F3-4 (85%). Además, el VPP y VPN de F3-4, fueron 81% y 79% respectivamente. Por otro lado, permitió clasificar a pacientes con alto riesgo de fibrosis significativa (F2-4), hecho no posible en los otros modelos, donde la sensibilidad y el VPP fueron del 88% y 85% respectivamente.

Este algoritmo fue aplicado en las cohortes de atención primaria. En ambas, el 28% de los pacientes fueron clasificados como F3-4. Se compararon los resultados obtenidos con las pruebas diagnósticas registradas en el historial médico. El 80% de los pacientes afectados de diabetes clasificados como F3-4 tenían diagnóstico de esteatosis hepática, y un 12% además, presentaron medidas de ET $\geq 9,6$ kPa; el 44% de estos pacientes fueron derivados a atención especializada. En la cohorte de pacientes con hepatopatía crónica, el 71% de aquellos clasificados como F3-4 tenían un diagnóstico de esteatosis hepática, y un 11% además, presentaron medidas de ET $\geq 9,6$ kPa; el 42% de estos pacientes fueron derivados a atención especializada.

Estos resultados sugieren la potencial utilidad del algoritmo basado en el uso secuencial de biomarcadores circulantes, como herramienta de estratificación de fibrosis avanzada en pacientes de riesgo tratados en atención primaria, donde el abordaje completo de la hepatopatía es limitado. Así, mediante la actualización de protocolos de derivación a la atención especializada, se permitiría priorizar aquellos pacientes con alto riesgo de F3-4, y así acceder a nuevos tratamientos y a un control más individualizado.



Accuracy of a sequential algorithm based on FIB-4 and ELF to identify high-risk advanced liver fibrosis at the primary care level

Pablo Gabriel-Medina^{1,2,3} · Roser Ferrer-Costa^{1,3} · Andreea Ciudin^{4,5,6} · Salvador Augustin^{7,8} · Jesus Rivera-Esteban^{2,7} · J. M. Pericàs^{7,8} · D. M. Selva^{5,6} · Francisco Rodriguez-Frias^{1,2,3,8}

Received: 2 December 2022 / Accepted: 21 June 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the leading cause of chronic liver disease, and liver fibrosis is the strongest predictor of morbimortality. We aimed to assess the performance of a sequential algorithm encompassing the Fibrosis 4 (FIB-4) and Enhanced Liver Fibrosis (ELF) scores for identifying patients at risk of advanced fibrosis. This cross-sectional study included one hospital-based cohort with biopsy-proven NAFLD ($n = 140$) and two primary care cohorts from different clinical settings: Type 2 Diabetes (T2D) follow-up ($n = 141$) and chronic liver disease (CLD) initial study ($n = 138$). Logistic regression analysis was performed to assess liver fibrosis diagnosis models based on FIB-4 and ELF biomarkers. The sequential algorithm retrieved the following accuracy parameters in predicting stages F3–4 in the biopsy-confirmed cohort: sensitivity (85%), specificity (73%), negative predictive value (79%) and positive predictive value (81%). In both T2D and CLD cohorts, a total of 28% of patients were classified as stages F3–4. Furthermore, of all F3–4 classified patients in the T2D cohort, 80% had a diagnosis of liver disease and 44% were referred to secondary care. Likewise, of all F3–4 classified patients in the CLD cohort, 71% had a diagnosis of liver disease and 44% were referred to secondary care. These results suggest the potential utility of this algorithm as a liver fibrosis stratifying tool in primary care, where updating referral protocols to detect high-risk F3–4 is needed. FIB-4 and ELF sequential measurement is an efficient strategy to prioritize patients with high risk of F3–4 in populations with metabolic risk factors.

Keywords Advanced liver fibrosis · NASH · FIB-4 · ELF · Type 2 diabetes · Chronic liver disease

Introduction

Chronic liver disease (CLD) is a major cause of mortality globally and leads to a substantial health-care burden [1]. CLD often presents asymptotically until advanced

David M. Selva and Francisco Rodriguez-Frias have contributed equally to this study.

✉ Pablo Gabriel-Medina
pablo.gabriel@vallhebron.cat

✉ Roser Ferrer-Costa
roser.ferrer@vallhebron.cat

¹ Clinical Biochemistry Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

² Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Barcelona, Spain

³ Clinical Biochemistry Research Team, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), 08035 Barcelona, Spain

⁴ Endocrinology and Nutrition Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

⁵ Diabetes and Metabolism Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08035 Barcelona, Spain

⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 28029 Madrid, Spain

⁷ Liver Unit, Internal Medicine Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

⁸ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 28029 Madrid, Spain

phases, when liver damage is irreversible and therapy can only slow or stop progression of the disease [2, 3]. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the leading cause of CLD worldwide, affecting 17–46% of adults in high-income countries [4–6]. Around 20% of patients with NAFLD progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with various degrees of fibrosis and eventually cirrhosis and hepatocellular carcinoma [7]. Liver fibrosis is the strongest predictor of clinically meaningful outcomes, including decompensation, cardiovascular and liver-related morbimortality [8–10].

The tools used in the screening of CLD with advanced fibrosis are paramount to designing and implementing efficient, sustainable, and equitable health-care pathways both in the general population at community and primary care centers and special populations at high-risk. NAFLD and metabolic syndrome (MetS) are intimately related entities [11]. Additionally, Type 2 Diabetes Mellitus (T2D) is a well-known risk factor for NAFLD [12]. The prevalence of NAFLD among T2D patients increases to 60–80%, and it has been consistently shown that T2D also acts as a trigger by promoting the progression to NASH and advanced liver fibrosis [5, 13].

The gold standard of NAFLD diagnosis is based on histological assessment by liver biopsy. Liver biopsy is an invasive procedure that can lead to complications [14] and a significant diagnostic error rate [15, 16]. Use of liver biopsy is largely limited to screening liver disease on a large scale. In recent years, noninvasive markers as ¹³C Methacetin Breath Test, which assess microsomal liver function [17], or techniques have been proposed for the screening of liver disease, such as transient elastography (TE) and acoustic radiation force impulse shear wave elastography (ARFI), which can predict and monitoring significant fibrosis from different etiologies [18–20]. TE has proven to be cost-effective for population screening of liver fibrosis [21], but its availability is currently limited in primary care centers and requires certain training for operators [22].

Several serum biomarkers and panels have been developed to detect significant liver fibrosis (equivalent to F2–F3 fibrosis stages in liver biopsy) or advanced liver fibrosis (F3–F4) in NAFLD patients [23, 24]. Fibrosis 4 score (FIB-4) was initially defined to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection [25]. FIB-4 performs best at excluding advanced fibrosis (with negative predictive values > 90%) and is, therefore, commonly used as a first-line triage to identify patients at low risk of severe fibrosis [26]. Current guidelines by the European Association for the Study of the Liver propose two FIB-4 cut-off points (1.3 and 2.67) to rule out advanced fibrosis according to the age of the patient [27]. However, some reports suggest that FIB-4 accuracy might be impaired amongst patients with T2D [28]. The Enhanced Liver Fibrosis Test (ELF™, Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA) is a blood panel that combines

results for tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1 (TIMP-1), hyaluronic acid (HA), and aminoterminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) into a single score or index. All three markers are involved in hepatic extracellular matrix metabolism (fibrinolysis or fibrinogenesis). Different cut-off values have been described to stratify patients into none to mild fibrosis, moderate fibrosis, and severe fibrosis [29, 30]. The ELF score has shown excellent accuracy for the non-invasive diagnosis of advanced fibrosis in different cohorts [31]. In addition, The ELF score is able to predict clinical outcomes [26].

Several reports have provided information on the performance of a sequential algorithm including FIB-4 and ELF into routine primary care, where the active participation of general practitioners and physicians who manage patients with metabolic disorders is crucial [32, 33]. There is poor application of these based-on biomarker algorithms in our health system, and their implementation is needed in clinical laboratories to detect patients with high risk of advanced fibrosis. Detecting patients at high risk of advanced fibrosis would strongly facilitate further advanced fibrosis screening. Use of a FIB-4 and ELF sequential algorithm would be especially useful for primary health care, where the knowledge about degree of liver fibrosis is limited [34–36].

We aimed to assess a FIB-4 and ELF algorithm to diagnose liver fibrosis in a NASH cohort and propose its application to stratify the risk of fibrosis in two primary care cohorts with liver-related comorbidities.

Materials and methods

We performed a cross-sectional study, including consecutive subjects diagnosed with NASH from January 2016 to December 2019 at the Liver Unit of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (PR(AG)601/2020). Liver and biochemical samples from patients included in this study were provided by the Vall d'Hebron University Hospital Biobank (PT17/0015/0047), integrated in the Spanish National Biobanks Network, and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the ethical and scientific committees. Serum samples were drawn at the same time that liver biopsy was performed (if applicable), as per protocol. All participants had previously signed the informed consent.

NASH cohort

Inclusion criteria: (a) age > 18 years. (b) NASH diagnosis by liver biopsy.

Exclusion criteria: (a) potentially harmful alcohol consumption (> 30 g/day for men and > 20 g/day for women), (b) other causes of liver disease (viral or autoimmune hepatitis, hereditary hemochromatosis, alcoholic liver disease, liver transplantation, etc.), (c) hepatotoxic drugs, and (d) uncontrolled endocrine diseases (hypothyroidism, hypercortisolism, etc.).

Liver histology was evaluated according to the Clinical Research Network (CRN) NASH criteria [37]: (a) steatosis was scored 0–3 (b) lobular inflammation was scored 0–3 (c) ballooning (marker of cell injury) was scored 0–2 (d) NASH activity score corresponded to the unweighted sum of the scores for steatosis, lobular inflammation and ballooning; finally, (e) fibrosis was staged 0–4. Advanced liver fibrosis was defined as the presence of fibrosis grades 3–4 in the histological evaluation. Furthermore, TE (FibroScan®) and ultrasonography measures were performed in the entire cohort. Steatosis was graded as follows: Absent (score 0), echotexture of the liver is normal; mild (score 1), slight and diffuse increase of liver echogenicity with normal visualization of the diaphragm and of the portal vein wall; moderate (score 2), moderate increase of liver echogenicity with slightly impaired appearance of the portal vein wall and the diaphragm; severe (score 3), marked increase of liver echogenicity with poor or no visualization of portal vein wall, diaphragm, and posterior part of the right liver lobe [38]. The grading of fibrosis was obtained using Fibroscan 502 Touch devices (Echosens, Paris, France) equipped with M and XL probes. All measurements were performed by a specialized health-care professional experienced with the procedure. TE measurements were performed under usual and manufacturer standards. A liver stiffness measurement was considered reliable if an interquartile range/median (IQR/M) ratio < 0.30 was achieved, and only examinations with at least 10 individual measurements were deemed valid [27, 39, 40].

Primary care cohorts

Since Vall d'Hebron Hospital Clinical Laboratories provides clinical analysis service to primary care patients, we decided to include a population of patients that are regularly monitored at the analytical level in our hospital. To simplify and increase the efficiency of requesting analytical tests in a routine care setting, the Catalan Health System has implemented a set of Primary Care Protocols (PCPs) with multiple tests. Community clinicians can request those PCPs that better suit each clinical situation or diagnostic suspicion. The PCPs considered were T2D annual follow-up and initial study of CLD.

Inclusion criteria: (a) age > 18 years, (b) T2D diagnosis defined according to the American Diabetes Association (ADA) guidelines [41], for the primary care T2D cohort,

(c) suspicious liver disease: alcohol-related liver disease, chronic viral hepatitis, non-alcoholic liver steatosis, metabolic syndrome-related liver disease, autoimmune hepatitis, hepatotoxic drugs or CLD of unknown etiology, for the primary care CLD cohort.

Exclusion criteria: uncontrolled endocrine diseases (hypercortisolism, etc.).

These cohorts were included as a real-world study of the degree of liver fibrosis diagnosis, so liver samples were not available.

Biomarker measurement and noninvasive models of diagnosis of liver fibrosis

Hepatic insulin resistance (IR) was indirectly evaluated using the Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR), based on the formula [fasting glucose (mg/dl)*fasting insulin (μ U/mL)/405] [42]. A cut-off ≥ 3.02 has been described as a marker of IR in Caucasian population [43]. Patients with T2D on insulin treatment were excluded from the calculation of HOMA-IR.

The FIB-4 score was calculated following the formula: (age [years] \times AST [U/L])/(platelets [10^9 /L] \times (ALT [U/L])^{1/2}) [26], and the ELF score was measured by immunoassay on ADVIA Centaur® analyzers (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) [30].

Different liver fibrosis diagnosis models, non-significant fibrosis (F0–1) and advanced fibrosis (F3–4), were assessed in the biopsy-confirmed NASH cohort according to noninvasive biomarker results, considering liver biopsy as gold standard; namely, FIB-4 alone, ELF alone, FIB-4 and ELF in multivariate analysis, and FIB-4 and ELF in a sequential algorithm. The sequential algorithm involved an initial FIB-4 calculation in all patients. Those with FIB-4 < 1.30 were classified as F0–1 and those with FIB-4 ≥ 2.67 were classified as F3–4. In patients with FIB-4 intermediate values ($1.30 \leq \text{FIB-4} < 2.67$), ELF was measured, where ELF < 8.30 indicated F0–1 and ELF ≥ 9.50 indicated F3–4. Patients with intermediate values in ELF test ($8.30 \leq \text{ELF} < 9.50$) were classified as high risk of F2–4. Additionally, FibroScan measurement was included for high-risk F3–4 fibrosis to complement the noninvasive diagnosis in the sequential algorithm.

The sequential algorithm was assessed in primary care cohorts (T2D and CLD) to estimate the degree of liver fibrosis diagnosis, according to the evidence of liver disease in patients' medical records (i.e., confirmed by TE, magnetic resonance or ultrasonography findings).

Statistical analysis

The distribution of data was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. ANOVA and Kruskal–Wallis tests were

used to compare quantitative variables which followed a Gaussian distribution or not, respectively. Chi-squared test was used to compare proportions.

Logistic regression and Area Under Curve of Receiver Operator Characteristic (AUC-ROC) analysis were performed to assess liver fibrosis diagnosis models based on noninvasive biomarkers (FIB-4 and ELF). Parameters of diagnosis accuracy were calculated based on cut-offs proposed. All statistical analyses were performed with R-commander (R-UCA package, v.2.6-2).

Results

Characteristics of the study cohort

A total of 140 NASH patients fulfilling inclusion criteria were identified. Furthermore, 141 T2D primary care patients and 138 CLD primary care patients were included. Baseline characteristics of the three groups are shown in Table 1. Anthropometric variables (body mass index and waist circumference) were similar between NASH and T2D primary

care cohorts and higher than CLD primary care patients, as well as glucose and lipids metabolism parameters (fasting glucose, HOMA-IR, triglycerides, cholesterol LDL and HDL).

In the NASH cohort, 66% were diabetics ($n=93$). T2D treatment approaches included metformin (77%), either as a single treatment (27%) or co-administered with insulin (23%), glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs (9%), inhibitors of sodium-glucose cotransporter-2 (iSGLT2) (12%), or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (iDPP-IV) (6%); insulin alone (9%), and diet only (14%).

Biopsy, ultrasonography and biomarkers results of NASH cohort are shown in Table 2. The majority of patients had steatosis 0–1 ($n=90$) by histological study and mild steatosis ($n=80$) by ultrasonography measure, but only 50 of them had the similar classification. Otherwise, both FIB-4 and ELF biomarkers and TE measures showed increasing values with higher degrees of fibrosis.

In the T2D primary care cohort, treatment approaches included metformin (42%), insulin (7%), GLP-1 analogs (7%), iSGLT2 (9%), iDPP-IV (11%), sulfonylureas (7%) and diet only (17%).

Table 1 Clinical characteristics in the cohorts studied. Values are mean (standard deviation), number (%) or median (Q1–Q3)

Variable	NASH ($n=140$)	Primary care T2D ($n=141$)	Primary care CLD ($n=138$)	<i>P</i> value
Age (years)	59 (10)	57 (10)	56 (11)	0.093
Sex. Female	81 (58%)	71 (50%)	68 (49%)	0.294
BMI (kg/m ²)	32 (5)	32 (7)	27 (5)	<0.001^a
Waist circumference (cm)	108 (12)	104 (13)	92 (10)	<0.001^a
Fasting glucose (mg/dL)	129 (55)	148 (69)	90 (19)	<0.001^b
HbA1c (%)	6.5 (1.4)	7.5 (1.8)	5.7 (0.6)	<0.001^b
HOMA-IR	7.41 (6.40)	5.41 (4.04)	1.97 (1.07)	<0.001^a
Triglycerides (mg/dL)	153 (113–206)	156 (112–204)	109 (77–153)	<0.001^a
Cholesterol LDL (mg/dL)	116 (37)	116 (43)	137 (37)	<0.001^a
Cholesterol HDL (mg/dL)	49 (12)	48 (12)	55 (15)	<0.001^a
ALT (IU/L)	46 (31–71)	26 (20–40)	24 (21–32)	<0.001^c
AST (IU/L)	42 (29–59)	31 (20–49)	24 (15–33)	<0.001^b
GGT (IU/L)	73 (41–160)	43 (27–71)	29 (19–49)	<0.001^c
FIB-4	1.50 (1.06–2.38)	1.19 (0.85–1.53)	1.29 (0.92–1.78)	<0.001^c
ELF	9.57 (8.90–10.44)	9.66 (9.13–10.23)	9.41 (8.90–10.22)	0.367
Fibroscan	11.75 (9.00–17.08)			
Ultrasonography				
Mild steatosis	63 (45%)			
Moderate steatosis	43 (31%)			
Severe steatosis	34 (24%)			

Bold values indicate statistical significance

BMI body mass index, *HOMA-IR* homeostasis model assessment of insulin resistance, *ALT* alanine aminotransferase, *AST* aspartate aminotransferase, *GGT* gamma-glutamyl transpeptidase, *FIB-4* fibrosis 4 score, *ELF* enhanced liver fibrosis

^aSignificant differences between NASH and primary care T2D vs primary care CLD groups

^bSignificant differences between all groups

^cSignificant differences between NASH vs primary care T2D and primary care CLD groups

Table 2 Summary of biopsy findings, ultrasonography measures and FIB-4, ELF and Fibroscan values in the NASH cohort

Biopsy results		Ultrasonography		
Steatosis		Mild steatosis	Moderate steatosis	Severe steatosis
0–1	90 (64%)	50 (36%)	25 (18%)	15 (11%)
2	39 (28%)	10 (7%)	14 (10%)	15 (11%)
3	11 (8%)	3 (2%)	4 (3%)	4 (3%)
NASH activity score				
≤ 3	55 (39%)			
4	40 (29%)			
5	27 (19%)			
≥ 6	18 (13%)			
Fibrosis		FIB-4	ELF	Fibroscan
0–1	38 (27%)	1.04 (0.85–1.36)	8.93 (8.52–9.47)	9.00 (7.90–10.80)
2	23 (17%)	1.50 (1.08–1.82)	9.31 (8.83–9.75)	9.65 (7.88–12.45)
3–4	79 (56%)	1.95 (1.44–3.01)	10.10 (9.22–10.91)	15.00 (10.95–20.90)

Values are number (%) for biopsy and ultrasonography results and median (Q1–Q3) for FIB-4, ELF and Fibroscan measures

Diagnostic approaches for CLD in the primary care cohort were alcohol-related liver disease (8%), chronic hepatitis C infection (4%), non-alcoholic steatosis (15%), metabolic syndrome-related liver disease [high blood pressure (11%), dyslipidemia (20%), obesity (4%), hyperuricemia (6%) and hypothyroidism (6%)], liver cancer (1%), gastroenterological and liver lithiasis diseases (7%), cardiovascular disease (3%) and others (15%).

Noninvasive models of diagnosis of liver fibrosis in NASH cohort

Nonsignificant fibrosis (F0–1) and advanced liver fibrosis (F3–4) diagnosis models evaluated in the NASH cohort were: FIB-4 alone, ELF alone, FIB-4 and ELF in multivariate analysis and FIB-4 and ELF sequential algorithm. Summary of data and diagnostic accuracy parameters for all models is shown in Table 3.

The FIB-4 index alone showed the highest specificity (98%) and positive predictive value (PPV) (97%) in

Table 3 Model comparison for liver fibrosis diagnosis in the whole NASH cohort

	Diagnosis	Cut-off	AUC	IC95%	Sensitivity (%)	IC95%	Specificity (%)	IC95%	PPV (%)	IC95%	NPV (%)	IC95%
FIB-4	F0–1	< 1.3	0.79	0.71–0.86	68	51–83	75	65–83	50	36–64	86	76–93
	F3–4	≥ 2.67	0.80	0.72–0.86	35	25–47	98	91–100	97	82–100	55	45–64
ELF	F0–1	< 8.30	0.76	0.68–0.83	18	8–34	94	88–98	54	25–81	76	67–83
	F3–4	≥ 9.50	0.76	0.68–0.83	68	57–78	70	57–82	75	63–85	63	51–75
Multivariate regression	F0–1	–	0.81	0.73–0.87	61	46–77	82	71–94	56	39–71	85	76–91
	F3–4	–	0.81	0.73–0.87	80	71–89	70	60–81	78	67–86	73	61–84
Algorithm	F0–1	Combined ^a	0.76	0.68–0.83	71	57–85	81	69–94	58	43–72	88	80–90
	F3–4	Combined ^b	0.74	0.66–0.81	85	78–91	73	64–83	81	69–89	79	64–89
	F2–4	Combined ^c	0.62	0.43–0.80	88	65–96	58	43–73	85	66–97	50	36–63
	F≥ 2	Combined ^{b,c}	0.76	0.68–0.83	81	72–88	71	54–85	89	81–95	57	41–72
TE	F≥ 2	≥ 8 kPa	0.78	0.70–0.84	90	83–96	30	16–47	77	68–84	55	31–78

AUC area under curve, PPV predictive positive value, NPV negative predictive value

^aFIB-4 < 1.30 or 1.30 ≤ FIB-4 < 2.67 and ELF < 8.30

^bFIB-4 ≥ 2.67 or 1.30 ≤ FIB-4 < 2.67 and ELF ≥ 9.50

^c1.30 ≤ FIB-4 < 2.67 and 8.30 ≤ ELF < 9.50

predicting stages F3–4 comparing with the sequential algorithm (73% and 81%, respectively). However, the sensitivity and negative predictive value (NPV) for F3–4 were the lowest in FIB-4 alone comparing with the rest of models, being of 85% and 79%, respectively, in the sequential algorithm. Furthermore, ELF alone pointed to the highest specificity (94%) in predicting stages F0–1 versus the sequential algorithm, which only reached a 71%. However, the rest of parameters were lower than the sequential algorithm, highlighting the sensitivity for F0–1 and F3–4 diagnosis. On the other hand, multivariate model achieved lower diagnostic accuracy parameters than sequential algorithm but more compensated than the FIB-4 and ELF alone. Overall PPV was 81% (high risk) and NPV was 79% (low risk), for F3–4 diagnosis in the sequential algorithm (Fig. 1). Furthermore, this algorithm pointed to high-risk significant fibrosis (F2–4) for FIB-4 and ELF intermediate values, where sensitivity

and PPV were 88% and 85%, respectively. This classification was not possible when FIB-4 or ELF alone application. Finally, due to the high prevalence of T2D in the NASH cohort and its possible limitation in the FIB-4 interpretation, the accuracy of the sequential algorithm was evaluated separately between the T2D patients and non-diabetic subjects. The diagnostic performance parameters are shown in Table 4.

