



## **IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE**

**Laia Bertran Ramos**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

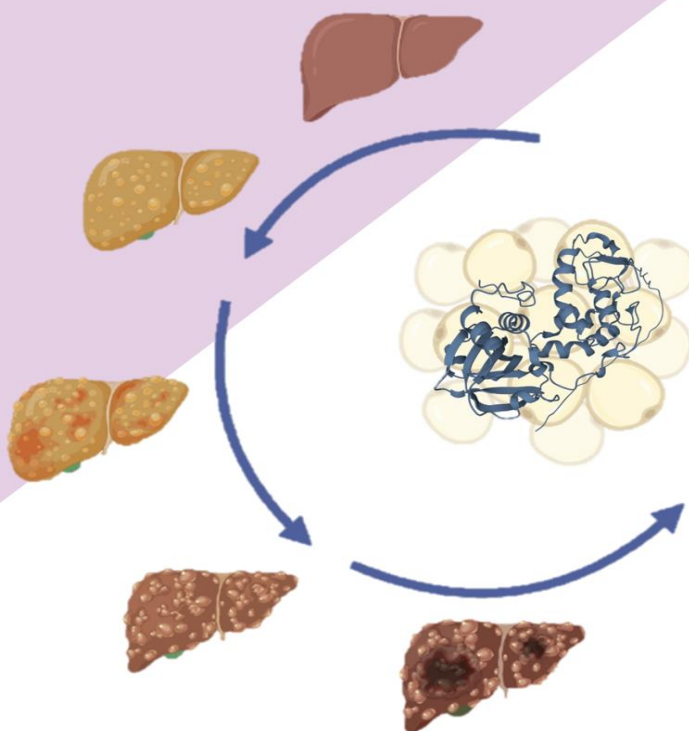


UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI

# Implicació de la via de senyalització de la proteïna SFRP5 en la malaltia del fetge gras no alcohòlic i en la comunicació teixit adipós-fetge

---

LAIA BERTRAN RAMOS



TESI DOCTORAL  
2023

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

Laia Bertran Ramos

**Implicació de la via de senyalització de la proteïna SFRP5 en la malaltia  
del fetge gras no alcohòlic i en la comunicació teixit adipós-fetge**

Tesi Doctoral

Dirigida per:

Prof. Maria Teresa Auguet Quintillà

Prof. Cristóbal Manuel Richart Jurado

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2022



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

FEM CONSTAR que aquest treball titulat “**Implicació de la via de senyalització de la proteïna SFRP5 en la malaltia del fetge gras no alcohòlic i en la comunicació teixit adipós-fetge**”, que presenta Laia Bertran Ramos per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d’aquesta universitat.

Tarragona, 12 de Desembre de 2022

La directora de la tesi doctoral

**Maria  
Teresa  
Auguet  
Quintillà  
(3932880  
5-R)**

Signat digitalment per  
Maria Teresa Auguet  
Quintillà (39328805-R)  
DN: cn=Maria Teresa  
Auguet Quintillà  
(39328805-R),  
o=Universitat Rovira i  
Virgili, ou=Facultat de  
Medicina i Cirurgia,  
email=tauguet.hj23.ics  
@gencat.cat, c=ES®  
Data: 2022.11.15  
08:24:17 +01'00'

Prof. Maria Teresa Auguet Quintillà

El codirector de la tesi doctoral

**Cristóbal  
Manuel  
Richart  
Jurado  
(21352822-  
J)**

Signat digitalment per  
Cristóbal Manuel Richart  
Jurado (21352822-J)  
DN: cn=Cristóbal  
Manuel Richart Jurado  
(21352822-J),  
o=Universitat Rovira i  
Virgili, ou=Facultat de  
Medicina i Cirurgia,  
email=cristobalmanuel.r  
ichart@urv.cat, c=<c  
Data: 2022.11.15  
08:25:06 +01'00'

Prof. Cristóbal Manuel Richart Jurado

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

*Als meus. Fins al cel i més amunt.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

*"En la investigación es incluso más importante  
el proceso que el logro mismo"*

*Emilio Muñoz*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



Voldria començar aquesta tesi doctoral mencionant i agraint a totes aquelles persones que d'una forma o d'altra m'han ajudat i m'han fet costat durant aquests anys d'aprenentatge predoctoral.

Primer de tot, vull començar agraint als meus directors de tesi, la Dra. Teresa Auguet i el Dr. Cristóbal Richart per haver-me guiat i assessorat en aquest procés i haver-me deixat formar part del Grup de Recerca en Malalties Metabòliques Associades a la Insulin-Resistència (GEMMAIR). Tere, no hi ha pàgines suficients per agrair tot el que has fet per mi, el suport, l'assessorament, els consells, tot el que m'has transmès i tot el que m'has ensenyat, no només com a professional, sinó també com a persona. Gràcies per deixar-me formar part d'aquesta família que és el nostre grup.

*Dr. Richart, muchas gracias por sus consejos y por mostrarme el mundo de la ciencia desde los ojos de la experiencia.*

Per descomptat, he d'agrair tot a la Carmen, i realment és tot, per que no se on estaria si no fos per ella i per que he pogut aprendre moltíssim de la seva mà. *Gracias por todo Carmen, eres irremplazable.*

Gràcies també a tots els meus companys, tots m'heu aportat coses valuoses. *Antón, siempre me has ayudado con mis interminables dudas y te estaré eternamente agradecida. Silvia, Jen, gracias por esos días. Jessica, gracias por ser compañera de camino.* Sergiy i Helena, pràcticament junts des dels inicis de la nostra vida prebioquímica, sou indispensables i espero tenir-vos sempre al meu costat. Andrea, estoy encantada de que ahora formes parte de esta pequeña familia, gracias. També agrair a la Vero i la Pili, sempre disposades a ajudar-me i animar-me quan ho he necessitat. *Gracias a ti también Javi, porque si no fuera por ti, no estaría donde estoy ahora. Te deseo lo mejor.* Finalment, vull destacar enormement el suport de la Marta, per tot el que m'ha ajudat en aquesta tesi, tot el que hem creat juntes, per que ja saps, aquest "fill" és de les dues. Gràcies per confiar en mi, et desitjo lo millor en el teu camí.

També agrair a tota la resta de persones del meu àmbit laboral que m'han recolzat d'una forma o d'altra i m'han ensenyat coses noves que més tard he adquirit en el meu "repositori". Voldria agrair també a tots aquells professors que vaig tenir a la universitat, els quals em van ensenyar a estimar aquest món i a fer créixer la meva curiositat científica. També crec que he d'agrair a aquelles persones que no han cregut en mi, per que potser les vostres opinions m'han fet més forta i espero que algun dia penseu "ostres, m'equivocava", o no, en realitat m'és igual, jo sempre seguiré endavant.





## AGRAÏMENTS

---

Sense dubte, tot això no hauria estat possible sense el suport de les persones més importants de la meua vida, la meua família. *Sergi, gracias por todo, por seguir creyendo en mi después de todos estos años juntos, por formar una pequeña familia conmigo y nuestra Lexy y por el viaje que comenzamos juntos y que seguiremos haciendo, siempre. Gracias por animarme cuando más lo he necesitado y por entenderme.*

Gràcies també als meus pares, per estar sempre al meu costat, no seria el que soc ni de llarg sense vosaltres. Mama, sempre has sigut la meua inspiració en aquest món i sempre ho seràs. Gràcies Ester, ets un trosset de mi rebel i caòtic que estimo molt. Gràcies Padri, Gaspar i Diego per ser família. Gràcies iaia, per que tu em fas forta, em fas valenta i sempre estàs al meu costat, ja saps, fins al cel i més amunt.

En definitiva, gràcies a tots, m'heu fet el que soc.



## CONTINGUTS DE LA TESI DOCTORAL:

<b>1. Abreviatures</b> .....	19
<b>2. Introducció</b> .....	23
2.1. L'OBESITAT .....	25
2.1.1 El teixit adipós .....	28
2.2 LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA.....	29
2.3 LA SÍNDROME METABÒLICA (SM).....	30
2.4 LA MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC (MFGNA).....	31
2.4.1 Definició de la MFGNA .....	31
2.4.2 Epidemiologia.....	32
2.4.3 Història natural de la MFGNA .....	33
2.4.4 Etiologia de la MFGNA.....	33
2.4.5 Altres etiologies del fetge gras.....	38
2.4.6 Característiques histopatològiques de la MFGNA .....	39
2.4.7 Diagnòstic.....	41
2.4.8 Tractament.....	45
2.4.9 Fisiopatologia de la MFGNA .....	48
2.4.10 Citocines en la MFGNA.....	51
2.5 LA PROTEÏNA 5 SECRETADA SIMILAR A <i>FRIZZLED</i> (SFRP5).....	56
2.5.1 El gen <i>Sfrp5</i> i la proteïna SFRP5.....	56
2.5.2 SFRP5 i la via de senyalització WNT .....	57
2.5.3 Implicació patològica de la via SFRP5/WNT .....	60
2.5.4 La proteïna SFRP5 i el seu rol en la MFGNA .....	62
<b>3.Hipòtesi i Objectius</b> .....	63
<b>4.Resultats</b> .....	67
4.1 PRIMER ESTUDI .....	69
4.2 SEGON ESTUDI.....	85
<b>5.Discussió global</b> .....	107
<b>6.Conclusions</b> .....	121
<b>7.Referències</b> .....	125
<b>8.Annexos</b> .....	147
9.1 ALTRES PUBLICACIONS.....	149
9.2 ASSISTÈNCIA A CONGRESSOS.....	150

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

## *Resum*

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



La proteïna 5 secretada similar a *frizzled* (SFRP5) és un antagonista de la via de senyalització no canònica de WNT, que s'ha descrit com una citocina segregada pel teixit adipós. Evidències prèvies han suggerit el seu paper protector i antiinflamatori en front a desequilibris metabòlics com la resistència a la insulina. Tot i això, la proteïna SFRP5 s'ha estudiat majoritàriament en animal, pel que fa que es conegui ben poc del seu paper en humans. Per aquestes raons, podria ser que la proteïna SFRP5 tingui un paper rellevant en la patogènia de la malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA). La MFGNA és una de les malalties hepàtiques més prevalents, però manca d'un mètode diagnòstic no invasiu i d'un tractament específic, per la qual cosa és important el seu estudi a nivell molecular. En aquest sentit, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral, és investigar el rol específic de la proteïna SFRP5 i la via no canònica de WNT en la MFGNA. En el primer estudi es van voler analitzar, mitjançant l'assaig d'immunoabsorció associat a un enzim, els nivells circulants de SFRP5 en mostres de sèrum sanguini de dones amb pes normal (PN) i amb obesitat mòrbida (OM) que presentessin o no MFGNA. També es va voler analitzar l'expressió d'ARNm de SFRP5, membre 5a de la família WNT (WNT5A) i jun quinasas N-terminal (JNK) en biòpsies de fetge de dones amb OM i diferents graus d'afectació hepàtica per la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa en temps real (RTqPCR). En el segon estudi, es volia analitzar l'expressió d'ARNm de SFRP5, WNT5A i el receptor activat per proliferador de peroxisomes gamma (PPAR $\gamma$ ), a través de RTqPCR, en biòpsies de teixit adipós subcutani i visceral (en anglès SAT i VAT respectivament) de dones amb PN i amb OM, amb diferents graus d'afectació hepàtica, per avaluar l'eix teixit adipós-fetge. Les troballes d'aquests estudis van ser que els nivells circulants de SFRP5 augmentaven després de la restricció calòrica en OM independentment de si presentaven o no MFGNA. A més, també es va veure que la expressió de SFRP5 hepàtica augmenta en els primers estadis de la MFGNA, probablement duent a terme un paper protector amb la intenció de frenar l'efecte danyí de la via no canònica de WNT. De totes maneres, en una etapa avançada de la MFGNA, l'acció de la SFRP5 sembla estar desregulada, induint-se en conseqüència la funció de WNT5A i JNK, el que afavoreix la progressió de la malaltia. Pel que fa al teixit adipós, l'expressió de SFRP5 en VAT i en SAT sembla estar induïda per l'obesitat i per la progressió de la MFGNA, amb un possible paper protector contra el desequilibri metabòlic. A més, l'augment de l'expressió de WNT5A en el teixit adipós de pacients amb esteatosi simple sembla estar relacionada amb l'acumulació de greix al fetge, amb la resistència a la insulina i amb la inflamació. En definitiva, la present tesi doctoral conclou que la via SFRP5/WNT5A en fetge i teixit adipós sembla tenir un paper clau en la patogènia de la MFGNA, tot i que futurs estudis són necessaris per a aclarir aquestes troballes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

# ***1. Abreviatures***

---



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



1H-MRS	<i>Proton magnetic resonance spectroscopy</i> / Ressonància magnètica de protons per espectroscòpia
AGL	Àcids grassos lliures
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> / Fosfatasa alcalina
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i> / Alanino-aminotransferasa
APRI	<i>AST/platelet ratio index</i> / Índex de la ratio AST/plaquetes
ARFI	<i>Acoustic radiation force impulse elastography</i> / Elastografia d'impuls de força de radiació acústica
ARID5B	<i>AT-Rich Interaction Domain 5B</i> / Domini interactiu ric en adenines-timines 5B
ARN	Àcid ribonucleic
ASK-1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase-1</i> / Quinasa reguladora del senyal d'apoptosi-1
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i> / Aspartat-aminotransferasa
BAT	<i>Brown adipose tissue</i> / Teixit adipós marró
CaMKII	<i>Calcium/calmodulin dependent kinase II</i> / Quinasa II depenent de calci/calmodulina
CaN	Calcineurina
CK	Citoqueratina
DAAM1	<i>Dsh associated activator of morphogenesis 1</i> / Activador de la morfogènesi 1 associat a Dsh
DMT2	Diabetis mellitus de tipus 2
Dsh	<i>Disheveled</i> / Desordenada
EHNA	Esteatohepatitis no alcohòlica
ELF	<i>Enhanced liver fibrosis</i> / Fibrosi hepàtica augmentada
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i> / Assaig d'immunoabsorció associat a un enzim
ES	Esteatosi simple
FDA	<i>Food and Drugs Agency</i> / Agència Americana d'Aliments i Fàrmacs
FGAE	Fetge gras agut per l'embaràs
FGF21	<i>Fibroblast growth factor 21</i> / Factor de creixement 21 dels fibroblasts
FI	<i>Fibrosis index</i> / Índex de fibrosi
FLI	<i>Fatty liver index</i> / Índex de fetge gras
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated gene</i> / Gen associat a la massa grassa i a l'obesitat
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i> / Receptor farnesoide X
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> / Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GGT	<i>Gamma-glutamyltransferase</i> / Gamma-glutamil transferasa
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i> / Pèptid semblant al glucagó-1
GSK3	Glycogen synthase kinase 3 / Glicogen sintasa quinasa 3
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL-c	<i>High density lipoprotein-cholesterol</i> / Lipoproteïna d'alta densitat - colesterol
HFE	Proteïna de l'hemocromatosi hereditària
HHN	Histologia hepàtica normal
HMOX	Hemoxigenases
HOMA2-IR	<i>Homeostasis model 2 assessment of insulin resistance</i> / Model d'homeòstasi per a la resistència a la insulina
HSI	<i>Hepatic steatosis index</i> / Índex d'esteatosi hepàtica
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i> / Molècula d'adhesió intercel·lular-1
IFNλ4	Interferó lambda 4
IL	Interleuquina
IMC	Índex de massa corporal
JNK	<i>Jun N-Terminal Kinase</i> / Jun quinasa N-terminal
kPa	Quilopascals
LAP	<i>Lipid accumulation product</i> / Producte d'acumulació de lípids
LCHAD	<i>Long chain 3-hydroxyl acil-CoA deshydrogenase</i> / 3-hidroxil acil-CoA deshidrogenasa de cadena llarga
LDL-c	<i>Low density lipoprotein-cholesterol</i> / Lipoproteïna de baixa densitat - colesterol
LIPA	<i>Lysosomal acid lipase A</i> / Lipasa àcid lisosomal A
LPS	Lipopolisacàrids



## 1. ABREVIATURES

LRP6	<i>Lipoprotein receptor related protein 6</i> / Proteïna relacionada amb el receptor de lipoproteïnes 6
MAFLD	<i>Metabolic associated fatty liver disease</i> / Malaltia metabòlica del fetge gras
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> / Proteïna quimiotàctica de monòcits-1
MDA	Malondialdehid
MFGA	Malaltia del fetge gras alcohol·lic
MFGNA	Malaltia del fetge gras no alcohol·lic
mmHg	Mil·límetres de mercuri
MRE	<i>Magnetic resonance elastography</i> / Ressonància magnètica per elastografia
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i> (MFGNA en anglès)
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i> (EHNA en anglès)
NDI	<i>NASH diagnostic index</i> / Índex diagnòstic d'EHNA
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i> / Factor nuclear-kappa B
NFS	<i>NAFLD fibrosis score</i> / Puntuació de fibrosi de la MFGNA
NLFS	<i>NAFLD liver fat score</i> / Puntuació de greix hepàtic de la MFGNA
NPI	<i>NASH predictive index</i> / Índex predictiu d'EHNA
OM	Obesitat mòrbida
OMS	Organització Mundial de la Salut
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> / Inhibidor de l'activador del plasminogen-1
PAMPS	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> / Patró molecular associat a patògens
PCSK9	Proteïna convertasa subtilina/kexina tipus 9
PLC	<i>Phospholipase C</i> / Fosfolipasa C
PN	Pes normal
PNLPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i> / Proteïna que conté domini de la fosfolipasa tipus patatina 3
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> / Receptor activat per proliferador de peroxisomes
PTX3	Pentraxina 3 plasmàtica
RE	Reticle endoplasmàtic
ROCK	<i>Rho associated kinase</i> / Proteïna quinasa associada a Rho
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative polymerase chain reaction</i> / Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa en temps real
SAT	<i>Subcutaneous adipose tissue</i> / Teixit adipós subcutani
SCD-1	<i>Stearoyl-CoA desaturase</i> / Estearoil-CoA desaturasa-1
SCFA	<i>Short-chain fatty acids</i> / Àcids grassos de cadena curta
SFRP5	<i>Secreted frizzled-related protein 5</i> / Proteïna 5 secretada similar a <i>frizzled</i>
SGLT-2	<i>Sodium-glucose cotransporter-2</i> / Cotransportador de glucosa-sodi-2
SM	Síndrome metabòlica
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i> / Proteïna d'unió a elements reguladors d'esterols 1
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> / Transductor de senyal i activador de la transcripció
SWE	<i>Shear-wave elastography</i> / Elastografia d'ona de cisalla
TAD	Tensió arterial diastòlica
TAS	Tensió arterial sistòlica
TGF	<i>Transforming growth factor</i> / Factor de creixement transformant
TGL	Triglicèrids
TLR	<i>Toll-like receptors</i> / Receptors toll-like
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 superfamily 2</i> / Proteïna de transmembrana 6 de la superfamília 2
TMAO	Trimetilamina N-òxid
TNF- $\alpha$	<i>Tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i> / Factor de necrosi tumoral $\alpha$
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i> / Teixit adipós visceral
VIH	Virus de la immunodeficiència humana
VLDL-c	<i>Very low density lipoprotein-cholesterol</i> / Lipoproteïna de molt baixa densitat - colesterol
WAT	<i>White adipose tissue</i> / Teixit adipós blanc
WNT5A	<i>Wingless-Integration site family member 5a</i> / Membre 5a de la família de lloc d'interacció-Wingless

## ***2. Introducció***

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



## 2.1. L'OBESITAT

L'obesitat és una malaltia multifactorial molt complexa en què existeix un excés d'acumulació de greix corporal, el qual té efectes negatius en la salut [1]. La incidència de l'obesitat ha augmentat en els últims 50 anys de forma considerable arreu del món, excepte en algunes regions de l'Àfrica subsahariana i d'Àsia [2]. Encara que de forma global, la prevalença de l'obesitat es troba en augment, aquesta varia segons les regions, els països i les ètnies, ja que depèn molt de l'estatus socioeconòmic de la població [3]. L'elevada incidència de l'obesitat és de greu importància en els països més desenvolupats, mentre que aquesta es troba focalitzada en les zones més urbanitzades dels països menys desenvolupats [4,5]. Aquesta incidència s'ha incrementat de forma dràstica tant en homes com en dones de totes les edats, tot i que és més incident en dones en edat adulta [6,7].

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) considera que una persona té obesitat quan aquesta presenta un índex de massa corporal (IMC) major o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> [8]. La Taula 1 mostra la classificació de l'estat nutricional de cada individu segons el seu IMC per l'OMS.

**Taula 1:** Estat nutricional segons l'índex de massa corporal segons l'Organització Mundial de la Salut.

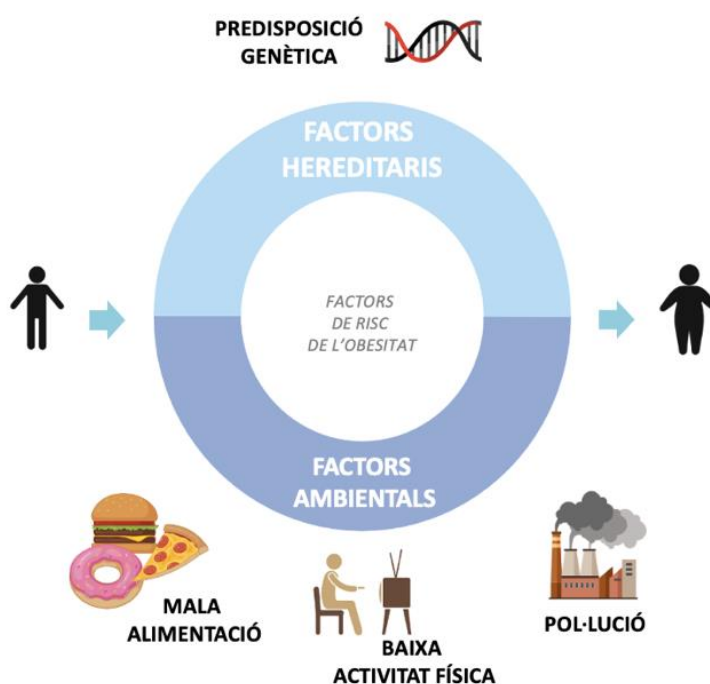
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Estat nutricional
< 18.5	Baix pes
18.5–24.9	Pes normal
25.0–29.9	Preobesitat o sobrepès
30.0–34.9	Obesitat de classe I
35.0–39.9	Obesitat de classe II
> 40	Obesitat de classe III

IMC, índex de massa corporal. Font: "A healthy lifestyle - WHO recommendations (May 6 2010)" [8].

Es pot considerar que l'obesitat té un component genètic i un component ambiental, aquest últim està molt influenciat per l'estil de vida de l'individu [9]. Per tant, si una persona amb una determinada predisposició genètica té un estil de vida caracteritzat per una excessiva ingesta d'aliments i una baixa activitat física, entre d'altres factors, fàcilment es dona pas a l'aparició del sobrepès i, després, si la situació es manté, a l'obesitat [1], tal com s'expressa en la Figura 1.

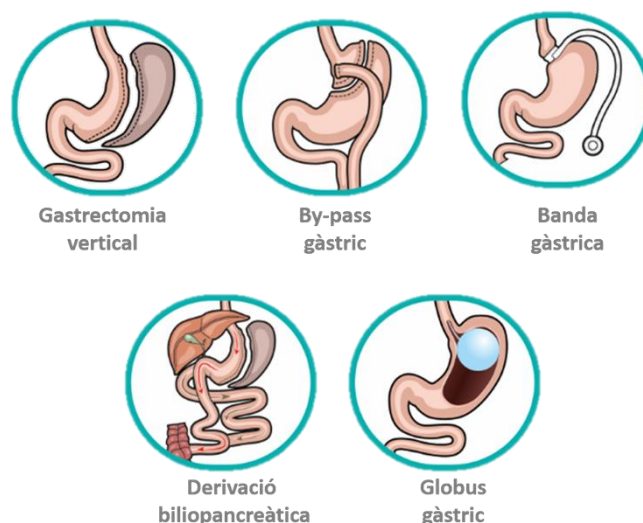


## 2. INTRODUCCIÓ



*Figura 1: Factors que predisposen a un individu a patir obesitat.*

Biològicament, el mecanisme principal per a combatre l'obesitat és mantenir l'homeòstasi energètica [10]. En aquest sentit, modificar l'estil de vida, és a dir, mantenir una dieta equilibrada i una activitat física regular, són les estratègies principals que se li plantegen a les persones amb obesitat per a baixar de pes i equilibrar el seu metabolisme [11]. Tot i això, a vegades aquestes estratègies fallen i, en persones amb un IMC major de 40 o un IMC major de 35 però amb comorbiditats, la salut de l'individu es troba en perill per l'alt risc de patir un esdeveniment cardiovascular, i és quan es recomanen estratègies més dràstiques com la cirurgia bariàtrica (Figura 2). La cirurgia bariàtrica pot ser restrictiva, on es modifica la capacitat de l'estómac, com per exemple la gastrectomia vertical; o malabsortiva, on a més de reduir la cavitat estomacal, també es redueix l'absorció intestinal, com passa amb un by-pass gàstric o amb la derivació biliopancreàtica [12]. També existeixen altres alternatives com la incorporació d'una banda gàstrica o d'un globus gàstric [13,14]. La cirurgia bariàtrica ha demostrat una considerable pèrdua de pes a l'any, però també s'han vist recidives passats uns anys [15].



**Figura 2:** Tipus de cirurgies bariàtriques. Font: “Cirugía bariátrica y metabólica” [16].

A part d'aquests mètodes terapèutics, també existeixen certs fàrmacs amb funcions anorexigèniques aprovats per la *Food and Drugs Agency* (FDA) que indueixen a la pèrdua de pes [17–19], els quals s'han resumit en la Taula 2.

**Taula 2:** Fàrmacs aprovats per la *Food and Drugs Agency* (EEUU) per a combatre l'obesitat.

Nom (Nom comercial)	Any d'aprovació	Mecanisme d'acció /Efecte clínic
Fentermina* (Adipex, Lomaira)	1959	Simpaticomimètic / Suprimeix la gana
Dietilpropió*	1979	Simpaticomimètic / Suprimeix la gana
Orlistat# (Alli, Xenical)	1999	Inhibidor de la lipasa intestinal / Redueix l'absorció de greixos fins a un 30%
Fentermina- Topiramát# (Qsymia)	2012	Combinació de simpaticomimètics i inhibidors de l'anhidrasa carbònica / Disminueix la gana i l'ansietat per menjar
Bupropió- Naltrexona# (Contrave)	2014	Combinació d'un inhibidor de la recaptació de dopamina i norepinefrina i un antagonista dels receptors muopioides / Disminueix la gana
Liraglutida# 3.0mg (Saxenda)	2014	Agonista del receptor GLP-1 / Disminueix la gana i augmenta la sacietat





## 2. INTRODUCCIÓ

Gelesis100 (Plenity)	2019	Partícules d'hidrogel superabsorbents d'una matriu de cel·lulosa-àcid cítric / Augmenta la sacietat
Setmelanotida <sup>#</sup> (Imciveree)	2020	Agonista del receptor de la melanocortina 4 / Disminueix la gana
Semaglutida <sup>#</sup> 2.4 mg (Wegovy)	2021	Agonista del receptor GLP-1 / Disminueix la gana i augmenta la sacietat

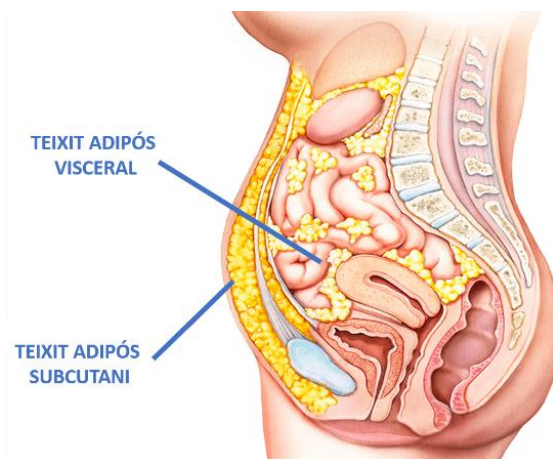
GLP-1, pèptid semblant al glucagó-1. \*Fàrmac acceptat per un ús a curt termini (màxim 3 mesos). #Fàrmacs aprovats també per la Agència Europea dels Medicaments (<https://www.ema.europa.eu/en>). Taula adaptada de: Tchang et al. 2021 [18].

En resum, tots aquests mecanismes terapèutics el que intenten, en conseqüència, és induir la disminució dels dipòsits de greix del teixit adipós, el principal responsable de l'obesitat.

### 2.1.1 El teixit adipós

El teixit adipós és un teixit connectiu tendre compost principalment per adipòcits [20], el qual juga un paper clau en la malaltia de l'obesitat. Hi ha dos tipus de teixit adipós al cos humà, el teixit adipós blanc (en anglès WAT), que és l'encarregat d'emmagatzemar l'excés d'energia del cos, a més de funcionar com a òrgan endocrí, per a la regulació de l'homeòstasi metabòlica a través de l'alliberament d'hormones i adipoquines [21]; i el teixit adipós marró (en anglès BAT) amb una funció antagonista a l'anterior, ja que promou el procés de termogènesi, que és la dissipació de l'energia a través de calor [22]. El BAT és un teixit molt important en neonats ja que els ajuda a mantenir la temperatura corporal i adaptar-se al medi extrauterí [23]. Recentment, s'ha observat que certes regions del WAT tenen la capacitat de transformar-se en BAT davant de certs estímuls, procés que s'anomena *browning*. L'estudi dels mecanismes moleculars implicats en el *browning* es troba a l'alça a causa dels potencials beneficis que podria tenir la inducció d'aquest procés com a mètode per a combatre l'obesitat [22].

L'obesitat no està condicionada només per l'acumulació en l'excés de greix a nivell global en l'individu, sinó també per la distribució d'aquest en el WAT. En aquest cas, trobem dos tipus de WAT, tal com es mostra en la Figura 3, el teixit adipós subcutani (en anglès SAT) que és el que es troba sota la pell; i el teixit adipós visceral (en anglès VAT) que és aquell que es troba recobrint els òrgans interns [20].



**Figura 3:** Distribució del teixit adipós blanc en el cos humà.

Tot i que el SAT i el VAT tenen els mateixos gens, l'expressió d'aquests és diferent, i es per això que varien quant a les seves funcions [20,24]. Per un costat, s'ha trobat una major expressió de gens proinflamatoris en el SAT que en el VAT, en individus amb obesitat mòrbida (OM,  $IMC \geq 40\text{kg/m}^2$ ); i es creu que és donat per la contribució del SAT en el patró proinflamatori dels individus amb una obesitat severa [20,25]. Pel contrari, s'ha vist que una major acumulació de greix en el SAT s'associa a una millor sensibilitat a la insulina, mentre que el contrari passa quan s'acumula més greix en el VAT, que es desenvolupa la resistència a la insulina [26].

Per altra banda, el VAT té un major drenatge de greixos i adipoquines cap al fetge a través de la circulació portal [20,27]; a més de que l'acumulació excessiva de greix en el VAT, el que es coneix com a obesitat visceral o abdominal, s'associa a un major risc cardiovascular, a l'aparició de trastorns metabòlics com la diabetis mellitus de tipus 2 (DMT2) i la dislipèmia, i la predisposició a patir malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) i certs tipus de càncers [28,29]. Aquestes patologies es desencadenen a partir de la desregulació del metabolisme dels lípids i/o dels glúcids, i de la resistència a la insulina [27].

## 2.2 LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA

Quan els receptors d'insulina, presents en la membrana de les cèl·lules encarregades de respondre a aquesta hormona, no funcionen correctament, es quan parlem d'una resistència a la insulina, i per tant, la incapacitat de promoure l'emmagatzematge de la glucosa en el fetge i en el teixit adipós [30–32]. Quan no hi ha una resposta correcta a l'estímul de la insulina en situació postprandial, es dona una hiperinsulinèmia que ve acompanyada d'una disrupció del metabolisme de la glucosa, per la interrupció del seu flux habitual [33].



## 2. INTRODUCCIÓ

Les dietes altes en carbohidrats o greixos saturats, que són les que també indueixen obesitat i per tant una acumulació ectòpica de greix, són les que predisposen a desenvolupar resistència a la insulina i, per conseqüència, trastorns com la DMT2, malalties cardiovasculars i l'Alzheimer, entre d'altres [30]. En aquest sentit, la resistència a la insulina és un dels components claus de la síndrome metabòlica (SM).

### 2.3 LA SÍNDROME METABÒLICA (SM)

La SM és un trastorn compost per una sèrie de trastorns metabòlics que comporten una pèrdua de l'homeòstasi del metabolisme global. L'OMS va definir el concepte de SM al 1998 [34], però després de proposar diferents criteris per al diagnòstic d'aquesta síndrome, finalment al 2009, la Federació Internacional de la Diabetis va acordar una definició de consens harmonitzat juntament amb altres consorcis, on es van definir els criteris involucrats en la SM [35], tal com es mostra en la Taula 3. En aquest consens, es va postular que per considerar-se SM s'havien de complir 3 dels 5 criteris.

**Taula 3:** Components de la Síndrome metabòlica.

Paràmetres	Criteris
Tensió arterial elevada	TAS $\geq$ 130 mmHg i/o TAD $\geq$ 85 mmHg (o tractament)
Nivells de TGL elevats	$\geq$ 150 mg/dl (o tractament)
Nivells de HDL-c reduïts	< 40 mg/dl (homes) < 50 mg/dl (dones) (o tractament)
Nivells de glucosa elevats	$\geq$ 100 mg/dl (en dejú) (o tractament per hiperglucèmia o DMT2)
Circumferència de cintura elevada	$\geq$ 94 cm (homes) $\geq$ 80 cm (dones) o rati cintura/malucs > 0.9*

\* Aquests paràmetres varien en funció de l'ètnia d'interès. TAS, tensió arterial sistòlica; TAD, tensió arterial diastòlica; mmHg, mil·límetres de mercuri (unitat de mesura); TGL, triglicèrids; HDL-c, colesterol - lipoproteïna d'alta densitat (sigles en anglès); DMT2, diabetis mellitus de tipus 2. Taula adaptada de: Alberti et al. 2009 [35].



Tot i que la fisiopatologia de la SM no es coneix del tot, es sap que l'obesitat i la resistència a la insulina són la seva principal etiologia. La SM es considera una malaltia proinflamatòria i protrombòtica, sent el teixit adipós l'òrgan principalment implicat en la seva fisiopatologia [33,36]. En condicions d'obesitat i de desequilibri metabòlic, es dona una hiperplàsia (augment del nombre) i una hipertròfia (augment de la mida) dels adipòcits i, per tant, el teixit entra en un estadi d'hipòxia que desencadena l'alliberament d'adipoquines proinflamatòries i d'espècies reactives d'oxigen que acaben danyant el propi teixit i donen pas a la formació de teixit fibrós [37,38].

El desequilibri metabòlic que comporta la SM, a més de donar lloc principalment a la DMT2 i a esdeveniments cardiovasculars, també promou l'aparició i el desenvolupament de malalties hepàtiques com la MFGNA [39]. A l'any 2001, Marchesini et al. van postular per primera vegada que la MFGNA podria ser considerada una manifestació hepàtica de la SM [40], i es que les consideracions fisiopatològiques, les associacions clíniques i les investigacions prèvies donen suport a que la resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia tenen un paper central en la patogènesi tant de la SM com de la MFGNA [41,42]. Tot i les similituds presentades, de moment, no hi ha estudis independents i suficientment robustos que recolzin aquest fet i per tant, només es pot hipotetitzar que la MFGNA forma part de l'espectre de la SM.

## 2.4 LA MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC (MFGNA)

### 2.4.1 Definició de la MFGNA

La MFGNA s'evidencia en presència d'acumulació de greix al fetge, ja sigui per imatge o per histologia, en absència d'altres causes d'esteatosi hepàtica, com el consum recurrent d'alcohol, l'ús de medicaments esteatogènics, infeccions víriques o alguns trastorns hereditaris [43]. La MFGNA és un trastorn hepàtic fortament associat a una disfuncionalitat metabòlica com és l'obesitat, la DMT2 o la dislipèmia [44,45].

En les últimes dècades, la MFGNA s'ha convertit en una de les malalties cròniques hepàtiques amb més prevalença [46]. Tot i que l'esteatosi hepàtica deguda a factors no alcohòlics es va considerar en un principi una malaltia benigna no progressiva, s'ha observat que els pacients obesos i aquells amb DMT2 poden desenvolupar esteatohepatitis, la qual imita patològicament una lesió hepàtica de causa alcohòlica [44].

La malaltia metabòlica del fetge gras (en anglès MAFLD) és un nou terme proposat per consens internacional al 2020. A diferència de la MFGNA, la MAFLD no exclou en el seu diagnòstic els

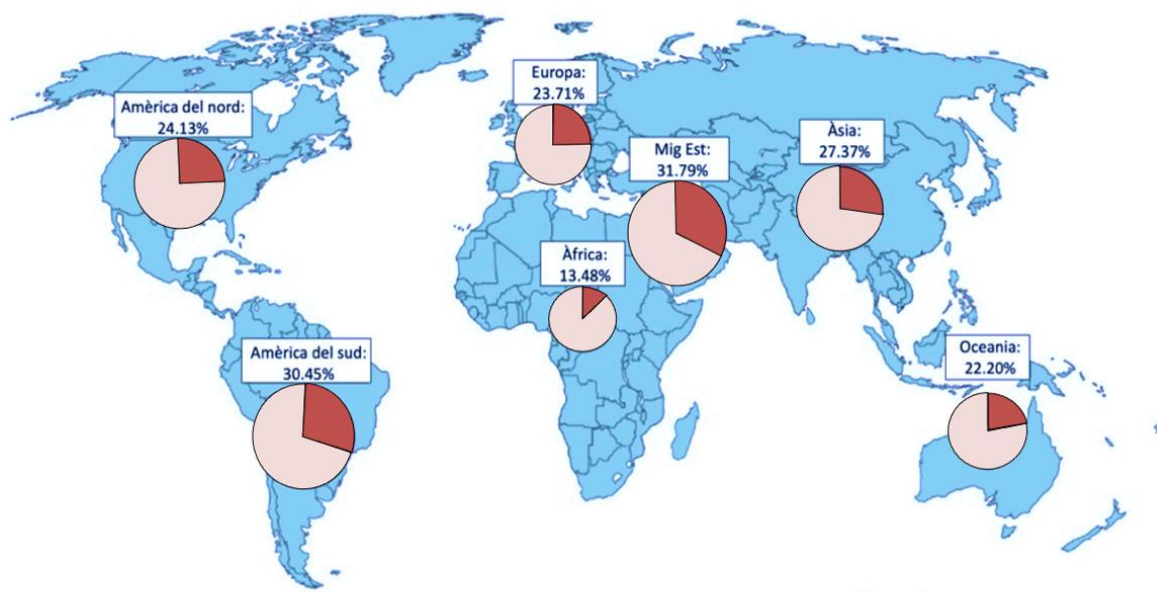


## 2. INTRODUCCIÓ

pacients amb ingesta d'alcohol o amb altres malalties cròniques, o la presència d'anormalitats metabòliques necessàries per al diagnòstic de la MAFLD [47,48].

### 2.4.2 Epidemiologia

La MFGNA és un problema important de salut, ja que en els darrers anys la seva incidència ha augmentat de forma dràstica. Actualment, la MFGNA té una elevada prevalença a nivell global, la qual oscil·la entre un 23 i un 25% en adults [49,50]; mentre que en nens es troba entre el 5 i el 10% [51]. La MFGNA acostuma a aparèixer més freqüentment en homes, però la esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA) amb estadis avançats de fibrosi és més freqüent en dones [52]. La prevalença de la MFGNA augmenta fins a un 58% en individus amb sobrepès [53], fins a 76% en persones amb DMT2 [54] i fins a un 90% en persones amb obesitat severa intervinguts de cirurgia bariàtrica [55]. A més a més, aquesta prevalença incrementa amb l'edat, tot i que, en persones majors de 70 anys, aquesta decau en picat [46]. La prevalença de la MFGNA, tal com mostra la Figura 4, és més elevada en països de l'Amèrica del Nord i del Sud [56], però també a la zona de l'Àsia del Pacífic, a Austràlia i Nova Zelanda, al mig Est i a Europa; mentre que la prevalença és més baixa a l'Àfrica [46,57,58]. La MFGNA és molt freqüent als països desenvolupats, però també en aquells en vies desenvolupament i es creu que és degut a la disponibilitat generalitzada d'aliments obesogènics, barats i altament calòrics [59].



**Figura 4:** Prevalença global de la MFGNA. Adaptat de Younossi et al. 2016 [60] i d'Adams et al. 2020 [61].



### 2.4.3 Història natural de la MFGNA

Una vegada que un individu passa de tenir un fetge histològicament normal a patir esteatosi hepàtica, ja podem parlar de MFGNA. Aquesta comprèn un ampli espectre de trastorns hepàtics, que van des de l'esteatosi simple (ES), donada per una acumulació de greix sense evidència de disfunció hepàtica [43]; fins a l'EHNA que es caracteritza per tenir un component inflamatori i presentar balonització hepatocel·lular, a més d'exhibir o no fibrosi hepàtica [62,63]. Mentre que l'ES es considera un trastorn benigne que no afecta en gran mesura a la funció hepàtica normal [64], entre un 15 i un 20% dels individus acaben desenvolupant EHNA. Aquesta comporta majors complicacions, ja que a més d'implicar inflamació hepàtica i sovint fibrosi, si no es tracta a temps, un 10-20% dels individus deriven cap a processos molt més perjudicials com són la cirrosi i el carcinoma hepatocel·lular, els quals tenen un alt risc de mort per disfunció hepàtica [65,66]. A més, en tots els estadis de la MFGNA, s'ha observat un augment del risc de patir malalties cardiovasculars, que son la principal causa de mort en aquests pacients [67].

La progressió de la MFGNA, representada en la Figura 5, varia segons els individus, depenent de la resposta immunològica pròpia al greix acumulat i a l'estrès oxidatiu [63,68].



**Figura 5:** Història natural de la Malaltia del fetge gras no alcohòlic. Adaptada de: Chen et al. 2020 [66].

### 2.4.4 Etiologia de la MFGNA

Està clar que l'etiologia de la MFGNA és multifactorial, com també la de l'obesitat i la de la SM. Aquesta inclou factors ambientals i genètics, entre d'altres causes:

#### a. Factors ambientals:

- **Estil de vida:** Tenir mals hàbits alimentaris, com seguir una dieta hipercalòrica, associats a un estil de vida sedentari, són els principals factors de risc per a desenvolupar la MFGNA [69]. En aquest sentit, l'obesitat i altres trastorns metabòlics associats a la SM com són la resistència a la insulina, la hipertensió, la dislipèmia i la hiperglucèmia, són factors de risc de la MFGNA [70].



## 2. INTRODUCCIÓ

- **Pol·lució:** Altres factors que poden donar lloc a l'aparició i a la progressió de la MFGNA són els contaminants atmosfèrics (materials vaporitzats, químics, gasolines, contaminants de les aigües i metalls) [71]. L'exposició a aquests químics i xenobiòtics pot promoure el desenvolupament d'un fetge gras associat a tòxics o d'esteatohepatitis associada a tòxics [72,73]. Això és donat per que la inhalació de certes partícules promou l'increment en sang de triglicèrids (TGL), lipoproteïnes de baixa densitat – colesterol (LDL-c) i lipoproteïnes de molt baixa densitat – colesterol (VLDL-c). A més, hi ha metalls que contenen i alliberen partícules que indueixen a l'estrès oxidatiu hepàtic [73]. Per altra banda, també s'ha suggerit que certs microplàstics que inhaledem e ingerim poden promoure l'acumulació de greix al fetge i desencadenar processos inflamatoris [74,75].

### *b. Factors genètics:*

Els polimorfismes, tant com els factors ambientals, tenen una rellevància clau en l'aparició i la severitat de la malaltia. Existeixen alguns gens molt relacionats amb el desenvolupament de la MFGNA:

- **Proteïna que conté domini de la fosfolipasa tipus Patatina 3 o (PNLPLA3 en anglès):** També anomenat adiponutrina, funciona a la vegada com a gen responsable de la hidròlisi dels TGL (funció catabòlica) i com a transciclasa independent de l'acetil-CoA (funció anabòlica) [76]. En concret, una variant important d'aquest gen (rs738409 o I148M) s'ha vist relacionada amb una major susceptibilitat de patir EHNA ja que augmenta l'acumulació hepàtica de lípids bloquejant la hidròlisi enzimàtica dels TGL, el que en conseqüència promou la MFGNA. A més, els individus amb la variant I148M presenten nivells baixos d'adiponectina, una de les més importants adipoquines antiinflamatòries i antifibròtiques. Aquests pacients tendeixen a desenvolupar cirrosi i carcinoma hepatocel·lular amb més freqüència [77,78].
- **Proteïna de transmembrana 6 de la superfamília 2 (TM6SF2 en anglès):** Tot i que la funcionalitat de la proteïna TM6SF2 és desconeguda, la variant rs58542926 del gen *TM6SF2* s'ha vist que està molt associada a la MFGNA i estadis avançats de fibrosi i cirrosi. És important recalcar que nivells baixos d'aquesta proteïna es correlacionen amb expressions alterades del gens involucrats en la síntesi de triglicèrids, però també amb la mida i nombre de gotes lipídiques del fetge [77,79].
- **Gen associat a la massa grassa i a l'obesitat (FTO en anglès):** Aquest gen codifica una proteïna nuclear que funciona com a contenidor de ferro i requereix una oxigenasa que repari els alquils de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) i l'àcid ribonucleic (ARN) mitjançant desmetilacions oxidatives. La variant rs1421085 d'aquest gen altera l'expressió del domini





interactiu ric en adenines-timines 5B (ARID5B en anglès) i l'expressió dels gens *IRX3* i *IRX5* que codifiquen per a les proteïnes homeodomini de classe Iroquois, afectant a la diferenciació dels adipòcits i el punt de referència de l'IMC i, per tant, promovent l'aparició i la progressió de la MFGNA; tot i que es necessitarien més estudis per a entendre els mecanismes que porten a desencadenar aquest fet [77,80].

- **Lipasa àcid lisosomal A (LIPA en anglès):** o també coneguda com a colesterol èster hidrolasa, catalitza la hidròlisi lisosomal d'èsters de colesterol i TGL. Aquesta proteïna és important en la regulació intracel·lular de la síntesi endògena de colesterol, la seva esterificació i la captació de LDL-c. Les mutacions del gen LIPA s'han relacionat amb la fibrosi i la progressió cap a la cirrosi [77,81].
- **Interferó lambda 4 (IFN $\lambda$ 4):** és una citocina que desencadena respostes antivirals mitjançant l'activació de la via de les Janus quinases i els transductors de senyals i activadors de transcripció (JAK-STAT) i la regulació a l'alça d'alguns gens *downstream* de l'interferó. Els pacients amb la variant rs12979860 del gen IFN $\lambda$ 4 han mostrat una major inflamació hepàtica i una major presència de fibrosi [77,82]. Per altra banda, la variant rs368234815 d'aquest mateix gen sembla tenir un paper protector en front al dany hepàtic que suposa la MFGNA i, fins i tot, algunes hepatitis víriques [83].
- **Gens del metabolisme del ferro:** la toxicitat hepàtica del ferro està relacionada amb el paper d'aquest metall en la catalització de reaccions d'oxidació, augmentant l'estrès oxidatiu, el qual podria influir en el desenvolupament de la MFGNA. Es coneix que la sobrecàrrega de ferro provoca fibrosi hepàtica, cirrosi i carcinoma hepatocel·lular. El polimorfisme rs1800562 de la proteïna de l'hemocromatosi hereditària (HFE en anglès) s'ha associat amb la MFGNA, més concretament amb l'EHNA i la fibrosi avançada. Altres variacions genètiques relacionades amb el ferro també s'han relacionat amb la MFGNA, ja que la disrupció del flux del ferro està relacionat amb la inflamació i els desequilibris metabòlics que semblen impactar en els reguladors de ferro, com l'hepcidina, la ferroportina i, en menor grau, en el receptor de transferrina, la ferritina o el coure [77,84].
- **Gens relacionats amb el metabolisme hemo:** les hemoxigenases (HMOX1, HMOX2) són enzims citoprotectors essencials, la funció dels quals és protegir el fetge i altres òrgans de l'estrès oxidatiu provocat per l'efecte antioxidant de l'excés del grup hemo. S'han trobat nivells més elevats d'expressió de HMOX1 en pacients amb una manifestació menor de MFGNA [77,85], tot i que aquesta relació no està del tot provada i necessita estudiar-se amb més profunditat [86].





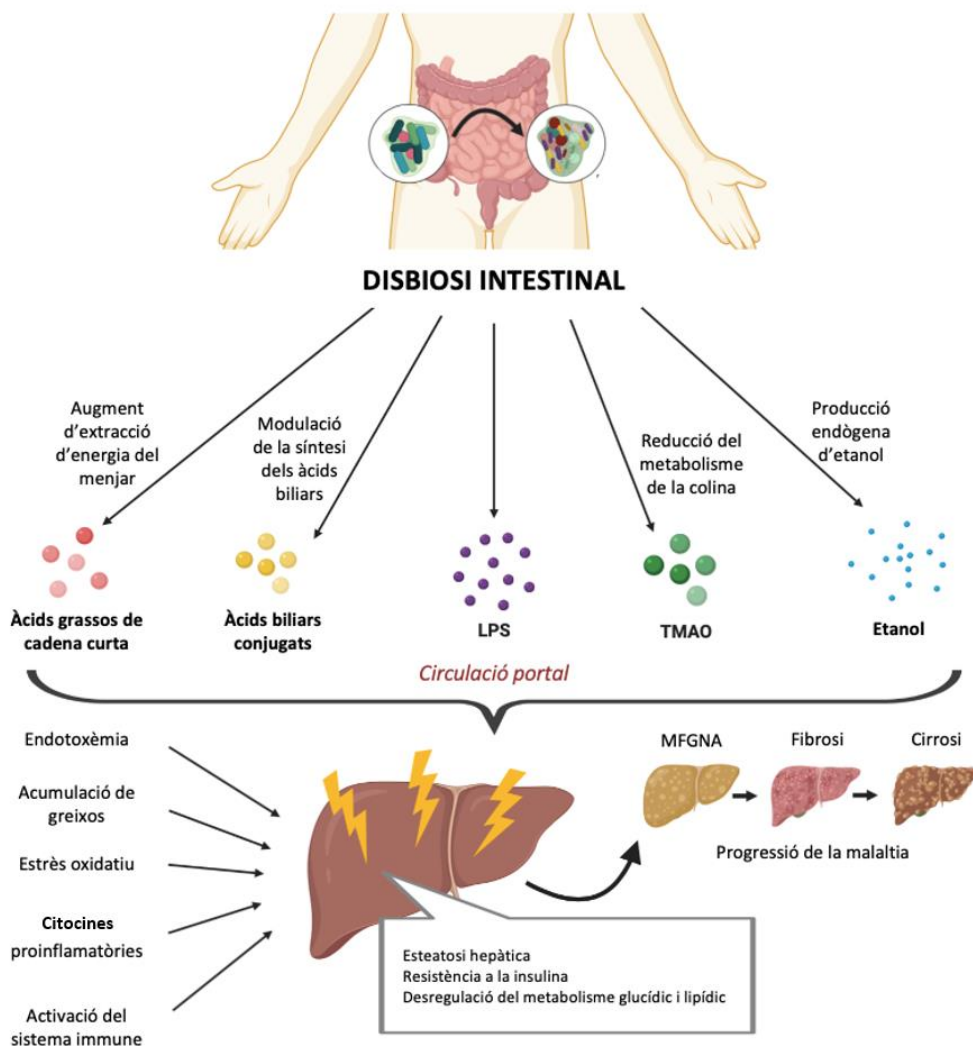
## 2. INTRODUCCIÓ

---

### *c. Alteració de la microbiota intestinal:*

En els últims anys ha augmentat considerablement l'interès en la interacció entre l'intestí, el microbioma i el fetge, ja que s'ha vist que l'alteració de la microbiota intestinal pot formar part dels processos involucrats en la patogènia de la MFGNA [87,88]. El terme "eix intestí-fetge" destaca l'estreta i directa interacció entre aquests dos òrgans, la qual es dona gràcies a la circulació portal [89], que és l'encarregada de transportar nutrients, metabòlits de la microbiota i components del sistema immune de l'intestí al fetge. Algunes d'aquestes molècules, en arribar al fetge, poden desencadenar respostes inflamatòries que promoguin la progressió de la MFGNA [90].

El microbioma intestinal està compost per una varietat de microorganismes involucrats en diverses funcions metabòliques, sintètiques i reguladores que inclouen la fermentació dels substrats no digeribles, la síntesi de proteïnes, el metabolisme dels àcids biliars i la regulació i la proliferació de les cèl·lules del sistema immune [91]. La composició de la microbiota és totalment diferent entre individus i està influenciada per factors genètics i ambientals. Per tant, un canvi perjudicial en la dieta pot provocar alteracions qualitatives i quantitatives en la comunitat de microbis intestinals, el que s'anomena disbiosi intestinal. Aquesta disbiosi pot tenir un impacte en el metabolisme no només bacterià, sinó també del propi individu [92–94], a més de provocar un augment de la permeabilitat de la barrera intestinal [95], el que pot ser molt perjudicial ja que aquesta barrera prevé la translocació de productes derivats de patògens (en anglès PAMPS), els quals una vegada en el torrent sanguini, poden desencadenar una resposta inflamatòria per part del sistema immune [96,97]. En conseqüència, l'arribada d'aquests metabòlits derivats de la microbiota al fetge, promou la inflamació hepàtica a part d'augmentar la desregulació de l'homeòstasi energètica, la insulinoresistència i la producció endògena d'etanol; tot el que, en conseqüència, empitjora la MFGNA [98], tal com es veu representat en la Figura 6.



**Figura 6:** Impacte de la disbiosi intestinal en l'aparició i la progressió de la Malaltia del fetge gras no alcohòlic. LPS, lipopolisacàrids; TMAO, trimetilamina N-òxid. Figura pròpia traduïda: Auguet et al. 2021 [99].

Els àcids grassos de cadena curta (SCFA en anglès) es generen per la fermentació produïda per la microbiota i proporcionen precursors de la lipogènesi i la gluconeogènesi, mecanismes crítics en la MFGNA. A més, el creixement excessiu de petits bacteris intestinals pot provocar insulinoresistència. Pel que fa a la permeabilitat intestinal, s'ha identificat una disfunció de la barrera intestinal en pacients amb MFGNA [100]. Els lipopolisacàrids (LPS), derivats dels bacteris, són capaços d'activar els receptors Toll-like (en anglès TLR), que s'han trobat altament expressats en la MFGNA i, especialment, el TLR2 en l'EHNA [101–103]. Els TLR2, TLR4, TLR5 i TLR9 reconeixen els LPS, els peptidoglicans, la flagel·lina i l'ADN bacterià, respectivament; i



## 2. INTRODUCCIÓ

---

activen les cèl·lules de Kupffer, que induiran la inflamació i, en última instància, la mort cel·lular i la fibrosi [98,101].

### 2.4.5 Altres etiologies del fetge gras

A més de la clàssica MFGNA donada per una desregulació en l'homeòstasi lipídica, normalment associada a la resistència a la insulina, l'acumulació ectòpica i excessiva de greix en els hepatòcits, el que ve a ser el fetge gras o esteatosi hepàtica, pot donar-se per altres causes. La teràpia antiretroviral d'alta activitat per al virus de la immunodeficiència humana (VIH), les liposuccions o altres intervencions quirúrgiques de reducció de la massa grassa, poden provocar lipodistròfies o defectes en el teixit adipós que donin lloc a l'aparició del fetge gras [104].

L'esteatosi hepàtica també pot estar donada per infeccions víriques associades a trastorns immunològics com l'hepatitis C, que inhibeix la secreció de VLDL-c promovent l'esteatosi [105]; i l'hepatitis B, que causa acumulació lipídica en els hepatòcits mediada per la proteïna d'unió a elements reguladors d'esterols 1 (en anglès SREBP1) i el receptor gamma activat pel proliferador de peroxisomes (en anglès PPAR $\gamma$ ) [106]. L'esteatosi també pot ser provocada per infeccions bacterianes [107] o malalties autoimmunes com el lupus o l'artritis reumatoide [108,109].

Un altre tipus de trastorn del fetge gras és l'associat a una causa xenobiòtica. Aquest apareix com a reacció adversa a alguns fàrmacs com les tetraciclines i l'aspirina, que inhibeixen l'oxidació dels àcids grassos. També hi ha toxines naturals com la hipoglicina-A, els estrògens o alguns pesticides que indueixen a l'acumulació de greix al fetge [110]. A més a més, trobem el fetge gras causat per una elevada ingesta d'alcohol, el qual és comunament anomenat com la malaltia del fetge gras alcohòlic (MFGA) [111]. El metabolisme de l'etanol augmenta els nivells de nicotinamida adenina dinucleòtid (NADH) en el fetge, els quals estimulen la síntesi d'àcids grassos i la seva incorporació als TGL. Sembla ser que la inhibició dels enzims PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , responsables de l'oxidació dels àcids grassos, i l'estimulació de SREBP1 que dona lloc a un augment de la síntesi de lípids, contribueixen a la càrrega lipídica global del fetge alcohòlic [112]. Per altra banda, defectes en el catabolisme dels àcids grassos també indueixen el fetge gras. La síndrome de Reye és una malaltia que sol afectar a nens menors de 15 anys i apareix generalment després d'una infecció vírica i l'ús d'aspirina, en la que hi ha una disfunció mitocondrial i una disminució de l'activitat dels enzims hepàtics, a causa d'una afectació en la proteïna d'unió a la tioredoxina-2. Qualsevol deficiència genètica en el catabolisme dels àcids grassos, causa la síndrome de Reye associada a fetge gras [113,114]. També existeix la síndrome del fetge gras agut per l'embaràs (FGAE), que apareix en una fase tardana de l'embaràs amb una incidència d'1 entre 13.000 individus, tot i que és més freqüent quan el fetus és masculí. El FGAE



s'associa a una deficiència de la 3-hidroxil acil-CoA deshidrogenasa de cadena llarga (en anglès LCHAD), el que no permet l'ús dels lípids com a font d'energia i es promou la seva acumulació al fetge [115].

De forma contrària a l'aparició de la MFGNA per una ingesta excessiva, la desnutrició proteica durant la infància és la responsable de la majoria dels casos de fetge gras als països més pobres. Aquest trastorn s'associa a la síndrome de Kwashiorkor, donada per una deficiència de micronutrients i antioxidants en la ingesta [116]. Per altra banda, una dieta rica en hidrats de carboni però deficient en greixos també pot predisposar al fetge gras, ja que els carbohidrats excedents indueixen l'activació del gens adipogènics. Aquest trastorns s'anomena fetge gras transitori i, al contrari que la resta de variants, sol presentar un curs benigne i mostra una regressió freqüent [117].

#### 2.4.6 Característiques histopatològiques de la MFGNA

La MFGNA, en concret els seus estadis histopatològics, comprèn un conjunt de lesions hepàtiques claus en la patogènia de la malaltia, des de l'aparició de l'esteatosi fins a la cirrosi hepàtica, passant per l'estadi d'esteatohepatitis [118]:

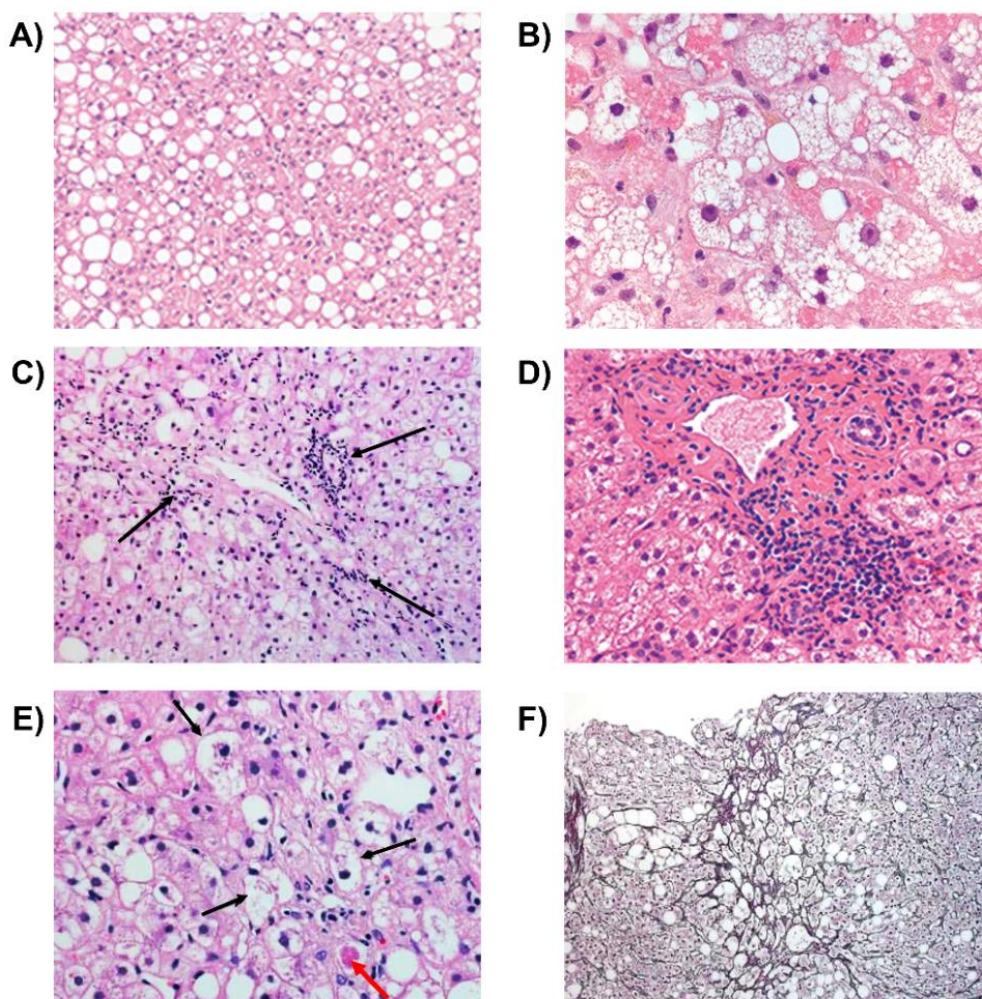
- **L'esteatosi:** L'esteatosi hepatocel·lular és la característica principal i primerenca de la MFGNA i es dona quan hi ha una acumulació de greix al fetge en més del 5% dels hepatòcits [43]. L'esteatosi hepatocel·lular pot ser macrovesicular o microvesicular. En l'esteatosi macrovesicular, la més freqüent en la MFGNA, les gotes lipídiques acostumen a ser grans i ben definides i es troben en el citoplasma cel·lular, empenyent el nucli cap a la perifèria de la cèl·lula (Figura 7A). En l'esteatosi microvesicular, el citoplasma dels hepatòcits s'omple de petites gotes lipídiques mantenint el nucli al mig de la cèl·lula (Figura 7B) [119,120].

- **La inflamació:** Aquesta pot ser lobulillar o portal. La inflamació lobulillar és un dels components presents en la EHNA juntament amb la inflamació portal i la balonització, normalment és una inflamació lleu composta per un infiltrat de cèl·lules inflamatòries (limfòcits, neutròfils, eosinòfils i cèl·lules de Kupffer). En aquest estadi inflamatori en l'EHNA podem trobar microgranulomes lobulillars dispersos (agregats de cèl·lules de Kupffer sinusoïdals) i lipogranulomes (constituïts per gotes lipídiques, cèl·lules inflamatòries i col·lagen) (Figura 7C) [121]. Per altra banda, la inflamació portal la podem trobar de forma lleu o no trobar-la en l'EHNA i consisteix principalment en una infiltració de limfòcits (Figura 7D). Quan la inflamació portal es troba en un estat avançat, s'hauria de considerar la presència d'altres afectacions hepàtiques com una hepatitis vírica o autoimmune [122].



## 2. INTRODUCCIÓ

- **Balonització hepatocel·lular:** És el procés en que els hepatòcits s'inflen i agafen una forma estranya a causa d'un dany per l'acumulació de greix (Figura 7E). Les cèl·lules que han patit balonització acostumen a presentar gotes lipídiques i la membrana cel·lular trencada [123]. A més, la balonització promou la pèrdua de les dues queratines dels hepatòcits, la 8 i la 18 [124].
- **Fibrosi:** Aquesta és la formació de teixit connectiu fibrós a causa d'una lesió (Figura 7F). En l'EHNA acostumem a trobar fibrosi sinusoidal o pericel·lular. La fibrosi acostuma a estar lligada a una reacció necroinflamatòria activa en l'EHNA, però també es pot produir sense lesions actives. A mesura que avança l'EHNA, es pot produir fibrosi portal o periportal i fins i tot, cirrosi hepàtica [125]. Durant la fibrosi avançada o la cirrosi, l'esteatosi i les reaccions necroinflamatòries poden desaparèixer, el que es coneix com a esgotament de l'EHNA; en aquests casos, els pacients tenen un gran risc de morir per disfunció hepàtica i és alta la necessitat d'un transplantament de fetge [126].
- **Altres característiques:** Com són la presència de nuclis glicogenats, cossos acidòfils o apoptòtics, cossos de Mallory (eosinòfils, Figura 7E), megamitocòndries o la deposició de ferro, també estan lligades a la MFGNA [119].



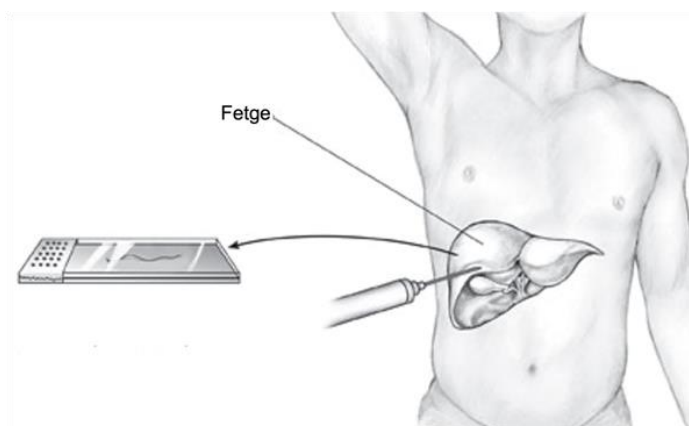




**Figura 7:** Imatges histològiques de les principals lesions hepàtiques de la Malaltia del fetge gras no alcohòlic. A) Esteatosi macrovesicular, B) Esteatosi microvesicular, C) Inflamació lobulillar, D) Inflamació portal, E) Balonització (fletxes negres) i cossos de Mallory-Denk (fletxa vermella) i F) Fibrosi hepàtica. Tinció d'hematoxilina i eosina (A-E) i tinció de reticulina (F). Adaptada de: Takahashi et al. 2014 [119] i Yerian et al. 2015 [127].

#### 2.4.7 Diagnòstic

Un dels reptes més importants quant a la MFGNA és definir un bon mètode de diagnosi. A dia d'avui, la biòpsia hepàtica encara és el *gold standard* per al diagnòstic, el pronòstic i el seguiment terapèutic de la MFGNA. La biòpsia hepàtica és l'única tècnica que ens permet diferenciar entre un fetge amb esteatosi d'un amb EHNA sense fibrosi [118], gràcies a la classificació de Kleiner i Brunt del 2005 [62], la qual avalua les principals característiques histopatològiques de la MFGNA darrerament esmentades. Això és crucial ja que el pas de l'esteatosi a la EHNA és el punt on la malaltia deixa de ser benigna i comença a desenvolupar complicacions per a la salut [118]. Tot i això, aquest mètode diagnòstic té un cost elevat i implica certs riscos, donat que és bastant invasiu [128] (Figura 8); és per això que aquesta tècnica es reserva per a certs pacients en que es sospita MFGNA amb fibrosi avançada o quan es sospita coexistència d'hepatopaties [129], com quan el pacient presenta hipoalbuminèmia, trombocitopènia o un rati de transaminases hepàtiques major de 1; a més, d'aquells pacients que es sotmeten a colecistectomia o cirurgia bariàtrica [130]. Estudis recents han demostrat que més del 80% dels pacients que es sotmeten a cirurgia bariàtrica presenten MFGNA [131,132], i es per això que s'acostuma a obtenir una biòpsia hepàtica per avaluar l'estadi de la MFGNA que presenten, tenint en compte de que la biòpsia intraoperatòria és un procediment de baix risc [130].



**Figura 8:** Representació d'una biòpsia hepàtica percutània.



## 2. INTRODUCCIÓ

Per altra banda, l'estudi de la histologia hepàtica en una biòpsia sol estar associat a problemes de precisió, variabilitat quant al lector i també quant a l'extrapolació del mètode, ja que només s'avalua un petit fragment de fetge (proporció 1/50.000) [118]. Per aquestes raons, hi ha una gran necessitat de trobar proves menys invasives i de definir bé els grups de risc, com són les persones amb obesitat o les que presenten SM [133].

La majoria dels pacients amb MFGNA són asimptomàtics i la malaltia es sol detectar quan en una analítica de sang rutinària es troben nivells elevats d'enzims hepàtics (transaminases) o quan en una ecografia per causes alienes es veu un augment en el contingut de greix hepàtic; tot i això s'han vist perfils bioquímics normals i ecografies sense alteracions en pacients amb estadis avançats de la MFGNA [134]. Abans de considerar el diagnòstic d'aquesta malaltia, s'ha d'excloure el fetge gras alcohòlic [128] i les hepatitis víriques [135] o autoimmunes [136].

Com ja s'ha esmentat, la biòpsia hepàtica és la tècnica predilecta per al diagnòstic de la MFGNA, però a causa de les complicacions que aquesta comporta, l'ecografia abdominal és realment la tècnica que s'utilitza en primera instància per al diagnòstic de l'esteatosi hepàtica, tot i que aquesta no és gaire fiable quan l'esteatosi és menor del 20% [137]. Per altra banda, la ressonància magnètica i l'elastografia transitòria controlada per vibracions són de major sensibilitat, però no estan disponibles per a un ús recurrent [133]. En la Taula 4, es presenten les tècniques d'imatges emprades per al diagnòstic de l'esteatosi hepàtica i els sistemes de puntuacions que s'utilitzen a partir de dades analítiques.

**Taula 4:** Tests no invasius per al diagnòstic de l'esteatosi hepàtica.

Sistemes de puntuació	Tècniques d'imatge
<i>NAFLD liver fat score (NLFS)</i>	Ecografia abdominal
<i>Fatty liver index (FLI)</i>	Paràmetre d'atenuació controlada
<i>Hepatic steatosis index (HSI)</i>	Tomografia computada
<i>Lipid accumulation product (LAP)</i>	Ressonància magnètica
<i>SteatoTest</i>	Exploració hepàtica amb xenó-133
<i>NAFLD screening score</i>	

*Puntuació de greix hepàtic de la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NLFS en anglès), índex de fetge gras (FLI en anglès), índex de esteatosi hepàtica (HSI en anglès), producte d'acumulació de lípids (LAP en anglès), puntuació de cribratge de la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD screening score en anglès). Taula adaptada de Paul et al. 2020 [128].*



Tot i que la biòpsia hepàtica és l'única tècnica fiable capaç de diferenciar l'ES de l'EHNA [138], determinar aquest punt de la malaltia és clau per evitar la progressió cap a cirrosi, carcinoma hepatocel·lular, disfunció hepàtica i hipertensió portal [128]. En aquest sentit, existeixen alguns biomarcadors en sèrum que poden ajudar quan hi ha sospita d'esteatohepatitis, a més de sistemes de puntuació i tècniques d'imatge no invasives que permeten avaluar la presència de l'EHNA (Taula 5). Un estudi va proposar també la prova d'alè, la qual proposava analitzar tres compostos orgànics volàtils (n-tridecà, 3-metil-butanonitril i 1- propanol) en l'alè espirat per distingir el pacients amb EHNA [139].

**Taula 5:** Tests no invasius per al diagnòstic de l'esteatohepatitis no alcohòlica.

Sistemes de puntuació	Biomarcadors sèrics	Tècniques d'imatge
<i>NASH test</i>	Citoqueratina (CK)-18	Ressonància magnètica de protons (1H-MRS)
<i>NASH diagnostic index (NDI)</i>	Aminotransferases sèriques	Ressonància magnètica per elastografia (MRE)
<i>HAIR score</i>	Adiponectina sèrica	
<i>Nice model</i>	Factor de creixement 21 dels fibroblasts (FGF21)	
<i>Palekar score</i>	Proteïna convertasa subtilina/kexina tipus 9 (PCSK9)	
<i>NASH ClinLipMet score</i>	Pentraxina 3 plasmàtica (PTX3)	
<i>NASH predictive index (NPI)</i>	Malondialdehid (MDA)	
<i>NAFIC score</i>	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )	
<i>Gholam score</i>	Interleuquina 6 (IL-6)	
<i>NASH score</i>		
<i>oxNASH score</i>		

*NASH, esteatohepatitis no alcohòlica en anglès; score, puntuació en anglès. Taula adaptada de Paul et al. 2020 [128].*

Tot i això, cap d'aquests biomarcadors, paràmetres diagnòstics analítics o tècniques d'imatge, són capaces de diferenciar amb eficàcia l'ES de l'EHNA, i es per això, que la biòpsia hepàtica segueix sent a dia d'avui el *gold standard* pel diagnòstic de la MFGNA.

Un dels paràmetres més importants de la MFGNA associat a la mortalitat és la fibrosi hepàtica, ja que la presència d'aquesta característica histològica radica en un estadi avançat de la malaltia [130]. Avaluar la fibrosi es molt important per determinar la gravetat de la malaltia en el pacient i com funcionen els tractaments vers la progressió de la fibrosi [140]. En aquest sentit, a part de la biòpsia hepàtica, altra tècnica molt útil en el diagnòstic de la fibrosi hepàtica és la tècnica





## 2. INTRODUCCIÓ

d'imatge FibroScan. El FibroScan és un tipus d'elastografia que mesura la rigidesa hepàtica i els canvis en la composició de greix al fetge. Aquesta rigidesa es calcula en quilopascals (kPa), i els resultats normals solen estar entre 2 i 7 kPa (F0-F1). Quan tenim entre 7,5 i 10 kPa estem parlant d'un estadi moderat de fibrosi (F2), quan en tenim entre 10 i 14 kPa parlem d'una fibrosi greu (F3) i quan ja tenim més de 14 kPa ens trobem amb l'estadi de cirrosi hepàtica (F4) [141]. A més del FibroScan, hi ha altres tècniques d'imatge i sistemes de puntuació per avaluar la fibrosi d'un pacient (Taula 6), els quals actualment ja s'utilitzen a la pràctica clínica diària.

**Taula 6:** Tests no invasius per al diagnòstic de la fibrosi hepàtica.

Sistemes de puntuació	Tècniques d'imatge
<i>AST/platelet ratio index (APRI)</i>	Elastografia transitòria (FibroScan)
<i>FIB-4 score</i>	Elastografia d'impuls de força de radiació acústica (ARFI)
<i>BARD score</i>	Elastografia d'ona de cisalla (SWE)
<i>Nice model</i>	MRE
<i>NAFLD fibrosis score (NFS)</i>	
<i>King's score</i>	
<i>Fibrosis index score (FI)</i>	
<i>Enhanced liver fibrosis (ELF) panel</i>	
<i>FibroTest</i>	
<i>Fibroindex</i>	
<i>Forns index</i>	
<i>Fibrospect II</i>	

NAFLD, malaltia del fetge gras no alcohòlic en anglès; score, puntuació en anglès; Índex del rati d'aminotransferasa/plaquetes (APRI en anglès), panell de fibrosi hepàtica augmentada (ELF panel en anglès). Taula adaptada de Paul et al. 2020 [128].

A part dels mètodes que s'utilitzen actualment per al diagnòstic i l'avaluació dels diferents estadis de la MFGNA, la cerca de nous biomarcadors és un camp molt actiu entre els investigadors. Actualment, els estudis es centren en buscar nous biomarcadors circulants de perfils metabòlics, lipídics, proteòmics i transcriptòmics [142–145], a més d'estudiar els perfils de metilació de l'ADN [146], les proteases hepàtiques no secretades [147] o la signatura metagenòmica de la microbiota intestinal [148]. La cerca de biomarcadors i tècniques més acurades és important no només per al diagnòstic i el pronòstic de la MFGNA, sinó també per a monitoritzar els possibles tractaments i els assajos clínics que es duen a terme.



### 2.4.8 Tractament

La primera línia d'acció per tractar la MFGNA és la intervenció en l'estil de vida de l'afectat. Donat que encara no hi ha un fàrmac específic aprovat per tractar la MFGNA [118] i que aquesta sol estar lligada a trastorns metabòlics com l'obesitat i la DMT2 [149], un canvi en l'estil de vida del pacient, tal com detalla la Figura 9, és l'estratègia terapèutica més recomanada i més eficient. Quan el pacients amb MFGNA presenta sobrepès u obesitat, se li recomana primer de tot reduir el seu pes corporal; a més a més, independentment de si aquest presenta sobrepès o no, hi ha un conjunt de recomanacions dietètiques i físico-esportives que s'aconsellen al pacient ja que s'ha vist que són molt beneficioses per a la seva salut hepàtica [118]. Per altra banda, també es recomana que aquests evitin el consum d'alcohol per no agreujar la malaltia [150].



**Figura 9:** Intervenció en l'estil de vida de les persones amb la Malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA).  
Figura adaptada de Dufour et al. 2022 [118].

D'altra part, quan la MFGNA està lligada a l'OM es sol aconsellar dur a terme una cirurgia bariàtrica. Aquesta cirurgia, com ja s'ha comentat anteriorment, és un tractament eficaç per a l'OM que proporciona una pèrdua de pes sostinguda i una millora de les comorbiditats de l'obesitat [151]. A més, la reducció del pes induïda per la cirurgia bariàtrica s'associa a una



## 2. INTRODUCCIÓ

possible disminució de la inflamació hepàtica, l'esteatosi i la fibrosi [152]. Malauradament, hi ha alguns pacients que després de la cirurgia bariàtrica desenvolupen MFGNA o mostren afectacions en la salut hepàtica, i això és un fet que s'ha de tenir en compte a l'hora de seleccionar els pacients per a aquest tipus de cirurgia [153].

Segons les directrius de l'Associació Europea per a l'Estudi del Fetge, la teràpia farmacològica s'ha d'implementar en pacients amb EHNA progressiva, és a dir, que presentin fibrosi o cirrosi, o en pacients amb EHNA primerenca però que presentin factors com un augment de transaminases, SM, DMT2 o tenir més de 50 anys [138]. Les possibles opcions farmacològiques per a la MFGNA inclouen: fàrmacs antidiabètics, fàrmacs que modifiquin el perfil lipídic, fàrmacs contra l'obesitat, suplementes vitamínics i un teràpies antiinflamatòries, antifibròtiques i antiapoptòtiques [153].

No obstant, malgrat l'augment de la prevalença i el potencial clínic greu de l'EHNA, encara no hi ha un tractament específic autoritzat per la MFGNA. La complexitat de la fisiopatologia de la malaltia ofereix múltiples dianes potencials per al tractament farmacològic (Taula 7). En aquesta taula es descriuen teràpies actuals per a tractar la malaltia quan el pacient requereix d'un tractament hipogluceçant o hipolipemiànt, i tractaments que actualment es troben en estudi (assajos clínics). En un futur proper, les combinacions de fàrmacs, probablement, permetran cobrir tant la disfunció metabòlica com el dany hepàtic, a més de dissenyar una teràpia farmacològica personalitzada a les característiques dels pacients [118].

**Taula 7:** Estratègies terapèutiques farmacològiques actuals i en estudi per a tractar la Malaltia del fetge gras no alcohòlic.

Fàrmac	Funció biològica	Efecte terapèutic en la MFGNA
<b>FÀRMACS ANTIDIABÈTICS</b>		
<b>Pioglitazona</b>	Agonista del PPAR $\gamma$	Millora l'esteatosi, la inflamació, la fibrosi i la sensibilitat a la insulina en pacients amb EHNA i DMT2 [154,155]
<b>Liraglutida</b>	Anàleg del GLP-1	Millora el risc metabòlic i redueix el greix hepàtic en pacients amb EHNA [156–158]
<b>Metformina</b>	Hipogluceçant	No hi ha evidència directa en la salut hepàtica [159], però millora el risc cardiometabòlic [160] i la microbiota intestinal [161], el que de forma indirecta afecta a la MFGNA
<b>Gliflozines</b>	Inhibidors de la SGLT-2	Disminueixen els nivells d'enzims hepàtics en pacients amb MFGNA i DMT2 [162]
<b>FÀRMACS QUE MODIFIQUEN EL PERFIL LIPÍDIC</b>		



<b>Estatines</b>	Hipolipemiants	Disminueix els nivells de transaminases hepàtiques, l'esteatosi, la inflamació i la balonització del fetge [163]. Només es recomanen quan el pacient pateix dislipidemia [150]
------------------	----------------	--

<b>Aramchol</b>	Inhibidor de la SCD-1	Disminueix l'acumulació lipídica al fetge [164]
-----------------	-----------------------	---

#### ROL DUAL (METABOLISME GLUCÍDIC I LIPÍDIC)

<b>Saroglitazar</b>	Agonista dual de PPAR $\alpha$ / $\gamma$	Millora els nivells de transaminases i el fetge gras en pacients amb MFGNA i dislipèmia diabètica [165]. S'acostuma a donar per tractar la SM [166]
---------------------	---	---

<b>Àcid obeticòlic</b>	Agonista del FXR	Té una funció hepatoprotectora [167], millora l'EHNA [168] i augmenta la sensibilitat a la insulina, disminueix la fibrosi i també la infamació hepàtica en MFGNA amb DMT2 [169]
------------------------	------------------	--

#### FÀRMACS QUE MILLOREN LA FUNCIÓ BILIAR

<b>Àcid ursodesoxicòlic</b>	Àcid biliar secundari	Millora l'EHNA en combinació amb la vitamina E [170]
-----------------------------	-----------------------	--

#### FÀRMACS CONTRA L'OBESITAT

<b>Orlistat</b>	Inhibidor de lipases intestinals	Millora l'esteatosi hepàtica i disminueix els nivells de transaminases [171]
-----------------	----------------------------------	--

#### SUPLEMENTS VITAMÍNICS

<b>Vitamina E</b>	Propietats antioxidant	Té un efecte antiinflamatori i antiapoptòtic. S'associa significativament a una millora en l'EHNA en adults sense DMT2 [172]
-------------------	------------------------	--

#### FÀRMACS ANTIINFLAMATORIS

<b>Cenicriviroc</b>	Inhibidor del reclutament de quimiocines	Millora la fibrosi en pacients amb EHNA [173]. Poques evidències i massa primerenques
---------------------	--	---

<b><math>\omega</math>-3</b>	Àcids grassos insaturats	Disminueixen l'estrès oxidatiu, la lipotoxicitat i la inflamació en pacients amb EHNA [174]. Es recomanen a pacients amb TGL elevats [130]
------------------------------	--------------------------	--

#### FÀRMACS ANTIAPOPTÒTICS-ANTIFIBRÒTICS

<b>Emeriscan</b>	Inhibidor de caspases	Millora els marcadors de fibrosi hepàtica (transaminases, caspases, citoqueratines) [175]
------------------	-----------------------	---

<b>Selonsertib</b>	Inhibidor de ASK-1	Millora la fibrosi hepàtica en pacients amb EHNA [176]
--------------------	--------------------	--

*MFGNA, malaltia del fetge gras no alcohòlic; PPAR, receptors activats pel proliferador de peroxisomes en anglès; EHNA, esteatohepatitis no alcohòlica; DMT2, diabetis mellitus de tipus 2; GLP-1, pèptid semblant al glucagó-1 en anglès; SGT-2, Cotransportador de glucosa-sodi-2 en anglès; TGL, triglicèrids; SCD-1, esteroil-CoA desaturasa-1 en anglès; SM, síndrome metabòlica; FXR, receptor farnesoide X; ASK-1, quinasa reguladora del senyal d'apoptosi-1.*



## 2. INTRODUCCIÓ

---

Finalment, si les intervencions terapèutiques no funcionen i la malaltia continua empitjorant, pot acabar afectant greument a la funció del fetge. Quan la vital funció hepàtica es veu altament compromesa, es suggereix el transplantament hepàtic. Tot i això, el transplantament de fetge és una opció no disponible per a tothom i s'ha de fer una avaluació preoperatoria acurada dels pacients amb factors de risc preexistents de MFGNA, amb especial atenció a aquells possibles factors de risc en el curs postoperatori. A més, els hepatòlegs i els cirurgians de trasplantament han de ser conscients del risc de recurrència de la malaltia i la controvèrsia de fer una biòpsia postoperatoria. Per totes aquestes raons, el transplantament hepàtic, tot i que necessari en alguns casos, ha de ser l'última opció terapèutica per a un curs molt avançat i cirròtic de la MFGNA [177].

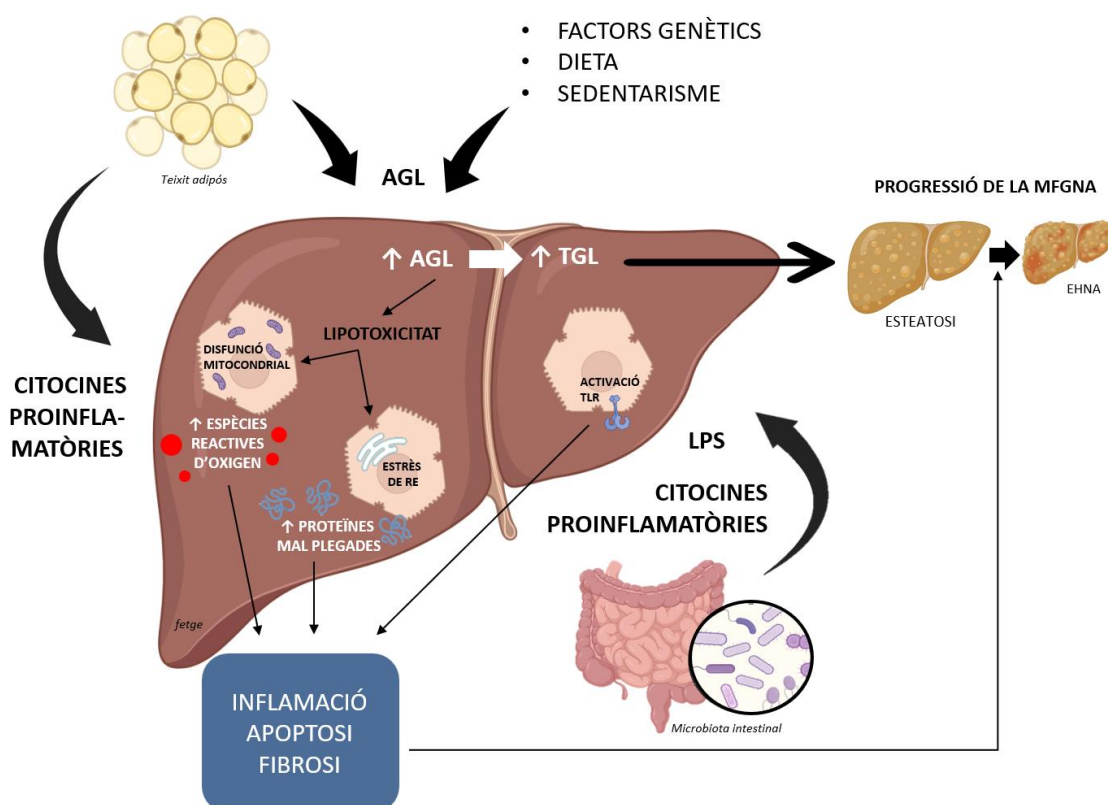
### 2.4.9 Fisiopatologia de la MFGNA

LA MFGNA és un trastorn d'etiologia multifactorial, com ja s'ha esmentat anteriorment, i és per això que els mecanismes involucrats en el seu desenvolupament i la seva progressió són complexos [178]. Al 1998, Day i James van proposar la "hipòtesis dels dos *hits*" per a definir el procés fisiopatogènic de la MFGNA [179]. En aquesta teoria, es postulava que el "primer *hit*" es desencadenava per l'acumulació de lípids en els hepatòcits a causa de la resistència a la insulina, la qual era induïda per una dieta alta en greixos i un estil de vida sedentari. A partir d'aquest punt, el fetge era vulnerable a rebre altres impactes, els quals s'anomenaven conjuntament "segon *hit*". Aquests impactes posteriors eren: l'estrès oxidatiu, els factors genètics, la resposta inflamatòria, l'apoptosi descontrolada i l'activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques, entre d'altres; els quals promovien la progressió de la malaltia cap a l'EHNA en forma de lesió gradual que incloïa processos inflamatoris, apoptòtics i fibrogènics. Si aquests factors que constituïen el "segon *hit*" augmentaven i/o persistien, es desencadenaven processos cirròtics i/o carcinogènics [179,180].