Additionally, FibroScan measurement was included for patients classified as high risk of F3–4 and F2–4. Ninety percent of $F \geq 2$ high risk patients demonstrated a TE value ≥ 8 kPa [23]. Alternatively, TE cut-offs ≥ 9.6 kPa and ≥ 7.0 kPa were applied for F3–4 and F2–4 classifications, respectively; both cut-offs have been described previously with high diagnostic performance in NAFLD [44]. Eighty two percent of F3–4 high-risk patients demonstrated a TE value ≥ 9.6 kPa, and 96% of F2–4 high-risk

Fig. 1 Algorithm of advanced fibrosis diagnosis in NASH cohort

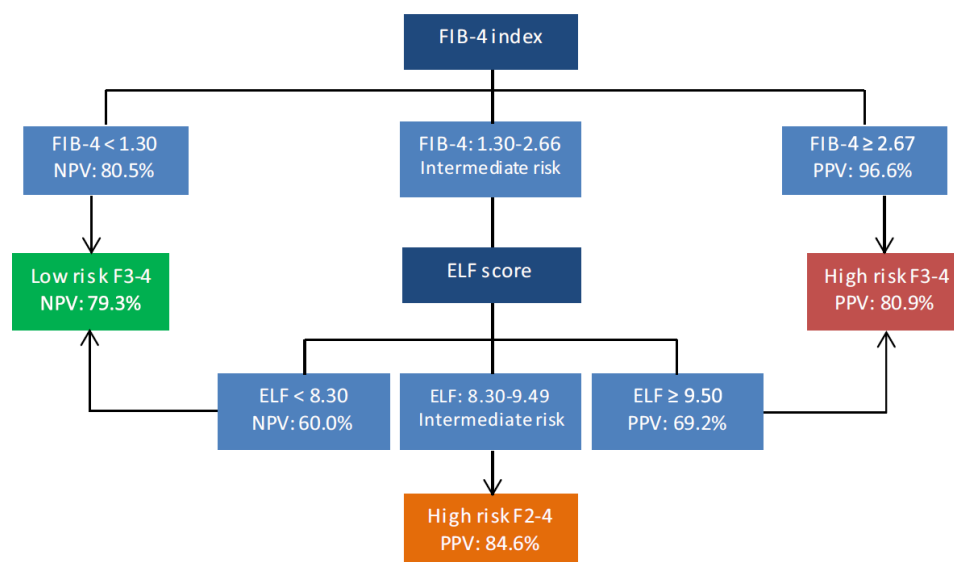


Table 4 Accuracy of sequential algorithm in the NASH patients with T2D and NASH patients without T2D

Diagnosis		Cut-off	AUC	IC95%	Sensi- tivity (%)	IC95%	Speci- ficity (%)	IC95%	PPV (%)	IC95%	NPV (%)	IC95%
F0–1	With T2D	Combined ^a	0.80	0.71–0.88	75	52–90	86	74–90	52	29–76	94	85–98
	Without T2D		0.70	0.55–0.83	68	43–84	68	49–87	65	43–85	71	48–86
F3–4	With T2D	Combined ^b	0.77	0.67–0.85	89	79–97	77	60–92	91	80–97	74	54–91
	Without T2D		0.61	0.46–0.75	64	38–88	68	53–86	60	39–87	83	58–97
F2–4	With T2D	Combined ^c	0.71	0.55–0.86	88	64–99	52	31–73	88	61–99	46	25–68
	Without T2D		0.74	0.56–0.88	88	61–100	65	43–84	78	42–95	53	35–71

^aFIB-4 < 1.30 or $1.30 \leq \text{FIB-4} < 2.67$ and $\text{ELF} < 8.30$

^b $\text{FIB-4} \geq 2.67$ or $1.30 \leq \text{FIB-4} < 2.67$ and $\text{ELF} \geq 9.50$

^c $1.30 \leq \text{FIB-4} < 2.67$ and $8.30 \leq \text{ELF} < 9.50$

AUC area under curve, PPV predictive positive value, NPV negative predictive value

patients demonstrated a TE value ≥ 7.0 kPa. The diagnostic performance parameters of $F \geq 2$ diagnosis for both TE and algorithm are summarized in Table 3.

Application of biomarkers in the primary care cohort

The liver fibrosis diagnostic sequential algorithm was applied on the primary care cohorts of T2D and CLD to compare with the NASH cohort. In both T2D ($n = 40$) and CLD ($n = 38$) primary care cohorts, a total of 28% of patients were classified as stages F3–4. Fifty-seven percent of patients were classified as F0–1 in the T2D primary care cohort ($n = 81$) and 53% of patients were classified as F0–1 in the CLD primary care cohort ($n = 73$) (Fig. 2). Additionally, a 14% ($n = 20$) of the T2D and a 20% ($n = 28$) of the CLD cohort patients were classified as F2–4.

Regarding clinical management and diagnostic evidence of liver disease in medical records, 80% of all F3–4 classified patients in the T2D cohort had steatosis as sign of liver disease based on ultrasonography techniques, where in addition, 12% of all F3–4 classified patients in the T2D cohort had a TE value ≥ 9.6 kPa. Forty-four percent of F3–4 classified patients in the T2D cohort were referred to secondary care, such as to a gastroenterologist, endocrinologist, or hepatologist.

In the CLD cohort, 71% of F3–4 classified patients had steatosis as sign of liver disease based on sonography techniques, where in addition, 11% of all F3–4 classified patients in the CLD cohort had a TE value ≥ 9.6 kPa. Forty-two percent of F3–4 classified patients in the CLD cohort were referred to secondary care, such as to a gastroenterologist or hepatologist.

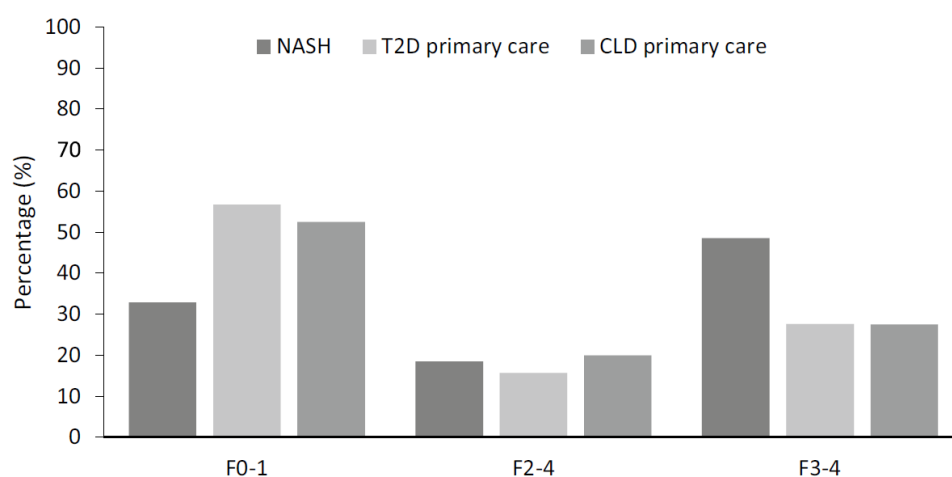
Discussion

Our results show the need and opportunity to implement algorithms for risk stratification of liver fibrosis based on biomarkers in patients with diagnostic suspicion of NAFLD, mainly those with NASH [45, 46]. Metabolic comorbidities, i.e., T2D, obesity, and dyslipidemia are the current targets for the detection of CLD [3], to such an extent that NAFLD is considered the liver manifestation of metabolic syndrome [47]. There are likely to be varying susceptibilities to the development of fibrosis in response to a similar amount of inflammatory liver injury, but NASH is probably the main driver of fibrosis progression and is a more dynamic entity than fibrosis [34].

NASH and T2D primary care cohorts showed similar values of analytes related to glucose and lipids metabolism (Table 1), reflexing the narrow association between both identities, which occurs in bidirectional ways [48, 49]. Insulin resistance plays a key role in the pathophysiology of NASH and fibrosis development, measured by HOMA-IR calculation [50–52]. Therefore, suspicion of liver fibrosis in an IR context and other metabolic comorbidities is warranted, as occurs in the NASH cohort, where the high F3–4 prevalence coexists with the HOMA-IR suggestive of IR [53, 54].

The misdiagnosis of NASH and fibrosis after liver biopsy occurs frequently, where 23% of discordances can be attributed to a biopsy error, and the degree of fibrosis estimated by TE is greater than biopsy in 89% of those cases [55, 56]. This misdiagnosis is shown in Table 2, where the F0–1 NASH patients had a TE median value suggestive of significant fibrosis. A poor correlation between steatosis degree by ultrasonography and liver biopsy was shown too, restricting their application in the liver disease severity stratification. Thus, FIB-4 and ELF can be useful tools to screen suspicious patients of liver fibrosis, complementary to TE

Fig. 2 Liver fibrosis estimation of the sequential algorithm in the three study cohorts. *NASH* Non-alcoholic steatohepatitis, *T2D* Type 2 diabetes, *CLD* Chronic liver disease



measurement to reinforce this diagnosis, as practiced in our NASH cohort, where TE and biomarkers values focused on the same diagnosis (Table 2). Used in this way, their optimal use can reduce the need for liver biopsy [23].

FIB-4 is a simple index composed of current routine laboratory tests, initially developed to rule out advanced fibrosis in patients coinfecting with HIV/HCV [25]. It has been demonstrated that FIB-4 allows appropriate identification of NAFLD patients at a higher risk of developing liver-related complications or death [57]; currently, FIB-4 is recommended by the EASL-Lancet Liver Commission for stratification of individuals at risk of liver disease [1]. In the NASH cohort, PPV of FIB-4 index for F3–4 was 97%, being enough for high-risk advanced fibrosis classification [58]; however, to solve the low NPV (55%) when FIB-4 value < 2.67 , a second step of fibrosis screening is needed.

The ELF score has been reported as a good biomarker of liver fibrosis detection [59] and it has been applied to detect NASH in obese patients with NAFLD [60]. In addition, ELF has been used to detect F2–3 [61] or F3–4 with $\text{ELF} > 9.8$ [62] and for F3–4 exclusion with $\text{ELF} < 8.4$ [29]. Also, $\text{ELF} > 10.4$ can predict clinical outcomes in patients with CLD [63]. Normal values are age dependent and this fact can limit predictive values when aging [61], but, because the higher sensitivity for F3–4 diagnosis than FIB-4 is observed in our results (68%), its implementation in practical assistance has been proposed as a cost-effective option compared to a single liver biopsy [64].

The algorithm proposed has higher diagnostic accuracy parameters for fibrosis diagnosis than the bivariate model (Table 3). It can be developed in one step from one blood drawn, saving physicians consultations, and it allows to guide a preliminary diagnosis from high-risk population of advanced CLD. This algorithm combines the high specificity of FIB-4 to discard F3–4 with the high sensitivity of ELF to detect F3–4 by sequential measure by combining use of two cut-off points. The limited use of individual biomarkers for the F2 detection is solved in the sequential algorithm, which achieved a high PPV (84.6%) for F2–4 when FIB-4 and ELF demonstrate intermediate values. Thus, the lower cut-off point proposed in ELF score allows F0–1 detection with high specificity ($\text{ELF} < 8.30$) when alone use, but also F2–4 detection ($\text{ELF} \geq 8.30$) with high sensitivity in combination to FIB-4 intermediate values.

Different scenarios of liver fibrosis detection have been reported, where management in primary care or referral to specialist depends on F3–4 risk [34]. An initial FIB-4 calculation followed by ELF measurement in intermediate cases have an impact on total health care save of 25% and a reduction in hospital referrals of 70% [35].

Finally, when TE measurement is available, it can complement this biomarker-based algorithm (as performed in our NASH cohort) to reduce liver biopsy necessity. In our

case, we showed a concordance of 90% of TE measurements for $F \geq 2$ using the consensus cut-off ≥ 8 kPa [23, 27]. However, since the algorithm provided both an F3–4 and F2–4 high-risk classifications in separate groups, adjusting worthwhile TE cut-offs in a population at high risk for advanced liver disease, as represented by the NASH cohort studied, may provide an advantage for the degree of liver fibrosis diagnostic confirmation [65, 66]. Meanwhile, the diagnostic sensitivity of $F \geq 2$ offered by the TE measurement was optimal; however, the lower specificity (30% versus 71% provided by algorithm) makes its use as a screening technique not advisable, but rather to be used in $\text{FIB-4} > 1.3$ results, as the algorithm with the ELF combination measurement offers. In addition, the low availability of TE measurement limits its implementation on a large scale, so the use of biomarker-based on algorithms is more affordable, as well as stratifying in F3–4 and F2–4 high-risk different groups. So, it is worth developing safe and easily accessible noninvasive modalities to accurately diagnose NASH associated fibrosis [67].

The algorithm was proven in T2D and CLD primary care clinical settings in a pilot study. The T2D and CLD patients followed standard of care and only had a steatosis diagnosis in the majority of cases despite metabolic comorbidities—where T2D has been considered the main metabolic risk factor of advanced fibrosis [5, 49, 68]. So, liver fibrosis has to be suspicious in these patients, particularly when diagnosed with CLD [69]. Risk factor detection, such as, T2D, obesity or metabolic syndrome, is the first step in the assessment of liver fibrosis; subsequent imaging evidence of fat accumulation or liver enzyme abnormalities can trigger the non-invasive algorithm for advanced fibrosis detection [36].

Advanced fibrosis classification in both primary care cohorts was lower than in the NASH cohort, but it was 28%, a percentage high enough to consider the necessity to implement referral protocols to a secondary care specialist [23]. Since 44% and 42% of high-risk F3–4 T2D and CLD patients, respectively, were referred to a specialist and over 10% had previously a LS pathological measurement, the sequential algorithm implementation would be appropriate, because these patients would have benefited directly. This fact also reflects the necessity to set up the current referral protocols in our sanitary system to rescue the rest of high-risk patients according to noninvasive biomarkers. An estimation of the amount of ELF determinations and referrals to specialists is needed to assess the economic impact. When considering high-risk F2–4 patients, repeating biomarker-based algorithm at primary care level or TE measure would be recommended [1, 70]. Thus, the cut-offs fitting of the biomarkers allows stratify at high-risk or intermediate-risk of F3–4 and prioritize referral to specialist [66].

Guidelines have raised concerns regarding the need for community NAFLD screening because of the progressive

form to NASH—particularly associated with advanced fibrosis—indicating that it should be identified in patients at risk [71]. In low-prevalence populations, noninvasive fibrosis tests should be used for ruling out advanced fibrosis, but they should be preferentially used in patients at risk of advanced liver fibrosis (such as patients with metabolic risk factors) and not in unselected general populations [27]. Additionally, it has been established that NAFLD and NASH should be suspected in patients with T2D, indicating that the clinical decision must be supported by biomarker measurement in addition to TE [2, 6, 72]. Of note, a 25% of T2D with NAFLD and FIB-4 < 1.3 who underwent liver biopsy had F3–F4 fibrosis (this percentage was 14% in patients without T2D); a FIB-4 result < 1.30 should be considered with caution in patients with T2D, and TE could help to refine the evaluation in this situation [28, 73]. In the NASH cohort studied, T2D variable inclusion in the multivariate logistic regression model did not improve the cases correctly classified (76%). Regarding the assessment of the algorithm in diabetic and non-diabetic patients separately, the diagnostic performance of F0–1 and F3–4 was higher in the T2D patients, whereas classification of the F2–4 group was more accurately done in patients without T2D. The high prevalence of F3–4 in T2D patients has been able to overcome the 25% of false negatives for FIB-4 < 1.3. On the other hand, the higher prevalence of F2 in non-diabetics (65% versus 47% in T2D subjects) can explain the improvement of the diagnostic accuracy for F2–4 in this sub-cohort.

Our study has some limitations that should be noted and that restrict the extrapolation of our results to the general population, such as: (a) the high proportion of advanced liver fibrosis in the NASH cohort could overestimate the high-risk F3–4 percentage in the primary care cohorts; (b) the absence of a gold standard method to grade liver fibrosis in the T2D and CLD primary care cohorts could limit the assessment of the algorithm concordance and direct implementation.

In conclusion, noninvasive biomarkers for liver fibrosis diagnosis allow the detection of high-risk patients with F3–4—the main outcome in CLD associated with poor prognosis in populations with metabolic risk factors. FIB-4 and ELF measurement in a sequential algorithm is a high efficiency strategy to stratify the risk of liver fibrosis in one step and prioritize patients attended at the primary care level who need specialist management and treatment.

Acknowledgements The authors of the study thank the technical staff of the Biochemistry Department for the support offered in the samples management, processing of serum samples and collection of results.

Author contributions Conceptualization: PG-M, RF-C, FR-F, AC and DMS; methodology: PG-M, RF-C, AC and DMS; software: PG-M; validation: PG-M, RF-C, AC and DMS; formal analysis: PG-M, RF-C, AC and DMS; investigation: PG-M, RF-C, AC and DMS; resources: SA and FR-F; data curation: PG-M, RF-C, FR-F, AC, JR-E and DMS; writing—original draft preparation: PG-M, RF-C, FR-F, AC, SA, JR-E,

JMP and DMS; writing—review and editing: PG-M, RF-C, FR-F, AC, SA, JR-E, JMP and DMS; visualization: PG-M, RF-C, FR-F, AC, SA, JR-E, JMP and DMS; supervision: RF-C, AC, FR-F and DMS; project administration: RF-C, AC, FR-F and DMS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This research received no external funding.

Data availability The data that support the findings of this article are available from the corresponding authors on reasonable request.

Declarations

Conflict of Interest Juan M. Pericàs: Consulting, speaking and travel fees (Boehringer-Ingelheim, MSD, Novo Nordisk, Gilead, Intercept, Rubió, Pfizer, Astellas, CUBICIN, Novartis), Educational and research support (Madrigal, Novo Nordisk, Gilead, Pfizer, Astellas, Accelerate, Novartis, Abbvie, ViiV, and MSD. Funds from European Commission/EFPIA IMI2 853966-2, IMI2 777377, H2020 847989, IS-CIII PI19/01898 and PI22/01770). Salvador Augustin: Consulting / Advisory Boards (Boehringer Ingelheim, Gilead, Intercept, Novartis, Pfizer, Ferrer, IQVIA), Speaking fees (Allergan, Gilead, MSD, Menarini, Novartis, Allergan), Grants (Gilead). Rest of authors declare no conflict of interest.

Human and animal rights All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional (approved by the local Ethics Committee (PR(AG)601/2020)) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Institutional review board statement The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital (protocol code PR(AG)601/2020 signed on 17 March 2021).