Amb el temps, es va veure que aquesta hipòtesi no era capaç d'explicar la complexitat de la MFGNA en humans i, al 2010, Tilg i Moschen van proposar la "hipòtesi dels múltiples *hits* en paral·lel" [181]. Aquesta és l'actual teoria més recolzada, en que es postula que l'acumulació de greix al fetge és donada per diversos factors simultanis: 1) un increment en sang, i consegüentment en fetge, d'àcids grassos lliures (AGL) a causa d'una lipòlisi augmentada en teixit adipós i/o d'una ingesta persistent rica en greixos; 2) una disminució de l'oxidació dels AGL; 3) un augment de la lipogènesi *de novo* en fetge i 4) una disminució de la secreció hepàtica de TGL-VLDL-c [182]. En aquest sentit, l'acumulació de greixos en els hepatòcits en forma de TGL, realment és una conseqüència adaptativa dels alts nivells d'AGL en fetge, els quals són els



vertaders “tòxics” que promouen el desenvolupament de la MFGNA [183,184]. Aquests mateixos AGL són els que activen per un costat els gens lipogènics hepàtics i per altra inhibeixen la  $\beta$ -oxidació [185,186]; això fa que esdevingui estrès del reticle endoplasmàtic i s’acumulin proteïnes mal plegades [187], a més de la disfunció mitocondrial que genera espècies reactives d’oxigen desencadenant estrès oxidatiu, i l’alliberament de citocines pro-inflamatòries com el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i la interleuquina (IL)-6 [184,188]. Tots aquests factors en conjunt indueixen respostes inflamatòries, apoptòtiques i fibrogèniques activant les cèl·lules estrellades i les cèl·lules de Kupffer i alliberant mediadors proinflamatoris i profibròtics; el que en última instància promou la lesió hepàtica severa (Figura 10) [178]. Si els *hits* esmentats anteriorment persisteixen, les cèl·lules estrellades, que són les principals promotores de la fibrosi hepàtica i les que promouen la lipotoxicitat i la inflamació, activen processos de reparació que cicatritzen el teixit danyat. Si aquest dany es manté persistent, els hepatòcits afectats són reemplaçats per teixit cicatritzat compost principalment per col·lagen, donant lloc a una disfunció progressiva de la funció hepàtica coneguda com la cirrosi [189,190].



**Figura 10:** Representació de la hipòtesi dels múltiples hits en paral·lel per a l'explicació de la patogènia de la Malaltia del fetge gras no alcohòlic. Diferents factors com són els antecedents genètics i l'estil de vida, promouen canvis en el fetge, i també en el teixit adipós i en la microbiota intestinal, els quals impacten de forma negativa en el teixit hepàtic, donant lloc a l'aparició i al desenvolupament de la malaltia del fetge



## 2. INTRODUCCIÓ

*gras no alcohòlic. Un augment dels AGL porta a una acumulació de triglicèrids en els hepatòcits i a una lipotoxicitat per disfunció mitocondrial i estrès del reticle endoplasmàtic, els quals desencadenen respostes inflamatòries i de fibrosi. D'aquesta manera, es promou l'avenç de la malaltia. AGL, àcids grassos lliures; TGL, triglicèrids; MFGNA, malaltia del fetge gras no alcohòlic; EHNA, esteatohepatitis no alcohòlica; RE, reticle endoplasmàtic; LPS, lipopolisacàrids; TLR, receptors toll-like en anglès. Figura adaptada de Buzzetti et al. 2016 [178].*

A més a més, en aquesta teoria també es tenen en compte els efectes que pateix el fetge a partir d'estímuls provinents d'altres òrgans (Figura 10), com per exemple el teixit adipós, el qual envia un flux d'AGL quan l'individu es troba en situació d'obesitat i resistència a la insulina [191], i també allibera adipoquines inflamatòries que un cop al fetge, promouen la inflamació del teixit hepàtic [192–194]. També, el fetge rep estímuls de l'intestí i concretament de la microbiota intestinal, la qual, com ja s'ha explicat amb anterioritat, es pot veure alterada per una mala alimentació, entre d'altres factors [195]. La disbiosi intestinal promou un augment de la permeabilitat de l'intestí que fa que el fetge [196], a través de la circulació portal, rebi LPS que activin els TLR hepàtics desencadenant més respostes inflamatòries [197,198]. A més, la disbiosi intestinal fa que s'absorbeixin polisacàrids complexos que fermenten en forma de SCFA, els quals una vegada al fetge promouen l'acumulació de TGL [181,199]. Un altre mecanisme pel que els canvis en la microbiota promouen la MFGNA és a partir de l'alteració del metabolisme dels àcids biliars, afectant a la senyalització del receptor farnesoide X (FXR en anglès) el qual intervé en processos d'exportació de VLDL-c i en la lipogènesis hepàtica *de novo* [200].

Aquesta teoria, a més, també té en compte els factors genètics que poden promoure el desenvolupament de la malaltia, com les alteracions en els gens PNPLA3 [201] i TM6SF2 [202]. Segons aquesta hipòtesi, tots aquests *hits* que poden actuar de forma simultània, promouen la progressió de la MFGNA [178,203]. Tot i que actualment “la hipòtesi dels múltiples *hits*” en paral·lel és la més acceptada a l'hora d'explicar la patogènia de la MFGNA, aquesta ha anat adaptant-se i adquirint nous conceptes des de que es va postular fins a dia d'avui [203]. Per exemple, s'ha vist que una acumulació excessiva de ferro en el fetge també pot contribuir en el desenvolupament de l'esteatosi i en la progressió cap a l'EHNA, donat el dany pro-oxidatiu que pot tenir el ferro en el fetge, exacerbant la producció d'espècies reactives d'oxigen [204]. A més, també s'ha vist que l'ús de certs fàrmacs pot agreujar l'estrès oxidatiu i per tant la malaltia; com en el cas dels pacients amb MFGNA lligada a obesitat, que es troben en tractament de les comorbiditats [205].

Com a una nova extensió de la hipòtesi actual, s'ha proposat “la teoria dels *hits* distintius”, en que es considera que el fetge purament gras i l'EHNA poden considerar-se entitats patològiques





independents. Es creu que aquestes dues són induïdes per un factor comú que és la resistència a la insulina, però que segons la combinació i la persistència dels *hits* que impactin al fetge, es presenta una determinada hepatotoxicitat que pot portar el desenvolupament patològic cap al fetge gras i/o l'EHNA. D'acord amb aquesta visió, els pacients amb EHNA poden presentar-se sense cap o molta esteatosi; mentre que per altra costat, l'estrès oxidatiu causat per inflamació de l'EHNA pot provocar acumulació lipídica, de manera que a vegades, la inflamació pot precedir l'esteatosi [206].

Tot i que s'han anat incorporant nous factors involucrats en la patogènia del MFGNA, en els últims anys s'ha reforçat la implicació de la intrincada interacció triangular entre l'intestí, el teixit adipós i el fetge en el desenvolupament de la MFGNA [203]. Com ja hem vist, la disbiosi intestinal i la disfuncionalitat del teixit adipós tenen un important efecte en la salut hepàtica, no només pels AGL que pot enviar el teixit adipós o les endotoxines que poden arribar des de l'intestí, sinó pel *pool* de citocines que provenen de la inflamació en aquests teixits i que s'uneixen al "còctel" inflamatori hepàtic que contribueix a l'avenç de la MFGNA [203,207].

#### 2.4.10 Citocines en la MFGNA

A dia d'avui, la major part de les investigacions involucrades en millorar els coneixements sobre els mecanismes fisiopatològics que es donen en la MFGNA giren al voltant de l'estudi de la inflamació crònica present en les diferents etapes d'aquesta malaltia. En aquest sentit, la cerca de nous biomarcadors s'enfoca usualment en l'estudi de les citocines circulants implicades en la progressió de la malaltia [208].

Les citocines són molècules solubles que exerceixen funcions en la comunicació cel·lular i són produïdes i alliberades per una gran varietat de cèl·lules [209]. Aquestes comprenen diverses famílies, entre elles: els interferons, les interleuquines, els TNF, els factors de creixement transformants (TGF en anglès), els factors estimulants de colònies i les quimiocines. Les citocines s'encarreguen de mediar processos fisiològics fonamentals com són el creixement corporal, l'adipositat, la lactància, l'hematopoesi, la inflamació i la immunitat. Aquestes molècules, també estan implicades en processos patològics com l'aterosclerosi, l'artritis reumatoide, el lupus eritematós sistèmic, la psoriasi, el càncer i malalties metabòliques cròniques, com són l'obesitat i la MFGNA [209–211].

En el fetge, en condicions fisiològiques, hi ha una producció mínima de citocines constitutives, però sota estímuls patològics com és l'acumulació lipídica, s'indueix la producció de citocines inflamatòries per part de les cèl·lules hepàtiques. A més a més, el teixit adipós representa una font important d'inflamació induïda per l'obesitat, ja que aquest teixit s'estimula i produeix i





## 2. INTRODUCCIÓ

---

allibera adipoquines, citocines produïdes pel teixit adipós [212,213], que arriben al fetge i indueixen inflamació hepàtica i resistència a la insulina [209].

Les citocines proinflamàtores poden tenir un paper fonamental en l'inici i en la progressió de la MFGNA promovent la resistència a la insulina, l'estrès oxidatiu, la inflamació hepàtica, la necrosi cel·lular, l'apoptosi i la fibrosi hepàtica [214,215]. D'altra banda, les citocines antiinflamàtores com la IL-10, són essencials a l'hora de regular aquests processos i estimular la regeneració del fetge després de la lesió hepàtica [216].

Les principals citocines involucrades en la MFGNA es detallen a continuació:

- **TNF- $\alpha$** : és un mediador inflamatori secretat per diverses cèl·lules inflamàtores, endotelials, del sistema nerviós central, del teixit adipós o del fetge [217]. El TNF- $\alpha$  present al fetge és secretat directament pels hepatòcits i/o les cèl·lules de Kupffer o prové del que es secreta en el teixit adipós. Diversos estudis han demostrat que el TNF- $\alpha$  és un factor clau en la progressió de la MFGNA cap a l'EHNA, tant en humans com en animals [218]. Tot i això, el TNF- $\alpha$  sembla tenir un paper controvertit, ja que també es veu involucrat en els processos de regeneració tissular després de la lesió hepàtica [219].
- **TGF- $\beta$** : és un factor de creixement amb propietats immunosupressores, antiinflamàtores i profibròtiques [220]. En el fetge, el TGF- $\beta$ 1 és la isoforma més abundant, la qual és secretada per cèl·lules immunitàries, cèl·lules estrellades i cèl·lules epitelials [221]. El TGF- $\beta$ 1 té un paper fonamental en la fibrosi hepàtica mitjançant l'activació de les cèl·lules estrellades i la producció de les proteïnes de la matriu extracel·lular [209].
- **IL-1**: són una família de citocines proinflamàtores que, quan s'activen, són capaces d'interrompre les rutes de senyalització de la insulina i els lípids [222]. L'IL-1 $\beta$  promou l'esteatosi hepàtica, la inflamació i la fibrosi i està àmpliament expressada per les diferents subpoblacions de cèl·lules hepàtiques [223]. Una disminució de l'IL-1 $\beta$  es dona en augmentar l'esteatosi i en l'EHNA [224,225].
- **IL-6**: té un paper molt complex en la MFGNA, ja que per un costat activa cèl·lules immunitàries, els hepatòcits, les cèl·lules mare hematopoètiques i els osteoclasts; mentre que per l'altra, indueix la inflamació, la carcinogènesi, regula la resposta immunitària i media l'hematopoesi [226]. Inicialment, aquesta citocina va ser considerada com un hepatoprotector en situació d'esteatosi, ja que era capaç de reduir l'estrès oxidatiu i evitar la disfunció mitocondrial [227], però també s'ha vist que la IL-6 intervé en la síntesi de proteïnes de la fase aguda de la inflamació [228]. A més a més, aquesta citocina es considera un marcador predictiu de resistència a la insulina i de



- malalties cardiovasculars [229]. Per tant, tot i que la IL-6 pot promoure la regeneració hepàtica, també pot sensibilitzar el fetge a lesions, estimular l'apoptosi, induir resistència a la insulina i participar en el desenvolupament de la malaltia cap a l'EHNA [230].
- **IL-7:** és una citocina proinflamatòria secretada pel teixit adipós i altres tipus cel·lulars que sembla disminuir els seus nivells en l'etapa de fibrosi [231].
  - **IL-8:** és una quimiocina produïda per cèl·lules inflamatòries i endotelials, entre d'altres. El paper principal d'aquesta quimiocina és promoure el reclutament de neutròfils en els teixits inflamats. Els nivells d'IL-8 acostumen a ser més alts quan més greu és la malaltia hepàtica [232,233].
  - **IL-10:** es considera una citocina antiinflamatòria que regula la inflamació en diversos òrgans i teixits en situacions fisiològiques i patològiques [234], ja que la IL-10 inhibeix les funcions mediades per cèl·lules T, monòcits i macròfags. En el fetge, la IL-10 s'ha detectat en hepatòcits, cèl·lules estrellades i cèl·lules de Kupffer [235].
  - **IL-13:** és una citocina Th2 que té un paper clau en diverses malalties inflamatòries, a més de que sembla induir la fibrosi hepàtica [236].
  - **IL-12:** es correlaciona positivament amb la fibrosi hepàtica, amb l'empitjorament del perfil lipídic i també amb els nivells de bilirubina en l'EHNA [208]. Per contra, en fases inicials de la MFGNA, els nivells d'IL-10 i d'IL-12 fluctuen de forma inversa i es relacionen amb la resistència a la insulina [216].
  - **IL-17:** inclou una petita família de citocines proinflamatòries (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E i IL-17F). La producció d'IL-17 es sol donar en la pell, les mucoses i el fetge [237]. L'augment de la producció d'IL-17A es va reportar en diverses malalties hepàtiques humanes, i sembla ser que en la MFGNA, la IL-17A promou l'activació immunitària impulsada per la disbiosi intestinal [238].
  - **IL-18:** és una citocina proinflamatòria produïda pel teixit adipós. Els nivells en sèrum d'IL-18 s'incrementen en individus obesos, i disminueixen després de la pèrdua de pes. També s'han detectat nivells alts d'IL-18 en lesions ateroscleròtiques i poden indicar inestabilitat de la placa [239]. Malgrat la naturalesa proinflamatòria de la IL-18, els ratolins deficientes en la IL-18 o el seu receptor mostren característiques de la SM [240].
  - **IL-22:** és un membre de la família de les citocines IL-10 que és produïda per molts tipus de cèl·lules immunitàries, com les T helper 17 i 22, *natural killers* i limfòcits T [241,242]. Quan la IL-22 s'uneix al seu receptor, activa STAT-3 promovent l'expressió de gens de supervivència [243,244].



## 2. INTRODUCCIÓ

---

- **CCL2 o proteïna quimiotàctica de monòcits-1 (MCP-1 en anglès):** és un potent quimioatracent que és principalment secretat per macròfags i, en menor mesura, per cèl·lules endotelials activades, cèl·lules musculars llises i cèl·lules estrellades hepàtiques. La CCL2 o MCP-1 activa principalment macròfags mitjançant la unió amb el seu receptor [245]. La CCL2 es secreta principalment al teixit adipós [246,247], però també s'ha vist que aquesta quimiocina contribueix directament en l'acumulació hepàtica de lípids mitjançant l'activació dels receptors PPAR [248]. Estudis previs suggereixen una participació important de la CCL2 en la progressió de l'ES cap a l'EHNA [249,250].
- **CCL5:** està involucrada en diverses malalties immunitàries cròniques, com l'aterosclerosi, l'infart de miocardi agut, la miocarditis, l'artritis reumatoide i l'esclerosi múltiple [251]. Aquesta és secretada per cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises, macròfags i cèl·lules estrellades hepàtiques [252]. L'alliberament de CCL5 en el fetge és mediada per l'esteatosi, tot i que aquesta quimiocina també està involucrada en la progressió de la fibrosi hepàtica a través dels receptors CCR1 i el CCR5 [253].
- **Adiponectina:** és l'adipoquina més estudiada en la MFGNA i les troballes són força consistents en comparació amb altres citocines. Els nivells de plasma d'adiponectina es veuen reduïts en l'obesitat i en la resistència a la insulina, com també en l'EHNA, l'aterosclerosi i la DMT2 [254,255]. L'adiponectina és un mediador antiinflamatori derivat dels adipòcits que actua a través de dos receptors (ADIPOR1 i ADIPOR2), els quals activen una via de senyalització depenent de l'AMP-quinasa [256]. L'adiponectina suprimeix l'expressió de TNF al teixit adipós i indueix un efecte antiinflamatori a través dels leucòcits humans incloent els receptors IL-10 i IL-1 [257,258]. Les propietats antiinflamatòries de l'adiponectina també impliquen altres vies com la inducció de l'HMOX-1. Consistent amb això, la producció d'adiponectina pels adipòcits és inhibida per factors proinflamatoris, com el TNF i la IL-6 [212,213], així com per hipòxia i estrès oxidatiu [259]. Els agonistes dels PPAR promouen la diferenciació dels adipòcits, i la secreció d'adiponectina [260].
- **Leptina:** el seu paper recau en la modulació de la immunitat i la inflamació [261], a més de regular la funció neuroendocrina, l'homeòstasi energètica, l'hematopoesi i l'angiogènesi. L'expressió de la leptina està regulada per la insulina i els glucocorticoides, i s'expressa predominantment en el teixit adipós i després és secretada a la circulació [262]. La leptina media la comunicació entre el teixit adipós i el cervell, regulant la sensació de gana. Aquesta adipoquina indueix l'expressió de citocines inflamatòries que



- al seu torn poden promoure l'alliberació de leptina [263]. L'augment dels nivells de leptina en sèrum s'han correlacionat amb la gravetat de la malaltia hepàtica, és a dir, la inflamació i la fibrosi [264].
- **Resistina:** es secreta principalment en el teixit adipós i està involucrada en el desenvolupament de la DMT2 i la resistència a la insulina [265]. El seu paper en malalties humanes s'associa a obesitat, però en la MFGNA encara no està del tot establert, tot i que es suggereix que té un paper proinflamatori per la inducció de diverses citocines inflammatòries [266]. A més, els nivells elevats de resistina s'associen a estadis d'EHNA avançada [267].
  - **Lipocalina 2:** pertany a la superfamília de les proteïnes lipocalines, les quals s'uneixen i transporten petites substàncies lipòfiles com els retinoids, l'àcid araquidònic i els esteroids. La lipocalina 2 s'expressa abundantment en el teixit adipós [268,269] i és induïda per estímuls inflamatoris mitjançant l'activació del factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) [270]. Les concentracions en sèrum de lipocalina 2 estan positivament associades amb l'adipositat, la hiperglucèmia, la resistència a la insulina i els nivells de proteïna C reactiva [271]. No obstant això, un altre estudi va informar que la deficiència de lipocalina 2 potencia l'obesitat induïda per la dieta i la resistència a la insulina [272].
  - **Inhibidor de l'activador de plasminogen 1 (PAI-1):** és un inhibidor de la fibrinòlisi fortament regulat en els dipòsits del VAT, pel que es va suggerir la seva relació amb l'obesitat i els trastorns trombòtics [273]. El PAI-1 va identificar-se com l'única citocina diferencial entre l'EHNA i "l'EHNA no ben definida". Es creu que el PAI-1 podria estar involucrat en els processos d'inflamació hepàtica, ja que les seves isoformes tPAI-1 i aPAI-1 s'han relacionat amb la inflamació lobulillar i la portal, respectivament [274].
  - **Proteïna 5 secretada similar a frizzled (SFRP5):** s'ha identificat recentment com una nova adipoquina amb propietats antiinflamatòries que sembla tenir efectes beneficiosos sobre la disfunció metabòlica [275]. Les SFRPs actuen com a moduladors solubles que segresten les proteïnes WNT (*Wingless-related integration site* en anglès), evitant que s'uneixin als seu receptor *frizzled*; en concret la WNT5A, ha estat implicada en diversos trastorns inflamatoris. La proteïna SFRP5 s'expressa en nivells alts en el WAT del ratolí, però es desregula amb l'obesitat. En condicions d'obesitat, en el teixit adipós, el TNF i la proteïna WNT5A, la qual està antagonitzada per la SFRP5, estan regulats positivament, mentre que l'adiponectina i la SFRP5 estan regulades a la baixa [213,275].

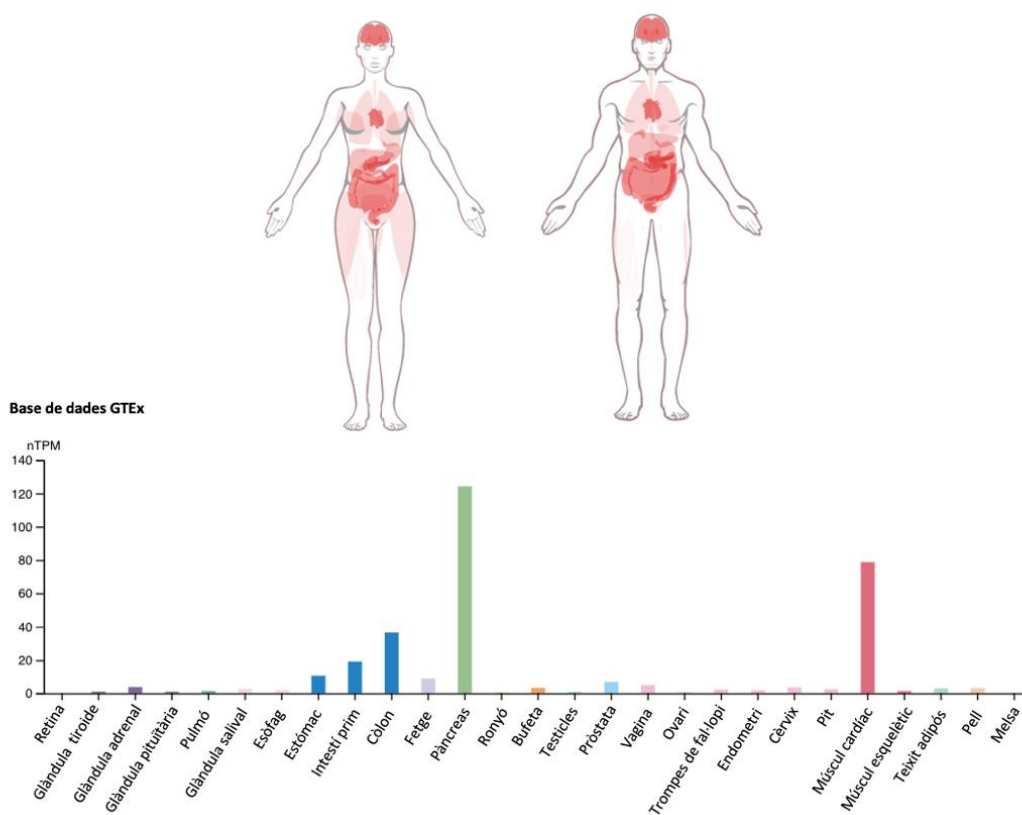


## 2. INTRODUCCIÓ

### 2.5 LA PROTEÏNA 5 SECRETADA SIMILAR A *FRIZZLED* (SFRP5)

#### 2.5.1 El gen *Sfrp5* i la proteïna SFRP5

El gen *Sfrp5* es localitza al cromosoma 10q24.1 en humans i consta de 317 residus d'aminoàcids i 3 exons codificants. Aquest gen es va descobrir per que es va trobar expressat en les cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina i després es va veure que aquest estava molt expressat en el pàncrees [276,277]. En l'actualitat, es coneix que aquest gen es troba distribuït en diferents teixits del cos humà, com són el múscul cardíac i els teixits del tracte digestiu, entre d'altres, tal com representa la Figura 11.



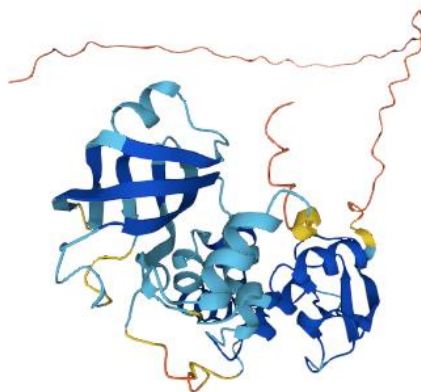
**Figura 11:** Distribució de l'expressió d'ARN del gen *Sfrp5* en els diferents teixits del cos humà. Font: Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120057-SFRP5>).

Posteriorment, es va començar a estudiar el paper de SFRP5 en diverses malalties neoplàsiques [278–281], però no va ser fins que dos estudis van reportar evidències d'un augment de l'expressió d'aquest gen en l'obesitat induïda per la dieta [282,283], que Ouchi et al. al 2010 van voler estudiar la proteïna SFRP5 des d'un altre punt de vista diferent al càncer. Aquests autors van demostrar que el gen *Sfrp5* també s'expressava altament en el WAT i que la proteïna que codificava era produïda i secretada principalment pels adipòcits del VAT. A més, també van postular que la SFRP5 es podia considerar una adipocina antiinflamatòria moduladora de la



disfuncionalitat metabòlica en situació d'obesitat [275]. A partir d'aquesta troballa, els estudis en relació a la proteïna SFRP5 i la seva implicació en les vies metabòliques van créixer exponencialment.

La proteïna SFRP5 és un inhibidor de la via de senyalització de WNT, concretament del lligand WNT5A [275]. L'estructura de la proteïna SFRP5 s'ha predit, recentment, mitjançant models computacionals (Figura 12).



**Figura 12:** Representació de l'estructura de la proteïna SFRP5 emmotllada segons un model de confiança.  
Font: UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A852NST0/entry#structure>).

La proteïna SFRP5 forma part de la família de les SFRP juntament amb les proteïnes SFRP1, SFRP2, SFRP3 i SFRP4. Aquestes tenen un pes molecular que oscil·la entre 30 i 40 kDaltons. Els dominis rics en cisteïnes de les SFRP, que es troben a la meitat N-terminal de la proteïna, són els trets característiques estructurals més importants i consisteixen en 10 residus de cisteïna conservats i diversos segments d'altres residus també conservats [284]. La meitat C-terminal de les SFRP5 conté una netrina, que es compon de 6 residus de cisteïna i diversos segments conservats de residus hidrofòbics. Les proteïnes SFRP, les WNT i els receptors *frizzled* als quals s'uneixen tenen un residu ric en cisteïna homòleg, per la qual cosa es permet el bloqueig de la via de senyalització de WNT a través de la unió de les SFRP amb el receptor *frizzled* creant complexos no funcionals [285]; tot i que també s'ha vist que existeixen altres mecanismes per els quals les SFRP inhibeixen la via WNT [286].

### 2.5.2 SFRP5 i la via de senyalització WNT

La funció biològica de la proteïna SFRP5 en la via de senyalització de WNT, inclou principalment la regulació de la polaritat cel·lular i la formació d'òrgans durant el desenvolupament embrionari [277,287,288]. Per altra banda, quan el gen *Sfrp5* pateix una hipermetilació, contribueix en la formació i el desenvolupament de tumors [289]. A més, com ja s'ha esmentat, la proteïna SFRP5 s'ha vist relacionada amb l'alteració de l'homeòstasi metabòlica, donant lloc a la resistència a la



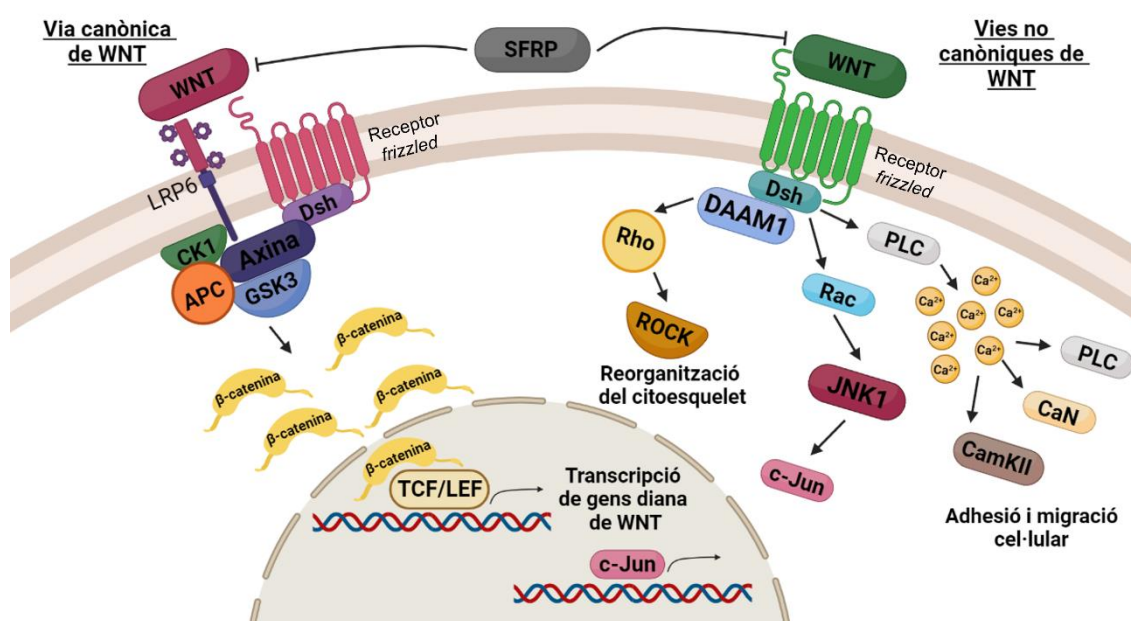
## 2. INTRODUCCIÓ

insulina i als trastorns metabòlics relacionats amb l'obesitat [275,290], com també amb la supressió de respostes inflamatòries [285,291].

La via de senyalització WNT s'activa quan es dona la unió d'una de les proteïnes de la família WNT amb el seu receptor *frizzled* de membrana. Les proteïnes WNT s'anomenen així per les primeres proteïnes d'aquesta família que es van descobrir: la proteïna Wg codificada en el gen *wingless* en *Drosophila* (mosca de la fruita) i la proteïna Int-1 o lloc d'integració 1 del virus del tumor mamari de ratolí. La contracció d'aquests dos mots va donar lloc a anomenar WNT a les proteïnes d'aquesta família [292].

Les WNT són un grup de proteïnes que contenen lligands glicosilats rics en cisteïna i 350-400 residus d'aminoàcids. Aquestes proteïnes són molècules de senyalització molt conservades evolutivament que presenten una elevada homologia i regulen una àmplia gamma de funcions cel·lulars durant el desenvolupament i en l'edat adulta [292,293].

Realment, la via de senyalització WNT comprèn 3 cascades d'inducció de senyals diferents: la via canònica WNT/ $\beta$ -catenina, la via no canònica WNT/Jun quinasa N-terminal (JNK) i la via no canònica Wnt/ $Ca^{2+}$  [294], representades en la Figura 13.



**Figura 13:** Representació de les vies de senyalització WNT. Els lligands WNT activen la senyalització de 3 vies principals: La via canònica WNT/ $\beta$ -catenina i les vies no canòniques WNT/JNK i WNT/ $Ca^{2+}$ , aquestes vies donen lloc a la transcripció de gens diana de WNT, a la reordenació del citoesquelet i a l'adhesió i la migració cel·lular, respectivament. Les proteïnes SFRP antagonitzen aquestes vies inhibint la seva inducció de senyals. SFRP, proteïnes secretades similar a frizzled en anglès; WNT, contracció del nom de les proteïnes Wingless i Integration site 1; LRP6, proteïna relacionada amb el receptor de lipoproteïnes 6 en anglès; Dsh, Disheveled o desordenada; CK1, caseïna quinasa 1 en anglès; APC, poliposi adenomatosa coli





en anglès; *GSK3*, glicogen sintasa quinasa 3 en anglès; *TCF/LEF*, factor de cèl·lules T/factor de millora limfoide en anglès; *DAAM 1*, activador de la morfogènesi 1 associat a Dsh en anglès; *ROCK*, proteïna quinasa associada a Rho en anglès; *JNK1*, Jun quinasa N-terminal 1 en anglès; *PLC*, fosfolipasa C en anglès; *CamKII*, quinasa dependent de calci/calmodulina II en anglès; *CaN*, calcineurina. Figura adaptada de Ng et al. 2019 [292].

- **Via canònica de WNT:** En presència de lligands WNT, la via canònica inhibeix la degradació de la  $\beta$ -catenina activant la transcripció de gens diana de WNT. Quan els lligands WNT s'uneixen al seu receptor *frizzled* específic i al co-receptor “proteïna relacionada amb el receptor de lipoproteïnes 6” (LRP6 en anglès), s’activa la senyalització de la via. En primer lloc, la proteïna *disheveled* o desordenada (Dsh) s’uneix al receptor *frizzled* en la zona intracel·lular de la membrana plasmàtica i s’activa, segrestant a la vegada l’axina i el complex de destrucció, per la qual cosa s’inhibeix la fosforilació de la  $\beta$ -catenina per part de la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3 en anglès) i la seva conseqüent destrucció [295,296]. En aquest sentit, augmenten els nivells de  $\beta$ -catenina en el citosol i aquest factor de transcripció incideix al nucli cel·lular i activa la transcripció de gens diana de WNT [297].
- **Vies no canòniques de WNT:** A diferència de la via canònica dependent de la  $\beta$ -catenina, les proteïnes WNT són capaces d'activar vies de senyalització addicionals que són independents de la  $\beta$ -catenina. Aquestes vies s'anomenen vies no canòniques i es poden classificar en dues branques diferents: la via WNT/JNK i la via WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  [292,293].  
La via WNT/JNK, a més d’activar la transcripció de gens diana de WNT, també regula una varietat de canvis cel·lulars com la polaritat cel·lular plana, els moviments cel·lulars durant la gastrulació i la migració cel·lular [298–301]. Aquesta via s'activa mitjançant la unió dels lligands WNT al seu receptor *frizzled* específic de forma independent al co-receptor LRP6 [302], però mitjançant la unió amb la proteïna Dsh i amb l'activador de la morfogènesi 1 associat a Dsh (DAAM1 en anglès). Aquesta unió activa, per un costat, les GTPases-Rho i la proteïna quinasa associada a Rho (ROCK en anglès), donant lloc així a la reorganització del citoesquelet [303]. Per altra costat, la proteïna Dsh forma un complex amb la proteïna GTPasa-Rac, independent de DAAM1 i s’indueix l'activitat de la proteïna JNK-1 que dóna lloc a la inserció del factor de transcripció c-Jun al nucli, per la qual cosa s’activa la transcripció de gens diana de WNT [301–303].  
El paper de la via WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  és el de regular l'alliberament del  $\text{Ca}^{2+}$  per part del reticle endoplasmàtic al citosol i modular els moviments de les cèl·lules, l'adhesió cel·lular, la





## 2. INTRODUCCIÓ

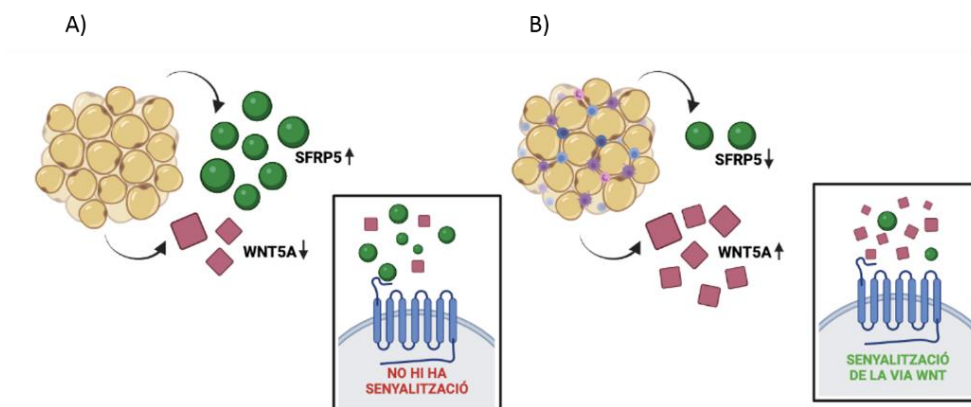
---

migració i la separació de teixits durant la gastrulació [304–306]. De la mateixa forma que la via no canònica WNT/JNK, l'activació de la WNT/Ca<sup>2+</sup> requereix la unió dels lligands WNT al receptor *frizzled*. Aquesta unió activa la fosfolipasa C (PLC en anglès) donant lloc a un augment de la concentració intracel·lular de Ca<sup>2+</sup> [307]. El Ca<sup>2+</sup> alliberat activa aleshores la quinasa 2 dependent del calci/calmodulina (CamKII en anglès), la calcineurina (CaN) i la PLC induint esdeveniments de migració i adhesió cel·lular i la retro-alimentació positiva de la senyalització de la via [304,306,307].

### 2.5.3 Implicació patològica de la via SFRP5/WNT

Donat que la via WNT participa en un ampli ventall de processos fisiològics com són la proliferació i la diferenciació cel·lular, l'apoptosi, la migració, etc. [308,309], és raonable pensar que la seva desregulació pugui donar lloc al desenvolupament i la progressió de tumors [310–313]. Aquest mateix fet ha portat a estudiar la proteïna SFRP5, principal inhibidora de la cascada de WNT5A, i la seva implicació en diverses neoplàsies humanes com són el càncer gàstric [278], cervical [280,314], hepatocel·lular [281], de cèl·lules escatoses orals [315,316], de mama [317,318], de còlon [319], de bufeta [320] i de ronyó [321]. Aquests estudis han demostrat que la proteïna SFRP5 funciona com un supressor tumoral que es veu regulat negativament en el càncer i han suggerit la seva inducció com una possible estratègia terapèutica en aquests tumors [322,323].

Recentment, l'estudi de la funció de la proteïna SFRP5 s'ha focalitzat també en la seva relació amb l'obesitat; tot i això, existeixen dades contradictòries quant a la seva implicació precisa. Alguns estudis han reportat que en ratolins l'activació de SFRP5 és induïda per una predisposició genètica i/o per la dieta en condicions d'obesitat [282,283,324,325]. Per altra costat, Ouchi et al. van demostrar en un model de ratolí que l'expressió de SFRP5 es trobava disminuïda en el teixit adipós quan hi havia un augment en la mida dels adipòcits i van suggerir que aquesta expressió es veia minvada davant de disfuncions metabòliques relacionades amb l'obesitat [275], tal com es representa en la Figura 14.



**Figura 14:** Representació de la secreció de les adipocines SFRP5 i WNT5A pels adipòcits sans i els adipòcits inflamats. A) La figura expressa que els adipòcits en condicions normals produeixen i secreten petites quantitats de WNT5A i quantitats moderades de SFRP5, per la qual cosa la via de senyalització de WNT es veu inhibida [326]. B) En condició d'obesitat, quan hi ha hiperplàsia i hipertròfia dels adipòcits i inflamació del teixit adipós, es secreten majors quantitats de WNT5A que de SFRP5 i s'activa la inducció de la via de senyalització de WNT desencadenant resistència a la insulina i inflamació [275,293]. SFRP5, proteïna 5 secretada similar a frizzled en anglès; WNT5a, membre 5 de la família WNT (contracció del nom de les proteïnes Wingless i Integration site 1). Figura d'elaboració pròpia.

A més a més, s'ha vist que la via SFRP5-WNT5A juga un paper molt important en la diferenciació dels preadipòcits [327], ja que WNT5A inhibeix l'adipogènesi, bloquejant l'acció de PPAR $\gamma$  [328]. Per tant, en aquest sentit, SFRP5 inhibeix la senyalització de WNT5A suprimint el metabolisme oxidatiu i estimulant el creixement dels adipòcits durant l'obesitat [293]. Tot i això, els mecanismes precisos pels quals es dona lloc a aquestes vies de senyalització mediatas per SFRP5 i WNT5A, no estan encara ben definits i necessiten ser estudiats amb més detall.

Per altra banda, la senyalització de la proteïna SFRP5 també té un rol remarcable en els dos teixits on més s'expressa, el pàncreas i el múscul cardíac (tal com s'expressa en la Figura 11). En el pàncreas, quan la via de WNT és bloquejada per SFRP5, les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques tendeixen a desenvolupar un fenotip diabètic [329,330], mentre que aquesta mateixa via funciona de forma diferent en altres teixits com és el teixit adipós, on l'activació de la via WNT indueix al desequilibri metabòlic, contribuint en última instància, en l'aparició de la DMT2 [331].

Quant al teixit cardíac, la senyalització de WNT/SFRP5 està fortament involucrada en el desenvolupament fisiopatològic de les malalties cardiovasculars, tant pel que fa a les alteracions metabòliques com en la remodelació cardiovascular i en els canvis estructurals del teixit cardíac [293,319,332–334]. També s'ha vist que la proteïna SFRP5 s'expressa al cervell [275], on sembla activar una via de senyalització a l'hipotàlem i a l'eix hepàtic-cerebral amb el propòsit de



## 2. INTRODUCCIÓ

---

disminuir la secreció hepàtica de glucosa i VLDL-c [335]. Per tant, totes aquestes evidències fan pensar en la forta implicació de la proteïna SFRP5 en el desenvolupament de les malalties metabòliques i encoratgen a seguir investigant el seu paper en altres patologies relacionades com pot ser la MFGNA.

### 2.5.4 La proteïna SFRP5 i el seu rol en la MFGNA

Estudis en models animals han reportat que l'adipoquina SFRP5 té un rol protector vers la resistència a la insulina, l'esteatosi hepàtica i la fibrosi [275,336]. Per altra costat, tot i que Catalán et al. van trobar nivells sèrics de SFRP5 similars entre controls i pacients amb MFGNA, Gutiérrez-Vidal et al. van demostrar en humans que l'expressió tant de proteïna com d'ARN missatger de SFRP5 es correlacionava negativament amb el contingut hepàtic de TGL i també amb l'EHNA [337], donant suport al que havien reportat anteriorment Ouchi et al. [275]. Aquests autors van demostrar que el contingut de TGL al fetge i que l'esteatosi hepàtica eren menors en ratolins deficients de SFRP5, tot i ser tractats amb una dieta alta en greixos. A més a més, Gutiérrez-Vidal et al. van trobar una correlació positiva dels nivells sèrics de SFRP5 amb els d'adiponectina, la més coneguda adipoquina antiinflamatòria [338], i una correlació negativa amb els nivells de leptina, molt associada amb la MFGNA [339]. També van proposar els nivells hepàtics de la proteïna SFRP5 com un possible predictor de la MFGNA junt a altres variables com els nivells sèrics d'adiponectina i leptina, la presència de DMT2, els nivells d'alanino aminotransferasa (ALT) i el valor de l'avaluació del model homeostàtic per a la resistència a la insulina (HOMA-IR) [337]. Tot i això, encara que podria semblar que la SFRP5 estigués involucrada en la MFGNA, segueix havent-hi moltes llacunes en relació als mecanismes precisos pels quals es donen aquestes interaccions entre SFRP5 i la patogènia de la MFGNA, essent encara molt incerts.

## ***3. Hipòtesi i Objectius***

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



La present tesi doctoral pretén donar resposta a dos dels principals reptes de la investigació en la MFGNA: 1) Millorar el diagnòstic no invasiu per tal que sigui suficientment precís per als diferents estadis histològics de la malaltia; 2) Aprofundir en l'estudi de la patogènia de la MFGNA per tal de fer aflorar possibles dianes terapèutiques novedoses.

Tenint en compte el potencial paper antiinflamatori que sembla tenir l'adipoquina SFRP5, produïda i secretada pels adipòcits, la qual és un lligand antagonista de la via de WNT, que desencadena processos inflamatoris i de dany tissular; la relació que s'ha proposat entre SFRP5 i l'esteatosi hepàtica i, donat que la MFGNA és un trastorn metabòlic multifactorial amb una forta relació amb altres òrgans com el teixit adipós; es pot arribar a pensar, que la proteïna SFRP5 podria tenir un paper clau en l'aparició i el desenvolupament de la MFGNA.

En aquest sentit, estudis previs en models animals han demostrat que la modulació de l'adipoquina antiinflamatòria SFRP5 pot regular trastorns metabòlics com la resistència a la insulina i l'esteatosi hepàtica; tot i això, el seu paper en humans no és clar. A més, s'ha vist que la senyalització de WNT s'activa durant la fibrosi hepàtica, encara que els mecanismes en els quals participa encara són incerts.