Informed consent Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Karlsen TH, Sheron N, Zelber-Sagi S, Carrieri P, Dusheiko G, Bugianesi E et al (2022) The EASL–lancet liver commission: protecting the next generation of Europeans against liver disease complications and premature mortality. *Lancet* 399:61–116. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01701-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01701-3)
2. Blanco-Grau A, Gabriel-Medina P, Rodríguez-Algarra F, Villena Y, López-Martínez R, Agustín S et al (2021) Assessing liver

- fibrosis using the fib4 index in the community setting. *Diagnostics* 11:2236. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122236>
3. Cotter TG, Nonalcoholic RM, Disease FL (2020) The state of the disease (2020). *Gastroenterology* 158:1851–1864. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>
 4. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64:73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
 5. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M et al (2018) Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15:11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>
 6. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M et al (2018) The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American association for the study of liver diseases. *Hepatology* 67:328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>
 7. Mazzolini G, Sowa JP, Atorrasagasti C, Küçükoglu Ö, Syn WK, Canbay A (2020) Significance of simple steatosis: an update on the clinical and molecular evidence. *Cells* 9:1–19. <https://doi.org/10.3390/cells9112458>
 8. Sanyal AJ, Van Natta ML, Clark J, Neuschwander-Tetri BA, Diehl A, Dasarthy S et al (2021) Prospective study of outcomes in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 385:1559–1569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2029349>
 9. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Björnsson ES, Charatcharoenwitthaya P et al (2015) Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 149:389–397.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>
 10. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z et al (2017) Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 65:1557–1565. <https://doi.org/10.1002/hep.29085>
 11. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J et al (2018) Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol* 69:896–904. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.036>
 12. Younossi Z (2019) Non-alcoholic fatty liver disease – a global public health perspective. *J Hepatol* 70:531–544. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.033>
 13. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N et al (2019) The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 71:793–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>
 14. Perrault J, McGill DB, Ott BJ, Taylor WF (1978) Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients. *Gastroenterology* 74:103–106. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(78\)90364-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(78)90364-5)
 15. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS et al (2003) A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:518–526. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346>
 16. Rossi E, Adams LA, Bulsara M, Jeffrey GP (2007) Assessing liver fibrosis with serum marker models. *Clin Biochem Rev* 28:3–10. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346>
 17. Gorowska-Kowolik K, Chobot A, Kwiecien J (2017) 13C methacetin breath test for assessment of microsomal liver function: methodology and clinical application. *Gastroenterol Res Pract* 2017:7397840. <https://doi.org/10.1155/2017/7397840>
 18. da Silva Junior RG, de Miranda MLQ, de Araújo Caldeira Brant PE et al (2021) Acoustic radiation force impulse elastography and liver fibrosis risk scores in severe obesity. *Arch Endocrinol Metab* 65:730–738. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000397>
 19. Reiter R, Wetzel M, Hamesch K et al (2018) Comparison of non-invasive assessment of liver fibrosis in patients with alpha1-antitrypsin deficiency using magnetic resonance elastography (MRE), acoustic radiation force impulse (ARFI) quantification, and 2D-shear wave elastography (2D-SWE). *PLoS One* 13:e0196486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196486>
 20. Hanquinet S, Rougemont AL, Courvoisier D et al (2013) Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography for the noninvasive diagnosis of liver fibrosis in children. *Pediatr Radiol* 43:545–551. <https://doi.org/10.1007/s00247-012-2595-8>
 21. Serra-Burriel M, Graupera I, Torán P, Thiele M, Roulot D, Wai-Sun Wong V et al (2019) Transient elastography for screening of liver fibrosis: cost-effectiveness analysis from six prospective cohorts in Europe and Asia. *J Hepatol* 71:1141–1151. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.019>
 22. Carrion JA, Puigvehí M, Coll S, Garcia-Retortillo M, Cañete N, Fernández R et al (2015) Applicability and accuracy improvement of transient elastography using the M and XL probes by experienced operators. *J Viral Hepat* 22:297–306. <https://doi.org/10.1111/jvh.12296>
 23. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R (2019) Noninvasive assessment of liver disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 156:1264–1281.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.036>
 24. Wong VWS, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GLH, Sookoian S (2018) Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH—current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15:461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0014-9>
 25. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J et al (2006) Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 43:1317–1325. <https://doi.org/10.1002/hep.21178>
 26. Wang L, Wang M, Zhao W, Shi Y, Sun Y, Wu X et al (2015) Key points of 2015 EASL-ALEH clinical practice guidelines: non invasive tests for evaluation of liver severity and prognosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 23:488–492
 27. Berzigotti A, Tsochatzis E, Boursier J, Castera L, Cazzagon N, Friedrich-Rust M et al (2021) EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. *J Hepatol* 75:659–689. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.05.025>
 28. Boursier J, Hagström H, Ekstedt M, Moreau C, Bonacci M, Cure S et al (2022) Non-invasive tests accurately stratify patients with NAFLD based on their risk of liver-related events. *J Hepatol* 76:1013–1020. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.12.031>
 29. Wong GLH, Chan HLY, Choi PCL, Chan AWH, Yu Z, Lai JWY et al (2014) Non-invasive algorithm of enhanced liver fibrosis and liver stiffness measurement with transient elastography for advanced liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 39:197–208. <https://doi.org/10.1111/apt.12559>
 30. Fernandes FF, Ferraz ML, Andrade LE, Dellavance A, Terra C, Pereira G et al (2015) Enhanced liver fibrosis panel as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Clin Gastroenterol* 49:235–241. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000128>
 31. Guillaume M, Moal V, Delabaudiere C, Zuberbuhler F, Robic MA, Lannes A et al (2019) Direct comparison of the specialised blood fibrosis tests FibroMeterV2G and Enhanced Liver Fibrosis score in patients with non-alcoholic fatty liver disease from tertiary care centres. *Aliment Pharmacol Ther* 50:1214–1222. <https://doi.org/10.1111/apt.15529>
 32. Mansour D, Grapes A, Herscovitz M, Cassidy P, Vernazza J, Broad A et al (2021) Embedding assessment of liver fibrosis into

- routine diabetic review in primary care. *JHEP Reports* 3:100293. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100293>
33. Boursier J, Tsochatzis EA (2021) Case-finding strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep* 3:100219. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100219>
34. Tsochatzis EA, Newsome PN (2018) Non-alcoholic fatty liver disease and the interface between primary and secondary care. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 3:509–517. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30077-3](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30077-3)
35. Srivastava A, Jong S, Gola A, Gailer R, Morgan S, Sennett K et al (2019) Cost-comparison analysis of FIB-4, ELF and fibroscan in community pathways for non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 19:122. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1039-4>
36. Vilar-Gomez E, Chalasani N (2018) Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol* 68:305–315. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.013>
37. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
38. Ferraioli G, Soares Monteiro LB (2019) Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. *World J Gastroenterol* 25(40):6053–6062. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i40.6053>
39. Castera L, Yuen Chan HL, Arrese M et al (2015) EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 63(1):237–264. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.04.006>
40. Eddowes PJ, Sasso M, Allison M et al (2019) Accuracy of fibroscan controlled attenuation parameter and liver stiffness measurement in assessing steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 156(6):1717–1730. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.042>
41. American Diabetes Association (2021) 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care* 44:S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
42. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
43. Shashaj B, Luciano R, Contoli B, Morino GS, Spreghini MR, Rustico C et al (2016) Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. *Acta Diabetol* 53:251–260. <https://doi.org/10.1007/s00592-015-0782-4>
44. Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, Foucher J, Chan HLY, Le Bail B et al (2010) Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51:454–462. <https://doi.org/10.1002/hep.23312>
45. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R (2015) Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13:643–e40. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.014>
46. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S et al (2008) Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatology* 47:455–460. <https://doi.org/10.1002/hep.21984>
47. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E et al (2015) Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 61:506–514. <https://doi.org/10.1002/hep.27490>
48. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G (2018) Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: cause or consequence? *J Hepatol* 68(2):335–352. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.021>
49. Lomonaco R, Leiva EG, Bril F, Shrestha S, Mansour L, Budd J et al (2021) Advanced liver fibrosis is common in patients with type 2 diabetes followed in the outpatient setting: the need for systematic screening. *Diabetes Care* 44:399–406. <https://doi.org/10.2337/dc20-1997>
50. Sorrentino P, Terracciano L, D'Angelo S, Ferbo U, Bracigliano A, Vecchione R (2010) Predicting fibrosis worsening in obese patients with NASH through parenchymal fibronectin, HOMA-IR, and hypertension. *Am J Gastroenterol* 105:336–344. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.587>
51. Chatterjee A, Basu A, Das K, Singh P, Mondal D, Bhattacharya B et al (2020) Hepatic transcriptome signature correlated with HOMA-IR explains early nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Ann Hepatol* 19:472–481. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.06.009>
52. Dongiovanni P, Stender S, Pietrelli A, Mancina RM, Cespiati A, Petta S et al (2018) Causal relationship of hepatic fat with liver damage and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver. *J Intern Med* 283:356–370. <https://doi.org/10.1111/joim.12719>
53. Gabriel-Medina P, Ferrer-Costa R, Rodriguez-Frias F, Ciudin A, Augustin S, Rivera-Esteban J, Pericàs JM, Selva DM (2022) Influence of Type 2 diabetes in the association of PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 polymorphisms in NASH advanced liver fibrosis. *Biomedicines* 10:1015. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051015>
54. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ (2018) Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 24:908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>
55. Myers RP, Crotty P, Pomier-Layrargues G, Ma M, Urbanski SJ, Elkashab M (2010) Prevalence, risk factors and causes of discordance in fibrosis staging by transient elastography and liver biopsy. *Liver Int* 30:1471–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02331.x>
56. Kleiner DE, Bedossa P (2015) Liver histology and clinical trials for nonalcoholic steatohepatitis—perspectives from 2 pathologists. *Gastroenterology* 149:1305–1308. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.015>
57. Angulo P, Bugianesi E, Björnsson ES, Charatcharoenwittaya P, Mills PR, Barrera F et al (2013) Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 145:782–9.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.057>
58. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, NASH Clinical Research Network (2009) Use of the fib4 index for non-invasive evaluation of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7:1104–1112. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.05.033>
59. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D (2009) Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 136:160–167. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.013>
60. López IC, Aroca FG, Bernal MDF, Mompeán JAL, Bernal ÁB, Martínez AMH et al (2017) Utility of the ELF test for detecting steatohepatitis in morbid obese patients with suspicion of nonalcoholic fatty liver disease. *Obes Surg* 27:2347–2353. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-2606-9>
61. Lichtigthagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ (2013) The enhanced liver fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol* 59:236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.016>
62. Day J, Patel P, Parkes J, Rosenberg W (2019) Derivation and performance of standardized enhanced liver fibrosis (ELF) test

- thresholds for the detection and prognosis of liver fibrosis. *J Appl Lab Med* 3:815–826. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027359>
63. Parkes J, Roderick P, Harris S, Day C, Mutimer D, Collier J et al (2010) Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut* 59:1245–1251. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.203166>
 64. Soto M, Sampietro-Colom L, Lasalvia L, Mira A, Jiménez W, Navasa M (2017) Cost-effectiveness of enhanced liver fibrosis test to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C virus and alcoholic liver disease patients. *World J Gastroenterol* 23:3163–3173. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i17.3163>
 65. Honda Y, Yoneda M, Imajo K, Nakajima A (2020) Elastography techniques for the assessment of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 21:4039. <https://doi.org/10.3390/ijms21114039>
 66. Kjaergaard M, Lindvig KP, Thorhauge KH et al (2023) Using the ELF test, FIB-4 and NAFLD fibrosis score to screen the population for liver disease. *J Hepatol* S0168–8278(23):00225–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.04.002>
 67. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G et al (2018) Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology* 68:349–360. <https://doi.org/10.1002/hep.29721>
 68. Morling JR, Fallowfield JA, Guha IN, Nee LD, Glancy S, Williamson RM et al (2014) Using non-invasive biomarkers to identify hepatic fibrosis in people with type 2 diabetes mellitus: the Edinburgh type 2 diabetes study. *J Hepatol* 60:384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.10.017>
 69. Thiagarajan P, Chalmers J, Guha IN, James MW (2020) Detecting chronic liver disease: Are liver function tests the solution? *Br J Hosp Med* 81:1–8. <https://doi.org/10.12968/hmed.2019.0308>
 70. Romero-Gómez M, Aller R, Ampuero J et al (2022) AEEH consensus about detection and referral of hidden prevalent liver diseases. *Gastroenterol Hepatol* S0210–5705(22):00137–6. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2022.04.001>
 71. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V et al (2016) EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64:1388–1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
 72. Bazick J, Donithan M, Neuschwander-Tetri BA, Kleiner D, Brunt EM, Wilson L (2015) Clinical model for NASH and advanced fibrosis in adult patients with diabetes and NAFLD: guidelines for referral in NAFLD. *Diabetes Care* 38:1347–1355. <https://doi.org/10.2337/dc14-1239>
 73. Rojano-Toimil A, Rivera-Esteban J, Manzano-Núñez R, Bañares J, Selva DM, Gabriel-Medina P (2022) When sugar reaches the liver: phenotypes of patients with diabetes and NAFLD. *J Clin Med* 11:3286. <https://doi.org/10.3390/jcm11123286>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.3 Aumento precoz de la SHBG como predictor de la respuesta a la cirugía bariátrica en la obesidad severa

En la actualidad, la CB representa la mejor solución en términos de reducción de peso sostenida y remisión de las comorbilidades metabólicas en pacientes con obesidad severa, además de restaurar la homeostasis metabólica, donde se produce un aumento de la concentración de proteínas plasmáticas, como la SHBG, cuya expresión se ve disminuida por el desequilibrio de adipocinas que se produce en la obesidad. No obstante, la respuesta a la CB a largo plazo puede ser variable, y la reganancia de peso se produce en un número significativo de pacientes. Debido a la existencia de múltiples factores que se asocian en parte a la reganancia de peso tras la CB, existe la necesidad de encontrar un biomarcador fiable que prediga el éxito de la CB en términos como el TWL y WR.

El objetivo de este estudio fue explorar el impacto de la CB en la SHBG, así como el papel potencial de la SHBG como biomarcador fiable para predecir el TWL y WR tras la CB en pacientes con obesidad.

Se realizó un estudio prospectivo que incluyó pacientes atendidos en la Unidad de Obesidad del Hospital Universitari Vall d'Hebron que se sometieron a CB. Los criterios de inclusión fueron: edad: 18-60 años, IMC ≥ 40 kg/m² o IMC ≥ 35 kg/m² con comorbilidades, cumplimiento de protocolo preoperatorio para BS, sometidos a RYGB o gastrectomía en manga como técnica de BS. Se excluyeron aquellos pacientes con contraindicaciones de CB, imposibilidad de realizar el seguimiento durante al menos 2 años e intervenidos con otras técnicas de CB. Los pacientes fueron visitados previamente a la CB (pre-CB), un mes (1^{er} seguimiento), 6 meses (6^o seguimiento), 12 meses (12^o seguimiento) y 24 meses (24^o seguimiento) después de la CB; en los que se recogieron datos antropométricos y se midió la SHBG mediante ELISA, entre otras variables bioquímicas habituales del laboratorio clínico. La pérdida de peso se evaluó mediante el TWL (%) y la reganancia de peso mediante la WR (%), calculada como $[100 \times (\text{peso post-nadir} - \text{peso nadir})] / \text{peso nadir}$.

Se incluyeron a un total de 62 pacientes, donde el 40% (n=25) fueron diagnosticados de DM2 antes de la CB. Se observó una remisión de la DM2 en el 76% de los pacientes con este diagnóstico antes de la CB tras dos años de seguimiento.

En cuanto a los cambios antropométricos durante los dos años de seguimiento, el peso, el IMC y el perímetro de cintura experimentaron un descenso significativo, alcanzando el nadir a los 12 meses. Cabe destacar que toda la cohorte presentó un HOMA-IR medio pre-CB superior al punto de corte considerado normal para la población española, y se normalizó

a partir del 1^{er} seguimiento. En cuanto a la SHBG, la concentración en sangre aumentó significativamente hasta el 6^o mes tras la CB, alcanzando el máximo en el 12^o mes.

Los pacientes se subdividieron en función del TWL al año de la cirugía, en TWL<25% y TWL≥25%, ajustados por edad y sexo. El TWL al 6^o, 12^o y 24^o mes fue significativamente mayor en el grupo con TWL≥25%. Al 24^o mes, los pacientes con un TWL<25% experimentaron una WR media del 6,6% respecto al nadir.

La concentración de SHBG no aumentó significativamente en el grupo con un TWL<25% en el 1^{er} mes, y alcanzó el 13% de aumento en el 6^o mes comparado con el previo. No se encontraron aumentos significativos entre el 6^o, 12^o y 24^o mes. En los pacientes con un TWL≥25%, la concentración plasmática de SHBG aumentó significativamente en un 65% en el 1^{er} mes, y un 16% entre el 1^o y el 6^o mes. No se observaron aumentos significativos entre el 6^o, el 12^o y el 24^o mes. Estos resultados se corroboraron analizando la variación de SHBG (ratio SHBG seguimiento / SHBG pre-CB), donde los pacientes con un TWL≥25% presentaron aumentos significativamente mayores de SHBG que aquellos con un TWL<25% en cada mes, excepto en el 12^o.

Se realizó un análisis de regresión logística para evaluar el papel predictor del ratio SHBG 1^{er} mes / SHBG pre-CB en la buena respuesta a la CB (TWL≥25%). Se obtuvo un OR=2,71 (IC 95%=1,11-6,60, p=0,028) y un AUC=0,68 (IC 95%=0,55-0,80).

Por otro lado, se realizó un análisis de regresión múltiple para predecir el TWL en el 12^o mes después de la CB, el cual generó el modelo (r=0,330, p=0,012):

$$\text{TWL } 12^{\circ} \text{ mes} = 26,23 + 2,89 * \frac{\text{SHBG } 1^{\text{er}} \text{ mes}}{\text{SHBG pre} - \text{CB}}$$



Finalmente, se calculó un modelo de predicción de la WR al 24^o mes por regresión múltiple, obteniendo el siguiente (r=-0,301, p=0,028):

$$\text{WR } 24^{\circ} \text{ mes} = 3,30 - 1,72 * \frac{\text{SHBG } 1^{\text{er}} \text{ mes}}{\text{SHBG pre} - \text{CB}}$$

Estos resultados apuntan al papel de la SHBG como un biomarcador precoz de la respuesta a la CB en términos de pérdida total de peso y reganancia de peso, dando un papel relevante a la recuperación de la función hepática y del control metabólico en esta respuesta a la CB a largo plazo.



Plasma SHBG Levels as an Early Predictor of Response to Bariatric Surgery

P. Gabriel-Medina^{1,2,3} · R. Ferrer-Costa^{1,3} · F. Rodriguez-Frias^{1,2,3,4} · M. Comas⁵ · R. Vilallonga⁶ · A. Ciudin^{5,7,8}  · D. M. Selva^{7,8} 

Received: 30 June 2023 / Revised: 30 November 2023 / Accepted: 6 December 2023
© The Author(s) 2024

Abstract

Background Obesity is a growing global health problem, and currently, bariatric surgery (BS) is the best solution in terms of sustained total weight loss (TWL). However, a significant number of patients present weight regain (WR) in time. There is a lack of biomarkers predicting the response to BS and WR during the follow-up. Plasma SHBG levels, which are low in obesity, increase 1 month after BS but there is no data of plasma SHBG levels at long term. We performed the present study aimed at exploring the SHBG role in predicting TWL and WR after BS.

Methods Prospective study including 62 patients with obesity undergoing BS. Anthropometric and biochemical variables, including SHBG were analyzed at baseline, 1, 6, 12, and 24 months; TWL $\geq 25\%$ was considered as good BS response.

Results Weight loss nadir was achieved at 12 months post-BS where maximum SHBG increase was reached. Greater than or equal to 25% TWL patients presented significantly higher SHBG increases at the first and sixth months of follow-up with respect to baseline (100% and 150% respectively, $p=0.025$), than $<25\%$ TWL patients (40% and 50% respectively, $p=0.03$). Also, these presented 6.6% WR after 24 months. The first month SHBG increase predicted BS response at 24 months (OR=2.71; 95%CI=[1.11–6.60]; $p=0.028$) and TWL in the 12th month ($r=0.330$, $p=0.012$) and the WR in the 24th ($r=-0.301$, $p=0.028$).

Conclusions Our results showed for the first time that increase in plasma SHBG levels within the first month after BS is a good predictor of TWL and WR response after 2 years.

Keywords Bariatric surgery · Sex hormone-binding globulin · Biomarker · Weight loss · Weight regain

Introduction

Obesity is a global health epidemic leading to the development of metabolic syndrome (MetS), type 2 diabetes mellitus (T2D), metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD), dyslipemia,

and cardiovascular disease (CVD) [1, 2] among other serious complications. Obesity and its associated comorbidities have been exponentially increased during the last 40 years [3]. In this regard, the adult population worldwide with obesity and overweight is 13% and 39% respectively [4], exceeding the 24% of prevalence for obesity in Europe and the USA [5]. Obesity management represents a medical and socio-economic burden in industrialized and in developing countries [6].

Obesity leads to adipose tissue inflammation which contributes to the development of peripheral and hepatic insulin resistance (IR) and MAFLD [7]. Furthermore, obesity gives rise to increased intestinal permeability, resulting in higher circulating levels of microbiome antigens, which amplify inflammatory processes and proinflammatory adipokines dysregulation [8]. This dysregulation potentially leads to metabolic disorders and chronic complications such as CVD, hypertension, and systemic IR [9]. Another effect of this adipokine imbalance is the downregulation of the biosynthesis of liver proteins, such as sex hormone-binding

Key points

- Reliable biomarkers predicting the response to bariatric surgery and weight regain are needed.
- The increase in plasma SHBG levels within the first month after BS is a good predictor of the response to bariatric surgery in terms of total weight loss and weight regain.
- SHBG may be a biomarker of the improvement of metabolic control after bariatric surgery.

✉ A. Ciudin
andreea.ciudin@vallhebron.cat

✉ D. M. Selva
david.martinez.selva@vhir.org

Extended author information available on the last page of the article

globulin (SHBG). In this regard, it has been described that pro-inflammatory cytokines decrease, and anti-inflammatory cytokines increase hepatic SHBG production, respectively [10–12]. The role of SHBG as a biomarker associated with metabolic dysregulation has been described in experimental animal models, which have shown that glucose- and fructose-induced lipogenesis decrease liver SHBG synthesis [13]. In addition, plasma SHBG levels have been inversely correlated with intrahepatic fat content, IR, and body mass index (BMI) [14, 15], so it is considered a biomarker for MetS [16] and predictive of T2D [17] and CVD [18, 19].

At present, bariatric surgery (BS) represents the best solution in terms of sustained weight reduction and remission of the associated metabolic comorbidities in patients with obesity [20]. European guidelines recommend BS to be considered for patients of 18–60 years with BMI ≥ 40.0 kg/m² or BMI ≥ 35.0 and comorbidities expected to improve after significant weight loss [21–23]. Long-term response to BS can be variable and was usually evaluated by % excess weight loss (EWL) and % total weight loss (TWL). Classically, EWL $> 50\%$ and more recently TWL $\geq 25\%$ cut-offs have been defined as “good response” to BS [24]. Nevertheless, weight regain (WR) occurs in a significant number of patients after BS [25]. Previous studies have reported that the nadir EWL and TWL after BS were maintained in $< 50\%$ and $< 25\%$, respectively, after 20 years of follow-up [26]. A recent meta-analysis reported that 17.6% of patients who underwent BS had a WR $\geq 10\%$ starting 3 years after BS [27]. The WR etiology is multifactorial. Several factors have been proposed to explain WR, including pre-operative BMI, hormonal factors, nutrition habits, physical activity, mental health, genetics [28, 29], and anatomical changes [30]. Nevertheless, these factors do not completely explain the WR after BS [31].

To the best of our knowledge, there is no reliable biomarker that predicts successful TWL and/or WR after BS. Overall, BS restores metabolic homeostasis [32]; apart from TWL and reduction in waist circumference (WC), there is an increase in SHBG levels on the first month after BS, accompanied by the secretion of anti-inflammatory and insulin-sensitizing factors [33–35]. On these bases, we designed the present study to explore the impact of BS on SHBG, as well as the potential role of SHBG as reliable biomarker for predicting TWL and WR after BS in patients with obesity.

Method

Study Design and Patients

A prospective study, including consecutive patients with obesity attended at the Obesity Unit of the Vall d’Hebron University Hospital (VHUH) that underwent BS from June 2018 to January 2020, was performed. The study was conducted

according to the Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee (PR(AG)320/2018). Serum samples from patients included in this study were provided by the VHUH Obesity Biobank (PT17/0015/0047), integrated in the Spanish National Biobanks Network, and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. All participants had previously signed the informed consent.

Inclusion criteria were as follows: (a) age, 18–60 years; (b) BMI ≥ 40 kg/m² or BMI ≥ 35 kg/m² with comorbidities; (c) preoperative protocol fulfilment for BS; and (d) Roux-en-Y-gastric bypass (RYGB) or sleeve gastrectomy as BS technique.

Exclusion criteria were as follows: (a) BS contraindication according to the usual clinical practice in our center; (b) impossibility of performing the follow-up for at least 2 years; and (c) other BS techniques.

As per BS protocol at our site, patients are visited before BS (pre-BS), 1 month (1st month follow-up), 6 months (6th follow-up), 12 months (12th follow-up), and 24 months (24th follow-up) after BS. Anthropometry (weight, height, and waist circumference), biochemical analysis, and systematic extraction of blood samples in fasting conditions for Obesity Biobank are obtained at all-time points (Fig. 1). These data were used for the study.

Clinical, anthropometric, and laboratory measurements

Weight loss was evaluated by TWL (%) calculation, as follows: $100 \times (\text{weight (kg) at month follow-up} / \text{weight (kg) at pre-BS})$. A TWL cut-off $\geq 25\%$ on the 24th follow-up was considered as good response to BS [24]. WR was calculated as $[100 \times (\text{post-nadir weight} - \text{nadir weight}) / \text{nadir weight}]$ [36].