**Tots aquests factors en conjunt, donen lloc a hipotetitzar, que la senyalització de SFRP5 podria estar involucrada en la patogènia de la MFGNA.**

**En aquest sentit, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és investigar el rol específic de la proteïna SFRP5 i la via no canònica de WNT en la MFGNA.**

Per a portar a terme l'objectiu principal, la present tesi doctoral es divideix en dos estudis:

- Objectius del **PRIMER ESTUDI**:
  1. Analitzar els nivells circulants de SFRP5 en mostres de sèrum sanguini de dones amb pes normal (PN) i dones amb OM que presentin o no MFGNA.
  2. Analitzar l'expressió d'ARNm de SFRP5 en biòpsies de fetge de dones amb OM i diferents graus d'afectació hepàtica.
  3. Analitzar els nivells d'ARNm de WNT5A i JNK en mostres de fetge de dones amb OM presentant o no MFGNA.
- Objectius del **SEGON ESTUDI**:
  1. Analitzar l'expressió d'ARNm de SFRP5 en biòpsies de SAT i VAT de dones amb PN, i de dones amb OM amb diferents graus d'afectació hepàtica.
  2. Analitzar els nivells d'ARNm de WNT5A i PPAR $\gamma$  en mostres de SAT i VAT de dones amb PN, i dones amb OM presentant o no MFGNA.
  3. Avaluar l'eix teixit adipós-fetge des del punt de vista de la via SFRP5/WNT5A.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

## ***4. Resultats***

---



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



## 4.1 PRIMER ESTUDI






International Journal of  
Molecular Sciences



Article

### Deregulation of Secreted Frizzled-Related Protein 5 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity

Laia Bertran <sup>1,†</sup>, Marta Portillo-Carrasquer <sup>1,†</sup>, Carmen Aguilar <sup>1</sup>, José Antonio Porras <sup>2</sup>, David Riesco <sup>2</sup>,  
Salomé Martínez <sup>3</sup>, Margarita Vives <sup>4</sup>, Fàtima Sabench <sup>4</sup>, Eva Gonzalez <sup>5</sup>, Daniel Del Castillo <sup>4</sup>, Cristóbal Richart <sup>1,2</sup>  
and Teresa Auguet <sup>1,2,\*</sup>

**Figura 15:** Bertran, L.; Portillo-Carrasquer, M.; Aguilar, C.; Porras, J.A.; Riesco, D.; Martínez, S.; Vives, M.; Sabench, F.; Gonzalez, E.; Del Castillo, D.; Richart, C.; Auguet, T. Deregulation of Secreted Frizzled-Related Protein 5 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6895. <https://doi.org/10.3390/ijms22136895>

**TÍTOL:** Desregulació de la proteïna 5 secretada similar a *frizzled* en la malaltia del fetge gras no alcohòlic amb obesitat.

**AUTORS:** Laia Bertran<sup>1</sup>, Marta Portillo-Carrasquer<sup>1</sup>, Carmen Aguilar <sup>1</sup>, José Antonio Porras<sup>2</sup>, David Riesco<sup>2</sup>, Salomé Martínez<sup>3</sup>, Margarita Vives<sup>4</sup>, Fàtima Sabench<sup>4</sup>, Eva Gonzalez<sup>5</sup>, Daniel Del Castillo<sup>4</sup>, Cristóbal Richart<sup>1,2</sup> i Teresa Auguet<sup>1,2,\*</sup>

**AFILIACIONS:** <sup>1</sup>Grup de Recerca GEMMAIR, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV). <sup>2</sup> Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. <sup>3</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. <sup>4</sup> Servei de Cirurgia, Hospital Sant Joan de Reus, Departament de Medicina i Cirurgia, URV, IISPV.

**PUBLICACIÓ:** L'estat de la publicació és PUBLICAT el dia 27 de juny de 2021 a la revista International Journal of Molecular Sciences (IJMS) que pertany al Q1 i té un factor d'impacte de 6.208 (Journal Citation Reports (JCR), 2021).

#### RESUM:

**INTRODUCCIÓ:** La proteïna SFRP5 és un antagonista de la via de senyalització no canònica del WNT. La SFRP5 és una proteïna nova, que s'ha estudiat majoritàriament en models animals i es coneix ben poc del paper que representa en humans. Aquesta s'ha descrit com una citocina antiinflamatòria que es produeix en el teixit adipós i que sembla tenir un paper modulador en el metabolisme tant dels glúcids com dels lípids. Per tant, creiem que la proteïna SFRP5 pot tenir un paper en la patogènia de la MFGNA, una de les malalties hepàtiques més prevalents.



#### 4. RESULTATS

---

**OBJECTIU:** Analitzar el rol de la proteïna SFRP5 i la via no canònica del WNT avaluant els nivells plasmàtics de SFRP5 i l'expressió hepàtica d'ARNm de SFRP5, WNT5A i JNK en mostres hepàtiques de dones amb OM sotmeses a cirurgia bariàtrica i diferents graus de MFGNA.

**MATERIALS I MÈTODES:** Es van analitzar els nivells plasmàtics de SFRP5 mitjançant l'assaig d'immunoabsorció associat a un enzim (abreviat en anglès com ELISA) en dones amb PN (n = 20) i OM (n = 69). Les dones amb OM van ser classificades gràcies a l'estudi anatomopatològic en histologia hepàtica normal (HHN; n = 28) i MFGNA (n = 41); i el grup amb MFGNA es va subclassificar en ES (n = 24) i EHNA (n = 17). Es va realitzar una reacció en cadena de la polimerasa quantitativa en temps real (en anglès RT-qPCR) per avaluar l'expressió hepàtica d'ARNm de SFRP5, WNT5A i JNK en dones amb OM i diferents graus d'afectació hepàtica per MFGNA.

**RESULTATS:** Els nivells sèrics de SFRP5 van ser més baixos en pacients amb PN que en pacients amb OM; aquests últims havien seguit una dieta estrictament baixa en calories tres mesos abans de la intervenció. No es van trobar diferències significatives entre els grups de pacients amb OM i diferents graus d'afectació hepàtica. L'expressió hepàtica relativa d'ARNm de SFRP5 es trobava més augmentada en ES que en HHN o en EHNA. A més, les pacients amb inflamació hepàtica o balonització hepatocel·lular, característiques de l'EHNA, presentaven una abundància inferior de SFRP5. L'expressió relativa d'ARNm de WNT5A i JNK en fetge es trobava augmentada en la MFGNA en comparació a l'expressió en mostres amb HHN.

**CONCLUSIÓ:** Els nivells circulants de SFRP5 probablement estan influïts per la dieta. L'expressió hepàtica de SFRP5 sembla tenir un paper protector en les primeres etapes de la MFGNA, mentre que la seva senyalització es veu truncada en estadis avançats quan l'activitat de WNT5A i JNK es manté activa, promovent el dany hepàtic.



Article

# Deregulation of Secreted Frizzled-Related Protein 5 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity

Laia Bertran <sup>1,†</sup> , Marta Portillo-Carrasquer <sup>1,†</sup> , Carmen Aguilar <sup>1</sup>, José Antonio Porras <sup>2</sup>, David Riesco <sup>2</sup>, Salomé Martínez <sup>3</sup>, Margarita Vives <sup>4</sup>, Fàtima Sabench <sup>4</sup>, Eva Gonzalez <sup>5</sup>, Daniel Del Castillo <sup>4</sup>, Cristóbal Richart <sup>1,2</sup> and Teresa Auguet <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Grup de Recerca GEMMAIR (AGAUR)-Medicina Aplicada (URV), Departament de Medicina i Cirurgia, University Rovira i Virgili (URV), Institutue d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43007 Tarragona, Spain; laia.bertran@urv.cat (L.B.); marta.portillo.carrasquer@gmail.com (M.P.-C.); caguilar.hj23.ics@gencat.cat (C.A.); crichart.hj23.ics@gencat.cat (C.R.)
  - <sup>2</sup> Servei Medicina Interna, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain; aporras.hj23.ics@gencat.cat (J.A.P.); david\_riesco@hotmail.com (D.R.)
  - <sup>3</sup> Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain; mgonzalez.hj23.ics@gencat.cat
  - <sup>4</sup> Servei de Cirurgia, Hospital Sant Joan de Reus, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), IISPV. Avinguda Doctor Josep Laporte, 2, 43204 Reus, Spain; mvives@gmail.com (M.V.); fatima.sabench@urv.cat (F.S.); danieldel.castillo@urv.cat (D.D.C.)
  - <sup>5</sup> Laboratori Clínic Institut Català de Salut (ICS), Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain; egonzalezcarballo@hotmail.com
- \* Correspondence: tauguet.hj23.ics@gencat.cat; Tel.: +34-977-29-58-33  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Bertran, L.; Portillo-Carrasquer, M.; Aguilar, C.; Porras, J.A.; Riesco, D.; Martínez, S.; Vives, M.; Sabench, F.; Gonzalez, E.; Del Castillo, D.; et al. Deregulation of Secreted Frizzled-Related Protein 5 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6895. <https://doi.org/10.3390/ijms22136895>

Academic Editor: Mi-Kyung Lee

Received: 7 June 2021

Accepted: 25 June 2021

Published: 27 June 2021

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



**Copyright:** © 2021 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/>).

**Abstract:** Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5), an antagonist of the noncanonical WNT pathway, has a controversial role in liver disease. The aim of this study was to analyze the role of SFRP5 and the noncanonical WNT pathway in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Plasma SFRP5 levels were determined by ELISA in women with normal weight (NW;  $n = 20$ ) and morbid obesity (MO;  $n = 69$ ). Women with MO were subclassified according to hepatic histology into normal liver (NL;  $n = 28$ ), NAFLD ( $n = 41$ ) (simple steatosis (SS;  $n = 24$ ), and nonalcoholic steatohepatitis (NASH;  $n = 17$ )). We used RT-qPCR to evaluate the hepatic mRNA expression of SFRP5, WNT5A, and JNK in women with MO. SFRP5 levels were lower in NW than in MO patients who underwent a very low-calorie diet before surgery. Hepatic SFRP5 mRNA expression was higher in SS than in NL or NASH; additionally, patients with hepatic inflammation or ballooning presented lower SFRP5 abundance. WNT5A and JNK expression was enhanced in NAFLD compared with NL. In conclusion, circulating SFRP5 levels depend on the diet, and hepatic SFRP5 seems to have a protective role in the first steps of NAFLD; however, SFRP5 could be deregulated in an advanced stage while WNT5A and JNK are activated, promoting liver damage.

**Keywords:** SFRP5; nonalcoholic fatty liver disease; inflammation; liver; noncanonical WNT pathway

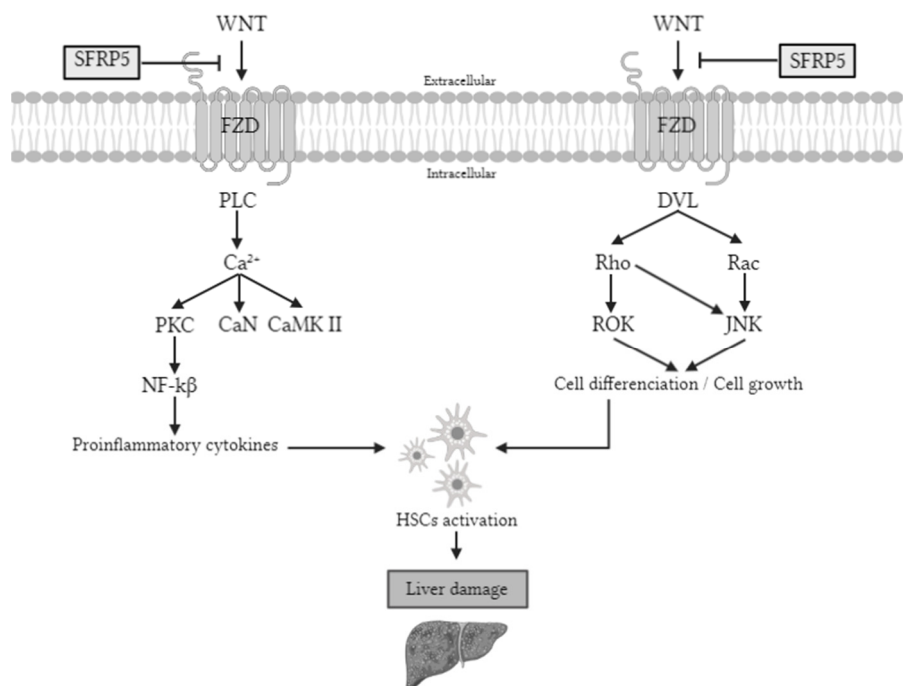
## 1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic metabolic disorder of the liver that has emerged as a major public health concern with a high prevalence rate ranging from 12.9% to 46.0%, depending on the country [1]. NAFLD represents a continuum of liver abnormalities from simple steatosis (SS) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) that can lead to cirrhosis and liver cancer, emerging as an important cause of liver transplant [2–4]. The pathogenesis of NAFLD is complicated and involves environmental and genetic factors, hormone secretion, lipid peroxidation damage, immunological reactions, oxidative stress, abnormal fat metabolism, intestinal dysbiosis, and angiogenesis, which ultimately induce NASH and cirrhosis [5]. However, these mechanisms are not well understood, and effective

methods for preventing and treating NAFLD are still lacking [5]. Therefore, improving the knowledge of the molecular pathways involved in NAFLD pathogenesis is crucial to identify future therapeutic targets.

Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) is an anti-inflammatory adipocytokine member of the SFRP family [6,7] that is an antagonist of the WNT (wingless-*MMTV* integration site) family member 5a (WNT5A), a ligand of WNT pathway [8]. There are two types of WNT signaling pathways: canonical and noncanonical, but SFRP5 is implicated only in the last one. The noncanonical pathway is activated by WNT ligands that bind to the frizzled receptors, followed by the phosphorylation of Jun N-terminal kinase (JNK) that triggers proinflammatory and proliferative processes [8,9].

The SFRP5/WNT5A-mediated noncanonical pathways are associated with the pathogenesis of many inflammation-related diseases [10]. Although it has been reported that WNT signaling is activated during hepatic fibrosis, little is known about its precise mechanism in the liver [11]. Additionally, it is also known that the phosphorylation of JNK is implicated in cell death, cancer, T2DM, and obesity and plays an important role in the activation of liver fibrosis [12]. Therefore, it seems that SFRP5/WNT5A-mediated noncanonical may be involved in NAFLD pathogenesis (Figure 1).



**Figure 1.** Noncanonical WNT pathway signaling. The WNT signaling pathway activates proteins that promote the synthesis of proinflammatory cytokines and cell differentiation. These two processes cause the activation of HSCs, which will cause liver damage if the stimulation persists. However, SFRP5 is able to inhibit the WNT signaling pathway, so the pathway is inactivated, so the liver is protected. PLC, phospholipase C;  $\text{Ca}^{2+}$ , calcium  $^{2+}$ ; PKC, protein kinase C; CaN, serine/threonine-protein phosphatase; CaMK II,  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II; NF- $\kappa\text{B}$ , nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; DVL, disheveled; ROK, rho-associated protein kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; Wnt, wingless-*MMTV* integration site; Sfrp5, secreted frizzled-related protein 5; FZD, frizzled receptor; HSC, hepatic stellate cells.

In this sense, some studies have shown that SFRP5 can regulate metabolic disorders by improving hepatic lipid metabolism, inhibiting the growth of adipocytes [13,14], and alleviating hepatic steatosis [6,9]. Regarding animal models, previous studies reported that SFRP5 is a protective adipokine for glucose tolerance, adipose inflammation, hepatic

steatosis, and fibrosis, and its anti-inflammatory role is perturbed in animal models of obesity with T2DM [14–16]. However, the role of SFRP5 in humans is not clear.

All these facts together suggest that the SFRP5 signaling pathway may be involved in NAFLD pathogenesis. Therefore, the main objective of this study was to investigate the specific role of SFRP5 in NAFLD: on the one hand, analyzing serum SFRP5 levels in women with normal weight (NW) and morbid obesity (MO) with and without NAFLD; and on the other hand, analyzing the relative mRNA hepatic abundance of SFRP5 in women with MO with different degrees of NAFLD. As an additional objective, we wanted to study in the same cohort of patients, mRNA hepatic abundance of WNT5A and JNK, two of the main genes implicated in the noncanonical WNT pathway, and their relationship with NAFLD.

## 2. Results

### 2.1. Baseline Characteristics of Subjects

The clinical characteristics and biochemical measurements of the population are shown in Table 1. We first classified our cohort depending on their body mass index (BMI) as NW (BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>, *n* = 20) and MO (BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>, *n* = 69). Then, those with MO were subclassified according to hepatic histology as normal liver (NL; *n* = 28), SS (*n* = 24), and NASH (*n* = 17), which were comparable in terms of weight, BMI, insulin, homeostatic model assessment method-insulin resistance (HOMA2-IR), glycosylated hemoglobin (HbA1c), cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), TG, aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), systolic blood pressure (SBP), and diastolic blood pressure (DBP).

**Table 1.** Anthropometric and biochemical variables of women in the studied cohort.

Variables	NW ( <i>n</i> = 20)	NL ( <i>n</i> = 28)	MO ( <i>n</i> = 69) SS ( <i>n</i> = 24)	NASH ( <i>n</i> = 17)
Weight (kg)	54.20(51.00–64.25)	116.50(107.25–130.50) *	113.20(108.33–128.00) &	112.00(104.65–125.00) ^
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.97(20.47–23.90)	43.30(40.94–46.47) *	44.35(40.82–46.83) &	44.46(40.76–46.03) ^
Glucose (mg/dL)	90.00(84.00–97.00)	85.50(76.25–93.00)	93.50(85.75–107.00) §	91.00(82.50–101.20)
Insulin (mUI/L)	7.80(4.80–9.90)	9.43(5.59–16.21)	11.27(7.81–14.51) &	6.57(5.09–23.04)
HOMA 2-IR	1.05(0.60–1.30)	1.23(0.75–2.05)	1.49(0.95–2.18)	0.86(0.61–3.00)
HbA1c (%)	4.75(4.50–5.03)	5.40(5.30–5.70) *	5.60(5.25–6.03) &	5.50(5.20–6.10) ^
Cholesterol (mg/dL)	193.98 ± 30.66	171.88 ± 36.20	174.42 ± 35.41 &	185.28 ± 43.39
HDL-C (mg/dL)	63.75 ± 16.03	40.84 ± 9.89 *	42.56 ± 12.38 &	38.89 ± 8.47 ^
LDL-C (mg/dL)	109.99 ± 30.67	108.16 ± 27.94	104.39 ± 31.21	104.62 ± 31.58
TG (mg/dL)	79.50(49.50–149.25)	106.00(89.00–136.00) *	129.50(85.75–175.50) &	140.00(106.00–247.00) ^
AST (UI/L)	19.50(15.75–23.00)	20.50(15.75–36.25)	23.00(17.00–35.00)	24.00(17.00–43.00) ^
ALT (UI/L)	15.00(12.00–21.00)	22.00(16.00–27.00) *	31.00(23.00–35.75) §,&	30.00(15.50–40.00) ^
GGT (UI/L)	12.00(9.00–20.00)	18.00(16.00–27.00)	21.00(16.25–30.50) &	25.00(15.00–27.00) ^
ALP (UI/L)	54.44 ± 14.10	60.42 ± 13.09	75.80 ± 11.66 §,&	62.77 ± 11.16 "
SBP (mmHg)	118.56 ± 10.92	119.00 ± 18.26	120.09 ± 13.41	113.44 ± 13.96
DBP (mmHg)	72.00(68.50–75.00)	63.00(57.75–75.75)	62.00(59.00–72.50)	65.50(56.75–70.75)

MO, morbid obesity; NW, normal weight; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; BMI, body mass index; HOMA2-IR, homeostatic model assessment method-insulin resistance; HbA1c, glycosylated hemoglobin; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; ALP, alkaline phosphatase; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure. Data are expressed as the mean ± standard deviation or median (interquartile range) depends on the distribution of the variables. \* Significant differences between the NW group and the NL group (*p* < 0.05). & Significant differences between the NW group and the SS group (*p* < 0.05). ^ Significant differences between the NW group and the NASH group (*p* < 0.05). § Significant differences between the NL group and the SS group (*p* < 0.05). " Significant differences between the SS group and the NASH group (*p* < 0.05).

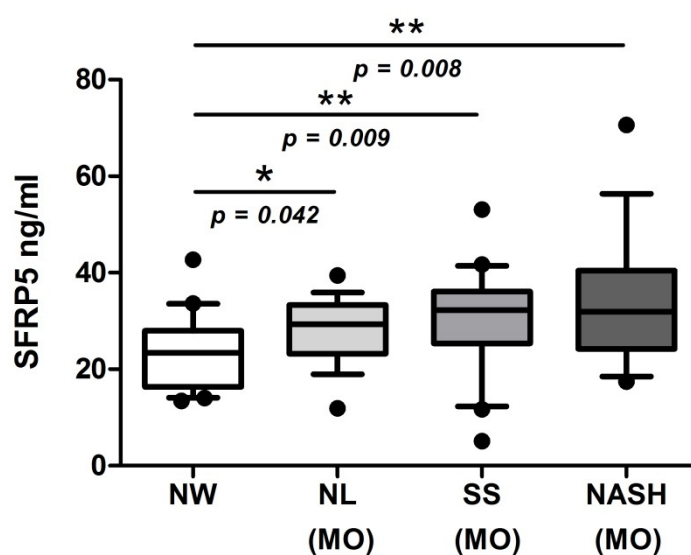
Biochemical analyses indicated that patients with NW had significantly lower weight, BMI, HbA1c, TG, and alanine aminotransferase (ALT) than NL, SS, and NASH groups; also, levels of insulin, GGT, and alkaline phosphatase (ALP) were lower in NW compared to SS; meanwhile, AST and GGT levels of NW subjects were lower compared to NASH patients. On the other hand, our NW subjects presented higher levels of HDL-C than NAFLD patients (NL, SS, and NASH) and enhanced levels of cholesterol than those with SS. In the MO cohort, we found higher levels of glucose, ALT, and ALP in SS subjects



than in the NL group and increased levels of ALP in SS than in the NASH group. It is important to note that any of the patients of our cohort who presented T2DM neither need pharmacological treatment since it has been reported that treatments for diabetes alter SFRP5 levels [13].

## 2.2. Evaluation of Serum SFRP5 Levels According to BMI and Hepatic Histology

To achieve the main objective of this study, we evaluated serum SFRP5 levels in a cohort of women with NW and MO (NL, SS, and NASH). Our results showed significantly lower levels of SFRP5 in NW patients than those with MO, specifically in NL, SS, and NASH subjects, as shown in Figure 2. Unfortunately, we did not find significant differences in SFRP5 levels between NL, SS, and NASH groups.



**Figure 2.** Box plot graphical representation of serum levels of SFRP5 women with NW and women with MO subclassified according to NL, SS, and NASH. NW, normal weight; MO, morbidly obesity; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5. Individual data points outside the maximum and minimum limits represent outliers.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\* means  $p < 0.05$ ; \*\* means  $p < 0.01$ ).

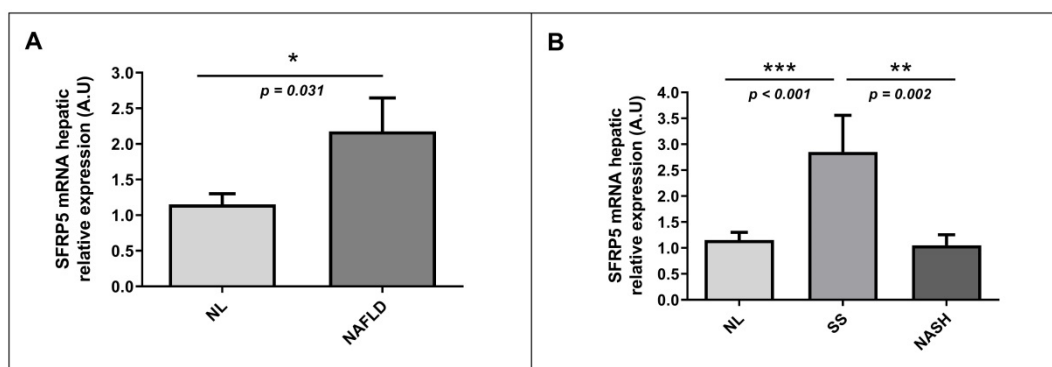
## 2.3. Evaluation of Relative mRNA Abundance of SFRP5 in Liver According to Hepatic Histology

Apart from determining SFRP5 levels in our study cohort, to achieve the main objective of this study, we also evaluated the relative mRNA hepatic abundance of SFRP5 in a cohort of women with MO without or with NAFLD (SS and NASH). First, we classified our patients into NL and NAFLD, and we observed that the hepatic relative mRNA expression of SFRP5 was higher in the NAFLD group than in NL subjects (Figure 3A). Then, when we analyzed hepatic relative mRNA expression of SFRP5 according to different degrees of NAFLD, we found that SFRP5 expression was significantly higher in patients with SS than those with NL or NASH. However, hepatic relative mRNA abundance of SFRP5 did not show significant differences between NL and NASH subjects (Figure 3B).

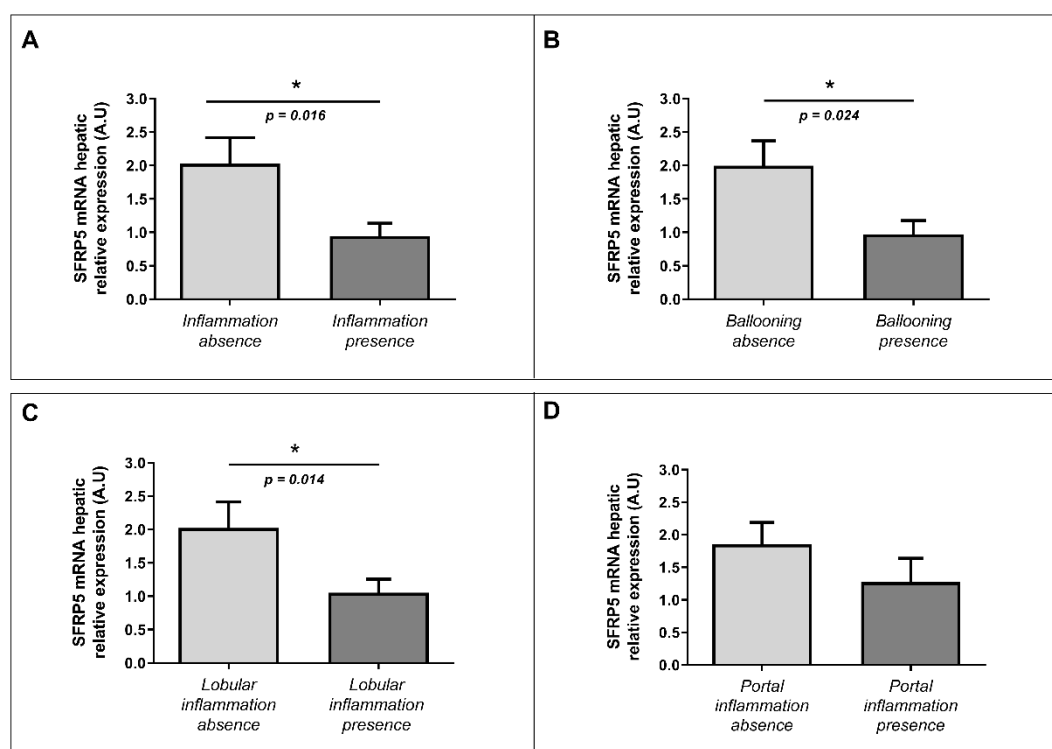
## 2.4. Evaluation of the Relative mRNA Abundance of SFRP5 in Liver According to Liver Inflammation-Related Parameters

First, we wanted to explore the implication of SFRP5 in hepatic inflammation and ballooning processes analyzed under the microscope by an expert pathologist. In this regard, we observed decreased levels of mRNA abundance of SFRP5 in patients with liver inflammation than those without it (Figure 4A). We also found lower levels of mRNA relative abundance of SFRP5 in subjects with hepatic ballooning than those in the absence of it (Figure 4B). Finally, we observed low levels of hepatic mRNA SFRP5 abundance in patients with lobular inflammation than subjects without lobular inflammation (Figure 4C).

There were no significant differences in SFRP5 mRNA hepatic relative expression according to portal inflammation presence or absence (Figure 4D).



**Figure 3.** Differential relative mRNA abundance of SFRP5 in liver between (A) women with MO with NL histology and women with MO with NAFLD and (B) MO women with NL, SS, and NASH. A.U, arbitrary units; MO, morbid obesity; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SFRP5; secreted frizzled-related protein 5.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\* means  $p < 0.05$ ; \*\* means  $p < 0.01$ ; \*\*\* means  $p < 0.001$ ).



**Figure 4.** Differential relative mRNA hepatic expression of SFRP5 between different parameters related to inflammation (ballooning, portal inflammation, and lobular inflammation). Differential relative mRNA abundance of SFRP5 in liver between (A) absence of inflammation and inflammation presence; (B) ballooning absence and ballooning presence; (C) lobular inflammation absence and presence; and (D) portal inflammation absence and presence. A.U, arbitrary units; SFRP5; secreted frizzled-related protein 5.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\* means  $p < 0.05$ ).

### 2.5. Hepatic Expression of Validated Proinflammatory Molecules in SS and NASH Groups

Then, to corroborate the veracity of the expression peak of SFRP5 in SS samples and the downregulation in NASH ones, we have also analyzed the hepatic expression of IL-6 and TNF- $\alpha$ , well-known proinflammatory molecules, in SS and NASH groups. Therefore,



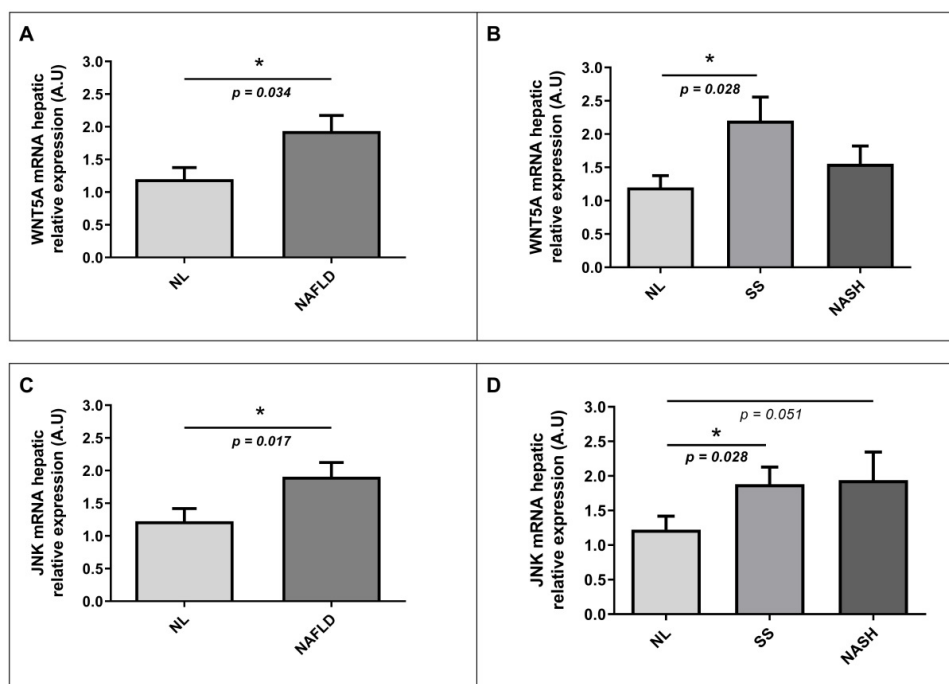
we found significant differences in IL-6 and TNF- $\alpha$  expressions between SS and NASH ( $p = 0.033$ ,  $p = 0.006$ , respectively), as expected.

### 2.6. Correlations of Relative Hepatic mRNA Abundance of SFRP5 with Clinical and Biochemical Parameters and with the Studied Adipocytokines

To deepen the knowledge of the role of SFRP5 in NAFLD pathogenesis, we wanted to analyze correlations between SFRP5 relative expression in the liver with different parameters such as weight, BMI, glucose, insulin, cholesterol, HDL-C, LDL-C, TG, and liver transaminases. In the correlation analysis, we only found a significant positive association between SFRP5 hepatic relative expression and ALP levels ( $\rho = 0.404$ ,  $p = 0.016$ ).

### 2.7. Evaluation of Relative mRNA Abundance of WNT5A and JNK in Liver According to Hepatic Histology

To explore the implication of the WNT signaling pathway in NAFLD pathogenesis, we also wanted to analyze in our study cohort the hepatic mRNA abundance of WNT5A and JNK, two of the main genes involved in the WNT pathway together with SFRP5. On the one hand, we observed significantly higher mRNA relative expression of WNT5A in the liver of NAFLD patients than those with NL histology, as shown in Figure 5A. Moreover, when we analyzed the hepatic relative mRNA abundance of WNT5A according to different degrees of NAFLD, we found that WNT5A hepatic expression was significantly enhanced in patients with SS than those with NL or NASH (Figure 5B). On the other hand, we observed higher levels of hepatic JNK relative expression in NAFLD patients than NL subjects (Figure 5C). Additionally, we also found increased levels of hepatic mRNA abundance of JNK in SS patients than those with NL, as was graphically represented in Figure 5D.



**Figure 5.** Differential relative mRNA abundance of WNT5A in liver between (A) women with MO and NL histology and women with MO with NAFLD; (B) women with MO with NL histology, women with MO with SS, and women with MO with NASH. Differential relative mRNA abundance of JNK in liver between (C) women with MO with NL histology and women with MO with NAFLD; (D) women with MO with NL histology, women with MO with SS, and women with MO with NASH. A.U, arbitrary units; MO, morbidly obesity; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; WNT5A, WNT family member 5a; JNK, Jun N-terminal kinase.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\* means  $p < 0.05$ ).

### 2.8. Correlations of Relative Hepatic mRNA Abundance of WNT5A and JNK with Clinical, Biochemical, and Other Parameters

On the one hand, we found significant correlations between WNT5A relative hepatic expression and GGT. In addition, a positive correlation between WNT5A and SFRP5 relative hepatic expressions existed (Table 2).

**Table 2.** Significant correlations between WNT5A relative hepatic expression with clinical and biochemical parameters and with SFRP5 and JNK hepatic expressions.

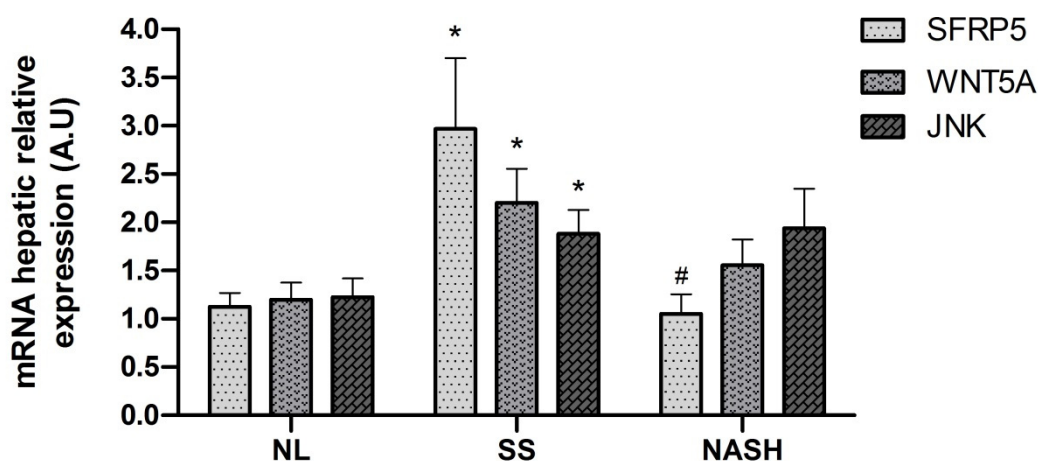
Variables	WNT5A mRNA Hepatic R.E.	
	<i>rho</i>	<i>p</i> -Value
GGT (UI/L)	0.318	0.033
SFRP5 hepatic R.E.	0.535	<0.001
JNK hepatic R.E.	0.846	<0.001

SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; JNK, Jun N-terminal kinase; GGT, gamma-glutamyltransferase; R.E., relative expression. Relative expression was calculated with 18s RNA as a housekeeping gene. Data are expressed as the correlation coefficient *rho* of Spearman and *p*-value ( $p < 0.05$  was considered statistically significant).

On the other hand, when we analyzed correlations between JNK relative expression in liver and clinical and biochemical parameters and SFRP5 and WNT5A hepatic expressions, we found some associations, which are shown in Table 3.

### 2.9. Evaluation of Relative mRNA Abundance of SFRP5, WNT5A and JNK in Liver According to Hepatic Histology

Given that SFRP5, WNT5A, and JNK mRNA hepatic abundance have shown a differential expression in NAFLD compared to NL subjects, we wanted to compare these expressions among them, according to the histopathological classification of the liver, as was represented in Figure 6. In this sense, the relative mRNA abundance of SFRP5, WNT5A, and JNK of NL subjects showed similar expression levels. Nevertheless, in the SS group, we found increased mRNA expressions of SFRP5, WNT5A, and JNK than NL, but SFRP5 showed a higher increase compared to the other genes. In contrast, when we analyzed the NASH cohort, we observed that the mRNA expression was decreased again in SFRP5 and WNT5A, but this reduction was only significant in SFRP5.



**Figure 6.** Differential relative mRNA abundance of SFRP5, WNT5A, and JNK in the liver. Differential relative mRNA abundance of SFRP5, WNT5A, and JNK in the liver of women with MO subclassified by NL, SS, and NASH. MO, morbid obesity; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; JNK, Jun N-terminal kinase; A.U, arbitrary units. \* Significant differences between the NL group and the SS group ( $p < 0.05$ ). # Significant differences between SS group and NASH group ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Significant correlations between JNK relative hepatic expression with clinical and biochemical parameters and with SFRP5 and JNK hepatic expressions.

Variables	JNK mRNA Hepatic R.E.	
	<i>rho</i>	<i>p</i> -Value
SFRP5 hepatic R.E.	0.513	0.001
WNT5A hepatic R.E.	0.846	<0.001

SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; R.E., relative expression. Relative expression was calculated with 18s RNA as a housekeeping gene. Data are expressed as the correlation coefficient *rho* of Spearman and *p*-value ( $p < 0.05$  was considered statistically significant).

### 3. Discussion

The main novelty of the present study is that we analyzed in a well-characterized cohort of women with MO and NAFLD the involvement of SFRP5 and the noncanonical WNT pathway in NAFLD pathogenesis. In this sense, although we did not find significant differences in serum SFRP5 levels between patients with or without NAFLD, we reported increased hepatic mRNA abundance of SFRP5 in patients with SS in contrast to those with NL or NASH. Moreover, we also found enhanced mRNA hepatic expressions of WNT5A and JNK, two of the main genes involved in the noncanonical WNT pathway, in SS compared to NL.

In the first instance, regarding obesity, we reported higher serum SFRP5 levels in patients with MO than NW subjects. These results are contrary to previous studies since Hu et al. showed that subjects with obesity had lower circulating SFRP5 levels compared to subjects with NW [13]. Moreover, Tan et al. demonstrated low SFRP5 levels in children with obesity [17]. This contradiction can be explained because our MO patients underwent a very low-calorie diet 3 months before the bariatric surgery, while our NW subjects followed a normal diet before the blood extraction. In this regard, the Tan et al. and Hu et al. cohorts of patients did not follow this type of strict diet. Additionally, some of the children with obesity in Tan et al.'s study underwent a reduction in caloric intake and reported an increase in SFRP5 levels after this lifestyle intervention [17], the same that occurred in our study. In addition, it should be taken into account that in both articles, they use male subjects; moreover, Tan et al.'s cohort is formed by children. Meanwhile, we studied adult women. This fact is also supported by a previous human study that demonstrated that SFRP5 can be used as a biomarker of the anti-inflammatory effect after caloric restriction [18]. Regarding our cohort with NAFLD, we did not find significant differences in SFRP5 serum levels between NL, SS, and NASH. Our results agree with Gutiérrez-Vidal et al., who reported non-significant differences between NAFLD groups neither between the first steps of fibrosis [19]. Regarding fibrosis, we could not perform this analysis because, in our study, any patient with NASH did not present hepatic fibrosis.

Later, we analyzed mRNA relative abundance of SFRP5 in the liver from MO patients with or without NAFLD. We reported increased expression of hepatic mRNA SFRP5 in NAFLD patients than NL ones; and then, when we classified our NAFLD subjects in SS and NASH, we observed higher expression in the SS group than NL and also than NASH patients. In this sense, there is only one previous human study in which they have analyzed hepatic mRNA expression of SFRP5 in NAFLD. They reported a decrease in SFRP5 expression in the liver as NAFLD progresses. However, when the data is deeply analyzed, this reduction was not significant between controls and SS subjects, but it was significant between controls and the NASH group [19]. These discrepancies can be given due to the fact that Gutierrez-Vidal et al. used the expression of actin- $\beta$  to standardize the hepatic abundance of SFRP5 [19], while we used 18s expression, and also, they did not normalize the expression in relation to the control group. Moreover, given that inflammation and ballooning are two of the main findings of NASH [20], we wanted to explore the SFRP5 abundance differences according to the presence or absence of inflammation (portal and lobular) and hepatic ballooning. Our results showed that SFRP5 was lower in patients with general inflammation, lobular inflammation, and ballooning. These results can be

explained by the fact that SFRP5 is an anti-inflammatory molecule that seems to have a protective role in the first steps of hepatic steatosis, but then the inflammation seems to deregulated SFRP5 signaling, blocking its inhibition of the noncanonical WNT pathway, which promotes NAFLD progression.

Since it was reported that the noncanonical WNT pathway involving JNK activation had been implicated in fatty liver disease [11,14], we wanted to study the hepatic relative mRNA expression of WNT5A and JNK to add new knowledge about the role of this pathway in NAFLD pathogenesis. On the one hand, we found higher relative mRNA WNT5A expression in patients with NAFLD than those with NL histology; concretely, we observed significantly enhanced expression in SS subjects than NL ones. On the other hand, we reported increased expression of JNK in NAFLD; in detail, we found higher levels in SS than in NL. However, we could not find significant differences in hepatic WNT5A and JNK expressions between SS and NASH patients. In this regard, our results support the fact that WNT5A and JNK are upregulated in NAFLD, triggering noncanonical WNT signaling that promotes liver damage [21], but we could not demonstrate that this pathway is increased in an advanced stage of NAFLD, such as NASH. In this regard, WNT5A and JNK hepatic expression analysis in NAFLD human subjects is a novelty, but our results seemed to agree with other studies assessed in animal models, such as Wang J. et al., who observed that the WNT pathway could play a key role in hepatic stellate cell activation and proliferation that trigger liver regeneration [11]. Moreover, Wang S. et al. postulated an association between the noncanonical WNT pathway and NAFLD, liver inflammation, and fibrosis [21]. Additionally, Kodama et al. indicated that blocking JNK may prevent the development of steatosis in mice models [22], which could represent a therapeutic target for this disease. Furthermore, Hirosumi et al. said that the activation of JNK was observed in the liver of obese mice, and Jnk1 knockout mice were protected from the development of obesity and insulin resistance [23].

At last, we observed a correlation between hepatic mRNA expression of WNT5A and GGT. In this sense, Coccia et al. demonstrated that GGT levels significantly increase with steatosis and fibrosis grade [24]. Moreover, we could demonstrate that hepatic mRNA expression of SFRP5, WNT5A, and JNK was correlated. This fact was explained because the three genes significantly increased in the steatosis state, but only SFRP5 expression significantly decreased in NASH, while WNT5A and JNK were maintained. Thus, it seems that in the first states of NAFLD, SFRP5 competes against the activation of the WNT pathway as a protective molecule. Then, in an advanced stage of liver damage and inflammation, its effects seem to be deregulated, and noncanonical WNT pathway signaling is activated, triggering NAFLD progression.

In this study, our cohort of women with MO has made it possible to establish some relationships between the WNT pathway (SFRP5, WNT5A, and JNK) and NAFLD without the interference of such confounding factors as sex or age. However, these results cannot be extrapolated to men, other obesity groups, or patients who do not follow a caloric restriction. Further studies, including these cohorts, would be useful in order to validate our findings.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Subjects

The institutional review board (Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) CEIm; 23c/2015; 11 May 2015) approved the study, and all participants provided written informed consent. The study population consisted of 89 Caucasian women: 20 with NW (BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>) and 69 with MO (BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>). Liver biopsies were obtained during planned laparoscopic bariatric surgery. All liver biopsies were indicated for clinical diagnosis. The exclusion criteria were as follows: (1) subjects who had alcohol consumption higher than 10 g/day; (2) patients who had acute or chronic hepatic, inflammatory, infectious, or neoplastic diseases; (3) women who were menopausal or undergoing contraceptive

treatment; (4) women with diabetes receiving pioglitazone or insulin; and (5) patients treated with antibiotics in the previous 4 weeks.

#### 4.2. Sample Size

Accepting an  $\alpha$  risk of 0.05 and a  $\beta$  risk of less than 0.2 in a bilateral contrast, 24 subjects per group were needed to detect a difference  $\geq 0.2$  units. It is assumed that the common standard deviation is 0.3.

#### 4.3. Liver Pathology

Liver samples were stained with hematoxylin and eosin and Manson's trichrome stains and scored by experienced hepatopathologists using the methods described elsewhere [25]. Hepatic samples were evaluated depending on the presence and the degree of macrovesicular steatosis to diagnose simple steatosis, and also portal and lobular inflammation, fibrosis (intensity and location), hepatocellular ballooning, and Mallory's hyaline to identify NASH samples. Samples with less than 5% of macrovesicular steatosis without the presence of inflammation were defined as the normal liver. According to their liver pathology, women with MO were classified into NL histology ( $n = 28$ ) and NAFLD ( $n = 41$ ). Then, patients were subclassified into NL histology ( $n = 28$ ), SS (micro/macrovesicular steatosis without inflammation or fibrosis,  $n = 24$ ), and NASH (Brunt grades 1–2,  $n = 17$ ). None of the patients with NASH in our cohort presented fibrosis or cirrhosis.

#### 4.4. Biochemical Analyses

All of the subjects included underwent physical, anthropometric, and biochemical assessments. Blood extraction was performed by specialized nurses through a BD Vacutainer® system after overnight fasting before bariatric surgery. Venous blood samples were obtained using empty and ethylenediaminetetraacetic acid tubes, which were separated into plasma and serum aliquots by centrifugation (3500 rpm, 4 °C, 15 min). Biochemical parameters were analyzed using a conventional automated analyzer. Insulin resistance was estimated using HOMA2-IR.

Peripheral SFRP5 levels were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Ref. BA E-8900, Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany).

#### 4.5. Gene Expression in the Liver

Liver samples collected during bariatric surgery were conserved in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) at 4 °C and then processed and stored at  $-80$  °C. Total RNA was extracted from the tissue by using the RNeasy mini kit (Qiagen, Barcelona, Spain). Reverse transcription to cDNA was performed with the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Real-time quantitative PCR was performed with the TaqMan Assay predesigned by Applied Biosystems for the detection of SFRP5 (Hs00169366\_m1), JNK (Hs01548508\_m1), WNT5A (Hs00998537\_m1), IL-6 (Hs00174131\_m1), and TNF- $\alpha$  (Hs02621508\_s1). The expression of each gene was calculated relative to the expression of 18s RNA (Fn04646250\_s1), and then it was normalized using the control group (NL) as a reference. All reactions were carried in duplicate in 96-well plates using the 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

#### 4.6. Statistical Analysis

The data were analyzed using the SPSS/PC+ for Windows statistical package (version 23.0; SPSS, Chicago, IL, USA). The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the distribution of variables. Continuous variables were reported as the mean (SD); non-continuous variables were reported as the median and the interquartile range. The different comparative analyses were performed using a nonparametric Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis test, according to the presence of two or more groups. The strength of the



association between variables was calculated using Spearman's method.  $p$ -values  $< 0.05$  were statistically significant.

## 5. Conclusions

Circulating SFRP5 levels increase after caloric restriction in subjects with MO regardless of NAFLD status. However, hepatic SFRP5 could have a protective role in the first steps of NAFLD in an attempt to inhibit the noncanonical WNT pathway but could be deregulated at the advanced stage of the disease while WNT5A and JNK are activated, thus promoting liver damage.

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

**Funding:** This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the project PI16/00498 (to Teresa Auguet) (co-funded by the European Regional Development Fund, "A way to make Europe"), by funds from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca (AGAUR 2017 SGR 357 to Cristóbal Richart) and the Grup de Recerca en Medicina Aplicada URV (2016PFR-URV-B2-72 to Cristóbal Richart), and by the Fundación Biociencia.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) CEIm; 23c/2015; 11 May 2015.

**Informed Consent Statement:** Signed written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

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

## Abbreviations

ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
BMI	Body mass index
DBP	Diastolic blood pressure
GGT	Gamma-glutamyltransferase
HbA1c	Glycosylated hemoglobin
HCC	Hepatocellular carcinoma
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
HOMA2-IR	Homeostatic model assessment method-insulin resistance
IL	Interleukin
JNK	Jun N-terminal kinase
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
MetS	Metabolic syndrome
MO	Morbid obesity
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NL	Normal liver
NW	Normal weigh
SBP	Systolic blood pressure
SFRP5	Secreted frizzled-related protein 5
SS	Simple steatosis

T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TG	Triglycerides
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
WNT	Wingless-MMTV integration site
WNT5A	WNT family member 5a

## References

1. Araújo, A.R.; Rosso, N.; Bedogni, G.; Tiribelli, C.; Bellentani, S. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease/Non-Alcoholic Steatohepatitis: What We Need in the Future. *Liver Int.* **2018**, *38*, 47–51. [[CrossRef](#)]
2. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fazel, Y.; Koenig, A.B.; Sayiner, M.; Goodman, Z.D.; Younossi, Z.M. Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism* **2016**, *65*, 1017–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Neuman, M.G.; Cohen, L.B.; Nanau, R.M. Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *28*, 607–618. [[CrossRef](#)]
5. Buzzetti, E.; Pinzani, M.; Tsochatzis, E.A. The Multiple-Hit Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Metabolism* **2016**, *65*, 1038–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chen, L.; Zhao, X.; Liang, G.; Sun, J.; Lin, Z.; Hu, R.; Chen, P.; Zhang, Z.; Zhou, L.; Li, Y. Recombinant SFRP5 Protein Significantly Alleviated Intrahepatic Inflammation of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 56. [[CrossRef](#)]
7. Zhao, A.; Jiang, F.; Yang, G.; Liu, H.; Li, L. Sfrp5 Interacts with Slurp1 to Regulate the Accumulation of Triglycerides in Hepatocyte Steatosis Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *512*, 256–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Liu, L.-B.; Chen, X.-D.; Zhou, X.-Y.; Zhu, Q. The Wnt Antagonist and Secreted Frizzled-Related Protein 5: Implications on Lipid Metabolism, Inflammation, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180011. [[CrossRef](#)]
9. Mori, H.; Prestwich, T.C.; Reid, M.A.; Longo, K.A.; Gerin, I.; Cawthorn, W.P.; Susulic, V.S.; Krishnan, V.; Greenfield, A.; MacDougald, O.A. Secreted Frizzled-Related Protein 5 Suppresses Adipocyte Mitochondrial Metabolism through WNT Inhibition. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2405–2416. [[CrossRef](#)]
10. Tong, S.; Ji, Q.; Du, Y.; Zhu, X.; Zhu, C.; Zhou, Y. Sfrp5/Wnt Pathway: A Protective Regulatory System in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J. Interferon Cytokine Res.* **2019**, *39*, 472–482. [[CrossRef](#)]
11. Wang, J.; Li, L.; Li, L.; Yan, Q.; Li, J.; Xu, T. Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Liver Fibrosis. *Gene* **2018**, *674*, 57–69. [[CrossRef](#)]
12. Delogu, W.; Caligiuri, A.; Provenzano, A.; Rosso, C.; Bugianesi, E.; Coratti, A.; Macias-Barragan, J.; Galastri, S.; Di Maira, G.; Marra, F. Myostatin Regulates the Fibrogenic Phenotype of Hepatic Stellate Cells via C-Jun N-Terminal Kinase Activation. *Dig. Liver Dis.* **2019**, *51*, 1400–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hu, W.; Li, L.; Yang, M.; Luo, X.; Ran, W.; Liu, D.; Xiong, Z.; Liu, H.; Yang, G. Circulating Sfrp5 Is a Signature of Obesity-Related Metabolic Disorders and Is Regulated by Glucose and Liraglutide in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 290–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ouchi, N.; Higuchi, A.; Ohashi, K.; Oshima, Y.; Gokce, N.; Shibata, R.; Akasaki, Y.; Shimono, A.; Walsh, K. Sfrp5 Is an Anti-Inflammatory Adipokine That Modulates Metabolic Dysfunction in Obesity. *Science* **2010**, *329*, 454–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rauch, A.; Mandrup, S. Lighting the Fat Furnace without SFRP5. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2349–2352. [[CrossRef](#)]
16. Li, Y.; Tian, M.; Yang, M.; Yang, G.; Chen, J.; Wang, H.; Liu, D.; Wang, H.; Deng, W.; Zhu, Z.; et al. Central Sfrp5 Regulates Hepatic Glucose Flux and VLDL-Triglyceride Secretion. *Metabolism* **2020**, *103*, 154029. [[CrossRef](#)]
17. Tan, X.; Wang, X.; Chu, H.; Liu, H.; Yi, X.; Xiao, Y. SFRP5 Correlates with Obesity and Metabolic Syndrome and Increases after Weight Loss in Children. *Clin. Endocrinol.* **2014**, *81*, 363–369. [[CrossRef](#)]
18. Schulte, D.M.; Müller, N.; Neumann, K.; Oberhäuser, F.; Faust, M.; Güdelhöfer, H.; Brandt, B.; Krone, W.; Laudes, M. Pro-Inflammatory Wnt5a and Anti-Inflammatory SFRP5 Are Differentially Regulated by Nutritional Factors in Obese Human Subjects. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32437. [[CrossRef](#)]
19. Gutiérrez-Vidal, R.; Vega-Badillo, J.; Reyes-Fermín, L.M.; Hernández-Pérez, H.A.; Sánchez-Muñoz, F.; López-Álvarez, G.S.; Larrieta-Carrasco, E.; Fernández-Silva, I.; Méndez-Sánchez, N.; Tovar, A.R.; et al. SFRP5 Hepatic Expression Is Associated with Non-Alcoholic Liver Disease in Morbidly Obese Women. *Ann. Hepatol.* **2015**, *14*, 666–674. [[CrossRef](#)]
20. Farrell, G.C.; van Rooyen, D.; Gan, L.; Chitturi, S. NASH Is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* **2012**, *6*, 149–171. [[CrossRef](#)]
21. Wang, S.; Song, K.; Srivastava, R.; Dong, C.; Go, G.-W.; Li, N.; Iwakiri, Y.; Mani, A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Noncanonical Wnt and Its Rescue by Wnt3a. *FASEB J.* **2015**, *29*, 3436–3445. [[CrossRef](#)]
22. Kodama, Y.; Kisseleva, T.; Iwaisako, K.; Miura, K.; Taura, K.; De Minicis, S.; Österreicher, C.H.; Schnabl, B.; Seki, E.; Brenner, D.A. C-Jun N-Terminal Kinase-1 From Hematopoietic Cells Mediates Progression From Hepatic Steatosis to Steatohepatitis and Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 1467–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Görgün, C.Z.; Uysal, K.T.; Maeda, K.; Karin, M.; Hotamisligil, G.S. A Central Role for JNK in Obesity and Insulin Resistance. *Nature* **2002**, *420*, 333–336. [[CrossRef](#)]

- 
24. Coccia, F.; Testa, M.; Guarisco, G.; Bonci, E.; Di Cristofano, C.; Silecchia, G.; Leonetti, F.; Gastaldelli, A.; Capoccia, D. Noninvasive Assessment of Hepatic Steatosis and Fibrosis in Patients with Severe Obesity. *Endocrine* **2020**, *67*, 569–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  25. Brunt, E.M.; Neuschwander-Tetri, B.A. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 2467–2474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



## 4.2 SEGON ESTUDI






International Journal of  
Molecular Sciences



Article

### Increased Secreted Frizzled-Related Protein 5 mRNA Expression in the Adipose Tissue of Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity

Laia Bertran <sup>1,\*</sup> , Marta Portillo-Carrasquer <sup>1,\*</sup> , Andrea Barrientos-Riosalido <sup>1</sup>, Carmen Aguilar <sup>1</sup>, David Riesco <sup>2</sup>, Salomé Martínez <sup>3</sup>, Amada Culebradas <sup>4</sup>, Margarita Vives <sup>4</sup>, Fàtima Sabench <sup>4</sup>, Daniel Del Castillo <sup>4</sup>, Cristóbal Richart <sup>1,2</sup> and Teresa Auguet <sup>1,2,\*</sup> 

**Figura 16:** Bertran, L.; Portillo-Carrasquer, M.; Barrientos-Riosalido, A.; Aguilar, C.; Riesco, D.; Martínez, S.; Culebradas, A.; Vives, M.; Sabench, F.; Castillo, D.D.; Richart, C.; Auguet, T. Increased Secreted Frizzled-Related Protein 5 mRNA Expression in the Adipose Tissue of Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9871. <https://doi.org/10.3390/ijms23179871>

**TÍTOL:** Expressió incrementada de l'ARNm de la proteïna 5 secretada similar a *frizzled* en el teixit adipós de dones amb la malaltia del fetge gras no alcohòlic associada a l'obesitat.

**AUTORS:** [Laia Bertran](#)<sup>1</sup>, Marta Portillo-Carrasquer<sup>1</sup>, Andrea Barrientos-Riosalido<sup>1</sup>, Carmen Aguilar <sup>1</sup>, David Riesco<sup>2</sup>, Salomé Martínez<sup>3</sup>, Amada Culebradas<sup>4</sup>, Margarita Vives<sup>4</sup>, Fàtima Sabench<sup>4</sup>, Daniel Del Castillo<sup>4</sup>, Cristóbal Richart<sup>1,2</sup> i Teresa Auguet<sup>1,2,\*</sup>

**AFILIACIONS:** <sup>1</sup>Grup de Recerca GEMMAIR, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV). <sup>2</sup> Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. <sup>3</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. <sup>4</sup> Servei de Cirurgia, Hospital Sant Joan de Reus, Departament de Medicina i Cirurgia, URV, IISPV

**PUBLICACIÓ:** L'estat de la publicació és PUBLICAT el dia 30 d'agost de 2022 a la revista International Journal of Molecular Sciences (IJMS) que pertany al Q1 i té un factor d'impacte de 6.208 (JCR, 2021).

#### RESUM:

**INTRODUCCIÓ:** Evidències prèvies han suggerit el paper protector i antiinflamatori que pot tenir la proteïna SFRP5 en front a desequilibris metabòlics com la resistència a la insulina. És per aquesta mateixa raó que es creu que l'adipoquina SFRP5, antagonista de la via de WNT5A, podria tenir un paper rellevant en la patogènia de la MFGNA. Tot i això, no es coneixen els mecanismes precisos pels quals aquesta relació es podria donar.



#### 4. RESULTATS

---

**OBJECTIU:** Avaluar el paper de la via SFRP5/WNT5A-PPAR $\gamma$  en el teixit adipós (SAT i VAT) i la seva relació amb l'obesitat i amb la MFGNA, per a entendre la implicació de la via de SFRP5 en l'eix teixit adipós-fetge.

**MATERIALS I MÈTODES:** La nostra cohort està formada per 60 dones amb OM subclassificades segons la seva histopatologia hepàtica en: HHN (n=20), ES (n=21) i EHNA (n=19), i 15 dones amb PN. Hem utilitzat RT-qPCR per avaluar l'expressió d'ARNm de SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  en mostres SAT i VAT.

**RESULTATS:** Els nostres resultats van mostrar que SFRP5 i WNT5A tenen una major expressió d'ARNm en VAT que en SAT. Després, vam observar un augment de l'expressió d'ARNm de SFRP5 en VAT i una expressió més baixa de WNT5A en SAT en dones amb OM en comparació amb les que tenien PN. També, vam trobar una expressió elevada de SFRP5 en l'EHNA en SAT i en ES lleu i EHNA en VAT; mentre que vam observar una expressió més alta de WNT5A en ES en comparació amb el HHN en SAT, i un pic d'expressió de WNT5A en el VAT dels pacients amb ES lleu. Per tant, vam informar d'una expressió d'ARNm augmentada de SFRP5 en SAT i VAT en pacients amb MFGNA associada a obesitat, cosa que suggereix una implicació de la via SFRP5/WNT5A en la patogènesi de la MFGNA, probablement a causa de l'eix teixit adipós-fetge. A més, vam informar d'algunes correlacions entre SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  i les citocines inflamatòries circulants.

**CONCLUSIÓ:** Hem demostrat un relació entre la via SFRP5 en el teixit adipós i la MFGNA associada a obesitat. Aquest estudi suggereix que l'augment d'expressió de SFRP5 al VAT sembla tenir un paper protector en els primers estadis de la MFGNA, mentre que l'augment de WNT5A sembla promoure el desequilibri metabòlic. Així mateix, la via SFRP5/WNT5A podria tenir un paper rellevant en la patogènesi de la MFGNA associada a obesitat, probablement a través de l'eix teixit adipós-fetge; no obstant, els mecanismes pels quals es du a terme aquesta interacció segueixen sent esquius, i per tant, calen més investigacions en aquest camp.



Article

# Increased Secreted Frizzled-Related Protein 5 mRNA Expression in the Adipose Tissue of Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity

Laia Bertran <sup>1,†</sup> , Marta Portillo-Carrasquer <sup>1,†</sup> , Andrea Barrientos-Riosalido <sup>1</sup>, Carmen Aguilar <sup>1</sup>, David Riesco <sup>2</sup>, Salomé Martínez <sup>3</sup>, Amada Culebradas <sup>4</sup>, Margarita Vives <sup>4</sup>, Fàtima Sabench <sup>4</sup>, Daniel Del Castillo <sup>4</sup>, Cristóbal Richart <sup>1,2,\*</sup> and Teresa Auguet <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Grup de Recerca GEMMAIR (AGAUR)—Medicina Aplicada (URV), Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43007 Tarragona, Spain
- <sup>2</sup> Servei Medicina Interna, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain
- <sup>3</sup> Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain
- <sup>4</sup> Servei de Cirurgia, Hospital Sant Joan de Reus, Departament de Medicina i Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili (URV), IISPV, Avinguda Doctor Josep Laporte, 2, 43204 Reus, Spain
- \* Correspondence: tauguet.hj23.ics@gencat.cat; Tel.: +34-977-29-58-33
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Bertran, L.; Portillo-Carrasquer, M.; Barrientos-Riosalido, A.; Aguilar, C.; Riesco, D.; Martínez, S.; Culebradas, A.; Vives, M.; Sabench, F.; Castillo, D.D.; et al. Increased Secreted Frizzled-Related Protein 5 mRNA Expression in the Adipose Tissue of Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9871. <https://doi.org/10.3390/ijms23179871>

Academic Editors: Nobuyuki Takahashi and Jérôme Roy

Received: 25 July 2022

Accepted: 29 August 2022

Published: 30 August 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/>).

**Abstract:** Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) is an anti-inflammatory adipocytokine secreted by adipocytes that seems to be linked with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). We aimed to evaluate the role of the SFRP5-wingless-*MMTV* integration site family member 5a (WNT5A) pathway, closely related to adipogenesis, in subcutaneous (SAT) and visceral adipose tissues (VAT) and its relationship with obesity-related NAFLD. Our cohort was composed of 60 women with morbid obesity (MO), who underwent hypocaloric diet, subclassified according to their hepatic histopathology and 15 women with normal weight. We observed increased SFRP5 mRNA expression in VAT and lower WNT5A expression in SAT in MO compared to normal weight. We found elevated SFRP5 expression in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in SAT and in mild simple steatosis (SS) and NASH in VAT. We observed higher WNT5A expression in SS compared to normal liver in SAT, and a peak of WNT5A expression in mild SS. To conclude, we reported increased SFRP5 mRNA expression in SAT and VAT of NAFLD-related to obesity subjects, suggesting an implication of the SFRP5-WNT5A pathway in NAFLD pathogenesis, probably due to the adipose tissue-liver axis. Since the mechanisms by which this potential interaction takes place remain elusive, more research in this field is needed.

**Keywords:** secreted frizzled-related protein 5; non-alcoholic fatty liver disease; obesity; adipose tissue-liver axis

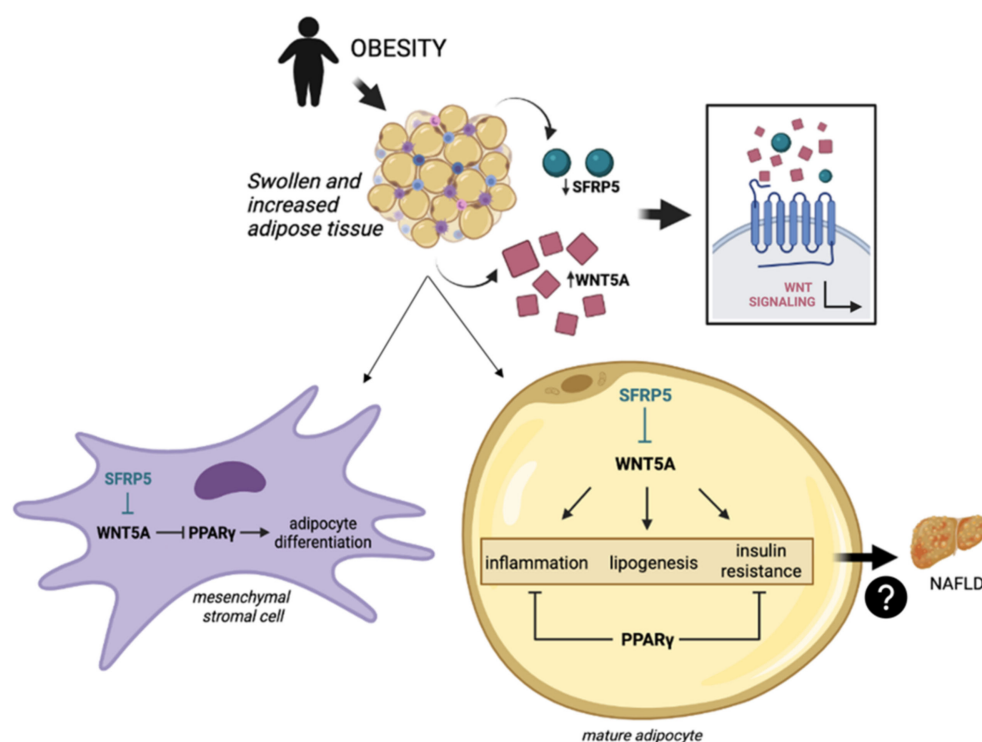
## 1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a complex metabolic disorder due to the interaction between genetic, hormonal and nutritional factors [1]. NAFLD is characterized by fatty accumulation in the liver in a higher proportion than 5% in the absence of secondary causes. This pathology concerns both hepatic simple steatosis (SS), the most benign state, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [2,3], which is the severe form of the disease, since it can evolve to cirrhosis and hepatocellular carcinoma if left untreated [4]. NAFLD prevalence has increased in parallel with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and obesity, two of its most important comorbidities [2,5,6].

Obesity is defined as an increased accumulation of fat, mainly in visceral adipose tissue (VAT) but also in subcutaneous adipose tissue (SAT), which can lead to chronic low-grade

inflammation and oxidative stress [7–9]. The most important functions of adipose tissue are storing the body's excess energy and acting as an endocrine organ for the regulation of metabolic homeostasis through the release of hormones and adipokines [10,11]. While VAT drains directly to the portal circulation of the liver [12] and seems to be directly associated with hepatic steatosis, liver inflammation and fibrosis [13–15], the relationship between SAT and NAFLD seems to lie in the transcriptome and macrophage phenotype [16].

Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) is an anti-inflammatory cytokine produced and secreted by adipocytes of adipose tissue [17,18]. Considering the crosstalk of adipokines between adipose tissue and liver [19], some authors have linked SFRP5 functions to NAFLD [7,20]. This adipokine acts as an antagonist of the wingless-MMTV integration site (WNT) family member 5a (WNT5A), inhibiting WNT pathway activation. On the one hand, WNT signaling suppress adipogenesis during several stages of adipocyte differentiation [21]. On the other hand, in mature adipocytes, WNT pathway triggers pro-inflammatory, proliferative [20,22] and lipogenic outcomes [23]. These stimuli in adipose tissue result in the release of pro-inflammatory factors and free fatty acids that could contribute to the onset and progression of NAFLD, as described [24]. However, the molecular mechanism by which this possible interaction occurs is still unknown, and contradictory results have been reported regarding the function of the SFRP5 in adipose tissue [25,26]. The potential interrelationship between these pathways is graphically detailed in Figure 1.



**Figure 1.** Obesity, the main comorbidity of NAFLD [2,5,6], causes chronic low-grade inflammation of the adipose tissue, leading to an upregulation of WNT5A [27,28] and a decrease in SFRP5 [26]. In mesenchymal stromal cells, WNT5A inhibits the adipogenesis by blocking PPAR $\gamma$  [21]. In mature adipocytes, WNT5A triggers an inflammatory response, lipogenic outcomes and insulin resistance [23,29,30], while PPAR $\gamma$  exhibits anti-inflammatory properties and acts as an insulin sensitizer [31,32]. These signs of metabolic breakdown could negatively affect the liver, making it susceptible to NAFLD occurrence [33,34]. NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT, wingless-MMTV integration site; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

Previous reports have demonstrated the protective anti-inflammatory role of SFRP5 in animal [17,25,26,35,36] and human models [26,37]. In contrast, WNT signaling is activated during liver fibrosis, although its mechanism is still unclear [38]. In this regard, further study to develop new anti-inflammatory strategies, such as SFRP5 enhancing action, may prevent NAFLD progression to NASH or even ameliorate NASH condition [39–41]. Moreover, since adipogenesis [42], insulin resistance [32] and oxidative stress have an important role in NAFLD development [43], proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), a downstream mediator of the WNT cascade, is likely involved in the prevention of NASH progression [7,44].

Similarly, in our previous study, we evaluated SFRP5 serum levels and hepatic SFRP5, WNT5A and c-Jun N-terminal kinase (JNK), an intermediate of the noncanonical WNT5A pathway, mRNA expression in patients with morbid obesity (MO) and NAFLD. First, we reported higher serum levels of SFRP5 in a normal weight (NW) cohort than in MO patients and a higher hepatic expression of SFRP5 in patients with SS than in patients with normal liver (NL) or with NASH. Meanwhile, WNT5A and JNK hepatic expression increased in SS compared to NL, but higher levels were maintained in NASH [45]. In that study, we hypothesized that SFRP5 had a protective role in the first steps of NAFLD, trying to prevent its progression.

Based on the previous results and given that NAFLD development is susceptible to adipokines released from adipose tissue, the synthesis location of SFRP5, the aim of the present work was to evaluate the role of the SFRP5/WNT5A/PPAR $\gamma$  pathway in SAT and VAT and its link with NAFLD pathogenesis in a cohort of NW and MO women, with the latter subclassified according to their hepatic histopathology.

## 2. Results

### 2.1. Baseline Characteristics of the Patients

The anthropometric and biochemical characteristics of the studied cohort are shown in Table 1. Patients were first classified into NW ( $n = 15$ ) and MO ( $n = 60$ ) according to their body mass index (BMI), which were comparable in terms of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Next, those with MO were subclassified according to their hepatic histology as NL ( $n = 20$ ), SS ( $n = 21$ ) and NASH ( $n = 19$ ) which were comparable in terms of weight, BMI, SBP, DBP, insulin, glycosylated hemoglobin (HbA1c), triglycerides (TG), cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), LDL-C, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST).

**Table 1.** Anthropometric and biochemical variables of women in the studied cohort.

Variables	NW ( $n = 15$ )	MO ( $n = 60$ )		
		NL ( $n = 20$ )	SS ( $n = 21$ )	NASH ( $n = 19$ )
Weight (kg)	57 (52–62)	119 (108–134) *	115 (111–129) *	110 (104–121) *
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.47 (21.59–24.19)	43.62 (41.56–48.83) *	44.94 (42.07–46.85) *	44.54 (40.95–47.29) *
SBP (mmHg)	117 (110–125)	120 (100–132)	116 (108–127)	117 (105–132)
DBP (mmHg)	70 (66–75)	63 (58–71)	62 (59–73)	68 (60–78)
HOMA1-IR	1.30 (0.85–2.17)	2.07 (1.22–3.45)	2.44 (1.27–3.05) *	1.90 (1.45–6.16) *
Glucose (mg/dL)	83.50 (64.75–94.25)	85.50 (77.50–92.75)	93.00 (88.00–106.00) *,\$	99.00 (82.25–109.75) *,\$
Insulin (mUI/L)	7.00 (4.90–9.62)	9.70 (5.59–16.21)	9.80 (6.94–14.10) *	9.54 (5.68–26.02) *
HbA1c (%)	5.10 (4.70–5.40)	5.60 (5.30–5.75) *	5.55 (5.30–5.85) *	5.80 (5.28–6.43) *
TG (mg/dL)	86.00 (57.25–110.25)	106.00 (93.00–136.00) *	117.50 (84.00–165.50) *	130.50 (99.25–187.50) *
Cholesterol (mg/dL)	183.25 (163.53–209.50)	170.00 (150.15–214.50)	165.70 (132.75–189.50) *	162.00 (150.50–213.25)
HDL-C (mg/dL)	62.40 (48.45–73.00)	40.20 (31.50–48.50) *	43.50 (33.25–46.75) *	38.00 (34.50–44.00) *
LDL-C (mg/dL)	112.20 (89.90–130.00)	108.80 (95.20–141.80)	103.10 (70.20–124.85)	93.40 (79.30–126.83)
AST (UI/L)	20.00 (16.00–26.00)	19.50 (15.00–36.25)	21.00 (17.00–31.00) *	30.00 (18.00–43.50) *
ALT (UI/L)	17.00 (12.50–25.00)	21.00 (16.00–37.00)	29.50 (22.00–35.00) *	33.50 (18.75–41.00) *



**Table 1.** Cont.

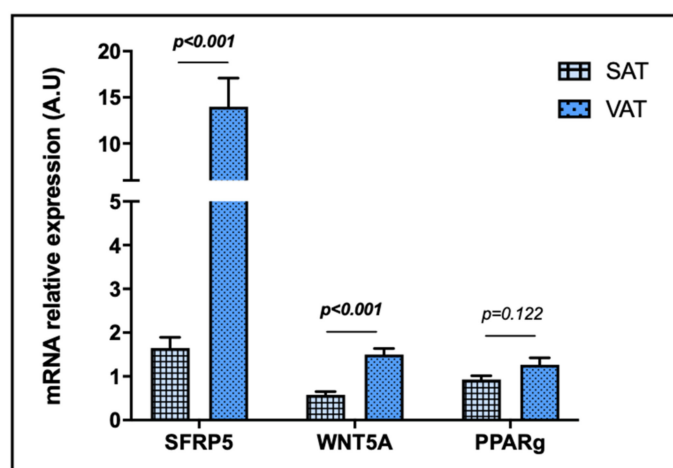
Variables	NW (n = 15)	MO (n = 60)		
		NL (n = 20)	SS (n = 21)	NASH (n = 19)
GGT (UI/L)	14.00 (10.00–31.00)	17.00 (13.00–23.00)	21.00 (16.25–32.75)	26.00 (19.75–34.00) *,§
ALP (UI/L)	65.00 (51.50–88.00)	57.50 (47.75–71.75)	73.50 (62.00–86.00) §	61.00 (53.25–74.50) <sup>a</sup>

NW, normal weight; MO, morbid obesity; NL, normal liver; SS, simple steatosis; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HOMA1-IR, homeostatic model assessment method-insulin resistance; HbA1c, glycosylated hemoglobin; TG, triglycerides; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; ALP, alkaline phosphatase. Data is expressed as the median (interquartile range). The Mann-Whitney test was used to find significant differences vs NW group (\*), significant differences vs NL group (§) and significant differences vs SS group (<sup>a</sup>).  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Anthropometric measures and biochemical analyses showed that subjects with NW presented lower weight, BMI, HbA1c and TG than MO patients; furthermore, glucose, insulin, homeostatic model assessment method-insulin resistance (HOMA1-IR), AST and ALT were lower than in SS and NASH groups; also, gamma-glutamyltransferase (GGT) levels were reduced in comparison with NASH women. On the other hand, NW cohort had higher HDL-C compared to MO group and showed enhanced cholesterol levels than SS subjects. Regarding patients with MO, it has been shown that the NL cohort had lower levels of alkaline phosphatase (ALP) than SS patients, decreased levels of GGT compared to NASH group, and lower levels of glucose than SS and NASH patients. SS group had enhanced levels of ALP in comparison to NASH cohort.

## 2.2. Evaluation of Relative mRNA Abundance of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$ in SAT and VAT

First, we performed an assay to compare SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  mRNA expressions between SAT and VAT. As it can be observed in Figure 2, SFRP5 and WNT5A mRNA expressions in VAT were notably higher than in SAT, while there were no significant differences regarding PPAR $\gamma$  mRNA expression when both tissues were compared. It should be taken into account that SFRP5 mRNA expression was detectable in 85.5% of SAT and 97.2% of VAT samples, WNT5A was detected in 87.0% of SAT and 100% of VAT samples, and PPAR $\gamma$  was found in 100% of SAT and VAT samples.

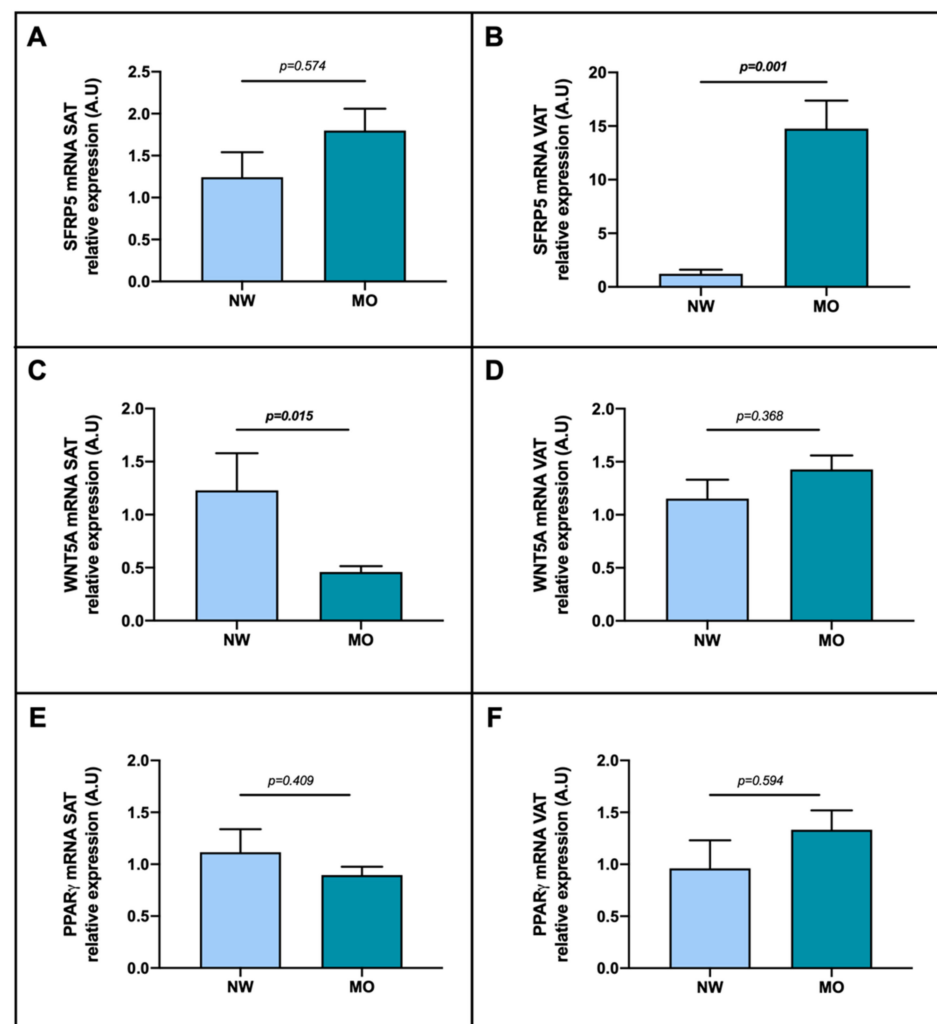


**Figure 2.** Differential relative mRNA abundance of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  in subcutaneous and visceral adipose tissue of the entire unclassified cohort. The data were normalized by NW group and expressed as mean standard error of the mean (SEM). SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; A.U arbitrary units.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (bold).

### 2.3. Evaluation of Relative mRNA Abundance of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$ according to the BMI

In order to evaluate the role of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  in SAT and VAT, we have studied the mRNA relative expression of these genes, first in a cohort classified according to the BMI into NW and MO.

The analysis of the SFRP5 mRNA according to the BMI presented non-significant differences between NW and MO groups in SAT (Figure 3A), however we found significantly increased expression of SFRP5 mRNA in MO subjects compared to NW (Figure 3B). Regarding WNT5A, we found reduced expression in patients with MO compared to NW group in SAT, as graphically represented in Figure 3C, but we did not observe significant differences between groups in VAT (Figure 3D). Concerning PPAR $\gamma$  mRNA expression, non-significant differences between analyzed groups were found (Figure 3E,F).

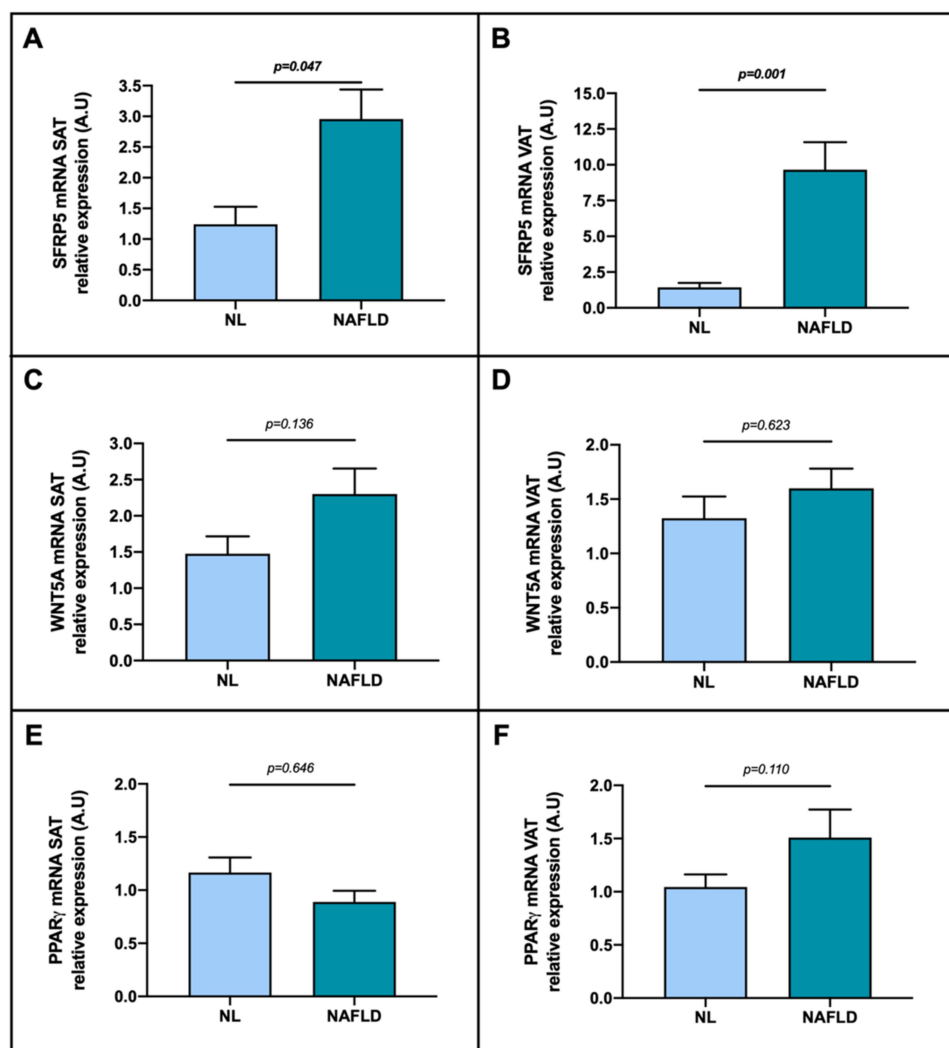


**Figure 3.** Differential relative mRNA abundance of (A) SFRP5, (C) WNT5A and (E) PPAR $\gamma$  in subcutaneous adipose tissue and (B) SFRP5, (D) WNT5A and (F) PPAR $\gamma$  in visceral adipose tissue of women classified depending on their BMI in NW and MO. The data were normalized by NW group and expressed as mean standard error of the mean (SEM). SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; NW, normal weight; MO, morbid obesity; A.U arbitrary units.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (bold).



#### 2.4. Evaluation of Relative mRNA Abundance of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$ according to NAFLD Presence

To ascertain if there were significant differences in SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  mRNA expression in adipose tissue (SAT and VAT) according to NAFLD presence, we first classified the MO cohort (the only one with liver biopsy for diagnosis) into NL and NAFLD. Regarding SFRP5, we reported a higher mRNA relative expression in NAFLD patients than in NL in SAT (Figure 4A) and also in VAT (Figure 4B). On the other hand, we did not observe differences between groups in SAT or in VAT concerning WNT5A (Figure 4C,D) and PPAR $\gamma$  (Figure 4E,F).

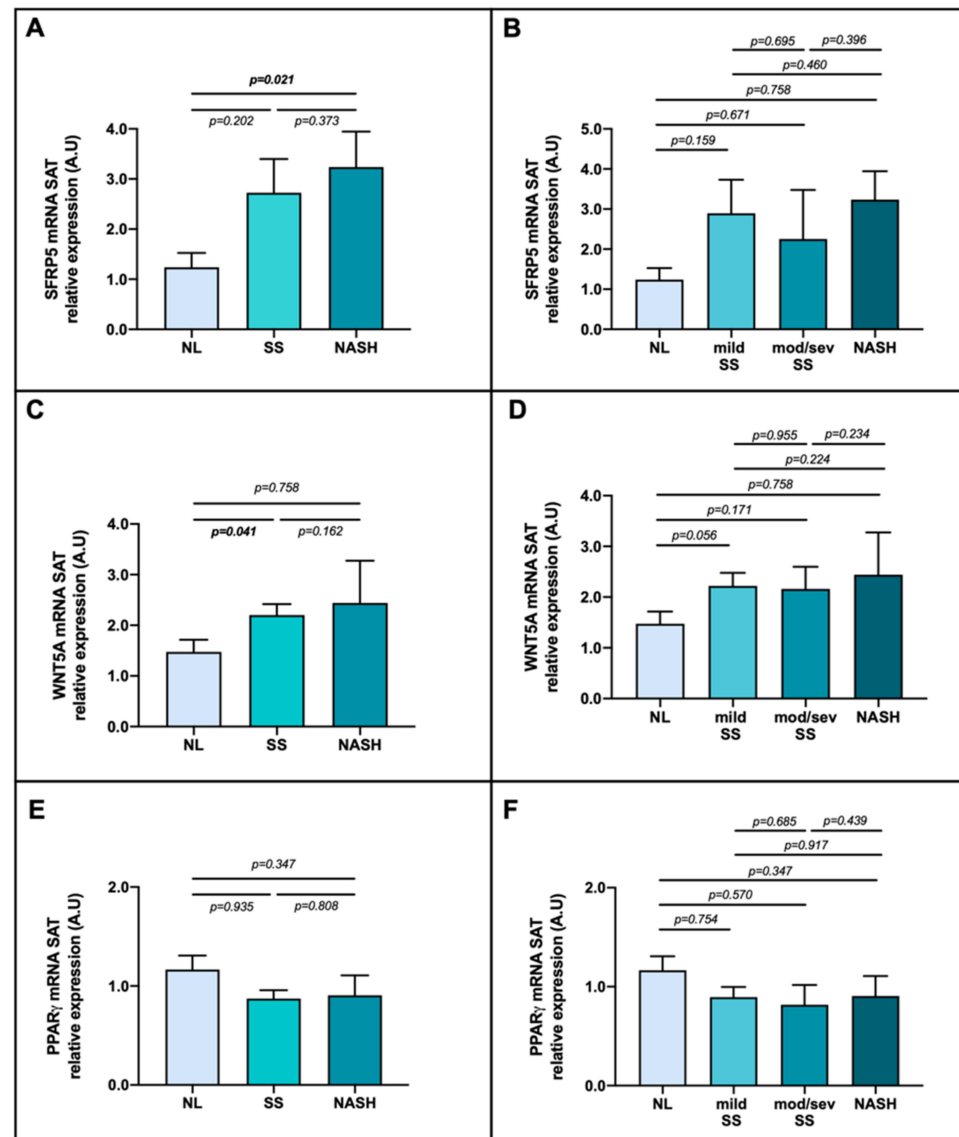


**Figure 4.** Differential relative mRNA abundance of (A) SFRP5, (C) WNT5A and (E) PPAR $\gamma$  in subcutaneous adipose tissue and (B) SFRP5, (D) WNT5A and (F) PPAR $\gamma$  in visceral adipose tissue of women with MO classified depending on NAFLD presence into NL or NAFLD. The data were normalized by NL group and expressed as mean standard error of the mean (SEM). SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; NL, normal weight; MO, morbid obesity; A.U arbitrary units.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (bold).