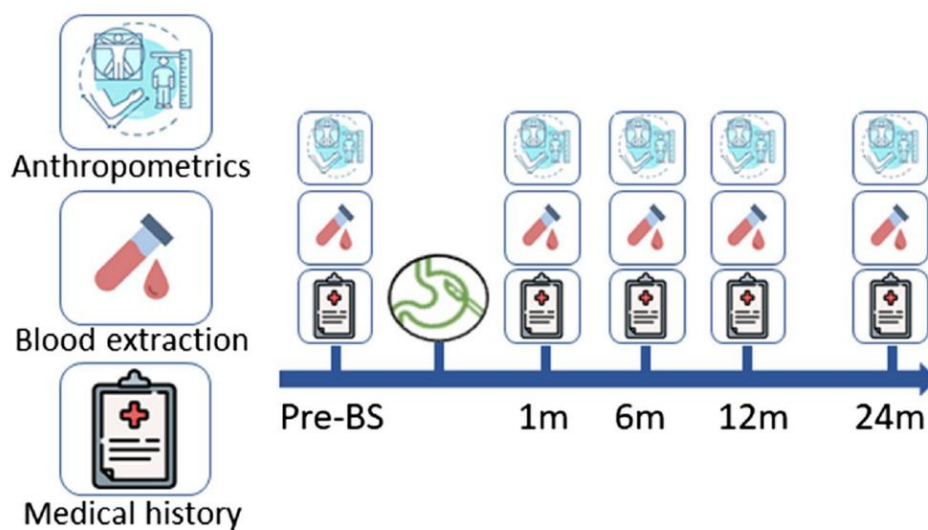
T2D was defined according to ADA guidelines [37]. Liver steatosis was measured by ultrasonography [38]. Hepatic IR was indirectly evaluated using the HOMA-IR, based on the formula: $\text{fasting glucose (mg/dl)} \times \text{fasting insulin (}\mu\text{U/mL)} / 405$ [39]. A cut-off ≥ 3.42 has been described as marker of IR in Caucasian population with obesity [40]. Patients with T2D on insulin treatment were excluded from the calculation of HOMA-IR.

SHBG levels (nmol/L) were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (Demeditec Diagnostics GmbH®, Kiel, Germany) following manufacturer’s instructions (Intra assay CV = 2.3% and Inter assay CV = 5.2%).

Statistical Analysis

The distribution of data was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Student’s *T* test and Mann–Whitney *U* test were used to compare quantitative variables, which followed a Gaussian distribution or not, respectively. Paired samples

Fig. 1 Study flowchart. Pre-BS, previous bariatric surgery follow-up; 1 m, 1st month after BS follow-up; 6 m, 6th month after BS follow-up; 12 m, 12th month after BS follow-up; 24 m, 24th month after BS follow-up



t test or Wilcoxon test were used to compare each variable between follow-ups. A chi-squared test was used to compare proportions. Logistic regression analysis was performed to study the predictive ability of SHBG increase with response to BS. Multiple regression analysis was performed to assess the predictive ability of SHBG increase with the TWL on the 12th month and WR on the 24th month. Bonferroni test was used to discard outliers. All statistical analyses were performed with R-commander (R-UCA package v.2.6–2).

Results

Anthropometric and Biochemical Characteristics of the Study Cohort

A total of 62 patients fulfilling inclusion criteria with at least 2 years of follow-up were included; all of them were Caucasian. The 40% ($n=25$) were diagnosed with T2D pre-BS. The treatment for T2D before BS were metformin (48%), insulin (16%), glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP-1AR), sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors (iSGLT2), or peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonists (12%); the rest (24%) were in diet alone.

T2D remission was observed in 76% of patients (52% females) with pre-BS T2D after 2 years of follow-up. At the first and sixth months, 52% of patients (36% females) with pre-BS T2D were suspended of drug therapy.

Furthermore, a 79% of patients showed liver steatosis, a 26% were under treatment for arterial hypertension and only the 8% were treated of hypothyroidism. None of the patients had a history of heart disease, anemia, liver cirrhosis, alcoholism, drug abuse, or mental disorders.

The main clinical and biochemical features of our cohort before BS are shown in Table 1. All patients followed the same

pattern of lifestyle change, and the pharmacological treatments they were taking before surgery were not modified during the first month after BS; only two patients had contraceptive pill [41]. Weight, BMI, and waist circumference underwent a significant decrease reaching the nadir after 12 months in all patients (Table 2). The impact of BS on the biochemical parameters is shown in Table 2. Notably, the whole cohort presented an average pre-BS HOMA-IR greater than the cut-off considered normal for the Spanish population, and normalized from the first month after BS. Regarding SHBG, the blood levels increased significantly until the sixth month after BS, reaching the top at the 12th follow-up (Table 2).

BS Response and TWL Follow-up

Patients were subdivided according to TWL on the 12th month after BS, in < 25% TWL patients and \geq 25% TWL patients, adjusted by age and gender-baseline data shown in Table 3. Both groups had the same proportion of females at menopause, and non-significant differences in glucose metabolism variables, SHBG levels, or any other parameters were observed before BS, included the surgical procedure (Table 3). Furthermore, the surgical procedure performed was independent of diabetes status (Supplementary Table 1).

The TWL at 6, 12, and 24 months after BS was greater in \geq 25% TWL patients than in < 25% TWL patients (Table 4). At 24 months of follow-up, < 25% TWL patients underwent a significant average of 6.6% WR with respect to the nadir regardless of the surgical procedure.

Plasma SHBG Levels During the Follow-up in \geq 25% TWL Patients and < 25% TWL Patients to BS

Plasma SHBG levels were compared during the follow-up at different time points in both groups (Table 5). The plasma

Table 1 Clinical and biochemical variables pre-BS in the whole cohort and subdivided by gender

Variable	Pre-BS	Females	Males	<i>p</i> value
Age (years)	46 (10)	44 (10)	53 (8)	0.002
Sex, female	45 (73%)	-	-	-
Weight (kg)	120.6 (24.1)	114.2 (16.4)	137.6 (32.6)	<0.001
BMI (kg/m ²)	43.7 (6.9)	43.2 (6.0)	44.7 (9.5)	0.439
Waist circumference (cm)	126 (14)	120 (9)	137 (15)	<0.001
Type 2 diabetes	25 (40%)	17 (38%)	8 (47%)	0.723
Fasting glucose (mg/dL)	105 (31)	98 (22)	123 (47)	0.009
HbA1c (%)	6.0 (1.1)	5.8 (0.9)	6.2 (1.3)	0.119
HOMA-IR	5.91 (4.20)	5.18 (3.82)	7.76 (4.57)	0.053
Triglycerides (mg/dL)	130 (99–167)	122 (89–157)	146 (122–171)	0.060
Total cholesterol (mg/dL)	198 (39)	198 (35)	198 (39)	0.945
Non-HDL cholesterol (mg/dL)	154 (35)	152 (35)	157 (35)	0.677
ALT (IU/L)	23 (16–36)	21 (14–36)	25 (20–32)	0.131
AST (IU/L)	21 (19–28)	20 (17–27)	22 (20–25)	0.263
GGT (IU/L)	31 (21–47)	27 (20–39)	45 (32–66)	0.007
SHBG (nmol/L)	51.0 (42.2)	48.5 (35.2)	37.9 (25.9)	0.267
Total testosterone (ng/dL)	-	29.3 (23.2–41.4)	293.1 (197.8–406.3)	<0.001
Estradiol (pg/mL)	-	25.9 (17.6–56.7)	35.9 (26.4–41.2)	0.792
FIB-4	0.95 (0.57)	0.80 (0.40)	1.38 (0.73)	<0.001
Platelets (× 10 ⁹ /L)	292 (72)	302 (73)	264 (61)	0.076

Values are mean (standard deviation), number (%) or median (Q1–Q3)

BS, bariatric surgery; BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; SHBG, sex hormone-binding globulin; FIB-4, fibrosis 4 index

Table 2 Clinical and biochemical variables along study

Variable	Pre-BS	1st month	6th month	12th month	24th month	<i>p</i> value pre-BS vs 1st	<i>p</i> value 1st vs 6th	<i>p</i> value 6th vs 12th	<i>p</i> value 12th vs 24th
Weight (kg)	120.6 (24.1)	107.8 (19.8)	89.2 (19.3)	82.4 (19.9)	83.0 (19.8)	<0.001	<0.001	<0.001	0.402
BMI (kg/m ²)	43.7 (6.9)	39.0 (5.9)	32.2 (6.1)	29.8 (6.1)	30.1 (6.3)	<0.001	<0.001	<0.001	0.354
Waist circumference (cm)	126 (14)	117 (12)	101 (13)	96 (14)	96 (18)	<0.001	<0.001	<0.001	0.536
Fasting glucose (mg/dL)	105 (31)	95 (21)	86 (12)	86 (13)	90 (18)	0.031	0.001	0.555	0.058
HbA1c (%)	6.0 (1.1)	5.7 (0.9)	5.1 (0.5)	5.2 (0.6)	5.4 (0.5)	<0.001	<0.001	0.185	0.001
HOMA-IR	5.91 (4.20)	3.17 (1.96)	1.82 (1.58)	1.69 (1.38)	1.92 (1.79)	<0.001	<0.001	0.251	0.092
Triglycerides (mg/dL)	130 (99–167)	138 (116–181)	94 (73–121)	83 (69–102)	79 (69–100)	0.051	<0.001	<0.001	0.312
Total cholesterol (mg/dL)	198 (39)	180 (32)	178 (35)	179 (32)	191 (39)	0.001	0.700	0.348	0.019
SHBG (nmol/L)	51.0 (42.2)	64.2 (47.8)	86.8 (72.4)	89.1 (64.6)	79.2 (52.8)	<0.001	0.011	0.369	0.194

Values are mean (standard deviation), number (%) or median (Q1–Q3)

BS, bariatric surgery; BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; SHBG, sex hormone-binding globulin

SHBG levels did not significantly increase in < 25% TWL patients 1 month after BS when compared with the initial levels (pre-BS); they increased around 13% at 6 months

when compared with the SHBG levels at 1 month but there were no significant differences between 6 and 12 months or between 12 and 24 months. However, in ≥ 25% TWL

Table 3 Clinical and biochemical basal characteristics in <25% TWL patients versus ≥25% TWL patients

Variable	<25% TWL patients (n=20)	≥25% TWL patients (n=42)	p value
Age (years)	45 (14)	47 (8)	0.498
Sex, female	13 (65%)	32 (76%)	0.536
Menopause	4 (31%)	11 (34%)	0.907
Weight (kg)	121.6 (24.4)	120.1 (24.3)	0.818
BMI (kg/m ²)	44.7 (8.0)	43.1 (6.6)	0.416
Waist circumference (cm)	127 (13)	124 (13)	0.346
T2D	11 (55%)	14 (33%)	0.167
Fasting glucose (mg/dL)	109 (44)	102 (24)	1.000
HbA1c (%)	6.0 (1.2)	5.8 (0.9)	0.533
HOMA-IR	6.45 (4.42)	5.47 (3.98)	0.427
SHBG (nmol/L)	49.0 (32.8)	44.0 (33.4)	0.581
RYGB technique	7 (35%)	27 (64%)	0.061

Values are mean (standard deviation) or number (%)

BMI, body mass index; *T2D*, type 2 diabetes; *HbA1c*, glycated hemoglobin; *HOMA-IR*, homeostasis model assessment of insulin resistance; *SHBG*, sex hormone-binding globulin; *RYGB*, Roux-en-Y-gastric bypass

patients, plasma SHBG levels increased significantly by 65% at 1 month when compared with pre-BS levels and by 16% between the first and sixth months, while no further increase was observed between the 6th and 12th months or the 12th and 24th months (Table 5). These results were corroborated by analyzing the SHBG variation (SHBG follow-up/SHBG pre-BS ratio) in both groups during the follow-up. The results showed that ≥25% TWL patients

presented significantly higher increases of SHBG than <25% TWL patients at each follow-up time point except on the 12th month (Fig. 2). On the other hand, no significant differences were observed in the increase of SHBG on the 1st month when considering the surgical procedure performed (Supplementary Table 2).

SHBG Plasma Levels as an Early Biomarker for TWL and WR

The logistic regression analysis showed an OR = 2.71 (95%CI = 1.11–6.60, $p = 0.028$) and AUC = 0.68 (95%CI = 0.55–0.80) for predicting good response to BS based on the SHBG 1st month/SHBG pre-BS ratio. Diagnostic performance parameters of different cut-off ratios assessed (expressed as percentages) are shown in Table 6.

Additionally, multiple regression analysis for predicting TWL on the 12th month after BS showed the following resultant model: TWL 12th month = $26.23 + 2.89 \times \text{SHBG 1st month/SHBG pre-BS}$ ($r = 0.330$, $p = 0.012$). Furthermore, a prediction model for WR at 24 months was performed: resultant model WR 24th month = $3.30 - 1.72 \times \text{SHBG 1st month/SHBG pre-BS}$ ($r = -0.301$, $p = 0.028$).

Discussion

Patients with obesity have BS as the only solution in terms of a successful and sustained weight loss and improvement of the related metabolic comorbidities. Long-term response to BS can be variable, and WR occurs in a significant number of patients [20, 25], which means the

Table 4 TWL (%) along the follow-up in <25% TWL patients and ≥25% TWL patients

	1st month	6th month	12th month	24th month	p value 1st vs 6th	p value 6th vs 12th	p value 12th vs 24th
<25% TWL patients	9.7 (8.4–11.0)	21.9 (19.3–24.6)	24.7 (21.8–27.7)	20.1 (17.7–22.4)	<0.001	0.001	<0.001
≥25% TWL patients	11.2 (10.0–12.3)	28.4 (26.5–30.2)	35.4 (33.8–37.0)	36.4 (34.4–38.3)	<0.001	<0.001	0.113
p value	0.116	<0.001	<0.001	<0.001			

Values are mean (95%CI)

TWL, total weight loss

Table 5 SHBG values (nmol/L) along the follow-up in <25% TWL patients and ≥25% TWL patients

	Before BS	1st month	6th month	12th month	24th month	p value pre-BS vs 1st	p value 1st vs 6th	p value 6th vs 12th	p value 12th vs 24th
<25% TWL patients	49.0 (32.9–65.4)	52.8 (43.9–61.6)	59.8 (44.2–75.4)	64.8 (45.3–84.2)	55.2 (32.5–77.8)	0.621	0.090	0.272	0.581
≥25% TWL patients	44.0 (32.7–55.1)	73.3 (58.3–88.3)	85.8 (68.8–102.9)	86.5 (69.7–103.2)	83.5 (70.0–96.9)	<0.001	0.022	0.698	0.197

Values are mean (95%CI)

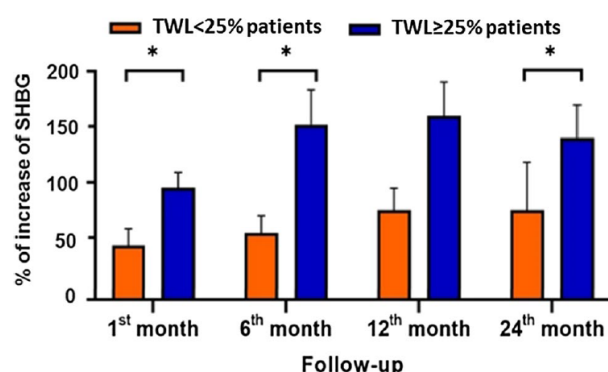


Fig. 2 Mean percentages of SHBG increase and standard error (SE) in each follow-up with respect to SHBG value before BS in <25% TWL patients and ≥25% TWL patients. * $p < 0.050$

reappearance or worsening of the associated comorbidities [27, 30, 42]. Therefore, there is a need for a biomarker to predict the TWL and WR in the long term after BS. Our results showed a 32% TWL at 12 months after BS. The TWL 1 year after BS observed in our study is similar to previous meta-analysis reporting an average TWL of 28–34% [36, 43]. Regarding the mean of WR in our study was 6.6% 1 year after nadir, and this percentage is comparable to the results of a previous study, where a 5.7% of WR was observed [36]. Although WR was calculated before the period recommended of 3 years, our mean did not differ much from the 8% reported previously [44]. In addition, the different trends in weight lost and regained observed in the 2 years of follow-up will be assessed in subsequent follow-ups.

Bariatric surgery improves metabolism in general and reduces the risk of obesity-associated disorders and all-cause mortality in patients with obesity [45–47]. In this sense, a T2D remission rate of 75% has been reported [48] similar to our results, in addition to a reduction of 70% in HOMA-IR along the first year [49]. Our results showed a HOMA-IR reduction from 5.91 to 1.69 in which the proposed HOMA-IR cut-off of 3.42 would inform us of an improvement in IR [40]. Furthermore, we also observed a significant reduction in fasting glucose and HbA1c levels along the first year after BS as described previously [45]. Regarding SHBG, our results showed that plasma SHBG levels increased after 1 month BS in all patients which has

also been described previously in women with polycystic ovary syndrome and obesity [20] and recently reported in several meta-analysis, where SHBG rise from 25 to 130% [43, 50–52].

In order to assess if SHBG plasma levels were a reliable predictor for a good response to BS in terms of TWL and WR, we decided to measure plasma SHBG levels up to 24 months after BS. Our results showed for the first time that early plasma SHBG levels increased differently depending on the response to BS at 24 months. Remarkably, ≥25% TWL patients showed a mean increase of 100% in plasma SHBG levels on the 1st month, which yielded an increment of 150% 6 months after BS with respect to pre-BS values. However, <25% TWL patients showed an increase of 40% in SHBG plasma levels on the 1st month, with SHBG relative increments at 6 to 24 months not higher than 75% with respect to pre-BS values. Importantly, the 1st month increase in plasma SHBG levels significantly predicted a TWL ≥25% to BS with a probability over 80%, regardless of age, gender, or surgical procedure. Furthermore, the 1st month SHBG increase also predicted the WR on the 24th month follow-up according to the multiple regression model. This increase in SHBG may be a consequence of decreased adipose tissue-related inflammation [53]. However, lifestyle modifications, such as fasting or exercise, have implications for the increasing SHBG expression, which could regulate energy expenditure [54–56]. Regarding surgical procedure, our data did not demonstrate that RYGB or the sleeve gastrectomy were associated with different outcomes in the response to BS along the follow-up, as previously reported [57], nor were they associated with a differential increase in SHBG on the first month after BS.

Thus, the early increase in SHBG observed in the ≥25% TWL patients could reflect the improvement of the metabolic profile in the medium and long term [58, 59], as previously reported, where WR is accompanied by an unfavorable metabolic profile [60]. Finding early post-BS biomarkers able to predict the mid- and long-term evolution is also interesting to identify, and thus complements the markers used prior to surgery, which are no-robust concerning BS response. This early identification of patients who will have WR 2 years after BS has a real potential of changing the current guidelines and would allow clinicians to conduct postoperative strategies and intensify treatments, such as behavior intervention, dietary counselling, and GLP-1AR

Table 6 Parameters of diagnostic performance of SHBG increase on the 1st month with respect to pre-BS for predicting good response to BS

SHBG increase	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)
48%	66.7% (49.8–80.9)	63.2% (38.4–83.7)	79.4% (61.7–91.4)	47.1% (26.7–68.3)
75%	56.4% (39.6–72.2)	79.0% (54.4–93.9)	85.1% (65.7–95.9)	46.0% (28.1–64.8)
82%	51.3% (34.8–67.6)	84.2% (60.4–96.6)	87.3% (66.9–97.4)	44.9% (27.8–62.8)

SHBG, sex hormone-binding globulin; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

in order to prevent WR [25, 61, 62]. The inclusion of SHBG in the analytical profiles of clinical practice and its accurate assessment would allow individualization in postoperative follow-up. Thus, collaboration between bariatric surgeons, obesity medicine specialists, and dietitians is required [63, 64], which would support the implementation of personalized medicine.

Our study has several limitations that should be noticed, such as (a) the absence of assessment of the relation between SHBG blood levels with basal metabolism and body composition change along the follow-up; (b) the influence of genetics in SHBG expression; (c) the role of adipokines variation after BS in the SHBG liver synthesis; and (d) the impact of each surgical technic used (RYGB and sleeve gastrectomy) in the BS response and WR, determined by the limited number of patients included. This is a pilot study, where future directions will be aimed at validating the cut-offs and predictive models obtained in a larger cohort considering all these variables and in determining a possible active role of SHBG in weight loss.

Conclusion

The increase in plasmatic SHBG levels within the first month after BS is a good predictor of BS response in term of TWL and WR after 2 years of intervention. More studies are needed to elucidate the role of SHBG increase in the overall improvement of the metabolic profile and weight loss maintenance.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11695-023-06981-w>.

Data Availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors (DMS and AC).

Declarations

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Human Rights All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional (approved by the local Ethics Committee (PR(AG)320/2018)) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated

otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References



1. Polyzos S, Kountouras J, Mantzoros C. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: from pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82–97.
2. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020;73(1):202–9.
3. Samavat J, Facchiano E, Lucchese M, et al. Hypogonadism as an additional indication for bariatric surgery in male morbid obesity? *Eur J Endocrinol*. 2014;171(5):555–60.
4. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, et al. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(1):36–49.
5. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 2019;92:6–10.
6. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557–67.
7. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):261–73.
8. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017;127(1):1–4.
9. Moghbeli M, Khedmatgozar H, Yadegari M, et al. Cytokines and the immune response in obesity-related disorders. *Adv Clin Chem*. 2021;101:135–68.
10. Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A, et al. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(7):376–83.
11. Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, et al. Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes*. 2012;61(2):372–82.
12. Yasui T, Tomita J, Miyatani Y, et al. Associations of adiponectin with sex hormone-binding globulin levels in aging male and female populations. *Clin Chim Acta*. 2007;386(1–2):69–75.
13. Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, et al. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3979–87.
14. Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Matthews KA, et al. Sex hormone-binding globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factors in multiethnic premenopausal and perimenopausal women enrolled in the study of women across the nation (SWAN). *Circulation*. 2005;111(10):1242–9.
15. Winters SJ, Gogineni J, Karegar M, et al. Sex hormone-binding globulin gene expression and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):E2780–8.
16. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, et al. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1036–41.
17. Ding EL, Song Y, Manson JE, et al. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1152–63.