#### 2.5. Evaluation of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$ Relative mRNA Abundance in Relation to NAFLD Grades

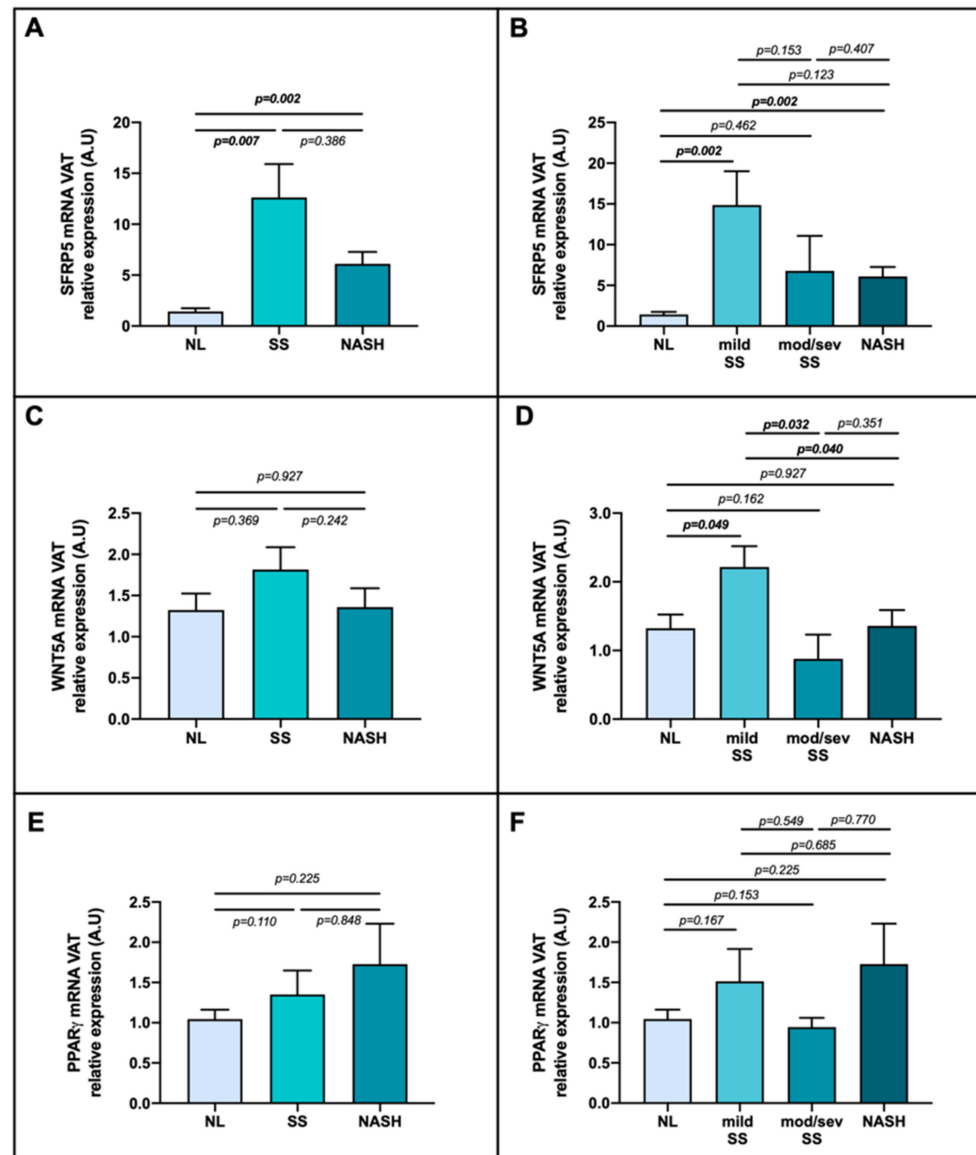
To achieve the main objective of the study, we evaluated SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  mRNA expression in adipose tissue (SAT and VAT) classifying the cohort into NAFLD grades. Focusing on SAT, our results showed an increase of SFRP5 mRNA expression

in NASH group compared with NL (Figure 5A,B, this last one disaggregating the stage of SS into mild and moderate/severe (mod/sev)). In addition, we found that SFRP5 in SAT was enhanced in patients presenting ballooning ( $p = 0.046$ ), one of the main NASH characteristics, compared to subjects without it. Regarding WNT5A expression in SAT, we found more elevated expression in SS compared to NL group (Figure 5C); whereas, when we separated the SS group into mild and mod/sev, no differences between groups were found (Figure 5D). Nevertheless, no differences were observed in PPAR $\gamma$  expression, as shown in Figure 5E,F.



**Figure 5.** Differential relative mRNA abundance of (A) SFRP5, (C) WNT5A and (E) PPAR $\gamma$  in subcutaneous adipose tissue of women with MO classified by their liver histology as NL, SS and NASH; also, differential relative mRNA abundance of (B) SFRP5, (D) WNT5A and (F) PPAR $\gamma$  classified as NL, mild SS, mod/sev SS, and NASH depending on the histopathological groups. The data were normalized by NL group and expressed as mean standard error of the mean (SEM). SAT, subcutaneous adipose tissue; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; MO, morbid obesity; SS, simple steatosis; mod/sev SS, moderate and severe SS; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; A.U arbitrary units.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (bold).

When we analyzed the gene expression in VAT, we found higher SFRP5 mRNA expression in SS and NASH patients than NL (Figure 6A); but, when the SS group was disaggregated, the enhanced expression of SFRP5 was observed in mild SS stage and in NASH compared with NL group (Figure 6B). In reference to WNT5A mRNA expression, when we classified patients into NL, SS and NASH, there were no relevant differences (Figure 6C); however, when SS group was subdivided, we reported a significant enhanced expression of this gene in mild SS stage compared to the other groups, as shown in Figure 6D. In respect of PPAR $\gamma$ , we did not report meaningful differences, as graphically represented in Figure 6E,F.



**Figure 6.** Differential relative mRNA abundance of (A) SFRP5, (C) WNT5A and (E) PPAR $\gamma$  in visceral adipose tissue of women with MO classified by their liver histology as NL, SS and NASH; also, differential relative mRNA abundance of (B) SFRP5, (D) WNT5A and (F) PPAR $\gamma$  classified as NL, mild SS, mod/sev SS, and NASH depending on the histopathological groups. The data were normalized by NL group and expressed as mean standard error of the mean (SEM). VAT, visceral adipose tissue; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; MO, morbid obesity; SS, simple steatosis; mod/sev SS, moderate and severe SS; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; A.U arbitrary units.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (bold).

Since we reported a peak of SFRP5 and WNT5A expressions in the SS mild stage in VAT samples, we decided to study the involvement of these genes focusing on the steatosis grades, regardless of inflammation or ballooning presence, in the analyzed cohort. Hence, we found significantly higher expression of SFRP5 in mild steatosis compared to absence ( $p = 0.001$ ) or mod/sev degrees ( $p = 0.032$ ); also, mod/sev group had an enhanced expression in comparison with the absence of steatosis cohort ( $p = 0.014$ ). In terms of WNT5A expression, it was higher in mild than in mod/sev patients ( $p = 0.025$ ).

#### 2.6. Evaluation of Relative mRNA Abundance of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$ according to Metabolic Syndrome Parameters

Additionally, we wanted to evaluate SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  mRNA expression based on the presence of metabolic syndrome and its main components according to Alberti et al. classification [46]. Therefore, we found decreased expression of WNT5A in VAT ( $p = 0.034$ ) and of PPAR $\gamma$  in SAT ( $p = 0.035$ ) samples in patients presenting metabolic syndrome. In regard to T2DM, we only found lower levels of WNT5A mRNA abundance in SAT ( $p = 0.030$ ) samples of the diabetic group. Moreover, we reported PPAR $\gamma$  decreased expression in SAT ( $p = 0.020$ ) of the patients who presented with dyslipidemia. Nevertheless, we did not find significant differences in these genes regarding hypertension. In the case of SFRP5, we did not find significant associations with these disorders.

#### 2.7. Correlations with SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$ mRNA Expression in SAT and VAT of MO Cohort

To further investigate the possible relationships between NAFLD-related to obesity and SFRP5, WNT5A or PPAR $\gamma$  adipose tissue expression, associations have been analyzed with circulating cytokines, as shown in Table 2. In terms of SAT, interleukin (IL)-8, IL-17 and IL-22 correlated positively with SFRP5 mRNA expression, while this gene correlated negatively with resistin and adiponectin. On the other hand, in VAT, we reported a positive association of IL-1 $\beta$ , IL-13, IL-17 and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) with SFRP5 expression. Regarding WNT5A, in SAT, we could observe a positive correlation with IL-1 $\beta$  and adiponectin; while in VAT, a positive association was shown with IL-13, but monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) correlated negatively. Concerning PPAR $\gamma$  we did not find significant associations.

**Table 2.** Correlations between circulating cytokines and the relative mRNA expression of SFRP5, WNT5A or PPAR $\gamma$  in SAT and VAT of MO patients.

Variables	SAT			VAT		
	SFRP5	WNT5A	PPAR $\gamma$	SFRP5	WNT5A	PPAR $\gamma$
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	ns	0.370 *	ns	0.404 *	ns	ns
IL-8 (pg/mL)	0.413 *	ns	ns	ns	ns	ns
IL-13 (pg/mL)	ns	ns	ns	0.445 **	0.345 *	ns
IL-17 (pg/mL)	0.435 *	ns	ns	0.362 *	ns	ns
IL-22 (pg/mL)	0.366 *	ns	ns	ns	ns	ns
Resistin (ng/mL)	−0.413 *	ns	ns	ns	ns	ns
Adiponectin (ng/mL)	−0.346 *	0.375 *	ns	ns	ns	ns
PAI (ng/mL)	ns	ns	ns	0.342 *	ns	ns
MCP-1 (pg/mL)	ns	ns	ns	ns	−0.377 *	ns

SAT, subcutaneous adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; SFRP5, secreted frizzled-related protein 5; WNT5A, WNT family member 5a; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; R.E., relative expression; IL, interleukin; PAI, plasminogen activator inhibitor-1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; ns, non-significant correlation. Data are expressed as the correlation coefficient rho of Spearman.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3. Discussion

Recently, some authors have suggested that SFRP5 is a protective adipokine with an anti-inflammatory role in NAFLD pathogenesis [7,20]; however, inconclusive results have been reported. In this sense, given that the adipose tissue-liver axis seems to be relevant in the progression of NAFLD [16], in this study, we evaluated the SFRP5/WNT5A-PPAR $\gamma$  pathway in adipose tissue samples of women with different degrees of NAFLD associated to obesity.

First, we found a remarkably elevated mRNA expression of SFRP5 in VAT compared to SAT, which supports previous studies suggesting that SFRP5 is mainly synthesized and secreted by this fat depot [22,26]. Moreover, we also found increased WNT5A mRNA abundance in VAT than in SAT in the whole cohort, which is consistent with previous results [47,48]. In this sense, SFRP5 and WNT5A of VAT seem to be able to play relevant roles in the pathogenesis of NAFLD given the implication of this tissue in the adipokine and free fatty acid delivery into portal-vein circulation [12]. However, PPAR $\gamma$  presented nonsignificant different expression levels between tissues.

Next, we wanted to evaluate the mRNA abundance of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  and their link with obesity, so we classified the cohort into NW subjects (control group) and MO patients. On the one hand, we reported enhanced expression of SFRP5 in the VAT of the MO group compared to the controls. Our results are consistent with previous reports, which suggested that SFRP5 expression is increased in adipose tissue of models with obesity, inducing adipogenesis [25,49–51]. However, we did not find a significant increased expression of PPAR $\gamma$  in the MO group, when this gene is the main regulator of adipogenesis [52]. On the contrary, our results differ from Ouchi et al., since they showed in animal models that SFRP5 expression in adipose tissue is reduced in response to severe obesity-related metabolic dysfunction [26]. These controversies could be explained because of the variability in the study model used or due to the very low-calorie diet that our subjects with MO followed three weeks prior to bariatric surgery, which was not followed by the NW group. This strict diet was indicated with the purpose of reducing the initial BMI before the surgery, and in this sense, Tan et al. and Schule et al. reported that children and adults with a caloric restrictive diet presented an increase in SFRP5 serum levels [40,53], proposing this adipokine as a possible biomarker for the anti-inflammatory effects of dietary interventions [40]. Additionally, and consistent with these facts, in an own previous study, we reported higher circulating levels of SFRP5 in patients with MO, who underwent the same hypocaloric diet, compared to NW subjects [45].

On the other hand, we only found a significant decrease in mRNA WNT5A expression in SAT of MO subjects compared to the NW group. Our results are difficult to explain, since no significant differences between subjects with obesity and without obesity have yet been reported in terms of WNT5A expression in SAT. In this sense, Catalán et al. found decreased, but nonsignificant, expression rates of WNT5A in SAT of subjects with obesity compared to lean subjects [28]. On the other hand, WNT5A pathway has been found to be remarkably more activated in VAT than in SAT in the presence of obesity [47,48], which is consistent with our results regarding WNT5A expression in VAT compared to that of the SAT in our whole cohort, the most part presenting MO. In any case, we need to mention again that our MO subjects underwent a very low-calorie diet to induce weight loss before the surgery, and as Catalán et al. postulated, weight loss could lead to reduce circulating levels of the adipokine WNT5A [28]. Moreover, it is important to note that SAT and VAT depots presented different patterns of expansion during obesity [54], and given that the activation of WNT signaling by high-fat diet stimulates hypertrophy and overproliferation of adipocytes in SAT [55], we hypothesize that a very restrictive diet could induce the opposite effect inactivating WNT5A pathway.

Therefore, all these facts lead us to hypothesize that diet regulates adipokine levels, which are mostly secreted by adipose tissue, suggesting that dietary changes could have a direct impact on adipose tissue-gene expression and its endocrine function [56,57]. However, it needs to be further validated in other cohorts or other diets.



In the regard of PPAR $\gamma$  expression in adipose tissue, we did not find significant differences between MO and NW groups, similar to Torres et al. study [58]. The authors of this recent article made a systematic review of the prior studies reporting PPAR $\gamma$  expression in adipose tissue, and they found conflicting results: 12 previous studies have shown an increased mRNA expression of PPAR $\gamma$  in obesity, eight studies have reported a decreased expression, and four studies have found no differences compared to lean subjects. In this sense, although PPAR $\gamma$  is considered the “master regulator” of adipogenesis [52], the precise mechanism that PPAR $\gamma$  plays in the adipose tissue in human obesity remains unclear. The authors proposed variables that may cause discrepancy between these results, such as small sample size, variances in the reference gene used, different characteristics between the groups (gender, age range, insulin sensitivity, recent weight loss) and the type of the adipose tissue analyzed [58–62].

Subsequently, we aimed to investigate the involvement of SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  adipose tissue expression in NAFLD pathogenesis. To do so, we first classified women with MO into NL and NAFLD. In this sense, we observed increased expression of SFRP5 mRNA in NAFLD group compared to NL patients in both SAT and in VAT. Next, to better understand this finding, we divided NAFLD patients according to their hepatic histopathological degrees. First, we observed a higher expression of SFRP5 in NASH in SAT; and in VAT, we reported an increased expression of SFRP5 in mild SS and NASH stages. Regarding WNT5A, we found an elevated expression of WNT5A in SS in SAT, and a peak of expression of WNT5A in mild SS in VAT. To our knowledge, we are the first to investigate the SFRP5/WNT5A pathway in the adipose tissue regarding NAFLD presence in humans, and our results suggested that patients with NAFLD presented enhanced expression of SFRP5 in adipose tissues, specifically in the SAT of NASH patients and in the VAT of subjects with NASH or mild SS. Since SFRP5 has been reported to be an anti-inflammatory adipokine produced by adipose tissue [17,18,36,63], we hypothesize that the upregulation of SFRP5 mRNA abundance as NAFLD progresses may be due to an attempt to protect adipose tissue against inflammation and lipid accumulation and to counteract the inflammatory imbalance. This protective role of SFRP5 was already suggested in the liver in our previous study [45].

In other ways, the expression of SFRP5 in adipose tissue of NAFLD patients it could be also increased by the liver disease itself given the intercommunication between both tissues [16]. Since obesity has been suggested to induce SFRP5 expression in mice and humans [64], we hypothesize that NAFLD may result in the same effect by increasing metabolic imbalance. In this sense, Choudhary et al. reported a positive correlation between SAT volume and total adipose tissue volume with the degree of hepatic steatosis and severity, but none of the adipose tissue volumes correlated with NASH features such as lobular inflammation, ballooning, or fibrosis [65]. On the other hand, two previous reports also demonstrated increased VAT volume in NAFLD/NASH patients [66,67]. Nevertheless, we did not find significant differences in terms of PPAR $\gamma$ , the key regulator of adipogenesis [52], and we also found in SAT of subjects with mild SS, a higher expression of WNT5A, an inhibitor of pre-adipocyte differentiation [21]. Still, the increased expression of WNT5A in adipose tissue would make sense in firsts stages of steatosis, since in subjects with MO, there is an adipose tissue overproliferation mediated by WNT5A [54]. This excessive proliferation gives rise to a saturation of the adipose tissue depots that reduce insulin sensitivity [68,69]. In this regard, insulin resistance may impact the liver inducing hepatic steatosis [70]. In addition, our previous study reported an enhanced expression of WNT5A in liver samples of patients with NAFLD [41], giving consistency to a crosstalk between both tissues. The current findings and previous evidence suggest the possible upregulation of both competitor adipokines in the adipose tissue of patients with NAFLD, probably in the context of the metabolic dysfunction associated to obesity [30,43], highlighting the important role of adipose tissue-liver axis [71].

Next, we evaluated the implication on SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  in SAT and VAT according to metabolic syndrome presence and their components (T2DM, dyslipidaemia

and hypertension). Hence, we found decreased expression of WNT5A in SAT in diabetic patients and reduced expression of WNT5A in VAT in metabolic syndrome patients. In this sense, although WNT5A has lipogenic effects, it has been reported that the inhibition of its pathway in the pancreas can lead to diabetes [69], which agrees with our results. Conversely, noncanonical WNT5A signaling has been found to play an essential role in obesity-induced VAT inflammation and metabolic dysfunction, which can promote insulin resistance under conditions of overfeeding [28,48,72]. However, this discrepancy may be mainly due to the hypocaloric diet followed by our patients before surgery and, as previously mentioned, this fact should be studied in subjects under other conditions.

Focusing on PPAR $\gamma$ , an insulin-sensitizing protein involved in the inhibition of lipogenesis [73,74], it makes sense that in our study, PPAR $\gamma$  levels were lower in SAT of metabolic syndrome and dyslipidaemic patients compared to that in healthy subjects. Unfortunately, in this analysis, we did not find significant variances in SFRP5 mRNA abundance in adipose tissues based on the studied comorbidities. In this case, significant differences in the analyzed transcripts were mostly present in SAT, which can be explained given that SAT protects other tissues from lipotoxicity, acting as a “buffer” of dietary lipid intake; also, a different profile of secreted adipokines has been reported between SAT and VAT [75,76].

Finally, we performed a correlation analysis between SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  in both tissues and some NAFLD-related cytokines. On the one hand, we observed a positive correlation between SFRP5 mRNA in SAT and proinflammatory cytokines, such as IL-8 and IL-17, which presented high levels in patients with fatty liver disease [77,78], consistent with our results. Additionally, it was positively correlated with IL-22, whose role in NAFLD is unclear, since some studies have indicated a possible protective action during liver injury [79,80], while others have reported that it can promote NAFLD development [81]. On the other hand, we reported a negative correlation between SFRP5 mRNA in SAT and resistin and adiponectin. Resistin is a circulating proinflammatory cytokine that is used to increase in obesity [82] and NAFLD [83], while adiponectin is an anti-inflammatory adipokine that tends to decrease in NAFLD patients compared to that in control subjects [84,85]. These correlations are difficult to explain and give rise to controversies, as we have found in this study that SFRP5, an anti-inflammatory cytokine, was increased in SAT samples from NASH patients. In addition, of note, this analysis was carried out in SAT, not in VAT, which is the major inductor of low-grade chronic inflammation in obesity [86]. Moreover, a differential pattern of functionality and adipokine production has been demonstrated between both tissues due to the clearance function of SAT [87,88].

On the subject of SFRP5 mRNA expression in VAT, we found a positive correlation with the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-17 and PAI-1 levels, whose increase has been linked to obesity and NAFLD [78,89,90], and with IL-13, a cytokine with an anti-inflammatory role that used to be increased in obesity [91], which presents beneficial effects in hepatic diseases [92], as we previously hypothesized that SFRP5 does. All these results are consistent with what was obtained in this study, since SFRP5 mRNA expression in VAT is significantly elevated in MO compared with NW, and it was higher in NAFLD.

In relation to WNT5A mRNA in SAT, we observed a positive correlation with IL-1 $\beta$ , a proinflammatory cytokine related to NAFLD progression [89], and with the anti-inflammatory adiponectin [84,85]. This last association is difficult to explain and is the same that happened with SFRP5 in VAT, due to the peculiar peak of expression that these proteins present in the mild SS group. Focusing on WNT5A mRNA in VAT, we found a positive association with IL-13, which was mentioned above in the SAT analysis. Moreover, we found a negative association between WNT5A mRNA in VAT and MCP-1, a proinflammatory adipokine [93] that presents higher levels in accordance with an increase in BMI, leading to low-grade chronic inflammation [94]. This trend is similar to that of SFRP5 correlations with proinflammatory cytokines.

In summary, SFRP5 and WNT5A in adipose tissue could be attractive therapeutic targets to prevent lipogenesis, inflammation and the consequent liver damage [22], since it

seems that their synthesis is enhanced when NAFLD begins in obese subjects [40,53]. However, more research in this field is needed to determine the specific molecular mechanism by which SFRP5 and WNT5A in adipose tissue are linked with the liver histology. In this study, our cohort of women made it possible to relate SFRP5, WNT5A and PPAR $\gamma$  mRNA abundance in SAT and VAT with obesity and NAFLD. Nevertheless, these results cannot be extrapolated to other obesity groups, patients who do not undergo a caloric restriction diet or men. In addition, it is important to mention that the subjects we studied were able to drink a maximum of 10 g of alcohol per day, so we cannot completely rule out any effect on the levels of the adipokines studied or even on liver histology. Additionally, we are not able to explain whether this association underlies a causal relationship or whether it is merely an epiphenomenon within the context of these complex pathogenic mechanisms. Therefore, further studies would validate our results.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Subjects

The institutional review board (Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) CEIm; 23c/2015) approved this research. The studied cohort is composed of 60 Caucasian women with MO (BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>), and a control group of 15 Caucasian women with NW (BMI 19–25 kg/m<sup>2</sup>); all of whom gave written informed consent. Liver, SAT and VAT biopsies of MO subjects were obtained during planned bariatric surgery, while SAT and VAT biopsies of NW patients were obtained during other planned surgeries (such as discectomy or cholecystectomy). Hepatic biopsies were indicated only when a clinical diagnosis was needed. Patients who underwent bariatric surgery (MO subjects) followed a very low caloric diet for three weeks before the intervention, whereas NW cohort did not undergo any specific diet prior to the surgery.

The study exclusion criteria were women who: (1) had an intake of alcohol higher than 10 g/day or other toxins; (2) had acute or chronic hepatic illness of other etiologies, inflammatory, infectious or neoplastic diseases; (3) were menopausal or undergoing contraceptive treatment; and (4) were treated with antibiotics in the previous 4 weeks.

In this study, we include only women to evaluate a homogenous cohort to avoid the interference of confounding factors such as gender. It is well known that men and women differ substantially regarding body composition, energy imbalance and hormones. Moreover, several studies showed sex-specific differences in lipid and glucose metabolism [95,96] and adipokine profile [97].

##### 4.2. Hepatic Histological Evaluation

Women with MO, from which a liver biopsy was obtained, were classified by one experienced pathologist according to hepatic histopathological classification following the Brunt criteria described elsewhere [98,99] into patients with NL histology ( $n = 20$ ) or NAFLD ( $n = 40$ ); furthermore, NAFLD cohort was subclassified as SS (micro/macrovesicular steatosis without inflammation or fibrosis,  $n = 21$ ) or NASH (Brunt Grades 1–2,  $n = 19$ ). It should be noted that none of the patients with NASH in our cohort presented fibrosis.

##### 4.3. Sample Size

This work is mainly focused on defining the specific role of SFRP5 in NAFLD. In this sense, sample size was calculated using the ARCSINUS approach, with an  $\alpha$  risk of 0.05 and a  $\beta$  risk of 0.1 in a bilateral contrast. Hence, a minimum of 15 subjects were needed in the first group (NW) and 45 in the second (MO) to detect differences between them with statistical significance.

##### 4.4. Biochemical Analyses

All the participants underwent physical, anthropometric and biochemical assessments. Blood extractions were performed by specialized nurses through a BD Vacutainer<sup>®</sup> system, after overnight fasting before the surgery. Venous blood samples were obtained using empty



and ethylenediaminetetraacetic acid coated tubes, which were, respectively, separated into serum and plasma aliquots by centrifugation (3500 rpm, 4 °C, 15 min) (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain). Biochemical parameters were analyzed using a conventional automated analyzer. Insulin resistance was estimated using HOMA1-IR.

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), PAI-1, MCP-1, adiponectin and resistin were determined using multiplex sandwich immunoassays and the MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 (HADK1MAG-61K, Millipore, Billerica, MA, USA) and MILLIPLEX MAP Human High- Sensitivity T Cell Panel (HSTCMAG28SK, Millipore, Billerica, MA, USA), and the Bio- Plex 200 instrument (Bio-Rad Laboratories SA, Madrid, Spain). at the Center for Omic Sciences (Universitat Rovira i Virgili), according to the manufacturer's instructions.

#### 4.5. Gene Expression Analysis

SAT, VAT and hepatic biopsies were collected in tubes with RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) during the surgery and were conserved at 4 °C and then, processed and stored at -80 °C. The RNeasy mini kit (Qiagen, Barcelona, Spain) was used to extract total RNA from SAT and VAT tissues. Reverse transcription to cDNA was performed with the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Real-time quantitative PCR was assessed with a TaqMan Assay predesigned by Applied Biosystems for the detection of SFRP5 (Hs00169366\_m1), WNT5A (Hs00998537\_m1), PPAR $\gamma$  (Hs01115513\_m1) in adipose tissue samples. The expression of each gene was first normalized with the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Hs02786624\_g1), and then standardized with the control group. All reactions were carried out in duplicate in 96-well plates using the QuantStudio™ 7 Pro Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Madrid, Spain).

#### 4.6. Statistical Analyses

The SPSS/PC+ for Windows statistical package (version 27.0; SPSS, Chicago, IL, USA) was used to analyze the data. The Kolmogorov-Smirnov test was performed to assess the distribution of variables. Variables were reported as the median and the 25–75th percentile or mean and standard error of the mean when we are analyzing relative expressions of genes. The different comparative analyses between groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney U test. The strength of the association between variables was calculated using Spearman's  $\rho$  correlation test. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. Graphics were performed using GraphPad Prism (version 7.04; San Diego, CA, USA).

### 5. Conclusions

In conclusion, we reported and elevated SFRP5 mRNA expression in adipose tissue of patients with NAFLD-related to obesity. This study suggested that the increased expression of SFRP5 in VAT seems to be induced by obesity, and by NAFLD pathogenesis in SAT and VAT, with a potential protective role against metabolic imbalance. On the contrary, we suggest that the increased WNT5A expression in SAT of SS subjects and in VAT of mild SS subjects may promote liver damage. Therefore, we hypothesize that SFRP5/WNT5A pathway in adipose tissue might play an important role in NAFLD-related to obesity pathogenesis through the adipose tissue-liver axis. However, further studies are needed in this field to establish the molecular mechanism and validate these hypotheses.

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

**Funding:** This research was funded by Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca, AGAUR 2017 SGR 357 to Cristóbal Richart; Grup de Recerca en Medicina Aplicada URV, 2016 PFR-URV-B2-72 to Cristóbal Richart and the Investigador actiu Program from the URV, 2021-10-837-AUGUET to Teresa Auguet. The APC was funded by Teresa Auguet own funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) (CEIm; 23c/2015; 11 May 2015).

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

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

## References

1. Pappachan, J.M.; Babu, S.; Krishnan, B.; Ravindran, N.C. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2017**, *5*, 384–393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Cotter, T.G.; Rinella, M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1851–1864. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Yang, J.; Fernández-Galilea, M.; Martínez-Fernández, L.; González-Muniesa, P.; Pérez-Chávez, A.; Martínez, J.A.; Moreno-Aliaga, M.J. Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients* **2019**, *11*, 872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Manne, V.; Handa, P.; Kowdley, K.V. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **2018**, *22*, 23–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Tilg, H.; Moschen, A.R.; Roden, M. NAFLD and Diabetes Mellitus. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 32–42. [\[CrossRef\]](#)
6. 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. [\[CrossRef\]](#)
7. Koutaki, D.; Michos, A.; Bacopoulou, F.; Charmandari, E. The Emerging Role of Sfrp5 and Wnt5a in the Pathogenesis of Obesity: Implications for a Healthy Diet and Lifestyle. *Nutrients* **2021**, *13*, 2459. [\[CrossRef\]](#)
8. Yazıcı, D.; Sezer, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. In *Obesity and Lipotoxicity*; Engin, A.B., Engin, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; Volume 960, pp. 277–304. ISBN 978-3-319-48380-1.
9. Biobaku, F.; Ghanim, H.; Batra, M.; Dandona, P. Macronutrient-Mediated Inflammation and Oxidative Stress: Relevance to Insulin Resistance, Obesity, and Atherogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 6118–6128. [\[CrossRef\]](#)
10. Nicholls, D.G.; Locke, R.M. Thermogenic Mechanisms in Brown Fat. *Physiol. Rev.* **1984**, *64*, 1–64. [\[CrossRef\]](#)
11. Cinti, S. The Adipose Organ at a Glance. *Dis. Models Mech.* **2012**, *5*, 588–594. [\[CrossRef\]](#)
12. Ibrahim, M.M. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obes. Rev.* **2010**, *11*, 11–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Park, B.J.; Kim, Y.J.; Kim, D.H.; Kim, W.; Jung, Y.J.; Yoon, J.H.; Kim, C.Y.; Cho, Y.M.; Kim, S.H.; Lee, K.B.; et al. Visceral Adipose Tissue Area Is an Independent Risk Factor for Hepatic Steatosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *23*, 900–907. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. van der Poorten, D.; Milner, K.-L.; Hui, J.; Hodge, A.; Trenell, M.I.; Kench, J.G.; London, R.; Peduto, T.; Chisholm, D.J.; George, J. Visceral Fat: A Key Mediator of Steatohepatitis in Metabolic Liver Disease. *Hepatology* **2008**, *48*, 449–457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Rodrigues, R.M.; Guan, Y.; Gao, B. Targeting Adipose Tissue to Tackle NASH: SPARCL1 as an Emerging Player. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, e153640. [\[CrossRef\]](#)
16. Osorio-Conles, Ó.; Vega-Beyhart, A.; Ibarzabal, A.; Balibrea, J.M.; Graupera, I.; Rimola, J.; Vidal, J.; de Hollanda, A. A Distinctive NAFLD Signature in Adipose Tissue from Women with Severe Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10541. [\[CrossRef\]](#)
17. Chen, L.; Zhao, X.; Liang, G.; Sun, J.; Lin, Z.; Hu, R.; Chen, P.; Zhang, Z.; Zhou, L.; Li, Y. Recombinant SFRP5 Protein Significantly Alleviated Intrahepatic Inflammation of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 56. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhao, A.; Jiang, F.; Yang, G.; Liu, H.; Li, L. Sfrp5 Interacts with Slurp1 to Regulate the Accumulation of Triglycerides in Hepatocyte Steatosis Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *512*, 256–262. [\[CrossRef\]](#)
19. Azzu, V.; Vacca, M.; Virtue, S.; Allison, M.; Vidal-Puig, A. Adipose Tissue-Liver Cross Talk in the Control of Whole-Body Metabolism: Implications in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1899–1912. [\[CrossRef\]](#)

20. Chatani, N.; Kamada, Y.; Kizu, T.; Ogura, S.; Furuta, K.; Egawa, M.; Hamano, M.; Ezaki, H.; Kiso, S.; Shimono, A.; et al. Secreted Frizzled-Related Protein 5 (Sfrp5) Decreases Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Liver Int.* **2015**, *35*, 2017–2026. [[CrossRef](#)]
21. de Winter, T.J.J.; Nusse, R. Running Against the Wnt: How Wnt/ $\beta$ -Catenin Suppresses Adipogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 627429. [[CrossRef](#)]
22. Liu, L.-B.; Chen, X.-D.; Zhou, X.-Y.; Zhu, Q. The Wnt Antagonist and Secreted Frizzled-Related Protein 5: Implications on Lipid Metabolism, Inflammation, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bagchi, D.P.; Nishii, A.; Li, Z.; DelProposto, J.B.; Corsa, C.A.; Mori, H.; Hardij, J.; Learman, B.S.; Lumeng, C.N.; MacDougald, O.A. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Adipose Tissue Lipogenesis and Adipocyte-Specific Loss Is Rigorously Defended by Neighboring Stromal-Vascular Cells. *Mol. Metab.* **2020**, *42*, 101078. [[CrossRef](#)]
24. Wang, X.; Rao, H.; Liu, F.; Wei, L.; Li, H.; Wu, C. Recent Advances in Adipose Tissue Dysfunction and Its Role in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells* **2021**, *10*, 3300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mori, H.; Prestwich, T.C.; Reid, M.A.; Longo, K.A.; Gerin, I.; Cawthorn, W.P.; Susulic, V.S.; Krishnan, V.; Greenfield, A.; MacDougald, O.A. Secreted Frizzled-Related Protein 5 Suppresses Adipocyte Mitochondrial Metabolism through WNT Inhibition. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2405–2416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ouchi, N.; Higuchi, A.; Ohashi, K.; Oshima, Y.; Gokce, N.; Shibata, R.; Akasaki, Y.; Shimono, A.; Walsh, K. Sfrp5 Is an Anti-Inflammatory Adipokine That Modulates Metabolic Dysfunction in Obesity. *Science* **2010**, *329*, 454–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhu, Z.; Yin, S.; Wu, K.; Lee, A.; Liu, Y.; Li, H.; Song, S. Downregulation of Sfrp5 in Insulin Resistant Rats Promotes Macrophage-Mediated Pulmonary Inflammation through Activation of Wnt5a/JNK1 Signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *505*, 498–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Rodríguez, A.; Pérez-Hernández, A.I.; Gurbindo, J.; Ramírez, B.; Méndez-Giménez, L.; Rotellar, F.; Valentí, V.; Moncada, R.; et al. Activation of Noncanonical Wnt Signaling Through WNT5A in Visceral Adipose Tissue of Obese Subjects Is Related to Inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 1407–1417. [[CrossRef](#)]
29. Lecarpentier, Y.; Schussler, O.; Hébert, J.-L.; Vallée, A. Multiple Targets of the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling in Cancers. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1248. [[CrossRef](#)]
30. Gustafson, B.; Smith, U. Activation of Canonical Wingless-Type MMTV Integration Site Family (Wnt) Signaling in Mature Adipocytes Increases  $\beta$ -Catenin Levels and Leads to Cell Dedifferentiation and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14031–14041. [[CrossRef](#)]
31. Wang, Q.A.; Zhang, F.; Jiang, L.; Ye, R.; An, Y.; Shao, M.; Tao, C.; Gupta, R.K.; Scherer, P.E. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Its Role in Adipocyte Homeostasis and Thiazolidinedione-Mediated Insulin Sensitization. *Mol. Cell. Biol.* **2018**, *38*, e00677-17. [[CrossRef](#)]
32. Stienstra, R.; Duval, C.; Müller, M.; Kersten, S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* **2007**, *2007*, 95974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Corbett, L.; Mann, J.; Mann, D.A. Non-Canonical Wnt Predominates in Activated Rat Hepatic Stellate Cells, Influencing HSC Survival and Paracrine Stimulation of Kupffer Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142794. [[CrossRef](#)]
34. Beljaars, L.; Daliri, S.; Dijkhuizen, C.; Poelstra, K.; Gosens, R. WNT-5A Regulates TGF- $\beta$ -Related Activities in Liver Fibrosis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2017**, *312*, G219–G227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rauch, A.; Mandrup, S. Lighting the Fat Furnace without SFRP5. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2349–2352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Li, Y.; Tian, M.; Yang, M.; Yang, G.; Chen, J.; Wang, H.; Liu, D.; Wang, H.; Deng, W.; Zhu, Z.; et al. Central Sfrp5 Regulates Hepatic Glucose Flux and VLDL-Triglyceride Secretion. *Metabolism* **2020**, *103*, 154029. [[CrossRef](#)]
37. Hu, W.; Li, L.; Yang, M.; Luo, X.; Ran, W.; Liu, D.; Xiong, Z.; Liu, H.; Yang, G. Circulating Sfrp5 Is a Signature of Obesity-Related Metabolic Disorders and Is Regulated by Glucose and Liraglutide in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 290–298. [[CrossRef](#)]
38. Wang, J.; Li, L.; Li, L.; Yan, Q.; Li, J.; Xu, T. Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Liver Fibrosis. *Gene* **2018**, *674*, 57–69. [[CrossRef](#)]
39. Oseini, A.M.; Sanyal, A.J. Therapies in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Liver Int.* **2017**, *37*, 97–103. [[CrossRef](#)]
40. Schulte, D.M.; Müller, N.; Neumann, K.; Oberhäuser, F.; Faust, M.; Güdelhöfer, H.; Brandt, B.; Krone, W.; Laudes, M. Pro-Inflammatory Wnt5a and Anti-Inflammatory SFRP5 Are Differentially Regulated by Nutritional Factors in Obese Human Subjects. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 32437. [[CrossRef](#)]
41. Gutiérrez-Vidal, R.; Vega-Badillo, J.; Reyes-Fermín, L.M.; Hernández-Pérez, H.A.; Sánchez-Muñoz, F.; López-Álvarez, G.S.; Larrieta-Carrasco, E.; Fernández-Silva, I.; Méndez-Sánchez, N.; Tovar, A.R.; et al. SFRP5 Hepatic Expression Is Associated with Non-Alcoholic Liver Disease in Morbidly Obese Women. *Ann. Hepatol.* **2015**, *14*, 666–674. [[CrossRef](#)]
42. Takada, I.; Kouzmenko, A.P.; Kato, S. Wnt and PPAR $\gamma$  Signaling in Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2009**, *5*, 442–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chen, Z.; Tian, R.; She, Z.; Cai, J.; Li, H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Free. Radic. Biol. Med.* **2020**, *152*, 116–141. [[CrossRef](#)]
44. Zhang, X.; Deng, F.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Chen, J.; Jiang, Y. PPAR $\gamma$  Attenuates Hepatic Inflammation and Oxidative Stress of Non-alcoholic Steatohepatitis via Modulating the MiR-21-5p/SFRP5 Pathway. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *24*, 823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Bertran, L.; Portillo-Carrasquer, M.; Aguilar, C.; Porras, J.A.; Riesco, D.; Martínez, S.; Vives, M.; Sabench, F.; Gonzalez, E.; Del Castillo, D.; et al. Deregulation of Secreted Frizzled-Related Protein 5 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.-C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith, S.C. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645. [[CrossRef](#)]
47. Zuriaga, M.A.; Fuster, J.J.; Farb, M.G.; MacLauchlan, S.; Bretón-Romero, R.; Karki, S.; Hess, D.T.; Apovian, C.M.; Hamburg, N.M.; Gokce, N.; et al. Activation of Non-Canonical WNT Signaling in Human Visceral Adipose Tissue Contributes to Local and Systemic Inflammation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17326. [[CrossRef](#)]
48. Fuster, J.J.; Zuriaga, M.A.; Ngo, D.T.-M.; Farb, M.G.; Aprahamian, T.; Yamaguchi, T.P.; Gokce, N.; Walsh, K. Noncanonical Wnt Signaling Promotes Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysfunction Independent of Adipose Tissue Expansion. *Diabetes* **2015**, *64*, 1235–1248. [[CrossRef](#)]
49. Lagathu, C.; Christodoulides, C.; Virtue, S.; Cawthorn, W.P.; Franzin, C.; Kimber, W.A.; Nora, E.D.; Campbell, M.; Medina-Gomez, G.; Cheyette, B.N.R.; et al. Dact1, a Nutritionally Regulated Preadipocyte Gene, Controls Adipogenesis by Coordinating the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Network. *Diabetes* **2009**, *58*, 609–619. [[CrossRef](#)]
50. Koza, R.A.; Nikonova, L.; Hogan, J.; Rim, J.-S.; Mendoza, T.; Faulk, C.; Skaf, J.; Kozak, L.P. Changes in Gene Expression Foreshadow Diet-Induced Obesity in Genetically Identical Mice. *PLoS Genet.* **2006**, *2*, e81. [[CrossRef](#)]
51. Okada, Y.; Sakaue, H.; Nagare, T.; Kasuga, M. Diet-Induced Up-Regulation of Gene Expression in Adipocytes without Changes in DNA Methylation. *Kobe J. Med. Sci.* **2009**, *54*, E241–E249.
52. Ahmadian, M.; Suh, J.M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A.R.; Downes, M.; Evans, R.M. PPAR $\gamma$  Signaling and Metabolism: The Good, the Bad and the Future. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 557–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tan, X.; Wang, X.; Chu, H.; Liu, H.; Yi, X.; Xiao, Y. SFRP5 Correlates with Obesity and Metabolic Syndrome and Increases after Weight Loss in Children. *Clin. Endocrinol.* **2014**, *81*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chen, N.; Wang, J. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Obesity. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wang, Q.A.; Tao, C.; Gupta, R.K.; Scherer, P.E. Tracking Adipogenesis during White Adipose Tissue Development, Expansion and Regeneration. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1338–1344. [[CrossRef](#)]
56. Klimcakova, E.; Kovacicova, M.; Stich, V.; Langin, D. Adipokines and Dietary Interventions in Human Obesity: Adipokines and Dieting. *Obes. Rev.* **2010**, *11*, 446–456. [[CrossRef](#)]
57. Monzillo, L.U.; Hamdy, O.; Horton, E.S.; Ledbury, S.; Mullooly, C.; Jarema, C.; Porter, S.; Ovalle, K.; Moussa, A.; Mantzoros, C.S. Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance. *Obes. Res.* **2003**, *11*, 1048–1054. [[CrossRef](#)]
58. Torres, J.-L.; Usategui-Martín, R.; Hernández-Cosido, L.; Bernardo, E.; Manzanedo-Bueno, L.; Hernández-García, I.; Mateos-Díaz, A.-M.; Roza, O.; Matesanz, N.; Saleté-Granado, D.; et al. PPAR- $\gamma$  Gene Expression in Human Adipose Tissue Is Associated with Weight Loss After Sleeve Gastrectomy. *J. Gastrointest. Surg.* **2022**, *26*, 286–297. [[CrossRef](#)]
59. Sato, H.; Sugai, H.; Kurosaki, H.; Ishikawa, M.; Funaki, A.; Kimura, Y.; Ueno, K. The Effect of Sex Hormones on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Expression and Activity in Mature Adipocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 564–573. [[CrossRef](#)]
60. Ruschke, K.; Fishbein, L.; Dietrich, A.; Klötting, N.; Tönjes, A.; Oberbach, A.; Fasshauer, M.; Jenkner, J.; Schön, M.R.; Stumvoll, M.; et al. Gene Expression of PPAR $\gamma$  and PGC-1 $\alpha$  in Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissues Is Related to Insulin Resistance Markers and Mediates Beneficial Effects of Physical Training. *Eur. J. Endocrinol.* **2010**, *162*, 515–523. [[CrossRef](#)]
61. Redonnet, A.; Bonilla, S.; Noël-Suberville, C.; Pallet, V.; Dabadie, H.; Gin, H.; Higuieret, P. Relationship between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Retinoic Acid Receptor Alpha Gene Expression in Obese Human Adipose Tissue. *Int. J. Obes.* **2002**, *26*, 920–927. [[CrossRef](#)]
62. Kosaka, K.; Kubota, Y.; Adachi, N.; Akita, S.; Sasahara, Y.; Kira, T.; Kuroda, M.; Mitsukawa, N.; Bujo, H.; Satoh, K. Human Adipocytes from the Subcutaneous Superficial Layer Have Greater Adipogenic Potential and Lower PPAR- $\gamma$  DNA Methylation Levels than Deep Layer Adipocytes. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2016**, *311*, C322–C329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Xu, Q.; Wang, H.; Li, Y.; Wang, J.; Lai, Y.; Gao, L.; Lei, L.; Yang, G.; Liao, X.; Fang, X.; et al. Plasma Sfrp5 Levels Correlate with Determinants of the Metabolic Syndrome in Chinese Adults. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2017**, *33*, e2896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wang, R.; Hong, J.; Liu, R.; Chen, M.; Xu, M.; Gu, W.; Zhang, Y.; Ma, Q.; Wang, F.; Shi, J.; et al. SFRP5 Acts as a Mature Adipocyte Marker but Not as a Regulator in Adipogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *53*, 405–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Choudhary, N.S.; Duseja, A.; Kalra, N.; Das, A.; Dhiman, R.K.; Chawla, Y.K. Correlation of Adipose Tissue with Liver Histology in Asian Indian Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Ann. Hepatol.* **2012**, *11*, 478–486. [[CrossRef](#)]
66. Yu, S.J.; Kim, W.; Kim, D.; Yoon, J.-H.; Lee, K.; Kim, J.H.; Cho, E.J.; Lee, J.-H.; Kim, H.Y.; Kim, Y.J.; et al. Visceral Obesity Predicts Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicine* **2015**, *94*, e2159. [[CrossRef](#)]
67. Idilman, I.S.; Low, H.M.; Gidener, T.; Philbrick, K.; Mounajjed, T.; Li, J.; Allen, A.M.; Yin, M.; Venkatesh, S.K. Association between Visceral Adipose Tissue and Non-Alcoholic Steatohepatitis Histology in Patients with Known or Suspected Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2565. [[CrossRef](#)]