18. Kalme T, Seppälä M, Qiao Q, et al. Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1550–6.
19. Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Bialokoz-Kalinowska I, et al. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(3):459–67.
20. Ezzat RS, Abdallah W, Elsayed M, et al. Impact of bariatric surgery on androgen profile and ovarian volume in obese polycystic ovary syndrome patients with infertility. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(9):5048–52.
21. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, et al. European guidelines for obesity management in adults. *Obes Facts.* 2015;8(6):402–24.
22. Bray GA, Frühbeck G, Ryan DH, et al. Management of obesity. *Lancet.* 2016;387(10031):1947–56.
23. Arterburn DE, Courcoulas AP. Bariatric surgery for obesity and metabolic conditions in adults. *BMJ.* 2014;349:g3961.
24. Tu Y, Pan Y, Han J, et al. A total weight loss of 25% shows better predictivity in evaluating the efficiency of bariatric surgery. *Int J Obes.* 2021;45(2):396–403.
25. Velapati SR, Shah M, Kuchkuntla AR, et al. Weight regain after bariatric surgery: prevalence, etiology, and treatment. *Curr Nutr Rep.* 2018;7(4):329–34.
26. O'Brien PE, Hindle A, Brennan L, et al. Long-term outcomes after bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis of weight loss at 10 or more years for all bariatric procedures and a single-centre review of 20-year outcomes after adjustable gastric banding. *Obes Surg.* 2019;29(1):3–14.
27. Athanasiadis DI, Martin A, Kapsampelis P, et al. Factors associated with weight regain post-bariatric surgery: a systematic review. *Surg Endosc.* 2021;35(8):4069–84.
28. Ciudin A, Fidilio E, Gutiérrez-Carrasquilla L, et al. A clinical-genetic score for predicting weight loss after bariatric surgery: the obegen study. *J Pers Med.* 2021;11(10):1040.
29. Ciudin A, Fidilio E, Ortiz A, et al. Genetic testing to predict weight loss and diabetes remission and long-term sustainability after bariatric surgery: a pilot study. *J Clin Med.* 2019;8(7):964.
30. El Ansari W, Elhag W. Weight regain and insufficient weight loss after bariatric surgery: definitions, prevalence, mechanisms, predictors, prevention and management strategies, and knowledge gaps—a scoping review. *Obes Surg.* 2021;31(4):1755–66.
31. Kim EY. Definition, mechanisms and predictors of weight loss failure after bariatric surgery. *J Metab Bariatr Surg.* 2022;11(2):39–48.
32. de OS Bratti L, do Carmo ÍAR, Vilela TF, et al. Bariatric surgery improves clinical outcomes and adiposity biomarkers but not inflammatory cytokines SAA and MCP-1 after a six-month follow-up. *Scand J Clin Lab Invest.* 2021;81(3):230–6.
33. Luconi M, Samavat J, Seghieri G, et al. Determinants of testosterone recovery after bariatric surgery: is it only a matter of reduction of body mass index? *Fertil Steril.* 2013;99(7):1872–9.e1.
34. Boonchaya-Anant P, Laichuthai N, Suwannasrisuk P, et al. Changes in testosterone levels and sex hormone-binding globulin levels in extremely obese men after bariatric surgery. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:1416503.
35. Shih KC, Janckila AJ, Lee WJ, et al. Effects of bariatric weight loss surgery on glucose metabolism, inflammatory cytokines, and serum tartrate-resistant acid phosphatase 5a in obese Chinese adults. *Clin Chim Acta.* 2016;453:197–202.
36. King WC, Hinerman AS, Belle SH, et al. Comparison of the performance of common measures of weight regain after bariatric surgery for association with clinical outcomes. *JAMA.* 2018;320(15):1560–9.
37. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S15–33.
38. Ferraioli G, Soares Monteiro LB. Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. *World J Gastroenterol.* 2019;25(40):6053–62.
39. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
40. Shashaj B, Luciano R, Contoli B, et al. Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. *Acta Diabetol.* 2016;53(2):251–60.
41. Klipping C, Duijkers I, Mawet M, et al. Endocrine and metabolic effects of an oral contraceptive containing estetrol and drospirenone. *Contraception.* 2021;103(4):213–21.
42. Tolvanen L, Christenson A, Surkan PJ, et al. Patients' experiences of weight regain after bariatric surgery. *Obes Surg.* 2022;32(5):1498–507.
43. Lee Y, Dang JT, Switzer N, et al. Impact of bariatric surgery on male sex hormones and sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg.* 2019;29(1):334–46.
44. King WC, Hinerman AS, Courcoulas AP. Weight regain after bariatric surgery: a systematic literature review and comparison across studies using a large reference sample. *Surg Obes Relat Dis.* 2020;16(8):1133–44.
45. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med.* 2012;366(17):1567–76.
46. Sjöström L. Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int J Obes.* 2008;32(Suppl 7):S93–7.
47. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med.* 2007;357(8):741–52.
48. Noel OF, Still CD, Argyropoulos G, et al. Bile acids, FXR, and metabolic effects of bariatric surgery. *J Obes.* 2016;2016:4390254.
49. Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI, Clemente-Postigo M, et al. Postprandial hypertriglyceridemia predicts improvement in insulin resistance in obese patients after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 2013;9(2):213–8.
50. Tian Z, Zhang YC, Wang Y, et al. Effects of bariatric surgery on patients with obesity and polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis.* 2021;17(8):1399–408.
51. Lv B, Xing C, He B. Effects of bariatric surgery on the menstruation- and reproductive-related hormones of women with obesity without polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis.* 2022;18(1):148–60.
52. Emami MR, Safabakhsh M, Khorshidi M, et al. Effect of bariatric surgery on endogenous sex hormones and sex hormone-binding globulin levels: a systematic review and meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis.* 2021;17(9):1621–36.
53. Moschen AR, Molnar C, Geiger S, et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose

- interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut*. 2010;59(9):1259–64.
54. Cienfuegos S, Corapi S, Gabel K, et al. Effect of intermittent fasting on reproductive hormone levels in females and males: a review of human trials. *Nutrients*. 2022;14(11):2343.
 55. Li C, Xing C, Zhang J, et al. Eight-hour time-restricted feeding improves endocrine and metabolic profiles in women with anovulatory polycystic ovary syndrome. *J Transl Med*. 2021;19(1):148.
 56. Zouhal H, Jayavel A, Parasuraman K, et al. Effects of exercise training on anabolic and catabolic hormones with advanced age: a systematic review. *Sports Med*. 2022;52(6):1353–68.
 57. Manning S, Pucci A, Carter NC, et al. Early postoperative weight loss predicts maximal weight loss after sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Endosc*. 2015;29(6):1484–91.
 58. Faramia J, Ostinelli G, Drolet-Labelle V, et al. Metabolic adaptations after bariatric surgery: adipokines, myokines and hepatokines. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;52:67–74.
 59. Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, et al. Adipokines and obesity. Potential link to metabolic disorders and chronic complications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3570.
 60. Zamarron BF, Porsche CE, Luan D, et al. Weight regain in formerly obese mice hastens development of hepatic steatosis due to impaired adipose tissue function. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(6):1086–97.
 61. Stanford FC, Alfaris N, Gomez G, et al. The utility of weight loss medications after bariatric surgery for weight regain or inadequate weight loss: a multi-center study. *Surg Obes Relat Dis*. 2017;13(3):491–500.
 62. Miras AD, Pérez-Pevida B, Aldhwayan M, et al. Adjunctive liraglutide treatment in patients with persistent or recurrent type 2 diabetes after metabolic surgery (GRAVITAS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(7):549–59.
 63. Wharton S, Kuk JL, Luszczynski M, et al. Liraglutide 3.0 mg for the management of insufficient weight loss or excessive weight regain post-bariatric surgery. *Clin Obes*. 2019;9(4):e12323.
 64. Istfan NW, Lipartia M, Anderson WA, et al. Approach to the patient: management of the post-bariatric surgery patient with weight regain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(1):251–63.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

P. Gabriel-Medina^{1,2,3} · R. Ferrer-Costa^{1,3} · F. Rodriguez-Frias^{1,2,3,4} · M. Comas⁵ · R. Vilallonga⁶ · A. Ciudin^{5,7,8}  · D. M. Selva^{7,8} 

¹ Clinical Biochemistry Department, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

² Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Barcelona, Spain

³ Biochemical Chemistry, Drug Delivery & Therapy (BC-DDT) Research Group, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), 08035 Barcelona, Spain

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 28029 Madrid, Spain

⁵ Endocrinology and Nutrition Department, Vall d'Hebron University Hospital, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

⁶ Endocrine, Metabolic and Bariatric Unit, Center of Excellence for the EAC-BC, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ Diabetes and Metabolism Research Unit, Diabetes and Metabolism Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

⁸ Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 28029 Madrid, Spain

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1 Influencia de la diabetes tipo 2 en la asociación de los polimorfismos

PNPLA3 rs738409 y TM6SF2 rs58542926 en la fibrosis avanzada por NASH

El NASH puede considerarse como el estadio con más implicaciones clínicas y pronósticas dentro del MAFLD [52]. Está definido por la presencia de esteatosis e inflamación hepáticas, combinado con diferentes grados de fibrosis. La determinación del grado de los diferentes aspectos a evaluar, es decir, presencia de gotas lipídicas, infiltración leucocitaria, balonización de hepatocitos y fibrosis, se realiza mediante el estudio de biopsia hepática [8]. Esta herramienta, sin embargo, muestra una foto estática de la enfermedad, y no permite determinar la velocidad de progresión en un contexto de combinación de diferentes factores metabólicos y genéticos [6].

Los pacientes con NASH comparten características clínicas y bioquímicas, donde destacan una edad media de >50 años, un IMC >30 kg/m² y alta prevalencia de DM2, tal y como se puede observar en nuestra cohorte de estudio [66,173,174]. A pesar de no mostrar un perfil lipídico alterado ni una concentración elevada de las enzimas hepáticas, se han reportado estudios donde es común la hipertrigliceridemia y mayor concentración de aminotransferasas, sobre todo en pacientes afectados de diabetes y NASH [52,175].

Respecto a las características histológicas de la cohorte estudiada, la severidad de la esteatosis y actividad NASH (índice NAS) fue similar entre los pacientes con DM2 y sin ésta. La mayoría de los pacientes (64%) presentó esteatosis leve, un porcentaje mayor a lo reportado previamente [66,175]. Por otro lado, más de la mitad de los pacientes (56%) presentó F3-4 [66,119,173,174]. Este alto porcentaje de fibrosis avanzada, frente a estadios leves de esteatosis y actividad inflamatoria, pueden ser explicadas por el hecho de que nuestra cohorte de estudio está formada por pacientes con clínica de hepatopatía crónica avanzada, elevada presencia de comorbilidades metabólicas, y cuyo seguimiento se realiza en el servicio de hepatología de nuestro hospital, de tercer nivel y alto grado de especialización.

Los pacientes con DM2 sí presentaron mayor proporción de fibrosis avanzada que aquellos sin diabetes, de acuerdo con datos publicados previamente [124,175-177]. Se ha reportado que las personas con DM2 presentan un aumento en las vías de señalización de respuesta al estrés, como la del NFκB. Además, es común la presencia de disbiosis, que puede aumentar la producción de LPS en la circulación portal creando estímulos inflamatorios a nivel hepático, lo que favorece la progresión a fibrosis [31].

Por otro lado, se puede considerar el NASH como un signo específico de la DM2, el cual representa la totalidad del daño hepático en el síndrome metabólico, donde la RI dirige la progresión de la enfermedad [178]. Los pacientes con NASH y DM2 tienen más complicaciones vasculares, nefropatía, ECV, y mayor mortalidad que aquellos sin diabetes, ocasionado posiblemente por la mayor progresión de la fibrosis hepática [55,175]. Por lo tanto, se puede considerar que el MAFLD en la DM2 es NASH [29].

La frecuencia encontrada del alelo menor (G) para la variante p.I148M fue del 47%, mayor a la reportada previamente en pacientes con MAFLD diagnosticado por biopsia hepática [179,180], y muy superior a la frecuencia alélica estimada global, que es del 21% [181]. No obstante, para la variante p.E167K, la frecuencia encontrada, del 11%, es comparable a otros estudios reportados en población con MAFLD [120].

Uno de los objetivos principales de este estudio fue evaluar la asociación de la fibrosis avanzada con la presencia de las variantes p.I148M y p.E167K. Esta estrecha asociación se ha descrito previamente [57,67,182,183]. La presencia de ambos polimorfismos también se ha asociado al incremento de esteatosis y al propio desarrollo de MAFLD, y específicamente NASH [119,184].

Los resultados obtenidos mostraron una asociación significativa de cada uno de los polimorfismos por separado o en combinación con la fibrosis avanzada. Esta asociación ha sido reportada previamente, donde se ha observado un efecto aditivo en el daño hepático y la fibrosis con el aumento de alelos de riesgo en hepatopatías de diferentes etiologías, como la alcohólica o por infección crónica de VHC [185,186]. El aumento de alelos de riesgo de los genes estudiados, además de las variantes *MBOAT7* rs641738 y *HSD17B13* rs72613567, se ha asociado a mayor concentración de aminotransferasas y mayor riesgo de cirrosis y CHC [63,66,120,173]. Por otro lado, se ha focalizado el efecto de estos alelos de riesgo en el hígado, ya que receptores de hígados procedentes de donantes portadores de las variantes p.I148M y p.E167K mostraron mayor grado de esteatosis frente a aquellos que no portaban dichas variantes [58].

El papel molecular de estas variantes aún no está descrito completamente. Por un lado, la variante p.I148M ocasiona una disminución en la actividad metabólica de los ácidos grasos libres mediante la inhibición de la enzima triglicérido lipasa adiposa presente en el hígado (ATGL), favoreciendo su acumulación en el hepatocito. Por otro lado, la variante p.E167K, reduce la actividad transportadora al exterior celular, impidiendo su liberación [187]. Esta combinación de menor actividad metabólica y menor exportación lipídica puede tener un

efecto sinérgico y acelerar la progresión de la enfermedad, encontrando, por tanto, mayor grado de esteatosis, NASH y/o fibrosis en población con estas variantes [120].

Al estudiar el efecto combinado de la DM2 con las variantes estudiadas, se multiplicó el riesgo de fibrosis avanzada. Confirmando, por tanto, que la concurrencia de diabetes en personas con alguna de estas variantes favorece la progresión de la enfermedad de manera desproporcionada [187] (**Figura 18**). Esta influencia ha sido reportada previamente, en el que la presencia de DM2 y las variantes p.I148M y p.E167K actúan como variables independientes predictoras de NASH y fibrosis avanzada [188]. El modelo multivariante obtenido en nuestra cohorte, conformado por la DM2 y la presencia de polimorfismos, apunta en esta dirección.

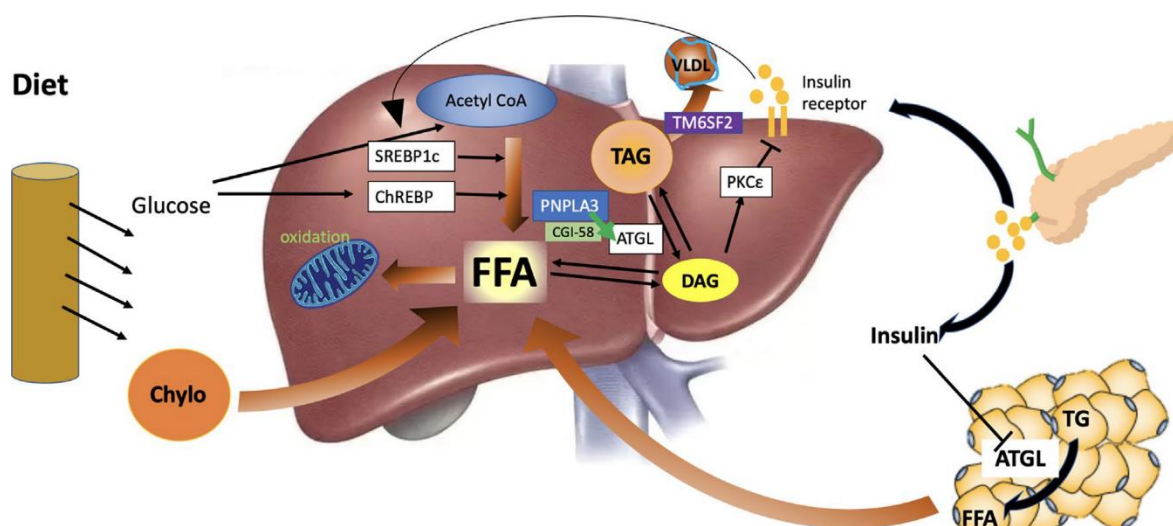


Figura 18. Metabolismo lipídico hepático en un contexto de RI y el papel de PNPLA3 y TM6SF2. En el estado de RI, la insulina no inhibe por completo la ATGL y los ácidos grasos libres se liberan continuamente del tejido adiposo a la sangre. La hiperinsulinemia también induce la actividad de la SREBP1c y la síntesis hepática *de novo* de lípidos. La PNPLA3 interactúa con CGI-58 para regular la actividad de ATGL y la hidrólisis de lípidos almacenados. Cuando está mutado, inhibe la ATGL hepática y provoca esteatosis hepática. El TM6SF2 mutado inhibe la movilización de triglicéridos y el ensamblaje de VLDL. Figura obtenida de: Xia M-F, et al. *Front Pharmacol.* 2019 Aug 6;10:877.

La interacción entre la variante p.I148M y el IMC con la rigidez hepática también se ha reportado previamente, donde pacientes con DM2 y obesidad presentaban significativamente mayor rigidez hepática a mayor cantidad de alelos mutados, que aquellos pacientes afectados de DM2 con normopeso y alelos mutados. La disfunción del tejido adiposo presente en personas con obesidad y DM2, ocasiona un estado proinflamatorio con una concentración patológica de adipocinas, como leptina y adiponectina, y citoquinas, como el $\text{TNF}\alpha$ y la IL6, favoreciendo la inflamación hepática, RI y finalmente, la activación de vías de señalización de fibrosis hepática. Este proceso puede estar acelerado por la disminución en la hidrólisis de triglicéridos por la mutación p.I148M, la cual favorece la acumulación de intermediarios lipotóxicos que exacerban el estrés

oxidativo y daño tisular [176]. Así pues, el estatus metabólico, condicionado principalmente por la presencia de DM2 y de obesidad, determina el efecto final de las variantes p.I148M y p.E167K en el daño hepático y la progresión del MAFLD [189].

Respecto a la edad, nuestros resultados mostraron que actúa como variable asociada a la fibrosis avanzada. Por un lado, las personas con DM2 tienen mayor edad media, [175], y por otro lado, la oportunidad de mayor progresión de la enfermedad con el envejecimiento también favorece la aparición de fibrosis avanzada [174,190]. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de diabetes enmascaró el efecto de la edad en la fibrosis avanzada, sugiriendo el gran peso de este factor metabólico en la progresión de la enfermedad.

En el subgrupo de pacientes sin DM2, únicamente la edad y el HOMA-IR fueron variables significativas de riesgo para la fibrosis avanzada. Como ya se ha comentado previamente, la RI juega un papel fundamental en la progresión de la enfermedad y la fibrosis avanzada, incluso en ausencia de DM2 [28,31]. Estudios previamente publicados, han confirmado que la RI favorece la progresión de la fibrosis hepática en un contexto de obesidad y MAFLD [191]. Además, se ha reportado un aumento de leptina y disminución de adiponectina, confirmando la disfunción del tejido adiposo como promotor de la progresión del MAFLD y la RI [46].

El HOMA-IR es el cálculo más habitual para medir la RI a nivel central o hepático [125]. El valor discriminante utilizado varía según la población estudiada, siendo de 3,02 en población joven mediterránea [126]; no obstante, las características clínicas han de ser tenidas en cuenta a la hora de ajustar este cut-off [192]. En este mismo estudio, se propuso un HOMA-IR >3,42 como indicador de RI en población con obesidad [126]. Otros autores, han incluido el HOMA-IR en modelos de predicción de fibrosis en el NASH como variable independiente [193], además de plantear su cálculo en el seguimiento de pacientes con NASH y proponiendo un cut-off de HOMA-IR >10 como predictor del empeoramiento de la fibrosis hepática [194].

En nuestra cohorte de pacientes con NASH, se puede afirmar que todos ellos presentaban algún grado de RI (media de HOMA-IR=7,41), incluso en ausencia de DM2 (media de HOMA-IR=5,40 en pacientes sin diabetes), y un IMC medio de 32 kg/m², siendo de 31 kg/m² en el subgrupo de pacientes sin diabetes, confirmando esta relación. El uso del HOMA-IR como variable significativa en la asociación y predicción de NASH y fibrosis avanzada, en combinación con las variantes p.I148M y p.E167K, ha sido utilizado previamente [124,188].

La relación de las variantes genéticas estudiadas y la RI no está dilucidada por completo. Los datos reportados hasta ahora han asociado la presencia de ambas variantes con el contenido hepático de triglicéridos [58,121], clave en la patogénesis del MAFLD. Inicialmente, se genera un desbalance entre síntesis (captación de ácidos grasos circulantes desde el tejido adiposo y lipogénesis *de novo*), oxidación hepática y liberación en forma de VLDL. En un contexto de hiperinsulinismo y RI, la oxidación de ácidos grasos libres en el hígado se reduce considerablemente, mientras que la síntesis de éstos es mayor, para su exportación en VLDL; por otro lado, la liberación de estos desde el tejido adiposo está aumentada, por acción de la LPL. Además, las dietas ricas en glucosa inducen la acumulación de triglicéridos hepáticos, además de aumentar el riesgo de RI [195-197]. La acumulación de AGL favorece la aparición de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, claves en la progresión a NASH. En este contexto, la disminución de la actividad de la PNPLA3 favorece aún más la acumulación lipídica, y, por otro lado, la alteración en la exportación de triglicéridos a causa de la disfunción del TM6SF2, aceleran este proceso [187,198] (**Figura 18**). Así, la RI incrementa las características del MAFLD independientemente de las variantes de riesgo, y, por otro lado, el riesgo genético aumenta las características del MAFLD independientemente de la RI [199].

Para definir el grado de interacción de las variantes estudiadas y la RI en la fibrosis avanzada, se propusieron varios modelos con las principales variables de interés: edad, HOMA-IR y polimorfismos p.I148M y p.E167K. El modelo 1 confirmó la independencia de las tres variables, alcanzando una sensibilidad del 80% y especificidad del 83%. El elevado grado de RI en los pacientes con NASH no permitió utilizar el cut-off de HOMA-IR \geq 3,02 (definido para población mediterránea) como variable significativa de predicción de F3-4 (modelo 2). Se propuso un tercer modelo, en el que se definió un cut-off de HOMA-IR $>$ 5,20 como el óptimo para la predicción de la fibrosis avanzada (OR=14,33), en combinación con la edad (OR=1,14) y la presencia de ambos polimorfismos (OR=19,04) con una alta sensibilidad y especificidad. Así pues, este cut-off no solo informa de la severidad de la RI, sino también del mayor riesgo de fibrosis avanzada en pacientes sin DM2 diagnosticados de NASH. El uso de este biomarcador como herramienta de control, puede ser útil en la predicción del desarrollo de enfermedad hepática grave [31].

Algunas de las limitaciones de este estudio son: a) el tamaño muestral, que puede haber limitado la interpretación del papel que la DM2 y los polimorfismos PNPLA3 p.I148M y TM6SF2 p.E167K en el desarrollo de fibrosis avanzada; b) la alta predominancia de la DM2 en la cohorte estudiada puede haber condicionado los resultados relativos al efecto de ambos polimorfismos en la fibrosis avanzada en ausencia de diabetes. Sin embargo,

consideramos esta proporción como un reflejo de situaciones de la vida real, siendo la DM2 la comorbilidad más frecuente en pacientes con NASH; (c) finalmente, el bajo número de alelos mutados en homocigosis hizo necesario el uso de un modelo genético dominante, no pudiendo testar el efecto de los homocigotos mutados frente a los heterocigotos en el desarrollo de fibrosis avanzada.

En resumen, en este estudio se ha demostrado que la presencia de DM2 o RI significativa, definida por un nuevo cut-off de HOMA-IR $\geq 5,20$, en combinación con los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926 se asocian a fibrosis hepática avanzada por NASH, y que la concurrencia de DM2 junto con las variantes genéticas tiene un efecto multiplicador en el riesgo de F3-4. La detección de estas variantes en población con DM2 o RI significativa permitiría identificar a aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar fibrosis hepática avanzada y centrar los esfuerzos en un seguimiento personalizado y tratamientos farmacológicos.

4.2 Aplicación de un algoritmo secuencial basado en el FIB-4 y ELF para identificar alto riesgo de fibrosis avanzada en atención primaria

Los resultados de este estudio muestran la necesidad y la oportunidad de implementar algoritmos de estratificación del riesgo de fibrosis, basados en biomarcadores, en población con riesgo de MAFLD [200,201], siendo las comorbilidades metabólicas, DM2, obesidad o dislipemia, las principales entidades clínicas en la detección de la hepatopatía crónica, especialmente del MAFLD [28]. A pesar de que existen una gran cantidad de factores en el desarrollo de fibrosis hepática, el propio NASH representa la principal alteración clínica en la progresión de la enfermedad, y de un modo mucho más dinámico [202].

La cohorte de NASH y de pacientes afectados de diabetes de atención primaria presentaron un perfil bioquímico de analitos relacionados con el metabolismo de glucosa y lípidos muy similar, reflejando la estrecha asociación entre ambas entidades clínicas; tanto es así que el NASH promueve el desarrollo de DM2, y viceversa, la DM2 favorece el desarrollo de NASH [48,177]. Tal y como se ha discutido anteriormente, la RI juega un papel esencial en la fisiopatología del NASH y la fibrosis hepática, reflejado en el HOMA-IR [191,194,203], cuyo valor significativamente más alto lo alcanzó la cohorte de NASH, por encima de los pacientes con DM2 de atención primaria. Así pues, la sospecha y búsqueda de fibrosis hepática se hacen necesarias en pacientes con RI, acompañada de otras comorbilidades metabólicas, tal y como reflejan los pacientes con NASH [49].

El diagnóstico erróneo de NASH y fibrosis mediante el estudio histológico de biopsia hepática es relativamente frecuente, donde un 23% de las discordancias pueden ser atribuidas al propio muestreo del tejido hepático. Se ha reportado que en el 89% de los casos, la fibrosis estimada mediante ET es mayor que la diagnosticada por el análisis histológico [204,205]. Esta discordancia entre la medida de ET y diagnóstico histológico se puede ver reflejada en la cohorte de NASH estudiada, donde los pacientes con F0-1 presentaron un valor medio de 9,0 kPa obtenido por Fibroscan, el cual sí hace sospechar de fibrosis significativa (F2 en adelante), ya que supera el cut-off de $\geq 8,0$ kPa, de consenso para $F \geq 2$ [105]. Tampoco se observó una buena correlación en el diagnóstico de esteatosis por ecografía frente al estudio de biopsia hepática, limitando la aplicación de estas técnicas en la estratificación de la severidad de la enfermedad hepática. No obstante, la detección de esteatosis hepática por imagen en población de riesgo, independientemente del grado de ésta, sí resulta coste-efectiva, y por tanto un diagnóstico de esteatosis oportuno puede modificar el manejo clínico de los pacientes, que, en función de otras alteraciones metabólicas, como obesidad y diabetes, permitiría llevar un control más individualizado de la posible progresión de la hepatopatía [206]. Una alternativa es utilizar biomarcadores de fibrosis hepática, como el FIB-4 o el ELF, los cuales se pueden obtener a partir de analíticas de seguimiento, y cuyo resultado puede complementar la medida de rigidez hepática por ET [207]. De esta manera, se reforzaría el posible diagnóstico de fibrosis hepática, tal y como se ha procedido en la cohorte de NASH estudiada, reduciendo la necesidad de la biopsia hepática [105].

El FIB-4 es un índice de cálculo sencillo inicialmente desarrollado para descartar fibrosis hepática en pacientes coinfectados con VIH/VHC [107]. Se ha demostrado que permite identificar pacientes con MAFLD con alto riesgo de desarrollar complicaciones o alto riesgo de fallecimiento a causa de la hepatopatía [110]. Ha sido recomendado recientemente por la *EASL-Lancet Liver Commission* para la estratificación del riesgo de hepatopatía [127]. Este índice fue evaluado en la cohorte de NASH, donde se obtuvo un VPP de F3-4 del 97% al aplicar un cut-off $\geq 2,67$, lo suficientemente alto como para clasificar directamente a estos pacientes con alto riesgo de fibrosis avanzada [208]. Sin embargo, debido al bajo VPN (55%) para valores de FIB-4 $< 2,67$, es necesario un segundo paso en la detección de fibrosis avanzada con el fin de “rescatar” a estos pacientes no detectados.

El ELF, por su parte, ha sido reportado como un buen marcador para la detección de fibrosis hepática [209] y para la detección de NASH en pacientes obesos que sí tenían un diagnóstico previo de esteatosis hepática [115]. Además, este índice ha sido utilizado para detectar tanto F3-4 (ELF $\geq 9,8$) [210], como para la exclusión de F3-4 (ELF $< 8,4$) [113]. Por

otro lado, se ha reportado su utilidad en la predicción de manifestaciones clínicas en pacientes con hepatopatía crónica ($ELF > 10,4$) [211]. No obstante, se ha de interpretar con precaución según la edad de los pacientes, ya que se han reportado “valores normales” crecientes con el envejecimiento en ausencia de hepatopatía [114]. En cuanto al rendimiento obtenido en la cohorte de NASH, se observó una sensibilidad diagnóstica de F3-4 del 68%, mayor que la del FIB-4 (35%), por lo que su uso en la práctica asistencial como medida complementaria al FIB-4, y como alternativa a la biopsia hepática ha sido defendido como coste-efectivo [207].

El algoritmo compuesto por la medida secuencial de FIB-4 y ELF alcanza los mejores valores de los parámetros diagnósticos de fibrosis avanzada (**Figura 19**), superando al modelo bivalente, compuesto por la medida simultánea de ambos biomarcadores (sensibilidad y especificidad para F3-4 del 85% y 73% respectivamente en el algoritmo, frente a una sensibilidad y especificidad del 80% y 70% respectivamente en el modelo bivalente). Además, puede ser aplicado en un solo paso a partir de una única extracción sanguínea, ahorrando consultas médicas, permitiendo establecer una orientación diagnóstica en población de alto riesgo de hepatopatía por MAFLD.

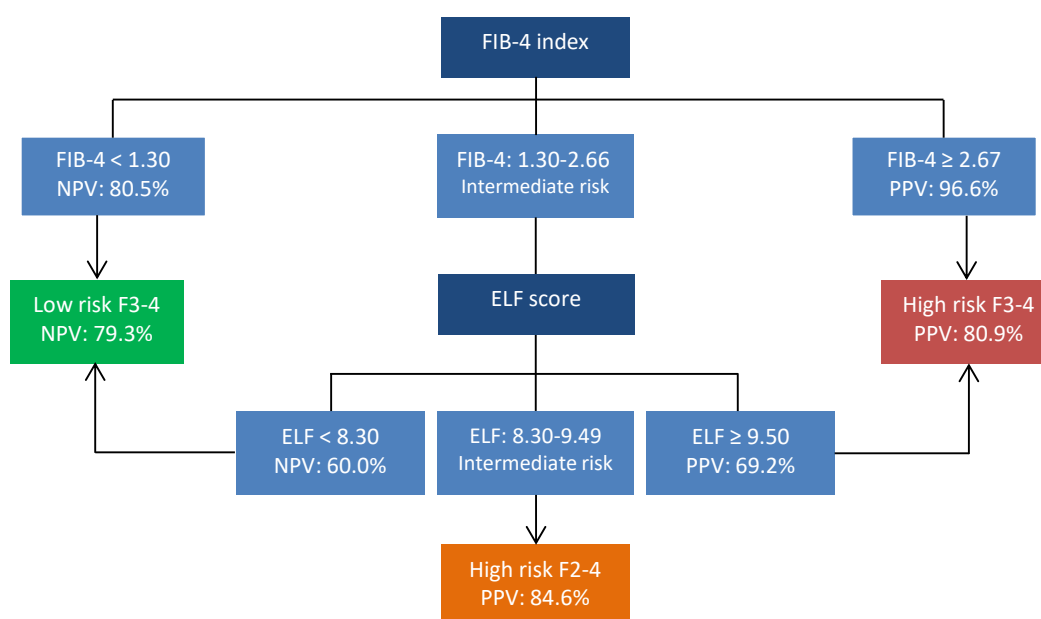


Figura 19. Algoritmo de diagnóstico de fibrosis avanzada en la cohorte de NASH. La aplicación secuencial de FIB-4 y ELF permitiría clasificar los pacientes en F0-1 con un elevado VPN ($FIB-4 < 1,30$ y $1,30 < FIB-4 \leq 2,66$ seguido de $ELF < 8,30$), F3-4 con un elevado VPP ($FIB-4 \geq 2,67$ y $1,30 < FIB-4 \leq 2,66$ seguido de $ELF \geq 9,50$) y F2-4 con un elevado VPP ($1,30 < FIB-4 \leq 2,66$ seguido de $8,30 < ELF \leq 9,49$). Elaboración propia.

Una gran ventaja del algoritmo propuesto es que combina la elevada especificidad del FIB-4 y la buena sensibilidad del ELF para la detección de fibrosis avanzada mediante la combinación de dos cut-offs para cada biomarcador: $FIB-4 < 1,3$ para detectar F0-1 y $FIB-4 \geq 2,67$ para detectar F3-4; y para los valores intermedios de FIB-4, $ELF < 8,30$ para

confirmar F0-1 y $\text{ELF} \geq 9,50$ para confirmar F3-4. Por otro lado, permite añadir la categoría de F2-4 (fibrosis significativa) en la estratificación del riesgo de fibrosis hepática. Para aquellos valores intermedios de FIB-4 y seguidamente de ELF ($8,30 \leq \text{ELF} < 9,50$), se alcanzó un VPP del 84,6%. Esta clasificación no es posible con el uso de biomarcadores individuales respetando los mismos valores discriminantes. De esta manera, se da un nuevo significado al valor discriminante de 8,30, ya que de manera individual solo permite detectar F0-1 con alta especificidad (94%) pero muy poca sensibilidad (18%) cuando $\text{ELF} < 8,30$, pero al combinarse con un valor intermedio de FIB-4 previo, se consigue una alta sensibilidad (88%) para la detección de F2-4 cuando $\text{ELF} \geq 8,30$ (**Figura 19**). Resulta de gran interés clínico en el manejo y tratamiento del MAFLD poder diagnosticar pacientes con estadios intermedios de fibrosis, ya que el grado de daño hepático es menor, y así aplicar terapia dirigida a mejorar las comorbilidades metabólicas que puedan mejorar el pronóstico de la hepatopatía [30].

Esta propuesta de algoritmo basado en biomarcadores séricos ha sido reportada previamente a la hora de decidir qué pacientes deberían ser derivados al especialista o en cambio, continuar en la atención primaria, según el riesgo de F3-4. El cálculo inicial de FIB-4, seguido de la medida del ELF para valores intermedios podría suponer una reducción del 70% de las derivaciones a la atención especializada, además de reducir un 25% el gasto total sanitario. Así, se priorizaría a los pacientes con alta sospecha de hepatopatía avanzada, frente a aquellos que solo necesitarían una atención sanitaria convencional (standard of care, SOF) [130].

En casos en el que la medida de ET sea posible, sería de gran interés incluirla como medida complementaria al estudio de biomarcadores, tal y como se ha realizado en la cohorte de NASH. Nuestros resultados mostraron una concordancia del 82% para la detección de F3-4 entre el Fibroscan y el algoritmo secuencial, alcanzando el 96% para la detección de F2-4. Esto supondría una reducción en la realización de biopsias hepáticas [104]. Por consiguiente, es totalmente asumible y eficiente trabajar en el desarrollo de métodos y algoritmos diagnósticos de fibrosis hepática derivada del NASH, basados en biomarcadores y pruebas de imagen no invasivas [212].

El algoritmo desarrollado se aplicó en las cohortes de primaria, con diagnósticos de DM2 y de hepatopatía crónica, a modo de estudio piloto. Los pacientes de estas cohortes eran visitados principalmente en atención primaria siguiendo SOF, a pesar de que muchos de ellos tenían un diagnóstico previo de esteatosis por ecografía, y tenían más de una comorbilidad metabólica, de acuerdo con los registros médicos. Cabe recordar, que la DM2

se considera uno de los principales factores de riesgo metabólicos para la fibrosis hepática avanzada [26,177,213]. Por lo que la sospecha y búsqueda activa de fibrosis hepática debería de realizarse en este perfil de pacientes, particularmente en aquellos con diagnóstico de hepatopatía crónica [214]. La selección de población de riesgo es el primer paso en el diagnóstico de fibrosis hepática por MAFLD, donde el SM, la DM2 y la obesidad ocupan el lugar central como factores de riesgo metabólico. Que, junto con la detección de esteatosis por ecografía o la presencia de valores anormalmente elevados de transaminasas, pueden desencadenar la detección de fibrosis hepática mediante algoritmos basados en biomarcadores [128]. Las cohortes de atención primaria seleccionadas representan por tanto la población de riesgo insuficientemente estudiada.

Un 28% de los pacientes de ambas cohortes de atención primaria fueron clasificados como F3-4, un porcentaje claramente inferior al estimado en la cohorte de NASH (49%), pero lo suficientemente grande como para considerar necesaria la implementación de protocolos de derivación [105]. Por otro lado, los elevados porcentajes de pacientes clasificados como F3-4 que fueron derivados en algún momento al médico especialista debido al diagnóstico clínico que tenían (44% y 42% de pacientes con diabetes y con hepatopatía crónica, respectivamente), muestran que casi la mitad de estos pacientes de alto riesgo se hubieran beneficiado directamente por la aplicación de este algoritmo. Cabe recordar que un 10% además, tenían una medida de Fibroscan indicativa de F3-4, y la mayoría tenían esteatosis hepática confirmada por ecografía (hasta un 80%). Se puede comprobar, por tanto, que a pesar de contar con diferentes niveles atención sanitaria y sistemas de derivación en población de riesgo, no se realiza poniendo la enfermedad hepática en el centro, y en concreto en la búsqueda de fibrosis avanzada. Es necesario actualizar los protocolos de derivación en nuestro sistema sanitario, donde se incluyan biomarcadores de fibrosis hepática, y así seleccionar a la población de alto riesgo, y rescatar aquella que permanece oculta, para que puedan recibir una atención sanitaria acorde a sus necesidades. Por otro lado, se ha de estudiar el impacto económico que supondría la medida del ELF, debido a su elevado coste.

En el caso particular de los pacientes clasificados como F2-4 según el algoritmo, se podrían implementar diferentes estrategias según la disponibilidad de recursos, por ejemplo, la repetición de la medida de los biomarcadores cada cierto tiempo o la medida de la rigidez hepática por ET en caso de estar disponible [127,215]; todo ello acompañado de un estudio de posibles alteraciones metabólicas de los pacientes y búsqueda de esteatosis por imagen, para así tener una primera orientación diagnóstica de MAFLD [3,9]. Por lo tanto, el ajuste de los valores discriminantes utilizados en los biomarcadores en la población

diana de nuestro entorno sanitario ha permitido estratificar en alto riesgo de F3-4 o riesgo intermedio (F2-4), priorizando así la derivación de los pacientes adecuados.

Las guías clínicas publicadas por la EASL y la AASLD han planteado algunas dudas sobre la necesidad de realizar un cribado poblacional del MAFLD sin criterios selectivos, y en particular de la fibrosis avanzada, sino que ha de realizarse en población de riesgo [29,43]. En pacientes con factores de riesgo metabólico en un entorno de medicina comunitaria, se espera una baja prevalencia de fibrosis avanzada, por lo que deberían utilizarse pruebas de fibrosis no invasivas con el fin de descartarla [103]. Además, se ha consensuado que, en la población afecta de DM2 en particular, se ha de realizar un mayor esfuerzo clínico en la búsqueda del MAFLD, donde el uso de biomarcadores y la ET son herramientas de apoyo esenciales [29,124,216]. Cabe destacar que un 25% de los pacientes con DM2 y MAFLD y FIB-4<1,30 presentaban fibrosis avanzada por estudio de biopsia hepática; así, un resultado de FIB-4<1,30 ha de considerarse con precaución en esta población, donde la ET puede ayudar a refinar la evaluación clínica [108,217]. En la cohorte de NASH estudiada, se incluyó la variable DM2 en el modelo bivalente (FIB-4 y ELF) con el fin de mejorar un posible infradiagnóstico de F3-4 causado por valores de FIB<1,30, sin embargo, no se mejoró el porcentaje de casos correctamente clasificados, del 76%.

Algunas limitaciones del estudio que han de considerarse son: a) la alta proporción de fibrosis avanzada en la cohorte de NASH que podría sobreestimar el porcentaje de pacientes F3-4 en las cohortes de atención primaria; b) la ausencia de un método *gold estándar* para determinar el grado de fibrosis en dichas cohortes de atención primaria podría limitar la evaluación de la concordancia del algoritmo propuesto y su implementación.

En resumen, el uso de biomarcadores para el diagnóstico de fibrosis hepática permite la detección de aquellos con alto riesgo de F3-4. El FIB-4 y el ELF utilizados en un algoritmo secuencial es una estrategia muy eficiente en la estratificación del riesgo de fibrosis en población de riesgo metabólico, ya que se puede realizar en un solo paso, y así priorizar la derivación de los pacientes de atendidos en atención primaria.

4.3 Aumento precoz de la SHBG como predictor de la respuesta a la cirugía bariátrica en la obesidad severa

Los pacientes con obesidad tienen en la CB la mejor solución para conseguir una pérdida de peso satisfactoria y sostenida, y una mejora de las comorbilidades metabólicas asociadas. Sin embargo, la respuesta a largo plazo a la CB es variable, en la que la

reganancia de peso se produce en un número significativo de pacientes [151,164], lo que supone un deterioro de la calidad de vida y la reaparición o empeoramiento de las comorbilidades asociadas que precisan un manejo adecuado [166,168,218]. Así, es necesaria la búsqueda de un biomarcador que prediga la respuesta a la CB a largo plazo en términos de TWL y WR, variables utilizadas en la práctica asistencial.

Nuestros resultados mostraron que el TWL en la cohorte estudiada alcanzó un 32% en el nadir (12º mes de seguimiento), a partir del cual no observamos variación en la tendencia de pérdida de peso (TWL=31%); incluso se observó una reganancia de peso en el 32% de los pacientes. Las características clínicas de nuestra cohorte son similares a otros estudios, como la DM2, la dislipemia y la RI, además de un IMC y un perímetro de cintura semejantes [219-221]. La pérdida de peso total observada un año después de la CB es similar a la reportada en un metaanálisis reciente, en el que el TWL medio fue del 28-34% [167,222]. Por otro lado, la media de la WR en nuestro estudio fue del 6,6% un año después del nadir (24º mes de seguimiento), además de que un 20% de los pacientes con un TWL<25% recuperaron >10% de peso después de 24 meses. Estos porcentajes son comparables a los de estudios previos, en los que se recuperó un 5,7% del peso nadir un año después y el percentil 75 fue del 9,6% [167]. En este sentido, se ha recomendado esperar a los 3 años de la CB para estudiar la variación de peso en términos de TWL y WR [223], no obstante, en los dos años de seguimiento realizado en nuestro estudio fue suficiente como para observar distintas tendencias en la pérdida de peso, que habrán de ser analizadas en los seguimientos posteriores. Por otro lado, las diferentes alternativas de medición de la WR y el umbral de TWL seleccionados pueden ajustarse de forma más precisa a la asociación con la mayoría de los resultados clínicos registrados durante el seguimiento y a la posible remisión de las comorbilidades relacionadas con el SM [163].

Los efectos de la CB en pacientes con obesidad reducen significativamente el riesgo de trastornos asociados a la obesidad y la mortalidad por cualquier causa [224-226]. En este sentido, se ha descrito una tasa de remisión de la DM2 del 75%, similar a nuestros resultados [227], y una reducción de alrededor del 70% del HOMA-IR a lo largo del primer año, de 5,91 a 1,69 en nuestro caso; así el punto de corte HOMA-IR propuesto de 3,42 en pacientes con obesidad nos informaría de una mejoría de la RI [126,228]. Además, observamos una mejora en el perfil metabólico, donde se ha descrito previamente una reducción significativa de la concentración de glucosa en ayunas y de HbA1c a lo largo del primer año tras la CB [224], así como un perfil lipídico más favorable con niveles más bajos de triglicéridos [227,228]. Finalmente, nuestros datos confirmaron que la concentración plasmática de SHBG aumentó después de un mes de someterse a la CB en todas las

pacientes, lo que también se ha descrito en mujeres con SOPC y obesidad [151]. Este aumento significativo se ha resumido en varios metaanálisis recientes en los que la SHBG aumentó del 25% al 130% [157,222,229,230].