68. Tang, Q.; Chen, C.; Zhang, Y.; Dai, M.; Jiang, Y.; Wang, H.; Yu, M.; Jing, W.; Tian, W. Wnt5a Regulates the Cell Proliferation and Adipogenesis via MAPK-Independent Pathway in Early Stage of Obesity: Wnt5a Involves Proliferation and Adipogenesis. *Cell Biol. Int.* **2018**, *42*, 63–74. [[CrossRef](#)]
69. Das, B.; Das, M.; Kalita, A.; Baro, M.R. The Role of Wnt Pathway in Obesity Induced Inflammation and Diabetes: A Review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2021**, *20*, 1871–1882. [[CrossRef](#)]
70. Garg, A.; Misra, A. Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Adipose Tissue Disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 3019–3022. [[CrossRef](#)]
71. Ye, D.; Rong, X.; Xu, A.; Guo, J. Liver-Adipose Tissue Crosstalk: A Key Player in the Pathogenesis of Glucolipid Metabolic Disease. *Chin. J. Integr. Med.* **2017**, *23*, 410–414. [[CrossRef](#)]
72. Prats-Puig, A. Balanced Duo of Anti-Inflammatory SFRP5 and Proinflammatory WNT5A in Children. *Pediatr. Res.* **2014**, *75*, 793–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sharma, A.M.; Staels, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 386–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Christodoulides, C.; Lagathu, C.; Sethi, J.K.; Vidal-Puig, A. Adipogenesis and WNT Signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 16–24. [[CrossRef](#)]
75. Manolopoulos, K.N.; Karpe, F.; Frayn, K.N. Gluteofemoral Body Fat as a Determinant of Metabolic Health. *Int. J. Obes.* **2010**, *34*, 949–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Guiu-Jurado, E.; Auguet, T.; Berlanga, A.; Aragonès, G.; Aguilar, C.; Sabench, F.; Armengol, S.; Porrás, J.; Martí, A.; Jorba, R.; et al. Downregulation of de Novo Fatty Acid Synthesis in Subcutaneous Adipose Tissue of Moderately Obese Women. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29911–29922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Jarrar, M.H.; Baranova, A.; Collantes, R.; Ranard, B.; Stepanova, M.; Bennett, C.; Fang, Y.; Elariny, H.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; et al. Adipokines and Cytokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Adipokines and Cytokines in Nafld. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *27*, 412–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Ruiz de Morales, J.M.G.; Puig, L.; Daudén, E.; Cañete, J.D.; Pablos, J.L.; Martín, A.O.; Juanatey, C.G.; Adán, A.; Montalbán, X.; Borrueal, N.; et al. Critical Role of Interleukin (IL)-17 in Inflammatory and Immune Disorders: An Updated Review of the Evidence Focusing in Controversies. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102429. [[CrossRef](#)]
79. Sabat, R.; Ouyang, W.; Wolk, K. Therapeutic Opportunities of the IL-22–IL-22R1 System. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 21–38. [[CrossRef](#)]
80. Rutz, S.; Wang, X.; Ouyang, W. The IL-20 Subfamily of Cytokines—From Host Defence to Tissue Homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 783–795. [[CrossRef](#)]
81. Rolla, S.; Alchera, E.; Imarisio, C.; Bardina, V.; Valente, G.; Cappello, P.; Mombello, C.; Follenzi, A.; Novelli, F.; Carini, R. The Balance between IL-17 and IL-22 Produced by Liver-Infiltrating T-Helper Cells Critically Controls NASH Development in Mice. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 193–203. [[CrossRef](#)]
82. Acquarone, E.; Monacelli, F.; Borghi, R.; Nencioni, A.; Odetti, P. Resistin: A Reappraisal. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *178*, 46–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Murad, A.; Hassan, H.; Husein, H.; Ayad, A. Serum Resistin Levels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Their Relationship to Severity of Live. *J. Endocrinol. Metab. Diabetes S. Afr.* **2010**, *15*, 53–56. [[CrossRef](#)]
84. Mavilia, M.G.; Wu, G.Y. Liver and Serum Adiponectin Levels in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Dig. Dis.* **2021**, *22*, 214–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Polyzos, S.A.; Toulis, K.A.; Goulis, D.G.; Zavos, C.; Kountouras, J. Serum Total Adiponectin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolism* **2011**, *60*, 313–326. [[CrossRef](#)]
86. Ziegler, A.K.; Damgaard, A.; Mackey, A.L.; Schjerling, P.; Magnusson, P.; Olesen, A.T.; Kjaer, M.; Scheele, C. An Anti-Inflammatory Phenotype in Visceral Adipose Tissue of Old Lean Mice, Augmented by Exercise. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12069. [[CrossRef](#)]
87. Mittal, B. Subcutaneous Adipose Tissue & Visceral Adipose Tissue. *Indian J. Med. Res.* **2019**, *149*, 571. [[CrossRef](#)]
88. Foster, M.T.; Pagliassotti, M.J. Metabolic Alterations Following Visceral Fat Removal and Expansion: Beyond Anatomic Location. *Adipocyte* **2012**, *1*, 192–199. [[CrossRef](#)]
89. Mirea, A.-M.; Tack, C.J.; Chavakis, T.; Joosten, L.A.B.; Toonen, E.J.M. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 458–471. [[CrossRef](#)]
90. Fuchs, A.; Samovski, D.; Smith, G.I.; Cifarelli, V.; Farabi, S.S.; Yoshino, J.; Pietka, T.; Chang, S.-W.; Ghosh, S.; Myckatyn, T.M.; et al. Associations Among Adipose Tissue Immunology, Inflammation, Exosomes and Insulin Sensitivity in People With Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2021**, *161*, 968–981.e12. [[CrossRef](#)]
91. Schmidt, F.M.; Weschenfelder, J.; Sander, C.; Minkwitz, J.; Thormann, J.; Chittka, T.; Mergl, R.; Kirkby, K.C.; Faßhauer, M.; Stumvoll, M.; et al. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121971. [[CrossRef](#)]
92. Machado, M.V.; Yang, Y.; Diehl, A.M. The Benefits of Restraint: A Pivotal Role for IL-13 in Hepatic Glucose Homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 115–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kanda, H. MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 1494–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Setyaningsih, W.A.W. Liver Fibrosis Associated with Adipose Tissue and Liver Inflammation in an Obesity Model. *Med. J. Malays.* **2021**, *76*, 7.
95. Bhagwandin, C.; Ashbeck, E.L.; Whalen, M.; Bandola-Simon, J.; Roche, P.A.; Szajman, A.; Truong, S.M.; Wertheim, B.C.; Klimentidis, Y.C.; Ishido, S.; et al. The E3 Ubiquitin Ligase MARCH1 Regulates Glucose-Tolerance and Lipid Storage in a Sex-Specific Manner. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rauschert, S.; Uhl, O.; Koletzko, B.; Mori, T.A.; Beilin, L.J.; Oddy, W.H.; Hellmuth, C. Sex Differences in the Association of Phospholipids with Components of the Metabolic Syndrome in Young Adults. *Biol. Sex Differ.* **2017**, *8*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Gürdoğan, M.; Altay, S. The Relationship Between Gender Differences and Abnormal Adipokine Profile for Cardiometabolic Risk Indicators. *Balkan Med. J.* **2019**, *36*, 298–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. 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](#)]
99. Brunt, E.M.; Janney, C.G.; Di Bisceglie, A.M.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Bacon, B.R. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging The Histological Lesions. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 2467–2474. [[CrossRef](#)]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

## ***5. Discussió global***

---



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



Evidències prèvies, suggereixen que la proteïna SFRP5 presenta un rol protector i antiinflamatori en front a trastorns metabòlics [340]. En aquest sentit, la via de senyalització d'aquesta proteïna sembla poder estar implicada en la patogènia de la MFGNA. Tot i això, els resultats publicats són escassos i poc concloents [326,336]. Per aquesta raó, la present tesi doctoral es centra en l'estudi de la via de senyalització de SFRP5 i la seva possible implicació en la patogènia de la MFGNA de forma directa, o a través de l'eix fetge-teixit adipós [341].

Per a discutir de forma global els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, primer farem una breu repassada de les principals troballes d'ambdós estudis.

En el **PRIMER ESTUDI**, vam voler analitzar els nivells circulants de SFRP5, i l'expressió hepàtica d'ARNm de SFRP5, WNT5A i JNK. La principal novetat d'aquest estudi és que vam analitzar en una cohort ben caracteritzada de dones amb OM, la implicació de SFRP5 i la via no canònica de WNT5A/JNK en la patogènia de la MFGNA. En aquest sentit, tot i que no vam trobar diferències significatives quant als nivells sèrics de SFRP5 entre les pacients amb MFGNA i aquelles amb HHN, vam veure un augment de l'abundància relativa d'ARNm hepàtic de SFRP5 en pacients amb ES en comparació amb aquelles amb HHN o EHNA. A més, també vam trobar expressions hepàtiques augmentades d'ARNm de WNT5A i JNK, dos dels principals gens implicats en la via no canònica de WNT, en pacients amb ES en comparació amb les que presentaven una HHN.

Després d'obtenir els resultats prèviament mencionats i, coneixent que les proteïnes SFRP5 i WNT5A es sintetitzen majoritàriament al teixit adipós, el qual té un gran impacte en el metabolisme del fetge per la intercomunicació de citocines entre d'altres, en el **SEGON ESTUDI**, vam voler avaluar la via SFRP5/WNT5A-PPAR $\gamma$  en mostres de teixit adipós (SAT i VAT) de dones amb diferents graus de MFGNA associada a l'obesitat. En primer lloc, vam trobar una expressió d'ARNm de SFRP5 i WNT5A notablement més elevada en VAT que en SAT. Després, vam observar una expressió incrementada de SFRP5 al VAT de les pacients amb OM en comparació amb les que tenien un PN, i una expressió de WNT5A significativament reduïda en el SAT de les OM en comparació amb les que presentaven un PN. Quant a la MFGNA, només vam trobar una expressió més elevada de SFRP5 en el grup amb MFGNA en comparació amb les pacients amb HHN, tant en el SAT com en el VAT. En un anàlisi més específic, vam observar una expressió més elevada de SFRP5 en EHNA en el SAT, i en estadis lleus d'ES i en EHNA en el VAT, en comparació amb aquelles pacients amb HHN. Pel que fa a WNT5A, vam trobar una expressió més elevada en ES en comparació amb l'HHN en mostres de SAT, i un pic d'expressió de WNT5A en ES lleu en el VAT. Finalment, avaluant les comorbiditats metabòliques, vam trobar una expressió reduïda de WNT5A en SAT en pacients diabètiques i una expressió reduïda de WNT5A en el VAT de



## 5. DISCUSSIÓ GLOBAL

---

pacients amb SM. Els nivells de PPAR $\gamma$  van mostrar-se més baixos en el SAT de les pacients amb SM i/o amb DMT2, en comparació amb el grup control sà.

A continuació, la discussió global de tots els resultats es veurà estructurada en els diferents teixits en els quals s'ha avaluat la via de SFRP5, per a facilitar-ne la lectura.

Primer de tot, es van voler estudiar els nivells de l'adipoquina SFRP5 en sèrum en la cohort del primer estudi. En pacients amb OM es van trobar nivells sèrics de SFRP5 significativament més elevats en comparació amb pacients que presentaven un PN. Aquests resultats semblen contraris a aquells anteriorment reportats, ja que Hu et al. van demostrar que els subjectes amb obesitat, presentaven nivells de SFRP5 circulants més baixos comparant-los amb els dels subjectes d'estudi primis [342]. A més a més, Tan et al. van informar de nivells més baixos de SFRP5 en sèrum en nens amb obesitat en comparació amb nens primis [343]. De totes maneres, aquesta contradicció entre els nostres resultats i els anteriorment publicats, es podria explicar perquè les nostres pacients amb PN (grup control) no van estar sotmeses a cap dieta específica prèviament a l'obtenció de la mostra de sang, mentre que les pacients del nostre estudi que presentaven OM, van estar sotmeses a una dieta per a reduir el seu IMC durant els 3 mesos previs a la cirurgia bariàtrica. En concret, durant les últimes 3 setmanes abans de l'operació, aquestes pacients es sotmetien a una dieta restrictiva molt baixa en calories. Per altra costat, els pacients de les cohorts de Tan et al. i Hu et al. no van seguir aquest tipus de dieta estricta abans de l'extracció de sang [342,343]. No obstant, cal destacar que, alguns dels nens amb obesitat de l'estudi de Tan et al. van estar sotmesos a una reducció de la ingesta calòrica abans de l'obtenció de la mostra de sang, obtenint nivells augmentats de SFRP5 en sèrum després d'aquesta intervenció en l'hàbit alimentari [343]. Això podria explicar per que les nostres pacients amb OM presenten nivells augmentats respecte les pacients primes. Aquest fet està recolzat per un estudi previ que suggeria la utilització de SFRP5 com a biomarcador de l'efecte antiinflamatori després de la restricció calòrica [344]; tot i això, està clar que una avaluació dels nivells de SFRP5 previs a aquesta dieta hipocalòrica, seria molt beneficiós per aclarir aquesta hipòtesi. També cal esmentar que ambdós articles anteriors incloïen homes [342,343], a més de que la cohort de Tan et al. està formada només per nens [343]; mentrestant, nosaltres només vam estudiar dones adultes.

Quant a l'avaluació de SFRP5 en sèrum basant-se en la presència de la MFGNA i els diferents graus d'afectació hepàtica, no vam evidenciar diferències significatives en els nivells sèrics de SFRP5 entre les pacients amb MFGNA i aquelles que tenien una HHN, ni tampoc vam trobar diferències entre els grups d'afectació hepàtica (HHN, ES i EHNA). Els nostres resultats



coincideixen amb evidències prèvies, les quals tampoc trobaven diferències en els nivells de SFRP5 entre els grups amb MFGNA [337,345], ni en els primers estadis de la fibrosi [337]. Pel que fa a la fibrosi, no hem pogut realitzar aquesta anàlisi perquè, en el nostre estudi, cap pacient amb EHNA presentava fibrosi hepàtica. Tot plegat, el nostre anàlisi de la SFRP5 circulant suggereix que els nivells sèrics d'aquesta proteïna no semblen ser un bon biomarcador de la presència de la MFGNA.

Posteriorment, es va voler analitzar l'abundància relativa d'ARNm de SFRP5 al fetge en relació a la MFGNA associada a obesitat. En primer lloc, es va informar d'una expressió més elevada de l'ARNm de SFRP5 en fetge de pacients amb MFGNA en comparació amb aquelles amb una HHN. Després, quan es van classificar les pacients amb MFGNA segons si presentaven ES o EHNA, vam observar un pic de l'expressió de SFRP5 al fetge de les pacients amb ES en comparació amb aquelles pacients amb HHN o EHNA. En aquest sentit, només hi ha un estudi previ en el qual s'avalua l'expressió d'ARNm de SFRP5 en fetge de pacients amb MFGNA, el qual va reportar una disminució de l'expressió hepàtica de SFRP5 a mesura que avançava la MFGNA. De totes maneres, quan les dades s'analitzen profundament, aquesta reducció no era significativa entre els controls (HHN) i els subjectes amb ES, però sí entre els controls i el grup amb EHNA [337]. Aquestes discrepàncies entre el nostre estudi i aquest darrer podrien ser donades per la tècnica quant a l'experiment, ja que Gutiérrez-Vidal et al. van utilitzar l'expressió de  $\beta$ -actina per estandarditzar l'abundància hepàtica de SFRP5 [337], mentre que nosaltres vam utilitzar l'expressió de 18s. A més, a diferència de nosaltres, ells no van relativitzar l'expressió d'ARNm de SFRP5 amb el grup control.

A continuació, atès que la inflamació i la balonització són dues de les principals característiques de l'EHNA [346], vam voler explorar les diferències de l'abundància relativa de SFRP5 segons la presència o absència d'inflamació (portal i lobulillar) i de la balonització hepàtica. Els nostres resultats van mostrar que els nivells hepàtics de SFRP5 era menors en pacients amb inflamació global, inflamació lobulillar i balonització, en comparació amb aquells que no presentaven aquestes característiques. Aquests resultats es podrien explicar pel fet que la SFRP5 és una molècula antiinflamatòria que podria tenir un paper protector en els primers estadis de l'esteatosi [275], però després, potser la inflamació podria desregular la senyalització de SFRP5, bloquejant la seva inhibició de la via no canònica de WNT, la qual contribueix en la progressió de la MFGNA [275,347].



## 5. DISCUSSIÓ GLOBAL

---

Donat que existeix aquesta implicació de la via no canònica de WNT/JNK en la patogènia de la MFGNA [275,347], també es va voler estudiar l'expressió relativa d'ARNm de WNT5A i JNK en fetge, per tal d'afegir nous coneixements sobre el paper d'aquesta via en la MFGNA. D'una banda, vam veure una expressió relativa més elevada d'ARNm de WNT5A en les pacients amb MFGNA en comparació amb aquelles amb una HHN; concretament, vam observar una expressió significativament incrementada en aquelles amb ES. D'altra banda, vam trobar un augment en l'expressió hepàtica de JNK en pacients amb MFGNA; també en concret en el grup amb ES en comparació amb el grup amb HHN. Malauradament, no hem pogut trobar diferències significatives en les expressions hepàtiques de WNT5A i JNK entre les pacients amb ES i les que presentaven EHNA. En aquest sentit, els nostres resultats donen suport al fet de que WNT5A i JNK estan regulades a l'alça en la MFGNA; per la qual cosa hi ha senyalització de la via no canònica de WNT/JNK, la qual afavoreix el dany hepàtic [348]. Tot i això, no hem pogut demostrar que la senyalització d'aquesta via s'incrementi en una etapa avançada de la MFGNA, com ara l'EHNA. Volem assenyalar aquí que l'anàlisi de l'expressió hepàtica de WNT5A i JNK en humans amb MFGNA del nostre estudi és una novetat en humans. De totes formes, els nostres resultats semblen concordar amb altres estudis avaluats en models animals, com el de Wang et al., els quals van observar que la via WNT podria tenir un paper clau en l'activació i la proliferació de cèl·lules estrellades hepàtiques [347]. A més, Wang et al. van postular una associació entre la via WNT no canònica i la MFGNA, la inflamació del fetge i la fibrosi hepàtica [348]. També, Kodama et al. van reportar que bloquejar JNK pot prevenir el desenvolupament de l'esteatosi en models de ratolins [349], cosa que podria representar un objectiu terapèutic per a aquesta malaltia. Tanmateix, Hirosumi et al. van informar de l'activació de JNK en el fetge de ratolins obesos, a més de que els ratolins knockout en JNK semblaven estar protegits en front al desenvolupament de l'obesitat i la resistència a la insulina [350].

Per últim, en el primer estudi, vam voler analitzar les correlacions entre l'expressió hepàtica d'aquests gens prèviament avaluats i diverses variables bioquímiques de les pacients. Primer de tot, vam observar una correlació entre l'expressió d'ARNm hepàtic de WNT5A i els nivells circulants de gamma-glutamil transferasa (GGT), un dels principals marcadors d'afectació hepàtica, ja que es coneix que els nivells de GGT augmenten significativament amb el grau d'esteatosi i fibrosi [351]. Per tant, tindria sentit creure que la proteïna WNT5A juga un paper clau en la progressió de la MFGNA. A més a més, vam trobar que les expressions d'ARNm hepàtic de SFRP5, WNT5A i JNK estaven correlacionades entre si. Aquest fet es pot explicar perquè els tres gens augmenten significativament en l'estat d'ES respecte al grup control, però només



l'expressió de SFRP5 disminueix significativament en EHNA, mentre que les expressions de WNT5A i JNK tenen una tendència lleu a disminuir, però de forma no significativa, per tant es mantenen. Aquestes tendències semblen suggerir que en els primers estadis de la MFGNA, la proteïna SFRP5 competeix contra l'activació de la via WNT-JNK, actuant amb un rol protector. En canvi, en una etapa avançada de dany hepàtic i inflamació, el seu efecte sembla estar desregulat i predomina l'acció de la via no canònica de WNT-JNK, la qual indueix la progressió de la MFGNA.

Posteriorment, donat que els anterior resultats semblen suggerir que les antagonistes SFRP5/WNT5A podrien estar relacionades amb la patogènia de la MFGNA, vam voler avaluar l'expressió d'ARNm de SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  en el SAT i en el VAT de les pacients amb OM i diferents graus d'afectació hepàtica, i en el grup de dones amb PN sense afectació hepàtica. D'aquesta manera volíem profunditzar en el coneixement del paper d'aquesta via en la disfunció metabòlica, concretament en el lloc de síntesi d'aquestes proteïnes, el teixit adipós [290], el qual té una forta influència en l'aparició i la progressió de la MFGNA [224].

En primer lloc, vam trobar una expressió d'ARNm de SFRP5 notablement més elevada en el VAT que en el SAT de les pacients estudiades. Aquest fet dóna suport a estudis anteriors que suggereixen que la proteïna SFRP5 es sintetitza i es secreta principalment en el VAT [275,352]. A més, també vam trobar una major abundància d'ARNm de WNT5A en el VAT en comparació amb el SAT en tota la cohort, cosa que és coherent amb resultats prèviament publicats [353,354]. En aquest sentit, SFRP5 i WNT5A del VAT podrien tenir un paper rellevant en la patogènesi de la MFGNA donada la implicació d'aquest teixit en el lliurament d'adipoquines i AGL a la circulació portal, la qual irriga directament el fetge [355]. Tanmateix, PPAR $\gamma$ , el qual està molt implicat en diverses funcions del teixit adipós [356], va presentar nivells d'expressió similars entre el SAT i el VAT.

Quant a l'expressió en teixit adipós de SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  en relació a l'obesitat, vam trobar una expressió de SFRP5 augmentada en el VAT del grup amb OM en comparació amb el grup control. Els nostres resultats són coherents amb articles anteriors, que suggerien que l'expressió de SFRP5 augmentava en el teixit adipós de models animals en presència d'obesitat, induint així l'adipogènesi [282,283,324,325]. Tanmateix, no vam trobar una expressió significativament augmentada de PPAR $\gamma$  en el VAT del grup amb OM, tot i ser el principal regulador de l'adipogènesi [357]. Per contra, els nostres resultats difereixen dels d'Ouchi et al., ja que aquests autors van demostrar en models animals que l'expressió de SFRP5 en el teixit adipós es reduïa



## 5. DISCUSSIÓ GLOBAL

---

en resposta a una disfunció metabòlica severa relacionada amb l'obesitat [275]. Aquestes controvèrsies es podrien explicar per la variabilitat en el model d'estudi utilitzat o per la dieta molt baixa en calories que van seguir les nostres pacients amb OM tres setmanes abans de la cirurgia bariàtrica, la qual no va ser seguida pel grup control amb PN. Aquesta dieta estricta es va indicar amb la finalitat de reduir l'IMC inicial abans de la cirurgia i, en aquest sentit, Tan et al. i Schulte et al. van informar que els nens i adults, respectivament, amb una dieta de restricció calòrica presentaven un augment dels nivells sèrics de SFRP5 [343,344], proposant aquesta adipoquina com a possible biomarcador dels efectes antiinflamatoris de les intervencions dietètiques [344]. A més, i d'acord amb aquests fets, en l'article publicat del primer estudi d'aquesta tesi doctoral [358], ja vam informar de nivells circulants més alts de SFRP5 en pacients amb OM, els quals es van sotmetre a la mateixa dieta hipocalòrica.

D'altra banda, només hem trobat una disminució significativa dels nivells de WNT5A en el SAT de pacients amb OM en comparació amb el grup control. Els nostres resultats són difícils d'explicar, ja que encara no s'han reportat diferències significatives quant a l'expressió de WNT5A en el SAT entre subjectes amb obesitat i sense obesitat. En aquest sentit, Catalán et al. van informar d'una tendència disminuïda quant a l'expressió dels nivells d'ARNm de WNT5A en el SAT de pacients amb obesitat en comparació amb subjectes primis, però els resultats no van ser estadísticament significatius [345]. D'altra banda, s'ha trobat que la via WNT5A es troba notablement més activada al VAT que en la SAT en presència d'obesitat [353,354], cosa que és coherent amb els nostres resultats inicials sobre l'expressió de WNT5A en el VAT en comparació amb la del SAT, tenint en compte tota la nostra cohort, la majoria presentant OM. En qualsevol cas, hem de tornar a esmentar que les nostres pacients amb OM es van sotmetre a una dieta molt baixa en calories per induir la pèrdua de pes abans de la cirurgia i, tal i com Catalán et al. van postular, la pèrdua de pes podria conduir a reduir els nivells circulants de l'adipoquina WNT5A [345]. A més, és important tenir en compte que tant el SAT com el VAT són dipòsits de greix que presenten diferents patrons d'expansió durant l'obesitat [359] i, atès que l'activació de la senyalització de WNT mitjançant una dieta alta en greixos estimula la hipertròfia i la sobreproliferació dels adipòcits en el SAT [360], creiem que una dieta molt restrictiva podria induir l'efecte contrari, inactivant la via de WNT.

Per tant, tots aquests fets ens porten a la hipòtesi de que la dieta regula els nivells d'adipoquines, que són secretades principalment pel teixit adipós, cosa que suggereix que els canvis en la dieta podrien tenir un impacte directe en l'expressió gènica i d'ARNm en el teixit adipós i en la seva



funció endocrina [361,362]. Tanmateix, s'ha de validar encara més aquesta hipòtesi en altres cohorts o en pacients sotmesos a altres dietes.

Pel que fa a l'expressió de PPAR $\gamma$  al teixit adipós, no vam trobar diferències significatives entre els grups amb OM i el grup de amb PN, de la mateixa manera que els hi va passar a Torres et al. en el seu estudi [363]. Els autors d'aquest recent article van fer una revisió sistemàtica d'estudis anteriors que informaven de l'expressió de PPAR $\gamma$  en el teixit adipós i van trobar resultats contradictoris: 12 estudis anteriors van demostrar una expressió d'ARNm de PPAR $\gamma$  augmentada en obesitat, 8 estudis van informar d'una expressió disminuïda i 4 investigacions no van trobar diferències en comparació amb els subjectes primis. En aquest sentit, encara que PPAR $\gamma$  es consideri el regulador principal de l'adipogènesi [357], el mecanisme precís que juga PPAR $\gamma$  en el teixit adipós durant l'obesitat en humans, encara no està clar. Aquests mateixos autors van proposar variables que podien provocar les discrepàncies entre els resultats prèviament mencionats, com una mida de la mostra petita, variacions en el gen de referència utilitzat o diferències quant a les característiques entre els grups d'estudi (sexe, franja d'edat, sensibilitat a la insulina, pèrdua de pes recent) i, fins i tot, el tipus de teixit adipós analitzat (VAT, SAT o total) [363–367].

Posteriorment, vam voler avaluar l'expressió en teixit adipós de SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  en relació a la patogènesi de la MFGNA. Començant per la SFRP5, es va observar una expressió més elevada de l'ARNm de SFRP5 en el grup amb MFGNA en comparació amb pacients amb HHN tant en el SAT com en el VAT. A continuació, per entendre millor aquesta troballa, vam dividir els pacients amb MFGNA segons els seu grau d'histologia hepàtica. Per un costat, vam observar una expressió més alta de SFRP5 en el SAT de pacients amb EHNA en comparació amb el grup amb HHN; mentre que en el VAT, vam trobar una expressió augmentada de SFRP5 en pacients amb ES (concretament en un estat lleu) i en pacients amb EHNA, en comparació amb les participants amb una HHN. Pel que fa a WNT5A, no vam veure diferències significatives quant a la seva expressió d'ARNm entre el grup amb HHN i el grup amb MFGNA. Tot i això, si que vam trobar una expressió elevada de WNT5A en el SAT de pacients amb ES comparant-ho amb el grup amb fetge normal; i un pic d'expressió de WNT5A en el VAT de pacients amb ES lleu en comparació amb aquelles pacients que presentaven HHN, ES moderada o severa o fins i tot aquelles amb EHNA. Segons el nostre coneixement, som els primers en investigar la via SFRP5/WNT5A en el teixit adipós en relació a la MFGNA en pacients humans. Els nostres resultats suggereixen que les pacients amb MFGNA presenten una expressió augmentada de SFRP5 en els seus teixits adiposos, específicament en el SAT en pacients amb EHNA i en el VAT, aquelles amb ES lleu o





## 5. DISCUSSIÓ GLOBAL

---

EHNA. Com que s'ha informat de que la SFRP5 és una adipoquina antiinflamatòria produïda i secretada pel teixit adipós [335,368–370], es planteja la hipòtesi de que l'augment en l'abundància de l'ARNm de SFRP5 a mesura que avança la MFGNA, podria ser degut a la intenció d'aquesta molècula de protegir el teixit adipós en front a la inflamació i l'acumulació de lípids, com també per contrarestar el desequilibri inflamatori i metabòlic. Aquest paper protector de SFRP5 també es va suggerir en el fetge, a causa dels resultats del primer estudi d'aquesta tesi doctoral [358]. D'altra manera, l'expressió de SFRP5 en el teixit adipós dels pacients amb MFGNA també podria estar augmentada per la pròpia malaltia hepàtica donada la intercomunicació entre ambdós teixits [341]. Com que s'ha suggerit que l'obesitat indueix l'expressió de SFRP5 en ratolins i humans [371], es planteja la hipòtesi que la MFGNA pot produir el mateix efecte quan hi ha un desequilibri metabòlic. En aquest sentit, Choudhary et al. van informar d'una correlació positiva entre el volum del SAT i el volum total de teixit adipós amb el grau d'esteatosi hepàtica i la gravetat de la malaltia, però cap dels volums de teixit adipós es va correlacionar amb les característiques principals de l'EHNA com són la inflamació lobulillar, la balonització o la fibrosi hepàtica [372]. D'altra banda, dos informes anteriors també van demostrar un augment del volum del VAT en pacients amb MFGNA/EHNA [373,374]. No obstant això, nosaltres no hem trobat diferències significatives quant a l'expressió d'ARNm de PPAR $\gamma$ , el regulador clau de l'adipogènesi [357]; a més, vam observar que en el SAT de subjectes amb ES lleu, hi havia una expressió més elevada de WNT5A, un inhibidor de la diferenciació dels pre-adipòcits [327,357]. Tot i així, l'augment de l'expressió de WNT5A al teixit adipós tindria sentit en les primeres etapes de l'esteatosi, ja que en subjectes amb OM, hi ha una sobre-proliferació del teixit adipós mediada per WNT5A [359]. Aquesta proliferació excessiva dóna lloc a una saturació dels dipòsits de greix del teixit adipós que redueixen la seva sensibilitat a la insulina [375,376]. En aquest sentit, la resistència a la insulina pot afectar el fetge induint esteatosi hepàtica [377]. A més, el nostre estudi anterior va informar d'una expressió incrementada de WNT5A en mostres de fetge de pacients amb MFGNA [337], donant consistència a una diafonia entre ambdós teixits. Per tant, les troballes actuals i les evidències prèvies suggereixen la possible desregulació de les dues adipoquines competidores (SFRP5/WNT5A) en el teixit adipós de pacients amb MFGNA, probablement en el context de la disfunció metabòlica associada a l'obesitat [378,379], destacant el paper important de l'eix teixit adipós-fetge en la progressió de la malaltia [380].

Una vegada avaluada la implicació d'aquesta via en l'obesitat i en la MFGNA, i donada la forta relació d'aquestes i de la via amb la disfunció metabòlica dels individus, es va voler estudiar l'expressió de SFRP5, WNT5A i PPAR $\gamma$  en teixit adipós segons la presència de SM i els seus



components (DMT2, dislipèmia i hipertensió). Primer de tot, vam trobar una expressió reduïda de WNT5A en el SAT de pacients diabètiques i una expressió reduïda de WNT5A en el VAT de pacients amb SM. En aquest sentit, tot i que WNT5A té un paper lipogènic, s'ha vist que la inhibició de la seva via en el pàncrees pot provocar diabetis [376], cosa que coincideix amb els nostres resultats. Per contra, s'ha trobat que la senyalització no canònica de WNT5A té un paper essencial en la inflamació del VAT induïda per l'obesitat i la disfunció metabòlica, la qual pot promoure l'aparició de la resistència a la insulina en condicions de sobrealimentació [345,354,381]. Tanmateix, aquesta discrepància pot ser deguda principalment a la dieta hipocalòrica que segueixen les nostres pacients amb OM abans de la cirurgia i, com s'ha mencionat anteriorment, aquest fet s'hauria d'estudiar en subjectes sota altres condicions alimentàries. Centrant-nos en el PPAR $\gamma$ , una proteïna sensibilitzant a la insulina implicada en la inhibició de la lipogènesi [382,383], té sentit que en el nostre estudi, els nivells de ARNm de PPAR $\gamma$  es trobessin més baixos en el SAT de les pacients amb SM i d'aquelles amb DMT2 en comparació amb les persones sanes. Finalment, comentar que en aquesta anàlisi, no hem trobat variacions significatives en l'abundància d'ARNm de SFRP5 en els teixits adiposos en funció de les comorbiditats estudiades. En aquest estudi, les diferències significatives trobades estaven presents majoritàriament en el SAT, cosa que es pot explicar atès que aquest dipòsit de greix protegeix als altres teixits de la lipotoxicitat, actuant com un "tampó" en front a un ingesta elevada de lípids en la dieta; també, s'ha informat d'un perfil diferent d'adipoquines secretades entre el SAT i el VAT [384,385].

Per finalitzar, vam analitzar les correlacions entre les expressions en teixit adipós de les molècules estudiades i els nivells circulants d'algunes citocines relacionades amb la MFGNA. D'una banda, vam observar una correlació positiva entre l'ARNm de SFRP5 en SAT i citocines proinflamatòries com la IL-8 i la IL-17, les quals es solen presentar en nivells elevats en pacients amb malaltia hepàtica grassa [386,387]. Aquesta correlació té sentit, ja que hem proposat que els nivells de SFRP5 en teixit adipós augmenten per a contrarestar el dany tissular que es dona a mesura que avança l'afectació hepàtica, representada amb l'increment dels nivells de les citocines proinflamatòries. A més, també es va trobar una correlació positiva entre l'expressió de SFRP5 en el SAT i els nivells de IL-22, el paper de la qual en la MFGNA encara no està clar, ja que alguns estudis han indicat una possible acció protectora durant la lesió hepàtica [242,388], mentre que altres proposen que pot promoure el desenvolupament de la MFGNA [389]. D'altra banda, vam evidenciar una correlació negativa entre l'ARNm de SFRP5 en SAT i els nivells de resistina i adiponectina. La resistina és una citocina proinflamatòria circulant que augmenta en



## 5. DISCUSSIÓ GLOBAL

---

l'obesitat [265] i en la MFGNA [390], mentre que l'adiponectina és una adipoquina antiinflamatòria que tendeix a disminuir en pacients amb MFGNA en comparació amb la dels subjectes amb HHN [338,391]. Aquestes correlacions són difícils d'explicar i donen lloc a controvèrsies, ja que l'expressió de SFRP5, una molècula suposadament antiinflamatòria, es correlaciona negativament amb una citocina proinflamatòria, però també amb una altra citocina antiinflamatòria. Per a intentar entendre aquest resultat, hem d'esmentar primerament que en el nostre estudi l'expressió en SAT de SFRP5 augmentava en pacients amb EHNA. A més, cal destacar que aquesta correlació es dona amb l'expressió en el SAT, no en el VAT, que és el principal inductor de la inflamació crònica de baix grau en l'obesitat [392]. També cal dir, que s'ha demostrat un patró diferencial de funcionalitat i producció d'adipoquines entre ambdós teixits a causa de la funció de "tampó" que té el SAT [20,393]. Finalment, mencionar que les nostres pacients, tot i presentar OM, han patit una pèrdua de pes a causa de la restricció calòrica prèvia a la cirurgia, per la qual cosa els seus nivells de citocines es poden veure alterats respecte a altres subjectes amb el mateix nivell d'obesitat que no hagin seguit aquesta dieta [394], i és per això que els patrons de referència dels nivells de citocines en pacients amb obesitat no serien massa útils en la nostra cohort.

Pel que fa a les correlacions amb l'expressió de l'ARNm de SFRP5 en el VAT, hem trobat una correlació positiva amb els nivells de les citocines proinflamatòries IL-1 $\beta$ , IL-17 i PAI-1, l'augment de les quals s'ha relacionat amb l'obesitat i la MFGNA [387,395,396] i també amb els nivells de IL-13, una citocina amb un paper antiinflamatori que acostuma a augmentar en l'obesitat [211] i que presenta efectes beneficiosos en les malalties hepàtiques [397], com ja s'ha plantejat que podria fer també la SFRP5. Tots aquests resultats són coherents amb els anteriors, ja que l'expressió d'ARNm de SFRP5 al VAT es troba significativament elevada en pacients amb OM en comparació amb subjectes primes, a la vegada que la trobem augmentada en el teixit adipós de pacients amb MFGNA.

En relació amb l'ARNm de WNT5A en SAT, vam observar una correlació positiva amb els nivells de IL-1 $\beta$ , una citocina proinflamatòria relacionada amb la progressió de la MFGNA [395] i amb l'antiinflamatòria adiponectina [338,391]. Passa el mateix que amb la correlació anterior amb els nivells de SFRP5 en SAT, que probablement es doni a causa del peculiar pic d'expressió que presenten aquestes proteïnes (SFRP5 i WNT5A) en el grup de pacients amb ES lleu. Centrant-nos en les correlacions amb l'abundància d'ARNm de WNT5A en el VAT, vam trobar una associació positiva amb la IL-13, que s'ha esmentat anteriorment en l'anàlisi de SFRP5 en el SAT. A més, vam trobar una associació negativa entre l'ARNm de WNT5A en el VAT i els nivells de MCP-1,



una adipoquina proinflamatòria [398] que presenta nivells més alts d'acord amb un augment de l'IMC, donant lloc a una inflamació crònica de baix grau [399]. Aquesta tendència és similar a la de les correlacions de SFRP5 amb les citocines proinflamatòries.

En resum, i tenint en compte els dos estudis que componen aquesta tesi doctoral, podem suggerir que tant SFRP5 com WNT5A en fetge i en teixit adipós semblen estar implicades en la patogènia de la MFGNA i, per tant, podrien ser considerades unes atractives dianes terapèutiques per a prevenir la lipogènesi, la resistència a la insulina, la inflamació i el consegüent dany hepàtic [400], ja que sembla que la seva síntesi s'incrementa durant la MFGNA en pacients amb OM [343,344]. Aquests fets donarien rellevància a la forta influència del teixit adipós en la malaltia hepàtica i destaquen el paper de l'eix teixit adipós-fetge en l'aparició i la progressió de la malaltia. De totes maneres, els mecanismes precisos pels quals la via de SFRP5/WNT5A està implicada en la patogènia de la MFGNA lligada a obesitat segueixen no sent del tot clars. Tanmateix, calen més investigacions en aquest camp per determinar el rol específic que les molècules competidores SFRP5 i WNT5A en fetge i teixit adipós juguen en la MFGNA.

En aquests dos estudis la nostra cohort de dones amb OM ens ha permès establir algunes relacions entre l'expressió d'ARNm en fetge i teixit adipós (SAT i VAT) de les molècules de la via WNT (SFRP5, WNT5A i JNK o PPAR $\gamma$ ) amb la MFGNA, l'obesitat i la SM sense la interferència de factors de confusió com són el sexe o l'edat. No obstant això, aquests resultats no es poden extrapol·lar a altres grups d'obesitat, pacients que no segueixen una dieta de restricció calòrica o homes, ja que aquestes dues investigacions s'han dut a terme en una cohort molt concreta de pacients, com per exemple pacients amb OM les quals tenen un IMC molt restringit, i això és atès que les mostres de fetge són molt difícil d'obtenir i aquestes han sigut recol·lectades exclusivament de cirurgies bariàtriques, les quals només es duen a terme en pacients amb un IMC que pugui comportar complicacions a la salut del pacient. A més a més, en aquests dos estudis només s'han inclòs dones, principalment per evitar l'efecte de confusió del sexe, ja que és conegut que el metabolisme dels glúcids i dels lípids, tal com els nivells d'hormones i citocines varien entre homes i dones. També perquè la major part dels pacients que s'operen de cirurgia bariàtrica són dones, i per assolir una cohort equitativa quant a ambdós sexes, hagués sigut necessari molt més de temps. A més, és important esmentar que les participants amb OM es trobaven sota una dieta estricta per a reduir el seu pes corporal durant tres mesos abans de l'operació i en una dieta molt baixa en calories durant les tres setmanes prèvies, el qual pot afectar, òbviament, als resultats obtinguts. També cal dir que la cohort estudiada podia beure un màxim de 10 g d'alcohol per dia, per la qual cosa no podem descartar completament cap



## 5. DISCUSSIÓ GLOBAL

---

efecte sobre els nivells de les adipoquines avaluades, ni tan sols sobre la histologia hepàtica. Així mateix, no som capaços d'explicar si les associacions descrites són causades per una relació causal o si són simplement un epifenomen en el context d'aquests mecanismes metabòlics complexos. La falta de pressupost ha limitat el fet de poder dur a terme estudis d'expressió de proteïna. Per tant, i donat els resultats esperançadors d'aquesta tesi, les perspectives de futur respecte a aquestes investigacions es basen principalment en el fet que es puguin validar els nostres resultats. En aquest sentit, i donades les noves troballes dels estudis d'aquesta tesi doctoral, es pretén, en primer lloc, dur a terme un estudi d'expressió de proteïna i potser també d'immunohistoquímica per a verificar l'expressió de les proteïnes estudiades en el teixit hepàtic i adipós de la nostra cohort d'estudi. Posteriorment, si els resultats a escala de proteïna recolzen les nostres troballes quant a l'ARNm, es podria dissenyar un estudi en cultius secundaris d'hepatòcits i adipòcits on s'avaluï el rol de la proteïna SFRP5 en diferents condicions similars a l'acumulació de lípids i a la inflamació, i també l'acció de la via WNT mitjançant processos d'activació i d'inactivació de la via amb siRNAs i miRNAs per a establir el flux d'acció que du a terme la proteïna SFRP5 i la via WNT en condicions similars a les que es donen en la MFGNA. A continuació, això es podria reproduir en un cultiu cel·lular primari a partir de mostres dels mateixos pacients per a establir aquesta relació en la MFGNA associada a l'obesitat en dones en edat fèrtil. Seguidament, també es podria pensar a dur a terme estudis en models animals com a ratolins, ja que la modulació de la SFRP5 té bones perspectives per a ser una bona opció terapèutica per a la MFGNA associada a l'obesitat.