La concentración de SHBG está asociada con el metabolismo de la glucosa, la adiposidad y los componentes del SM [19,91,231] y es uno de los mediadores entre varios tejidos endocrinos y podría contribuir con su propio papel fisiopatológico en la obesidad [145]. Además, la CB afecta profundamente a las funciones endocrinas del tejido adiposo, donde las citoquinas proinflamatorias, la adiponectina y la leptina restablecen sus niveles [232-235]. Como hemos observado en nuestra cohorte, existe una mejora de la RI y una remisión de la DM2 en la mayoría de los pacientes tras la CB [236,237], por lo que es posible que la reducción de la RI favorezca la recuperación la función hepática, hecho que puede desempeñar un papel importante en la pérdida de peso y la regulación del metabolismo tras la CB [170,238,239].

Para evaluar si la concentración circulante de SHBG eran un predictor fiable de una respuesta buena o mala a la CB en términos de TWL y WR, decidimos medir su concentración hasta 24 meses después de la CB. Nuestros resultados mostraron por primera vez que la concentración de SHBG aumentó precozmente de forma diferente dependiendo de la respuesta a la CB a los 24 meses. Así, los pacientes con un $TWL \geq 25\%$ experimentaron un aumento medio de la concentración de SHBG del 100% en el primer mes, que se tradujo en un incremento del 150% a partir del 6º mes de seguimiento con respecto a antes de CB. Sin embargo, los pacientes con un $TWL < 25\%$ presentaron un aumento de SHBG de sólo el 40% después del 1º seguimiento, con incrementos relativos de SHBG entre el 6º y el 24º mes con respecto al pre-CB no superiores al 75% (**Figura 20**). Es importante destacar que el aumento temprano de la concentración de SHBG predijo significativamente una buena respuesta a la CB con una probabilidad superior al 80%, independientemente de la edad, el sexo o el procedimiento quirúrgico. Además, el aumento precoz de la SHBG también predijo la WR en el 24º mes de seguimiento según el modelo de regresión múltiple.

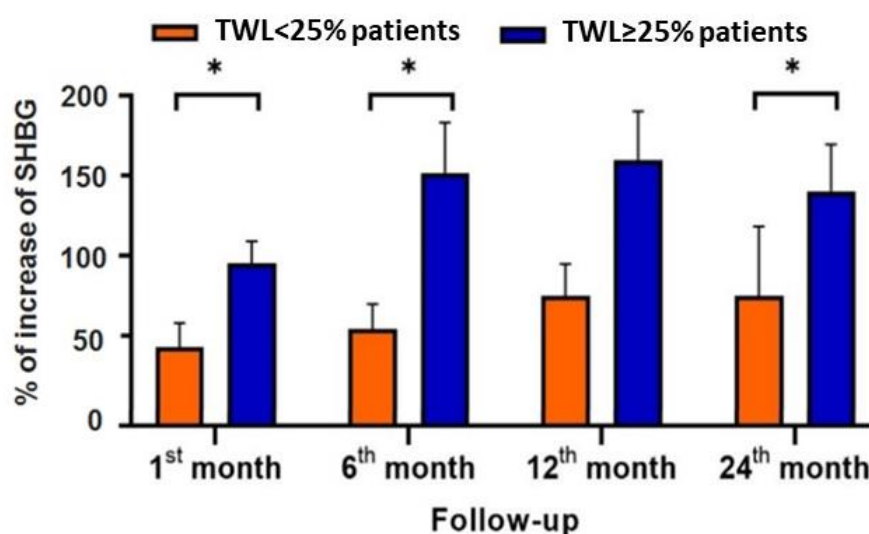


Figura 20. Aumento porcentual de la SHBG en cada seguimiento respecto al valor pre-CB. Media y error estándar del incremento de SHBG en porcentaje en cada seguimiento (1st month o 1^{er} seguimiento, 6th month o 6^o seguimiento, 12th month o 12^o seguimiento, 24th month o 24^o seguimiento) en pacientes con un TWL <25% y un TWL ≥25%. *p<0.050. Elaboración propia.

Este aumento de la SHBG puede ser consecuencia de la disminución de la inflamación relacionada con el tejido adiposo [160]. En estudios previos, se ha descrito una reducción significativa de la expresión del TNF α y de la IL6 en el tejido adiposo 6 meses después de la CB, lo que podría reducir la inflamación relacionada con la obesidad y la RI [233]. La reducción de los marcadores inflamatorios, junto con el aumento de los niveles de adiponectina [232], desencadenaría el aumento de la síntesis hepática de SHBG [222,230]. Así, la reducción masiva y rápida de tejido adiposo y la inflamación relacionada, podría explicar el aumento de la concentración plasmática de SHBG después de la CB [240]. Por otro lado, las modificaciones del estilo de vida, como el ayuno o el ejercicio, tienen implicaciones en el aumento de la expresión de SHBG, que podría regular el gasto energético [241-243]. En cuanto al procedimiento quirúrgico, nuestros datos no demostraron que el RYGB o la gastrectomía en manga se asociaran a diferentes respuestas a la CB como se ha descrito previamente [243], ni tampoco a un aumento diferencial de la SHBG en el primer mes tras la CB.

Así, el aumento precoz de la SHBG observado en los pacientes con un TWL ≥25% podría reflejar la mejora del perfil metabólico a medio y largo plazo [136,160], como ya se ha publicado previamente, en los que la WR se acompaña de un perfil metabólico desfavorable [244]. En este sentido, resulta interesante identificar biomarcadores tempranos post-CB capaces de predecir la evolución a medio y largo plazo, y complementar así los marcadores utilizados previamente a la cirugía, que no son lo suficientemente robustos en cuanto a la respuesta a la CB y se centran en variables

antropométricas y marcadores genéticos [166,169,245]. Esta identificación precoz de los pacientes que presentarán WR dos años después, tiene un potencial real de cambiar las guías de prácticas clínica actuales, y permitiría a los clínicos llevar a cabo estrategias postoperatorias e intensificar los tratamientos, como la intervención conductual, el asesoramiento dietético y el uso de fármacos como los GLP-1AR, con el fin de prevenir la reganancia ponderal [164,172,246] y reducir las elevadas tasas de reoperación [163]. La inclusión de la SHBG en los perfiles analíticos de la práctica clínica permitiría lograr el seguimiento individualizado tras la CB. Así pues, es necesaria la colaboración entre equipos de cirujanos, especialistas en medicina de la obesidad y dietistas [171,247], lo que favorecería la implantación de la medicina personalizada.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta, como: (a) la ausencia de evaluación de la relación entre la concentración de SHBG con el metabolismo basal y el cambio en la composición corporal a lo largo del seguimiento; (b) la influencia de variantes genéticas en la expresión de SHBG; (c) el papel de la variación de las adipocinas tras la CB en la síntesis hepática de SHBG; (d) el impacto de las técnicas quirúrgicas utilizadas (RYGB y gastrectomía en manga) en la respuesta a la CB y la WR, determinado por el limitado número de pacientes incluidos. Se trata de un estudio piloto en el que las futuras líneas irán dirigidas a validar los puntos de corte descritos y los modelos predictivos obtenidos en una cohorte mayor considerando todas estas variables.

En resumen, el aumento de la concentración plasmática de SHBG en el primer mes tras la CB es un buen predictor de la respuesta a ésta en términos de TWL y WR tras dos años de la intervención. Este aumento podría reflejar la disminución de la inflamación y disfunción del tejido adiposo visceral y la recuperación de la función hepática, además de que la SHBG podría tener un papel activo en la mejora general del perfil metabólico y el mantenimiento de la pérdida de peso.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La diabetes mellitus tipo 2, la resistencia a insulina severa y la presencia de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926 actúan como factores de riesgo independientes de fibrosis avanzada en el NASH.
2. La diabetes mellitus tipo 2 o la resistencia a insulina severa incrementan el riesgo de fibrosis avanzada en pacientes con NASH que portan los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *TM6SF2* rs58542926.
3. Los biomarcadores FIB-4 y ELF permiten la detección de pacientes con NASH con alto riesgo de fibrosis avanzada.
4. La medida combinada del FIB-4 y ELF en un algoritmo diagnóstico es una estrategia útil y eficiente en la estratificación del riesgo de fibrosis hepática en pacientes con factores de riesgo metabólicos de enfermedad hepática.
5. El incremento de la concentración de SHBG en el primer mes tras la cirugía bariátrica es un buen predictor de la respuesta a ésta en términos de pérdida total de peso y reganancia ponderal a los dos años de la intervención.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferrea Y, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):786.
2. Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med.* 2021;42(3):199-214.
3. Aller R, Fernández-Rodríguez C, Lo Iacono O, Bañares R, Abad J, Carrión JA, et al. Documento de consenso. Manejo de la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Guía de práctica clínica. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;41(5):328-49.
4. Schattenberg JM, Allen AM, Jarvis H, Zelber-Sagi S, Cusi K, Dillon JF, et al. A multistakeholder approach to innovations in NAFLD care. *Commun Med (Lond).* 2023;3(1):1.
5. Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2020 ;158(7):1999-2014.e1.
6. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020;73(1):202-9.
7. Godoy-Matos AF, Silva Júnior WS, Valerio CM. NAFLD as a continuum: From obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2020;12:60.
8. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J. Hepatol.* 2017;9(16):715-32.
9. Chan WK, Chuah KH, Rajaram RB, Lim LL, Ratnasingam J, Vethakkan SR. Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A State-of-the-Art Review. *J Obes Metab Syndr.* 2023;32(3):197-213.
10. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:706978.
11. Purnell JQ. Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2023.
12. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 5ª ed. Barcelona: Omega; 2009.
13. Fernández B, Suárez I, Rubio M, Muñoz E, Bodega G. Organografía microscópica animal comparada. Madrid: Síntesis; 2008.
14. Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: Current evidence and expectations. *Korean J Intern Med.* 2017;32(2):213-28.
15. Castaño López MA, Díaz Portillo J, Paredes Salido F. Bioquímica clínica: de la patología al laboratorio. Majadahonda: Ergon; 2008.
16. Mastoor Z, Diz-Chaves Y, González-Matías LC, Mallo F. Renin–Angiotensin System in Liver Metabolism: Gender Differences and Role of Incretins. *Metabolites.* 2022;12(5):411.
17. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):829-38.

18. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12 Suppl 2:83-92.
19. Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Bialokoz-Kalinowska I, Bobrus-Chociej A, Kowalska I. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol.* 2016; 63(3):459-67.
20. Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A, Hernández C, Selva DM. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(7):376-83.
21. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: Linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(9):509-20.
22. Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes.* 2012;61(2):372-82.
23. Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3979-87.
24. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2358.
25. Reccia I, Kumar J, Akladios C, Virdis F, Pai M, Habib N, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism.* 2017;72:94-108.
26. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11-20.
27. Rinella M, Charlton M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology.* 2016;64(1):19-22.
28. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology.* 2020;158(7):1851-64.
29. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;67(1):328-57.
30. Allen AM, Therneau TM, Larson JJ, Coward A, Somers VK, Kamath PS. Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study. *Hepatology.* 2018;67(5):1726-36.
31. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S47-S64.
32. Brea Á, Pintó X, Ascaso JF, Blasco M, Díaz Á, González-Santos P, et al. Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (I). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y su asociación con la enfermedad cardiovascular. *Clin Investig Arterioscler.* 2017;29(3):141-48.
33. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014 ;59(3):1174-97.
34. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain,

- United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol*. 2018;69(4):896-904.
35. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(1):36-49.
36. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 2019;92:6-10.
37. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82-97.
38. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557-67.
39. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res*. 2020;126(11):1477-500.
40. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-65.
41. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.e10.
42. Berenguer M, Schuppan D. Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: Mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatol*. 2013;58(5):1028-41.
43. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388-402.
44. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):261-73.
45. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017;127(1):1-4.
46. Aller R, Burgueño B, Sigüenza R, Fernández-Rodríguez C, Fernández N, Antolín B, et al. Comparative study of overweight and obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2019;111(4):256-63.
47. Mainous AG, Rooks BJ, Medley JF, Dickmann SB. Body composition among adults at a healthy body mass index and association with undetected non-alcoholic fatty liver. *Int J Obes (Lond)*. 2022;46(7):1403-5.
48. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol*. 2018;68(2):335-52.
49. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908-22.
50. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: *Standards of medical care in diabetes-2021*. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33.

51. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2019;71(4):793–801.
52. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 2020;323(12):1175-83.
53. Budd J, Cusi K. Role of Agents for the Treatment of Diabetes in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Diab Rep*. 2020; 20(11):59.
54. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol*. 2019;70(3):531-44.
55. Tilg H, Moschen AR, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):32-42.
56. Malone JL, Hansen BC. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? *Pediatr Diabetes*. 2019;20(1):5-9.
57. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(4):1209-17.
58. Míková I, Neřoldová M, Hubáček JA, Dlouhá D, Jirsa M, Honsová E, et al. Donor PNPLA3 and TM6SF2 variant alleles confer additive risks for graft steatosis after liver transplantation. *Transplantation*. 2020;104(3):526-34.
59. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic factors in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver and steatohepatitis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:460190.
60. Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, Nahon P. PNPLA3 gene in liver diseases. *J Hepatol*. 2016;65(2):399-412.
61. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology*. 2015;61(2):506-14.
62. Severson TJ, Besur S, Bonkovsky HL. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(29):6742-56.
63. Gellert-Kristensen H, Richardson TG, Davey Smith G, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Stender S. Combined Effect of PNPLA3, TM6SF2, and HSD17B13 Variants on Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in the General Population. *Hepatology*. 2020;72(3):845-56.
64. Kruk B, Liebe R, Milkiewicz M, Wunsch E, Raszeja-Wyszomirska J, Lammert F, et al. PNPLA3 p.I148M and TM6SF2 p.E167K variants do not predispose to liver injury in cholestatic liver diseases: A prospective analysis of 178 patients with PSC. *PLoS One*. 2018;13(8):e0202942.
65. Köpp J, Fleßa S, Lieb W, Markus MRP, Teumer A, Homuth G, et al. Association of PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 with health services utilization in a population-based study. *BMC Health Serv Res*. 2016;16:41.
66. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg RM, Bantel H, Pathil A, Demir M, et al. Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: A multicenter biopsy-based study1. *J Lipid Res*. 2017;58(1):247–55.

67. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*. 2018;68(2):268-79.
68. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 2019;92:37-50.
69. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv Nutr*. 2019;10(suppl_1):S17-S30.
70. Conjeevaram Selvakumar PK, Kabbany MN, Alkhouri N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Not a Small Matter. *Paediatr Drugs*. 2018;20(4):315-29.
71. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol*. 2021;192:114723.
72. Jaacks LM, Vandevijvere S, Pan A, McGowan CJ, Wallace C, Imamura F, et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(3):231-40.
73. Yamamura S, Eslam M, Kawaguchi T, Tsutsumi T, Nakano D, Yoshinaga S, et al. MAFLD identifies patients with significant hepatic fibrosis better than NAFLD. *Liver Int*. 2020;40(12):3018-30.
74. Younossi ZM, Loomba R, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, Neuschwander-Tetri BA, et al. Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2018;68(1):361-71.
75. Celik O, Yildiz BO. obesity and physical exercise. *Minerva Endocrinol (Torino)*. 2021;46(2):131-44.
76. Vilar-Gomez E, Nephew LD, Vuppalanchi R, Gawrieh S, Mladenovic A, Pike F, et al. High-quality diet, physical activity, and college education are associated with low risk of NAFLD among the US population. *Hepatology*. 2022;75(6):1491-506.
77. Giammarino AM, Qiu H, Bulsara K, Khan S, Jiang Y, Da BL, et al. Community Socioeconomic Deprivation Predicts Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2022;6(3):550-60.
78. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*. 2016;64(5):1577-86.
79. Scapaticci S, D'Adamo E, Mohn A, Chiarelli F, Giannini C. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Youth With Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:639548.
80. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science*. 2011;332(6037):1519-23.
81. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;19(4):291-302.
82. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320(3):C375-91.
83. Larter CZ, Farrell GC. Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat? *J Hepatol*. 2006;44(2):253-61.
84. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(3):299-310.

85. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(6):349-64.
86. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2018;155(2):282-302.e8.
87. Karamfilova V, Gateva A, Assyov Y, Alexiev A, Savov A, Yaneva N, et al. PNPLA3 I148M Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. *J Gastrointest Liver Dis*. 2019;28(4):433-8.
88. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*. 2013;59(3):583-94.
89. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury *J Clin Invest*. 2004;114(2):147-52.
90. Xu L, Nagata N, Ota T. Impact of glucoraphanin-mediated activation of nrf2 on non-alcoholic fatty liver disease with a focus on mitochondrial dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5920.
91. Mody A, Whitec D, Kanwal F, Garcia JM. Relevance of low testosterone to nonalcoholic fatty liver disease. *Cardiovasc Endocrinol*. 2015;4(3):83-9.
92. Quan L, Wang L, Wang J, Yuwen B, Zhu J. Association between sex hormone binding globulin gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(9):3514-20.
93. Winters SJ, Gogineni J, Karegar M, Scoggins C, Wunderlich CA, Baumgartner R, et al. Sex hormone-binding globulin gene expression and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):E2780-88.
94. Wong VWS, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GLH, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(8):461-78.
95. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
96. Bedossa P, Burt AA, Gouw AHA, Lackner C, Schirmacher P, Terracciano L, et al. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565-75.
97. Perrault J, McGill DB, Ott BJ, Taylor WF. Liver biopsy: Complications in 1000 inpatients and outpatients. *Gastroenterology*. 1978;74(1):103-6.
98. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
99. Rossi E, Adams LA, Bulsara M, Jeffrey GP. Assessing liver fibrosis with serum marker models. *Clin Biochem Rev*. 2007;28(1):3-10.
100. Carrión JA, Puigvehí M, Coll S, et al. Applicability and accuracy improvement of transient elastography using the M and XL probes by experienced operators. *J Viral Hepat*. 2015;22(3):297-306.

101. Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, Foucher J, Chan HLY, Le Bail B, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(2):454-62.
102. Serra-Burriel M, Graupera I, Torán P, Thiele M, Roulot D, Wai-Sun Wong V, et al. Transient elastography for screening of liver fibrosis: Cost-effectiveness analysis from six prospective cohorts in Europe and Asia. *J Hepatol*. 2019;71(6):1141–51.
103. Berzigotti A, Tsochatzis E, Boursier J, Castera L, Cazzagon N, Friedrich-Rust M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. *J Hepatol*. 2021;75(3):659-89.
104. Honda Y, Yoneda M, Imajo K, Nakajima A. Elastography techniques for the assessment of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4039.
105. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1264-81.e4.
106. Caballería L, Pera G, Arteaga I, Rodríguez L, Alumà A, Morillas RM, et al. High Prevalence of Liver Fibrosis Among European Adults With Unknown Liver Disease: A Population-Based Study. *Clin Gastroenterol*. 2018;16(7):1138-45.e5.
107. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317-25.
108. Boursier J, Hagström H, Ekstedt M, Moreau C, Bonacci M, Cure S, et al. Non-invasive tests accurately stratify patients with NAFLD based on their risk of liver-related events. *J Hepatol*. 2022;76(5):1013-20.
109. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.
110. Angulo P, Bugianesi E, Bjornsson ES, Charatcharoenwittaya P, Mills PR, Barrera F, et al. Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2013;145(4):782-9.e4.
111. Guillaume M, Moal V, Delabaudiere C, Zuberbuhler F, Robic MA, Lannes A, et al. Direct comparison of the specialised blood fibrosis tests FibroMeter^{V2G} and Enhanced Liver Fibrosis score in patients with non-alcoholic fatty liver disease from tertiary care centres. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;50(11-12):1214-22.
112. Fernandes FF, Ferraz ML, Andrade LE, Dellavance A, Terra C, Pereira G, et al. Enhanced liver fibrosis panel as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49(3):235-41.
113. Wong GLH, Chan HLY, Choi PCL, Chan AWH, Yu Z, Lai JWY, et al. Non-invasive algorithm of enhanced liver fibrosis and liver stiffness measurement with transient elastography for advanced liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(2):197-208.
114. Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: Normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol*. 2013;59(2):236-42.

115. López IC, Aroca FG, Bernal MDF, Mompeán JAL, Bernal ÁB, Martínez AMH, et al. Utility of the ELF Test for Detecting Steatohepatitis in Morbid Obese Patients with Suspicion of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Surg.* 2017;27(9):2347-53.
116. Wang L, Wang M, Zhao W, Shi Y, Sun Y, Wu X, et al. Key points of 2015 EASL-ALEH clinical practice guidelines: non invasive tests for evaluation of liver severity and prognosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2015;23(7):488-92.
117. 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.* 2004;127(6):1704-13.
118. Zambrano-Huaila R, Guedes L, Stefano JT, de Souza AAA, Marciano S, Yvamoto E, et al. Diagnostic performance of three non-invasive fibrosis scores (Hepamet, FIB-4, NAFLD fibrosis score) in NAFLD patients from a mixed Latin American population. *Ann Hepatol.* 2020;19(6):622-26.
119. Anstee QM, Darlay R, Cockell S, Meroni M, Govaere O, Tiniakos D, et al. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort^{*}. *J Hepatol.* 2020;73(3):505-15.
120. Wang X, Liu Z, Wang K, Wang Z, Sun X, Zhong L, et al. Additive effects of the risk alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a Chinese population. *Front Genet.* 2016;7:140.
121. Barata L, Feitosa MF, Bielak LF, Halligan B, Baldrige AS, Guo X, et al. Insulin Resistance Exacerbates Genetic Predisposition to Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals Without Diabetes. *Hepatol Commun.* 2019;3(7):894-907.
122. Machado CM, Leite NC, França PH, Cardoso CR, Salles GF, Villela-Nogueira CA. PNPLA3 gene polymorphism in Brazilian patients with type 2 diabetes: A prognostic marker beyond liver disease? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019;29(9):965-71.
123. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques.* 2001;31(5):1106-21.
124. Bazick J, Donithan M, Neuschwander-Tetri BA, Kleiner D, Brunt EM, Wilson L, et al. Clinical model for NASH and advanced fibrosis in adult patients with diabetes and NAFLD: Guidelines for referral in NAFLD. *Diabetes Care.* 2015;38(7):1347-55.
125. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
126. Shashaj B, Luciano R, Contoli B, Morino GS, Spreghini MR, Rustico C, et al. Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. *Acta Diabetol.* 2016;53(2):251-60.
127. Karlsen TH, Sheron N, Zelber-Sagi S, Carrieri P, Dusheiko G, Bugianesi E, et al. The EASL–Lancet Liver Commission: protecting the next generation of Europeans against liver disease complications and premature mortality. *Lancet.* 2022;399(10319):61-116.
128. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol.* 2018;68(2):305-15.
129. Tsochatzis EA, Newsome PN. Non-alcoholic fatty liver disease and the interface between primary and secondary care. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3(7):509-17.

130. Srivastava A, Jong S, Gola A, Gailer R, Morgan S, Sennett K, et al. Cost-comparison analysis of FIB-4, ELF and fibroscan in community pathways for non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2019;19(1):122.
131. Srivastava A, Gailer R, Tanwar S, Trembling P, Parkes J, Rodger A, et al. Prospective evaluation of a primary care referral pathway for patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2019;71(2):371-8.
132. Wharton S, Lau DCW, Vallis M, Sharma AM, Biertho L, Campbell-Scherer D, et al. Obesity in adults: A clinical practice guideline. *CMAJ.* 2020;192(31):E875-91.
133. Borga M, West J, Bell JD, Harvey NC, Romu T, Heymsfield SB, et al. Advanced body composition assessment: From body mass index to body composition profiling. *J Investig Med.* 2018;66(5):1-9.
134. Nimptsch K, Konigorski S, Pischon T. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. *Metabolism.* 2019;92:61-70.
135. Aleksandrova K, Mozaffarian D, Pischon T. Addressing the Perfect Storm: Biomarkers in Obesity and Pathophysiology of Cardiometabolic Risk. *Clin Chem.* 2018;64(1):142-53.
136. Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):3570.
137. Moghbeli M, Khedmatgozar H, Yadegari M, Avan A, Ferns GA, Ghayour Mobarhan M. Cytokines and the immune response in obesity-related disorders. *Adv Clin Chem.* 2021;101:135-68.
138. Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales FJ, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res.* 2020;151(1):11-21.
139. Ezquerro S, Mocha F, Frühbeck G, Guzmán-Ruiz R, Valentí V, Mugueta C, et al. Ghrelin Reduces TNF- α -Induced Human Hepatocyte Apoptosis, Autophagy, and Pyroptosis: Role in Obesity-Associated NAFLD. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;104(1):21-37.
140. Ren Y, Zhao H, Yin C, Lan X, Wu L, Du X, et al. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:873699.
141. Endalifer ML, Diress G. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. *J Obes.* 2020;2020:6134362.
142. Zhang Y, Wang Y, Liu J. Friend or foe for obesity: How hepatokines remodel adipose tissues and translational perspective. *Genes Dis.* 2022;10(3):825-47.
143. Wei S, Schmidt MD, Dwyer T, Norman RJ, Venn AJ. Obesity and menstrual irregularity: Associations with SHBG, testosterone, and insulin. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17(5):1070-6.
144. Grasa MDM, Gulfo J, Camps N, Alcalá R, Monserrat L, Moreno-Navarrete JM, et al. Modulation of SHBG binding to testosterone and estradiol by sex and morbid obesity. *Eur J Endocrinol.* 2017;176(4):393-404.
145. Goldštajn MŠ, Toljan K, Grgić F, Jurković I, Baldani DP. Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) as a Marker of Clinical Disorders. *Coll Antropol.* 2016;40(3):211-8.

146. Tokushige K, Ikejima K, Ono M, Eguchi Y, Kamada Y, Itoh Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. *J Gastroenterol*. 2021;56(11):951-63.
147. Fraile JM, Palliyil S, Barelle C, Porter AJ, Kovaleva M. Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) - A Review of a Crowded Clinical Landscape, Driven by a Complex Disease. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:3997-4009.
148. Albhaisi SAM, Sanyal AJ. New drugs for NASH. *Liver Int*. 2021;41 Suppl 1:112-8.
149. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. 2017;15(1):45.
150. Bray GA, Frühbeck G, Ryan DH, Wilding JPH. Management of obesity. *Lancet*. 2016;387(10031):1947-56.
151. Ezzat RS, Abdallah W, Elsayed M, Saleh HS, Abdalla W. Impact of bariatric surgery on androgen profile and ovarian volume in obese polycystic ovary syndrome patients with infertility. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(9):5048-52.
152. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts*. 2015;8(6):402-24.
153. Cazzo E, Pareja JC, Chaim EA. Nonalcoholic fatty liver disease and bariatric surgery: a comprehensive review. *Sao Paulo Med J*. 2017;135(3):277-95.
154. Aminian A, Al-Kurd A, Wilson R, Bena J, Fayazzadeh H, Singh T, et al. Association of Bariatric Surgery with Major Adverse Liver and Cardiovascular Outcomes in Patients with Biopsy-Proven Nonalcoholic Steatohepatitis. *JAMA*. 2021;326(20):2031-42.
155. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji LC, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, et al. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology*. 2020;159(4):1290-301.e5.
156. Truong E, Noureddin M. Improvement in nonalcoholic fatty liver disease through bariatric surgery. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2022;20(1):13-7.
157. Emami MR, Safabakhsh M, Khorshidi M, Moradi Moghaddam O, Mohammed SH, Zarezadeh M, et al. Effect of bariatric surgery on endogenous sex hormones and sex hormone-binding globulin levels: a systematic review and meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis*. 2021;17(9):1621-36.
158. Luconi M, Samavat J, Seghieri G, Iannuzzi G, Lucchese M, Rotella C, et al. Determinants of testosterone recovery after bariatric surgery: Is it only a matter of reduction of body mass index? *Fertil Steril*. 2013;99(7):1872-9.e1.
159. Boonchaya-Anant P, Laichuthai N, Suwannasrisuk P, Hounngam N, Udomsawaengsup S, Snabboon T. Changes in Testosterone Levels and Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Extremely Obese Men after Bariatric Surgery. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1416503.
160. Faramia J, Ostinelli G, Drolet-Labelle V, Picard F, Tchernof A. Metabolic adaptations after bariatric surgery: adipokines, myokines and hepatokines. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;52:67-74.
161. Shih KC, Janckila AJ, Lee WJ, Chou YC, Huang CJ, Kwok CF, et al. Effects of bariatric weight loss surgery on glucose metabolism, inflammatory cytokines, and serum tartrate-resistant acid phosphatase 5a in obese Chinese adults. *Clin Chim Acta*. 2016;453:197-202.

162. Bratti LOS, do Carmo ÍAR, Vilela TF, Souza LC, Moraes ACR de, Filippin-Monteiro FB. Bariatric surgery improves clinical outcomes and adiposity biomarkers but not inflammatory cytokines SAA and MCP-1 after a six-month follow-up. *Scand J Clin Lab Invest.* 2021;81(3):230-6.
163. Tu Y, Pan Y, Han J, Pan J, Zhang P, Jia W, et al. A total weight loss of 25% shows better predictivity in evaluating the efficiency of bariatric surgery. *Int J Obes (Lond).* 2021;45(2):396-403.
164. Velapati SR, Shah M, Kuchkuntla AR, Abu-dayyeh B, Grothe K, Hurt RT, et al. Weight Regain After Bariatric Surgery: Prevalence, Etiology, and Treatment. *Curr Nutr Rep.* 2018;7(4):329-34.
165. O'Brien PE, Hindle A, Brennan L, Skinner S, Burton P, Smith A, et al. Long-Term Outcomes After Bariatric Surgery: a Systematic Review and Meta-analysis of Weight Loss at 10 or More Years for All Bariatric Procedures and a Single-Centre Review of 20-Year Outcomes After Adjustable Gastric Banding. *Obes Surg.* 2019;29(1):3-14.
166. Athanasiadis DI, Martin A, Kapsampelis P, Monfared S, Stefanidis D. Factors associated with weight regain post-bariatric surgery: a systematic review. *Surg Endosc.* 2021;35(8):4069-84.
167. King WC, Hinerman AS, Belle SH, Wahed AS, Courcoulas AP. Comparison of the Performance of Common Measures of Weight Regain after Bariatric Surgery for Association with Clinical Outcomes. *JAMA.* 2018;320(15):1560-9.
168. El Ansari W, Elhag W. Weight Regain and Insufficient Weight Loss After Bariatric Surgery: Definitions, Prevalence, Mechanisms, Predictors, Prevention and Management Strategies, and Knowledge Gaps-a Scoping Review. *Obes Surg.* 2021;31(4):1755-66.
169. Ciudin A, Fidilio E, Gutiérrez-Carrasquilla L, Caixàs A, Vilarrasa N, Pellitero S, et al. A Clinical-Genetic Score for Predicting Weight Loss after Bariatric Surgery: The OBEGEN Study. *J Pers Med.* 2021;11(10):1040.
170. Kim EY. Definition, Mechanisms and Predictors of Weight Loss Failure After Bariatric Surgery. *J Metab Bariatr Surg.* 2022;11 (2):39-48.
171. Istfan NW, Lipartia M, Anderson WA, Hess DT, Apovian CM. Approach to the Patient: Management of the Post-Bariatric Surgery Patient with Weight Regain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(1):251-63.
172. Stanford FC, Alfaris N, Gomez G, Ricks ET, Shukla AP, Corey KE, et al. The utility of weight loss medications after bariatric surgery for weight regain or inadequate weight loss: A multi-center study. *Surg Obes Relat Dis.* 2017;13(3):491-500.
173. Lisboa QC, Nardelli MJ, Pereira P de A, Miranda DM, Ribeiro SN, Costa RSN, et al. *PNPLA3* and *TM6SF2* polymorphisms in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2020;12(10):792-806.
174. 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.* 2019;17(11):2310-9.e6.
175. Goh GBB, Pagadala MR, Dasarathy J, Unalp-Arida A, Sargent R, Hawkins C, et al. Clinical spectrum of non-alcoholic fatty liver disease in diabetic and non-diabetic patients. *BBA Clin.* 2014;3:141-5.
176. Bellan M, Colletta C, Barbaglia MN, Salmi L, Clerici R, Mallela VR, et al. Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes Mellitus: Relationship between

- Nongenetic Factors and PNPLA3/HSD17B13 Polymorphisms. *Diabetes Metab J*. 2019;43(5):700-10.
177. Lomonaco R, Leiva EG, Bril F, Shrestha S, Mansour L, Budd J, et al. Advanced Liver Fibrosis Is Common in Patients With Type 2 Diabetes Followed in the Outpatient Setting: The Need for Systematic Screening. *Diabetes Care*. 2021;44(2):399-406.
 178. Masarone M, Rosato V, Aglitti A, Bucci T, Caruso R, Salvatore T, et al. Liver biopsy in type 2 diabetes mellitus: Steatohepatitis represents the sole feature of liver damage. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178473.
 179. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461-5.
 180. Kalia HS, Gaglio PJ. The Prevalence and Pathobiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients of Different Races or Ethnicities. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):215-24.
 181. Phan L, Jin Y, Zhang H, Qiang W, Shekhtman E, Shao D, et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator [Internet]. *Natl Cent Biotechnol Information, U.S. Natl Libr Med*. 2020 [consultada el 23 de diciembre de 2023]. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/
 182. Chandrasekharan K, Alazawi W. Genetics of Non-Alcoholic Fatty Liver and Cardiovascular Disease: Implications for Therapy?. *Front Pharmacol*. 2020;10:1413.
 183. Tang S, Zhang J, Mei TT, Guo HQ, Wei XH, Zhang WY, et al. Association of TM6SF2 rs58542926 T/C gene polymorphism with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1128.
 184. Dai G, Liu P, Li X, Zhou X, He S. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) susceptibility and severity: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(7):e14324.
 185. Yang J, Trépo E, Nahon P, Cao Q, Moreno C, Letouzé E, et al. PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases. *Int J Cancer*. 2019;144(3):533-44.
 186. Stickel F, Buch S, Nischalke HD, Weiss KH, Gotthardt D, Fischer J, et al. Genetic variants in PNPLA3 and TM6SF2 predispose to the development of hepatocellular carcinoma in individuals with alcohol-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(10):1475-83.
 187. Xia MF, Bian H, Gao X. NAFLD and Diabetes: Two Sides of the Same Coin? Rationale for Gene-Based Personalized NAFLD Treatment. *Front Pharmacol*. 2019;10:877.
 188. Koo BK, Joo SK, Kim D, Lee S, Bae JM, Park JH, et al. Development and Validation of a Scoring System, Based on Genetic and Clinical Factors, to Determine Risk of Steatohepatitis in Asian Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(11):2592-9.e10.
 189. Xia MF, Ling Y, Bian H, Lin HD, Yan HM, Chang XX, et al. I148M variant of PNPLA3 increases the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease caused by obesity and metabolic disorders. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(5):631-42.
 190. Kabarra K, Golabi P, Younossi ZM. Nonalcoholic steatohepatitis: Global impact and clinical consequences. *Endocr Connect*. 2021;10(10):R240-7.

191. Chatterjee A, Basu A, Das K, Singh P, Mondal D, Bhattacharya B, et al. Hepatic transcriptome signature correlated with HOMA-IR explains early nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Ann Hepatol*. 2020;19(5):472-81.
192. Gayoso-Diz P, Otero-González A, Rodríguez-Alvarez MX, Gude F, García F, De Francisco A, et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: Effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2013;13:47.
193. Boursier J, Anty R, Vonghia L, Moal V, Vanwolleghem T, Canivet CM, et al. Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(10):1387-96.
194. Sorrentino P, Terracciano L, D'Angelo S, Ferbo U, Bracigliano A, Vecchione R. Predicting fibrosis worsening in obese patients with NASH through parenchymal fibronectin, HOMA-IR, and hypertension. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(2):336-44.
195. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46(4):352-6.
196. Zhao R, Xiang B, Dolinsky VW, Xia M, Shen GX. Saskatoon berry powder reduces hepatic steatosis and insulin resistance in high fat-high sucrose diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem*. 2021;95:108778.
197. Lovat NEJ, Legare DJ, Lutt WW. An animal model of gestational obesity and prediabetes: Hiss-dependent insulin resistance induced by a high-sucrose diet in Sprague Dawley rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021;99(6):599-608.
198. Scherer T, Lindtner C, O'Hare J, Hackl M, Zielinski E, Freudenthaler A, et al. Insulin Regulates Hepatic Triglyceride Secretion and Lipid Content via Signaling in the Brain. *Diabetes*. 2016;65(6):1511-20.
199. Luukkonen PK, Qadri S, Ahlholm N, Porthan K, Männistö V, Sammalkorpi H, et al. Distinct contributions of metabolic dysfunction and genetic risk factors in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2022;76(3):526-35.
200. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-e40.
201. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008;47(2):455-60.
202. Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J Hepatol*. 2018;68(2):238-50.
203. Dongiovanni P, Stender S, Pietrelli A, Mancina RM, Cespiati A, Petta S, et al. Causal relationship of hepatic fat with liver damage and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver. *J Intern Med*. 2018;283(4):356-70.
204. Myers RP, Crotty P, Pomier-Layrargues G, Ma M, Urbanski SJ, Elkashab M. Prevalence, risk factors and causes of discordance in fibrosis staging by transient elastography and liver biopsy. *Liver Int*. 2010;30(10):1471-80.

205. Kleiner DE, Bedossa P. Liver histology and clinical trials for nonalcoholic steatohepatitis-perspectives from 2 pathologists. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1305-8.
206. Tamaki N, Ajmera V, Loomba R. Non-invasive methods for imaging hepatic steatosis and their clinical importance in NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*. 2022;18(1):55-66.
207. Soto M, Sampietro-Colom L, Lasalvia L, Mira A, Jiménez W, Navasa M. Cost-effectiveness of enhanced liver fibrosis test to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C virus and alcoholic liver disease patients. *World J Gastroenterol*. 2017;23(17):3163-73.
208. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10):1104-12.
209. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):160-7.
210. Day J, Patel P, Parkes J, Rosenberg W. Derivation and Performance of Standardized Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test Thresholds for the Detection and Prognosis of Liver Fibrosis. *J Appl Lab Med*. 2019;3(5):815-26.
211. Parkes J, Roderick P, Harris S, Day C, Mutimer D, Collier J, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut*. 2010;59(9):1245-51.
212. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology*. 2018;68(1):349-60.
213. Morling JR, Fallowfield JA, Guha IN, Nee LD, Glancy S, Williamson RM, et al. Using non-invasive biomarkers to identify hepatic fibrosis in people with type 2 diabetes mellitus: The Edinburgh type 2 diabetes study. *J Hepatol*. 2014;60(2):384-91.
214. Thiagarajan P, Chalmers J, Guha IN, James MW. Detecting chronic liver disease: Are liver function tests the solution?. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2020;81(2):1-8.
215. Romero-Gómez M, Aller R, Ampuero J, Fernández Rodríguez C, Agustín S, Latorre R, et al. AEEH «Consensus about detection and referral of hidden prevalent liver diseases». *Gastroenterol Hepatol*. 2023;46(3):236-47.
216. Blanco-Grau A, Gabriel-Medina P, Rodríguez-Algarra F, Villena Y, López-Martínez R, Agustín S, et al. Assessing Liver Fibrosis Using the FIB4 Index in the Community Setting. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(12):2236.
217. Rojano-Toimil A, Rivera-Esteban J, Manzano-Nuñez R, Bañares J, Selva DM, Gabriel-Medina P, et al. When Sugar Reaches the Liver: Phenotypes of Patients with Diabetes and NAFLD. *J Clin Med*. 2022;11(12):3286.
218. Tolvanen L, Christenson A, Surkan PJ, Lagerros YT. Patients' Experiences of Weight Regain After Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2022;32(5):1498-507.
219. Alagna S, Cossu ML, Gallo P, Tilocca PL, Pileri P, Alagna G, et al. Biliopancreatic diversion: long-term effects on gonadal function in severely obese men. *Surg Obes Relat Dis*. 2006;2(2):82-6.
220. Ippersiel V, Lepot A, Gruson D, Jamart J, Alexopoulou O, Maiter D, et al. Hypogonadotropic hypogonadism among a population of obese men: Prevalence, risk

- factors and reversibility after weight loss induced by bariatric surgery. *ESPEN J*. 2013;8(2):e37-e43.
221. Mora M, Aranda GB, De Hollanda A, Flores L, Puig-Domingo M, Vidal J. Weight loss is a major contributor to improved sexual function after bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2013;27(9):3197-204.
222. Lee Y, Dang JT, Switzer N, Yu J, Tian C, Birch DW, et al. Impact of Bariatric Surgery on Male Sex Hormones and Sperm Quality: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg*. 2019;29(1):34-346.
223. King WC, Hinerman AS, Courcoulas AP. Weight regain after bariatric surgery: a systematic literature review and comparison across studies using a large reference sample. *Surg Obes Relat Dis*. 2020;16(8):1133-44.
224. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy in Obese Patients with Diabetes. *N Engl J Med*. 2012;366(17):1567-76.
225. Sjöström L. Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 7:S93-7.
226. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, et al. Effects of Bariatric Surgery on Mortality in Swedish Obese Subjects. *N Engl J Med*. 2007;357(8):741-52.
227. Noel OF, Still CD, Argyropoulos G, Edwards M, Gerhard GS. Bile Acids, FXR, and Metabolic Effects of Bariatric Surgery. *J Obes*. 2016;2016:4390254.
228. Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI, Clemente-Postigo M, Fernnandez-Garcia D, Mingrone G, Cardona F. Postprandial hypertriglyceridemia predicts improvement in insulin resistance in obese patients after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2013;9(2):213-8.
229. Tian Z, Zhang YC, Wang Y, Chang XH, Zhu HL, Zhao Y. Effects of bariatric surgery on patients with obesity and polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis*. 2021;17(8):1399-408.
230. Lv B, Xing C, He B. Effects of bariatric surgery on the menstruation- and reproductive-related hormones of women with obesity without polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis*. 2022;18(1):148-60.
231. Peter A, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Staiger H, Machicao F, et al. Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes*. 2010;59(12):3167-73.
232. Lefere S, Onghena L, Vanlander A, van Nieuwenhove Y, Devisscher L, Geerts A. Bariatric surgery and the liver—Mechanisms, benefits, and risks. *Obes Rev*. 2021;22(9):e13294.
233. Moschen AR, Molnar C, Geiger S, Graziadei I, Ebenbichler CF, Weiss H, et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut*. 2010;59(9):1259-64.
234. Yadav R, Hama S, Liu Y, Siahmansur T, Schofield J, Syed AA, et al. Effect of Roux-en-Y Bariatric Surgery on Lipoproteins, Insulin Resistance, and Systemic and Vascular Inflammation in Obesity and Diabetes. *Front Immunol*. 2017;8:1512.
235. Rao SR. Inflammatory markers and bariatric surgery: A meta-analysis. *Inflamm Res*. 2012;61(8):789-807.

236. Affinati AH, Esfandiari NH, Oral EA, Kraftson AT. Bariatric Surgery in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2019;19(12):156.
237. Stenberg E, Thorell A. Insulin resistance in bariatric surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2020;23(4):255-61.
238. Stefan N, Häring HU. The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(3):144-52.
239. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology.* 2015;149(2):379-e16.
240. Bourebaba N, Ngo TH, Śmieszek A, Bourebaba L, Marycz K. Sex hormone binding globulin as a potential drug candidate for liver-related metabolic disorders treatment. *Biomed Pharmacother.* 2022;153:113261.
241. Cienfuegos S, Corapi S, Gabel K, Ezpeleta M, Kalam F, Lin S, et al. Effect of Intermittent Fasting on Reproductive Hormone Levels in Females and Males: A Review of Human Trials. *Nutrients.* 2022;14(11):2343.
242. Li C, Xing C, Zhang J, Zhao H, Shi W, He B. Eight-hour time-restricted feeding improves endocrine and metabolic profiles in women with anovulatory polycystic ovary syndrome. *J Transl Med.* 2021;19(1):148.
243. Zouhal H, Jayavel A, Parasuraman K, Hayes LD, Tourny C, Rhibi F, et al. Effects of Exercise Training on Anabolic and Catabolic Hormones with Advanced Age: A Systematic Review. *Sports Med.* 2022;52(6):1353-68.
244. Zamarron BF, Porsche CE, Luan D, Lucas HR, Mergian TA, Martinez-Santibanez G, et al. Weight Regain in Formerly Obese Mice Hastens Development of Hepatic Steatosis Due to Impaired Adipose Tissue Function. *Obesity (Silver Spring).* 2020;28(6):1086-97.
245. Ciudin A, Fidilio E, Ortiz A, Pich S, Salas E, Mesa J, et al. Genetic Testing to Predict Weight Loss and Diabetes Remission and Long-Term Sustainability after Bariatric Surgery: A Pilot Study. *J Clin Med.* 2019;8(7):964.
246. Miras AD, Pérez-Pevida B, Aldhwayan M, Kamocka A, McGlone ER, Al-Najim W, et al. Adjunctive liraglutide treatment in patients with persistent or recurrent type 2 diabetes after metabolic surgery (GRAVITAS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(7):549-59.
247. Wharton S, Kuk JL, Luszczynski M, Kamran E, Christensen RAG. Liraglutide 3.0 mg for the management of insufficient weight loss or excessive weight regain post-bariatric surgery. *Clin Obes.* 2019;9(4):e12323.