## ***6. Conclusions***

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



Com a conclusions dels estudis de la present tesi doctoral postulem:

- Conclusions del **PRIMER ESTUDI**:
  1. Els nivells circulants de SFRP5 augmenten després de la restricció calòrica en subjectes amb OM independentment de si presenten o no MFGNA i del seu estadi histològic.
  2. La SFRP5 hepàtica augmenta en els primers estadis de la MFGNA probablement duent a terme un paper protector amb la intenció de frenar l'efecte danyí de la via no canònica de WNT.
  3. L'acció de la SFRP5 hepàtica es veu desregulada en una etapa avançada de la MFGNA induint-se en conseqüència, l'acció de WNT5A i JNK, el que afavoreix el dany hepàtic i la progressió de la malaltia.
- Conclusions del **SEGON ESTUDI**:
  4. L'expressió de SFRP5 en el VAT i en el SAT sembla estar induïda per l'obesitat i per la progressió de la MFGNA, amb un possible paper protector contra el desequilibri metabòlic.
  5. L'augment de l'expressió de WNT5A en el teixit adipós de pacients amb ES sembla estar relacionada amb l'acumulació de greix al fetge, amb la resistència a la insulina i amb la inflamació.
  6. La via SFRP5/WNT5A al teixit adipós podria tenir un paper important en la patogènesi de la MFGNA lligada a l'obesitat a través de l'eix teixit adipós-fetge.

**En definitiva, la via SFRP5/WNT5A en fetge i teixit adipós sembla estar involucrada en la patogènesi de la MFGNA, tot i que futurs estudis són necessaris per a aclarir aquestes troballes.**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

## ***7. Referències***

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



1. Lin, X.; Li, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 706978, doi:10.3389/fendo.2021.706978.
2. Al Kibria, G.M.; Swasey, K.; Hasan, M.Z.; Sharmeen, A.; Day, B. Prevalence and Factors Associated with Underweight, Overweight and Obesity among Women of Reproductive Age in India. *Glob. Health Res. Policy* **2019**, *4*, 24, doi:10.1186/s41256-019-0117-z.
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) Worldwide Trends in Body-Mass Index, Underweight, Overweight, and Obesity from 1975 to 2016: A Pooled Analysis of 2416 Population-Based Measurement Studies in 128.9 Million Children, Adolescents, and Adults. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *390*, 2627–2642, doi:10.1016/S0140-6736(17)32129-3.
4. Chen, Y.; Peng, Q.; Yang, Y.; Zheng, S.; Wang, Y.; Lu, W. The Prevalence and Increasing Trends of Overweight, General Obesity, and Abdominal Obesity among Chinese Adults: A Repeated Cross-Sectional Study. *BMC Public Health* **2019**, *19*, 1293, doi:10.1186/s12889-019-7633-0.
5. Jia, W. Obesity in China: Its Characteristics, Diagnostic Criteria, and Implications. *Front. Med.* **2015**, *9*, 129–133, doi:10.1007/s11684-015-0387-x.
6. Tauqeer, Z.; Gomez, G.; Stanford, F.C. Obesity in Women: Insights for the Clinician. *J. Womens Health* **2018**, *27*, 444–457, doi:10.1089/jwh.2016.6196.
7. Hales, C.M. *Prevalence of Obesity and Severe Obesity Among Adults: United States, 2017–2018*; NCHS Data Brief; National Center for Health Statistics: Hyattsville, MD, USA, 2020; p. 8.
8. World Health Organization A Healthy Lifestyle - WHO Recommendations. *World Health Organ.* 2010. <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations>. Last access: 9th Jan 2023.
9. Sheikh, A.B.; Nasrullah, A.; Haq, S.; Akhtar, A.; Ghazanfar, H.; Nasir, A.; Afzal, R.M.; Bukhari, M.M.; Chaudhary, A.Y.; Naqvi, S.W. The Interplay of Genetics and Environmental Factors in the Development of Obesity. *Cureus* **2017**, *9*, e1435, doi:10.7759/cureus.1435.
10. Jackson, V.M.; Breen, D.M.; Fortin, J.-P.; Liou, A.; Kuzmiski, J.B.; Loomis, A.K.; Rives, M.-L.; Shah, B.; Carpino, P.A. Latest Approaches for the Treatment of Obesity. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10*, 825–839, doi:10.1517/17460441.2015.1044966.
11. Powell, L.H.; Calvin, J.E.; Calvin, J.E. Effective Obesity Treatments. *Am. Psychol.* **2007**, *62*, 234–246, doi:10.1037/0003-066X.62.3.234.
12. Papapietro, V.K. Cirugía para la obesidad: efectos generales, beneficios y riesgos. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **2012**, *23*, 189–195, doi:10.1016/S0716-8640(12)70297-3.
13. Nguyen, N.T.; Varela, J.E. Bariatric Surgery for Obesity and Metabolic Disorders: State of the Art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 160–169, doi:10.1038/nrgastro.2016.170.
14. Carvalho Silveira, F.; Maranga, G.; Mitchell, F.; Nowak, B.A.; Ren-Fielding, C.J.; Fielding, G.A. First-Year Weight Loss Following Gastric Band Surgery Predicts Long-Term Outcomes. *ANZ J. Surg.* **2021**, *91*, 2443–2446, doi:10.1111/ans.17233.
15. Berger, E.R.; Huffman, K.M.; Fraker, T.; Petrick, A.T.; Brethauer, S.A.; Hall, B.L.; Ko, C.Y.; Morton, J.M. Prevalence and Risk Factors for Bariatric Surgery Readmissions: Findings From 130,007 Admissions in the Metabolic and Bariatric Surgery Accreditation and Quality Improvement Program. *Ann. Surg.* **2018**, *267*, 122–131, doi:10.1097/SLA.0000000000002079.
16. Clínica Ricardo Palma Cirugía bariátrica y metabólica. *Clínica Ricardo Palma Grupo Quirón*. <https://www.crp.com.pe/folleto/cirugia-bariatrica-y-metabolica/>. Last access: 9th Jan 2023.
17. Anonymous FDA-Approved Drugs to Treat Overweight and Obesity. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.* **2021**, *59*, 5–6, doi:10.3928/02793695-20210702-79.
18. Tchang, B.G.; Aras, M.; Kumar, R.B.; Aronne, L.J. Pharmacologic Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *Endotext* 2021. PMID: 25905267.
19. Camilleri, M.; Acosta, A. Combination Therapies for Obesity. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2018**, *16*, 390–394, doi:10.1089/met.2018.0075.
20. Mittal, B. Subcutaneous Adipose Tissue & Visceral Adipose Tissue. *Indian J. Med. Res.* **2019**, *149*, 571, doi:10.4103/ijmr.IJMR\_1910\_18.
21. Cinti, S. The Adipose Organ at a Glance. *Dis. Model. Mech.* **2021**, *5*, 588–594, doi:10.1242/dmm.009662.
22. Lo, K.A.; Sun, L. Turning WAT into BAT: A Review on Regulators Controlling the Browning of White Adipocytes. *Biosci. Rep.* **2013**, *33*, e00065, doi:10.1042/BSR20130046.
23. Lidell, M.E. Brown Adipose Tissue in Human Infants. In *Brown Adipose Tissue*; Pfeifer, A., Klingenspor, M., Herzig, S., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 251, pp. 107–123 ISBN 978-3-030-10512-9.



## 8. REFERÈNCIES

24. Alligier, M.; Gabert, L.; Meugnier, E.; Lambert-Porcheron, S.; Chanseume, E.; Pilleul, F.; Debard, C.; Sauvinet, V.; Morio, B.; Vidal-Puig, A.; et al. Visceral Fat Accumulation during Lipid Overfeeding Is Related to Subcutaneous Adipose Tissue Characteristics in Healthy Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 802–810, doi:10.1210/jc.2012-3289.
25. Spoto, B.; Di Betta, E.; Mattace-Raso, F.; Sijbrands, E.; Vilardi, A.; Parlongo, R.M.; Pizzini, P.; Pisano, A.; Vermi, W.; Testa, A.; et al. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Gene Expression in Subcutaneous and Visceral Fat in Severe Obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **2014**, *24*, 1137–1143, doi:10.1016/j.numecd.2014.04.017.
26. McLaughlin, T.; Lamendola, C.; Liu, A.; Abbasi, F. Preferential Fat Deposition in Subcutaneous versus Visceral Depots Is Associated with Insulin Sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, E1756-1760, doi:10.1210/jc.2011-0615.
27. Chait, A.; den Hartigh, L.J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **2020**, *7*, 22, doi:10.3389/fcvm.2020.00022.
28. Fuster, J.J.; Ouchi, N.; Gokce, N.; Walsh, K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1786–1807, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306885.
29. Smith, C.J.; Perfetti, T.A.; Hayes, A.W.; Berry, S.C. Obesity as a Source of Endogenous Compounds Associated With Chronic Disease: A Review. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2020**, *175*, 149–155, doi:10.1093/toxsci/kfaa042.
30. Hill, M.A.; Yang, Y.; Zhang, L.; Sun, Z.; Jia, G.; Parrish, A.R.; Sowers, J.R. Insulin Resistance, Cardiovascular Stiffening and Cardiovascular Disease. *Metabolism* **2021**, *119*, 154766, doi:10.1016/j.metabol.2021.154766.
31. Brown, A.E.; Walker, M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Curr. Cardiol. Rep.* **2016**, *18*, 75, doi:10.1007/s11886-016-0755-4.
32. Lee, S.-H.; Park, S.-Y.; Choi, C.S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab. J.* **2022**, *46*, 15–37, doi:10.4093/dmj.2021.0280.
33. Roberts, C.K.; Hevener, A.L.; Barnard, R.J. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. In *Comprehensive Physiology*; Terjung, R., Ed.; Wiley, 2013; pp. 1–58 ISBN 978-0-470-65071-4.
34. Oda, E. Historical Perspectives of the Metabolic Syndrome. *Clin. Dermatol.* **2018**, *36*, 3–8, doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.002.
35. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.-C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith, S.C. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
36. McCracken, E.; Monaghan, M.; Sreenivasan, S. Pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Clin. Dermatol.* **2018**, *36*, 14–20, doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
37. Halberg, N.; Wernstedt-Asterholm, I.; Scherer, P.E. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2008**, *37*, 753–768, doi:10.1016/j.ecl.2008.07.002.
38. Holvoet, P. Relations between Metabolic Syndrome, Oxidative Stress and Inflammation and Cardiovascular Disease. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* **2008**, *70*, 193–219.
39. Rosselli, M.; Lotersztajn, S.; Vizzutti, F.; Arena, U.; Pinzani, M.; Marra, F. The Metabolic Syndrome and Chronic Liver Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 5010–5024, doi:10.2174/1381612819666131206111352.
40. Marchesini, G.; Brizi, M.; Bianchi, G.; Tomassetti, S.; Bugianesi, E.; Lenzi, M.; McCullough, A.J.; Natale, S.; Forlani, G.; Melchionda, N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* **2001**, *50*, 1844–1850, doi:10.2337/diabetes.50.8.1844.
41. Kim, C.H.; Younossi, Z.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Manifestation of the Metabolic Syndrome. *Cleve. Clin. J. Med.* **2008**, *75*, 721–728, doi:10.3949/ccjm.75.10.721.
42. Katsiki, N.; Perez-Martinez, P.; Anagnostis, P.; Mikhailidis, D.P.; Karagiannis, A. Is Nonalcoholic Fatty Liver Disease Indeed the Hepatic Manifestation of Metabolic Syndrome? *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2018**, *16*, 219–227, doi:10.2174/1570161115666170621075619.
43. Enomoto, H. Liver Fibrosis Markers of Nonalcoholic Steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 7427, doi:10.3748/wjg.v21.i24.7427.
44. Barritt, A.S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Assessments, and Interventions Entering 2021. *Clin. Ther.* **2021**, *43*, 436–437, doi:10.1016/j.clinthera.2021.01.022.
45. Powell, E.E.; Wong, V.W.-S.; Rinella, M. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Lancet Lond. Engl.* **2021**, *397*, 2212–2224, doi:10.1016/S0140-6736(20)32511-3.



46. Younossi, Z.M.; Koenig, A.B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes: *HEPATOLOGY*, Vol. XX, No. X 2016. *Hepatology* **2016**, *64*, 73–84, doi:10.1002/hep.28431.
47. Eslam, M.; Sanyal, A.J.; George, J.; Sanyal, A.; Neuschwander-Tetri, B.; Tiribelli, C.; Kleiner, D.E.; Brunt, E.; Bugianesi, E.; Yki-Järvinen, H.; et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1999–2014.e1, doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312.
48. Lin, S.; Huang, J.; Wang, M.; Kumar, R.; Liu, Y.; Liu, S.; Wu, Y.; Wang, X.; Zhu, Y. Comparison of MAFLD and NAFLD Diagnostic Criteria in Real World. *Liver Int.* **2020**, *40*, 2082–2089, doi:10.1111/liv.14548.
49. Cotter, T.G.; Rinella, M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1851–1864, doi:10.1053/j.gastro.2020.01.052.
50. Lazarus, J.V.; Mark, H.E.; Anstee, Q.M.; Arab, J.P.; Batterham, R.L.; Castera, L.; Cortez-Pinto, H.; Crespo, J.; Cusi, K.; Dirac, M.A.; et al. Advancing the Global Public Health Agenda for NAFLD: A Consensus Statement. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *19*, 60–78, doi:10.1038/s41575-021-00523-4.
51. Yu, E.L.; Schwimmer, J.B. Epidemiology of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Liver Dis.* **2021**, *17*, 196–199, doi:10.1002/cld.1027.
52. Zelber-Sagi, S.; Nitzan-Kaluski, D.; Halpern, Z.; Oren, R. Prevalence of Primary Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Population-Based Study and Its Association with Biochemical and Anthropometric Measures. *Liver Int.* **2006**, *26*, 856–863, doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01311.x.
53. 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, doi:10.1038/nrgastro.2017.109.
54. Portillo-Sanchez, P.; Bril, F.; Maximov, M.; Lomonaco, R.; Biernacki, D.; Orsak, B.; Subbarayan, S.; Webb, A.; Hecht, J.; Cusi, K. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 2231–2238, doi:10.1210/jc.2015-1966.
55. Kasturiratne, A.; Weerasinghe, S.; Dassanayake, A.S.; Rajindrajith, S.; de Silva, A.P.; Kato, N.; Wickremasinghe, A.R.; de Silva, H.J. Influence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease on the Development of Diabetes Mellitus: Influence of NAFLD on Incident Diabetes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 142–147, doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07264.x.
56. Le, M.H.; Yeo, Y.H.; Li, X.; Li, J.; Zou, B.; Wu, Y.; Ye, Q.; Huang, D.Q.; Zhao, C.; Zhang, J.; et al. 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, S1542356521012805, doi:10.1016/j.cgh.2021.12.002.
57. Huh, Y.; Cho, Y.J.; Nam, G.E. Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Obes. Metab. Syndr.* **2022**, *31*, 17–27, doi:10.7570/jomes22021.
58. Zhang, X.; Wu, M.; Liu, Z.; Yuan, H.; Wu, X.; Shi, T.; Chen, X.; Zhang, T. Increasing Prevalence of NAFLD/NASH among Children, Adolescents and Young Adults from 1990 to 2017: A Population-Based Observational Study. *BMJ Open* **2021**, *11*, e042843, doi:10.1136/bmjopen-2020-042843.
59. Itoh, H.; Kanayama, N. Developmental Origins of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). In *Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)*; Kubota, T., Fukuoka, H., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, 2018; Vol. 1012, pp. 29–39 ISBN 978-981-10-5525-6.
60. Younossi, Z.M.; Blissett, D.; Blissett, R.; Henry, L.; Stepanova, M.; Younossi, Y.; Racila, A.; Hunt, S.; Beckerman, R. The Economic and Clinical Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States and Europe. *Hepatology* **2016**, *64*, 1577–1586, doi:10.1002/hep.28785.
61. Adams, L.A.; Roberts, S.K.; Strasser, S.I.; Mahady, S.E.; Powell, E.; Estes, C.; Razavi, H.; George, J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Burden: Australia, 2019–2030. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *35*, 1628–1635, doi:10.1111/jgh.15009.
62. Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.-C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2005**, *41*, 1313–1321, doi:10.1002/hep.20701.
63. Cohen, J.C.; Horton, J.D.; Hobbs, H.H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* **2011**, *332*, 1519–1523, doi:10.1126/science.1204265.
64. Nassir, F.; Rector, R.S.; Hammoud, G.M.; Ibdah, J.A. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *11*, 167–175.
65. Loomba, R.; Adams, L.A. The 20% Rule of NASH Progression: The Natural History of Advanced Fibrosis and Cirrhosis Caused by NASH. *Hepatology* **2019**, *70*, 1885–1888, doi:10.1002/hep.30946.
66. Chen, Y.-H.; Wu, W.-K.; Wu, M.-S. Microbiota-Associated Therapy for Non-Alcoholic Steatohepatitis-Induced Liver Cancer: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5999, doi:10.3390/ijms21175999.



## 8. REFERÈNCIES

67. Targher, G.; Byrne, C.D.; Tilg, H. NAFLD and Increased Risk of Cardiovascular Disease: Clinical Associations, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacological Implications. *Gut* **2020**, *69*, 1691–1705, doi:10.1136/gutjnl-2020-320622.
68. Larter, C.Z.; Chitturi, S.; Heydet, D.; Farrell, G.C. A Fresh Look at NASH Pathogenesis. Part 1: The Metabolic Movers. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *25*, 672–690, doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06253.x.
69. Sarwar, R.; Pierce, N.; Koppe, S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Perspectives. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2018**, *Volume 11*, 533–542, doi:10.2147/DMSO.S146339.
70. Divella, R.; Mazzocca, A.; Daniele, A.; Sabbà, C.; Paradiso, A. Obesity, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipocytokines Network in Promotion of Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 610–616, doi:10.7150/ijbs.29599.
71. VoPham, T. Environmental Risk Factors for Liver Cancer and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Epidemiol. Rep.* **2019**, *6*, 50–66, doi:10.1007/s40471-019-0183-2.
72. Guo, B.; Guo, Y.; Nima, Q.; Feng, Y.; Wang, Z.; Lu, R.; Baimayangji, Ma, Y.; Zhou, J.; Xu, H.; et al. Exposure to Air Pollution Is Associated with an Increased Risk of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2022**, *76*, 518–525, doi:10.1016/j.jhep.2021.10.016.
73. Arciello, M.; Gori, M.; Maggio, R.; Barbaro, B.; Tarocchi, M.; Galli, A.; Balsano, C. Environmental Pollution: A Tangible Risk for NAFLD Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 22052–22066, doi:10.3390/ijms141122052.
74. Kannan, K.; Vimalkumar, K. A Review of Human Exposure to Microplastics and Insights Into Microplastics as Obesogens. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 724989, doi:10.3389/fendo.2021.724989.
75. Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Lopes, I.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. Environmental Exposure to Microplastics: An Overview on Possible Human Health Effects. *Sci. Total Environ.* **2020**, *702*, 134455, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134455.
76. Tilson, S.G.; Morell, C.M.; Lenaerts, A.; Park, S.B.; Hu, Z.; Jenkins, B.; Koulman, A.; Liang, T.J.; Vallier, L. Modeling PNPLA3-Associated NAFLD Using Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology* **2021**, *74*, 2998–3017, doi:10.1002/hep.32063.
77. 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, doi:10.3748/wjg.v22.i29.6742.
78. Aragonès, G.; Auguet, T.; Armengol, S.; Berlanga, A.; Guiu-Jurado, E.; Aguilar, C.; Martínez, S.; Sabench, F.; Porras, J.; Ruiz, M.; et al. PNPLA3 Expression Is Related to Liver Steatosis in Morbidly Obese Women with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 630, doi:10.3390/ijms17050630.
79. Goffredo, M.; Caprio, S.; Feldstein, A.E.; D'Adamo, E.; Shaw, M.M.; Pierpont, B.; Savoye, M.; Zhao, H.; Bale, A.E.; Santoro, N. Role of TM6SF2 Rs58542926 in the Pathogenesis of Nonalcoholic Pediatric Fatty Liver Disease: A Multiethnic Study. *Hepatology* **2016**, *63*, 117–125, doi:10.1002/hep.28283.
80. Chen, X.; Gao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Mo, Z.; Tan, A. Relationship of FTO Gene Variations with NAFLD Risk in Chinese Men. *Open Life Sci.* **2020**, *15*, 860–867, doi:10.1515/biol-2020-0081.
81. Francesco, B.; Daniele, P.; Domenico, F.; Giovanna, C.; Giulia, T.; Francesco, A.; Francesco, V.; Maria, D.B. Reduced Lysosomal Acid Lipase Activity: A New Marker of Liver Disease Severity across the Clinical Continuum of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease? *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 4172–4180, doi:10.3748/wjg.v25.i30.4172.
82. Møhlenberg, M.; Eriksen, P.L.; Laursen, T.L.; Nielsen, M.B.; Hamilton Dutoit, S.J.; Grønbaek, H.; Hartmann, R.; Thomsen, K.L. The Presence of Interferon Affects the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Genes Immun.* **2022**, *23*, 157–165, doi:10.1038/s41435-022-00176-6.
83. Galmozzi, E.; D'Ambrosio, R. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Is the IFNL4 Rs368234815 Variant Protective from Liver Damage? *HepatoBiliary Surg. Nutr.* **2018**, *7*, 209–211, doi:10.21037/hbsn.2018.03.06.
84. Datz, C.; Müller, E.; Aigner, E. Iron Overload and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Minerva Endocrinol.* **2017**, *42*, doi:10.23736/S0391-1977.16.02565-7.
85. Martínez-Hernández, A.; Córdova, E.J.; Rosillo-Salazar, O.; García-Ortiz, H.; Contreras-Cubas, C.; Islas-Andrade, S.; Revilla-Monsalve, C.; Salas-Labadía, C.; Orozco, L. Association of HMOX1 and NQO1 Polymorphisms with Metabolic Syndrome Components. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0123313, doi:10.1371/journal.pone.0123313.
86. Petrtyl, J.; Dvořák, K.; Stříteský, J.; Leniček, M.; Jirásková, A.; Šmíd, V.; Haluzík, M.; Brůha, R.; Vítek, L. Association of Serum Bilirubin and Functional Variants of Heme Oxygenase 1 and Bilirubin UDP-Glucuronosyl Transferase Genes in Czech Adult Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants* **2021**, *10*, 2000, doi:10.3390/antiox10122000.
87. Wiest, R.; Albillos, A.; Trauner, M.; Bajaj, J.S.; Jalan, R. Targeting the Gut-Liver Axis in Liver Disease. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 1084–1103, doi:10.1016/j.jhep.2017.05.007.
88. Albillos, A.; de Gottardi, A.; Rescigno, M. The Gut-Liver Axis in Liver Disease: Pathophysiological Basis for Therapy. *J. Hepatol.* **2020**, *72*, 558–577, doi:10.1016/j.jhep.2019.10.003.





89. Parthasarathy, G.; Revelo, X.; Malhi, H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol. Commun.* **2020**, *4*, 478–492, doi:10.1002/hep4.1479.
90. Albillos, A.; Lario, M.; Álvarez-Mon, M. Cirrhosis-Associated Immune Dysfunction: Distinctive Features and Clinical Relevance. *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 1385–1396, doi:10.1016/j.jhep.2014.08.010.
91. Guarner, F.; Malagelada, J.-R. Gut Flora in Health and Disease. *The Lancet* **2003**, *361*, 512–519, doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0.
92. Konjevod, M.; Nikolac Perkovic, M.; Sáiz, J.; Svob Strac, D.; Barbas, C.; Rojo, D. Metabolomics Analysis of Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurodegenerative and Psychiatric Diseases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *194*, 113681, doi:10.1016/j.jpba.2020.113681.
93. Docimo, G.; Cangiano, A.; Romano, R.M.; Pignatelli, M.F.; Offi, C.; Paglionico, V.A.; Galdiero, M.; Donnarumma, G.; Nigro, V.; Esposito, D.; et al. The Human Microbiota in Endocrinology: Implications for Pathophysiology, Treatment, and Prognosis in Thyroid Diseases. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 586529, doi:10.3389/fendo.2020.586529.
94. Cheng, Y.; Ling, Z.; Li, L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 615056, doi:10.3389/fimmu.2020.615056.
95. Tilg, H.; Zmora, N.; Adolph, T.E.; Elinav, E. The Intestinal Microbiota Fuelling Metabolic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 40–54, doi:10.1038/s41577-019-0198-4.
96. Spadoni, I.; Zagato, E.; Bertocchi, A.; Paolinelli, R.; Hot, E.; Di Sabatino, A.; Caprioli, F.; Bottiglieri, L.; Oldani, A.; Viale, G.; et al. A Gut-Vascular Barrier Controls the Systemic Dissemination of Bacteria. *Science* **2015**, *350*, 830–834, doi:10.1126/science.aad0135.
97. Arab, J.P.; Martin-Mateos, R.M.; Shah, V.H. Gut-Liver Axis, Cirrhosis and Portal Hypertension: The Chicken and the Egg. *Hepatol. Int.* **2018**, *12*, 24–33, doi:10.1007/s12072-017-9798-x.
98. Aragonès, G.; Colom-Pellicer, M.; Aguilar, C.; Guiu-Jurado, E.; Martínez, S.; Sabench, F.; Antonio Porras, J.; Riesco, D.; Del Castillo, D.; Richart, C.; et al. Circulating Microbiota-Derived Metabolites: A “liquid Biopsy”? *Int J Obes* **2020**, *44*, 875–885, doi:10.1038/s41366-019-0430-0.
99. Auguet, T.; Bertran, L.; Binetti, J. Intestinal Dysbiosis and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In *Biochemistry*; V. Beloborodova, N., V. Grechko, A., Eds.; IntechOpen, 2021; Vol. 20 ISBN 978-1-78984-848-9.
100. Forlano, R.; Mullish, B.H.; Roberts, L.A.; Thursz, M.R.; Manousou, P. The Intestinal Barrier and Its Dysfunction in Patients with Metabolic Diseases and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 662, doi:10.3390/ijms23020662.
101. Kiziltas, S. Toll-like Receptors in Pathophysiology of Liver Diseases. *World J. Hepatol.* **2016**, *8*, 1354, doi:10.4254/wjh.v8.i32.1354.
102. Miura, K.; Kodama, Y.; Inokuchi, S.; Schnabl, B.; Aoyama, T.; Ohnishi, H.; Olefsky, J.M.; Brenner, D.A.; Seki, E. Toll-Like Receptor 9 Promotes Steatohepatitis by Induction of Interleukin-1 $\beta$  in Mice. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 323–334.e7, doi:10.1053/j.gastro.2010.03.052.
103. Kanuri, G.; Ladurner, R.; Skibovskaya, J.; Spruss, A.; Königsrainer, A.; Bischoff, S.C.; Bergheim, I. Expression of Toll-like Receptors 1-5 but Not TLR 6-10 Is Elevated in Livers of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Liver Int.* **2015**, *35*, 562–568, doi:10.1111/liv.12442.
104. Polyzos, S.A.; Perakakis, N.; Mantzoros, C.S. Fatty Liver in Lipodystrophy: A Review with a Focus on Therapeutic Perspectives of Adiponectin and/or Leptin Replacement. *Metabolism.* **2019**, *96*, 66–82, doi:10.1016/j.metabol.2019.05.001.
105. Adinolfi, L.E.; Rinaldi, L.; Guerrero, B.; Restivo, L.; Marrone, A.; Giordano, M.; Zampino, R. NAFLD and NASH in HCV Infection: Prevalence and Significance in Hepatic and Extrahepatic Manifestations. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, E803, doi:10.3390/ijms17060803.
106. Kim, K.; Kim, K.H.; Cheong, J. Hepatitis B Virus X Protein Impairs Hepatic Insulin Signaling Through Degradation of IRS1 and Induction of SOCS3. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8649, doi:10.1371/journal.pone.0008649.
107. Nseir, W.; Taha, H.; Khateeb, J.; Grosovski, M.; Assy, N. Fatty Liver Is Associated with Recurrent Bacterial Infections Independent of Metabolic Syndrome. *Dig. Dis. Sci.* **2011**, *56*, 3328–3334, doi:10.1007/s10620-011-1736-5.
108. Chowdhary, V.R.; Crowson, C.S.; Poterucha, J.J.; Moder, K.G. Liver Involvement in Systemic Lupus Erythematosus: Case Review of 40 Patients. *J. Rheumatol.* **2008**, *35*, 2159–2164, doi:10.3899/jrheum.080336.
109. Takahashi, A.; Arinaga-Hino, T.; Ohira, H.; Abe, K.; Torimura, T.; Zeniya, M.; Abe, M.; Yoshizawa, K.; Takaki, A.; Suzuki, Y.; et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Autoimmune Hepatitis. *JGH Open Open Access J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *2*, 54–58, doi:10.1002/jgh3.12046.
110. Klaunig, J.E.; Li, X.; Wang, Z. Role of Xenobiotics in the Induction and Progression of Fatty Liver Disease. *Toxicol. Res.* **2018**, *7*, 664–680, doi:10.1039/c7tx00326a.





## 8. REFERÈNCIES

111. de Medeiros, I.C.; de Lima, J.G. Is Nonalcoholic Fatty Liver Disease an Endogenous Alcoholic Fatty Liver Disease? – A Mechanistic Hypothesis. *Med. Hypotheses* **2015**, *85*, 148–152, doi:10.1016/j.mehy.2015.04.021.
112. Venkata, N.G.; Aung, C.S.; Cabot, P.J.; Monteith, G.R.; Roberts-Thomson, S.J. PPARalpha and PPARbeta Are Differentially Affected by Ethanol and the Ethanol Metabolite Acetaldehyde in the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2008**, *102*, 120–128, doi:10.1093/toxsci/kfm281.
113. Jennifer Chapman; Justin K. Arnold Reye Syndrome. *StatPearls* **2022**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526101/>. Last access: 9th Jan 2023.
114. Goetz, V.; Yang, D.D.; Lacaille, F.; Pelosi, M.; Angoulvant, F.; Brassier, A.; Arnoux, J.-B.; Schiff, M.; Heilbronner, C.; Salvador, E.; et al. What Are the Clues for an Inherited Metabolic Disorder in Reye Syndrome? A Single Centre Study of 58 Children. *Mol. Genet. Metab.* **2022**, *135*, 320–326, doi:10.1016/j.ymgme.2022.02.001.
115. Riely, C.A. Hepatic Disease in Pregnancy. *Am. J. Med.* **1994**, *96*, 18S–22S, doi:10.1016/0002-9343(94)90185-6.
116. van Zutphen, T.; Ciapaite, J.; Bloks, V.W.; Ackereley, C.; Gerding, A.; Jurdzinski, A.; de Moraes, R.A.; Zhang, L.; Wolters, J.C.; Bischoff, R.; et al. Malnutrition-Associated Liver Steatosis and ATP Depletion Is Caused by Peroxisomal and Mitochondrial Dysfunction. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 1198–1208, doi:10.1016/j.jhep.2016.05.046.
117. Yki-Järvinen, H.; Luukkonen, P.K.; Hodson, L.; Moore, J.B. Dietary Carbohydrates and Fats in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18*, 770–786, doi:10.1038/s41575-021-00472-y.
118. Dufour, J.-F.; Anstee, Q.M.; Bugianesi, E.; Harrison, S.; Loomba, R.; Paradis, V.; Tilg, H.; Wong, V.W.-S.; Zelber-sagi, S. Current Therapies and New Developments in NASH. *Gut* **2022**, gutjnl-2021-326874, doi:10.1136/gutjnl-2021-326874.
119. Takahashi, Y. Histopathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 15539, doi:10.3748/wjg.v20.i42.15539.
120. Tandra, S.; Yeh, M.M.; Brunt, E.M.; Vuppalanchi, R.; Cummings, O.W.; Ünalp-Arida, A.; Wilson, L.A.; Chalasani, N. Presence and Significance of Microvesicular Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 654–659, doi:10.1016/j.jhep.2010.11.021.
121. Brunt, E.M. Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **2002**, *6*, 399–420, vii, doi:10.1016/s1089-3261(02)00002-8.
122. Brunt, E.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: What the Pathologist Can Tell the Clinician. *Dig. Dis. Basel Switz.* **2012**, *30 Suppl 1*, 61–68, doi:10.1159/000341127.
123. Brunt, E.M. Pathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *7*, 195–203, doi:10.1038/nrgastro.2010.21.
124. Lackner, C.; Gogg-Kamerer, M.; Zatloukal, K.; Stumptner, C.; Brunt, E.M.; Denk, H. Ballooned Hepatocytes in Steatohepatitis: The Value of Keratin Immunohistochemistry for Diagnosis. *J. Hepatol.* **2008**, *48*, 821–828, doi:10.1016/j.jhep.2008.01.026.
125. Argo, C.K.; Northup, P.G.; Al-Osaimi, A.M.S.; Caldwell, S.H. Systematic Review of Risk Factors for Fibrosis Progression in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2009**, *51*, 371–379, doi:10.1016/j.jhep.2009.03.019.
126. Thuluvath, P.J.; Hanish, S.; Savva, Y. Waiting List Mortality and Transplant Rates for NASH Cirrhosis When Compared With Cryptogenic, Alcoholic, or AIH Cirrhosis. *Transplantation* **2019**, *103*, 113–121, doi:10.1097/TP.0000000000002355.
127. Lisa Yerian Liver Donor Organ Evaluation. CAP Press' In *Atlas of Transplant Pathology*; PUB 124; 2015; p. 8.
128. Paul, J. Recent Advances in Non-Invasive Diagnosis and Medical Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Adult. *Egypt. Liver J.* **2020**, *10*, 37, doi:10.1186/s43066-020-00043-x.
129. Ando, Y.; Jou, J.H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Recent Guideline Updates. *Clin. Liver Dis.* **2021**, *17*, 23–28, doi:10.1002/cld.1045.
130. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases: Hepatology, Vol. XX, No. X, 2017. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357, doi:10.1002/hep.29367.
131. Rheinwald, K.P.; Drebber, U.; Schierwagen, R.; Klein, S.; Neumann, U.P.; Ulmer, T.F.; Plamper, A.; Kroh, A.; Schipper, S.; Odenthal, M.; et al. Baseline Presence of NAFLD Predicts Weight Loss after Gastric Bypass Surgery for Morbid Obesity. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3430, doi:10.3390/jcm9113430.
132. Soresi, M.; Cabibi, D.; Giglio, R.V.; Martorana, S.; Guercio, G.; Porcasi, R.; Terranova, A.; Lazzaro, L.A.; Emma, M.R.; Augello, G.; et al. The Prevalence of NAFLD and Fibrosis in Bariatric Surgery Patients and the Reliability of Noninvasive Diagnostic Methods. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 1–7, doi:10.1155/2020/5023157.



133. Martinou, E.; Pericleous, M.; Stefanova, I.; Kaur, V.; Angelidi, A.M. Diagnostic Modalities of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Biochemical Biomarkers to Multi-Omics Non-Invasive Approaches. *Diagnostics* **2022**, *12*, 407, doi:10.3390/diagnostics12020407.
134. National Guideline Centre *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Assessment and Management*; Nice Guideline; National Institute for Health and Care Excellence: London, 2016; ISBN 978-1-4731-1996-3.
135. Obika, M.; Noguchi, H. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, *2012*, 1–12, doi:10.1155/2012/145754.
136. Cheng, Z.; Yang, L.; Chu, H. The Gut Microbiota: A Novel Player in Autoimmune Hepatitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 947382, doi:10.3389/fcimb.2022.947382.
137. Dasarathy, S.; Dasarathy, J.; Khiyami, A.; Joseph, R.; Lopez, R.; McCullough, A.J. Validity of Real Time Ultrasound in the Diagnosis of Hepatic Steatosis: A Prospective Study. *J. Hepatol.* **2009**, *51*, 1061–1067, doi:10.1016/j.jhep.2009.09.001.
138. EASL; EASD; EASO EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1388–1402, doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004.
139. Verdam, F.J.; Dallinga, J.W.; Driessen, A.; Jonge, C. de; Moonen, E.J.C.; van Berkel, J.B.N.; Luijk, J.; Bouvy, N.D.; Buurman, W.A.; Rensen, S.S.; et al. Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Non-Invasive Diagnosis by Analysis of Exhaled Breath. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 543–548, doi:10.1016/j.jhep.2012.10.030.
140. Adams, L.A.; Anstee, Q.M.; Tilg, H.; Targher, G. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Relationship with Cardiovascular Disease and Other Extrahepatic Diseases. *Gut* **2017**, *66*, 1138–1153, doi:10.1136/gutjnl-2017-313884.
141. Memorial Sloan Kettering Cancer Center *Understanding Your Liver Elastography (FibroScan®) Results*; Sloan Kettering Institute, 2022. <https://www.mskcc.org/cancer-care/patient-education/understanding-your-fibroscan-results>. Last access: 9th Jan 2023.
142. Mayo, R.; Crespo, J.; Martínez-Arranz, I.; Banales, J.M.; Arias, M.; Mincholé, I.; Aller de la Fuente, R.; Jimenez-Agüero, R.; Alonso, C.; de Luis, D.A.; et al. Metabolomic-based Noninvasive Serum Test to Diagnose Nonalcoholic Steatohepatitis: Results from Discovery and Validation Cohorts. *Hepatol. Commun.* **2018**, *2*, 807–820, doi:10.1002/hep4.1188.
143. Govaere, O.; Cockell, S.; Tiniakos, D.; Queen, R.; Younes, R.; Vacca, M.; Alexander, L.; Ravaioli, F.; Palmer, J.; Petta, S.; et al. Transcriptomic Profiling across the Nonalcoholic Fatty Liver Disease Spectrum Reveals Gene Signatures for Steatohepatitis and Fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaba4448, doi:10.1126/scitranslmed.aba4448.
144. Bell, L.N.; Theodorakis, J.L.; Vuppalanchi, R.; Saxena, R.; Bemis, K.G.; Wang, M.; Chalasani, N. Serum Proteomics and Biomarker Discovery across the Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2010**, *51*, 111–120, doi:10.1002/hep.23271.
145. Hou, W.; Janech, M.G.; Sobolesky, P.M.; Bland, A.M.; Samsuddin, S.; Alazawi, W.; Syn, W.-K. Proteomic Screening of Plasma Identifies Potential Noninvasive Biomarkers Associated with Significant/Advanced Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, BSR20190395, doi:10.1042/BSR20190395.
146. Johnson, N.D.; Wu, X.; Still, C.D.; Chu, X.; Petrick, A.T.; Gerhard, G.S.; Conneely, K.N.; DiStefano, J.K. Differential DNA Methylation and Changing Cell-Type Proportions as Fibrotic Stage Progresses in NAFLD. *Clin. Epigenetics* **2021**, *13*, 152, doi:10.1186/s13148-021-01129-y.
147. Cazanave, S.C.; Warren, A.D.; Pacula, M.; Touti, F.; Zagorska, A.; Gural, N.; Huang, E.K.; Sherman, S.; Cheema, M.; Ibarra, S.; et al. Peptide-Based Urinary Monitoring of Fibrotic Nonalcoholic Steatohepatitis by Mass-Barcoded Activity-Based Sensors. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabe8939, doi:10.1126/scitranslmed.abe8939.
148. Loomba, R.; Seguritan, V.; Li, W.; Long, T.; Klitgord, N.; Bhatt, A.; Dulai, P.S.; Caussy, C.; Bettencourt, R.; Highlander, S.K.; et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-Invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 1054–1062.e5, doi:10.1016/j.cmet.2017.04.001.
149. Glass, L.M.; Hunt, C.M.; Fuchs, M.; Su, G.L. Comorbidities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Chicken, the Egg, or Both? *Fed. Pract. Health Care Prof. VA DoD PHS* **2019**, *36*, 64–71.
150. Jeznach-Steinhagen, A.; Ostrowska, J.; Czerwonogrodzka-Senczyna, A.; Boniecka, I.; Shahnazaryan, U.; Kuryłowicz, A. Dietary and Pharmacological Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Mex.)* **2019**, *55*, 166, doi:10.3390/medicina55050166.
151. Ha, J.; Jang, M.; Kwon, Y.; Park, Y.S.; Park, D.J.; Lee, J.-H.; Lee, H.-J.; Ha, T.K.; Kim, Y.-J.; Han, S.-M.; et al. Metabolomic Profiles Predict Diabetes Remission after Bariatric Surgery. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3897, doi:10.3390/jcm9123897.
152. Madsbad, S.; Dirksen, C.; Holst, J.J. Mechanisms of Changes in Glucose Metabolism and Bodyweight after Bariatric Surgery. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2014**, *2*, 152–164, doi:10.1016/S2213-8587(13)70218-3.



## 8. REFERÈNCIES

153. Głuszyńska, P.; Lemancewicz, D.; Dziecioł, J.B.; Razak Hady, H. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Bariatric/Metabolic Surgery as Its Treatment Option: A Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5721, doi:10.3390/jcm10245721.
154. Della Pepa, G.; Russo, M.; Vitale, M.; Carli, F.; Vetrani, C.; Masulli, M.; Riccardi, G.; Vaccaro, O.; Gastaldelli, A.; Rivellese, A.A.; et al. Pioglitazone Even at Low Dosage Improves NAFLD in Type 2 Diabetes: Clinical and Pathophysiological Insights from a Subgroup of the TOSCA.IT Randomised Trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2021**, *178*, 108984, doi:10.1016/j.diabres.2021.108984.
155. Bril, F.; Kalavalapalli, S.; Clark, V.C.; Lomonaco, R.; Soldevila-Pico, C.; Liu, I.-C.; Orsak, B.; Tio, F.; Cusi, K. Response to Pioglitazone in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With vs Without Type 2 Diabetes. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *16*, 558-566.e2, doi:10.1016/j.cgh.2017.12.001.
156. Luo, Y.; Yang, P.; Li, Z.; Luo, Y.; Shen, J.; Li, R.; Zheng, H.; Liang, Y.; Xia, N. Liraglutide Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease In Diabetic Mice By Modulating Inflammatory Signaling Pathways. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, *Volume 13*, 4065–4074, doi:10.2147/DDDT.S224688.
157. Yang, M.; Ma, X.; Xuan, X.; Deng, H.; Chen, Q.; Yuan, L. Liraglutide Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice by Regulating the Local Renin-Angiotensin System. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 432, doi:10.3389/fphar.2020.00432.
158. Armstrong, M.J.; Barton, D.; Gaunt, P.; Hull, D.; Guo, K.; Stocken, D.; Gough, S.C.L.; Tomlinson, J.W.; Brown, R.M.; Hübscher, S.G.; et al. Liraglutide Efficacy and Action in Non-Alcoholic Steatohepatitis (LEAN): Study Protocol for a Phase II Multicentre, Double-Blinded, Randomised, Controlled Trial. *BMJ Open* **2013**, *3*, e003995, doi:10.1136/bmjopen-2013-003995.
159. Tang, W.; Xu, Q.; Hong, T.; Tong, G.; Feng, W.; Shen, S.; Bi, Y.; Zhu, D. Comparative Efficacy of Anti-Diabetic Agents on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized and Non-Randomized Studies: Anti-Diabetic Agents on NAFLD in T2DM. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2016**, *32*, 200–216, doi:10.1002/dmrr.2713.
160. Loomba, R.; Lutchman, G.; Kleiner, D.E.; Ricks, M.; Feld, J.J.; Borg, B.B.; Modi, A.; Nagabhyru, P.; Sumner, A.E.; Liang, T.J.; et al. Clinical Trial: Pilot Study of Metformin for the Treatment of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2009**, *29*, 172–182, doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03869.x.
161. Brandt, A.; Hernández-Arriaga, A.; Kehm, R.; Sánchez, V.; Jin, C.J.; Nier, A.; Baumann, A.; Camarinha-Silva, A.; Bergheim, I. Metformin Attenuates the Onset of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Affects Intestinal Microbiota and Barrier in Small Intestine. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6668, doi:10.1038/s41598-019-43228-0.
162. Raj, H.; Durgia, H.; Palui, R.; Kamalanathan, S.; Selvarajan, S.; Kar, S.S.; Sahoo, J. SGLT-2 Inhibitors in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *World J. Diabetes* **2019**, *10*, 114–132, doi:10.4239/wjd.v10.i2.114.
163. Hyogo, H.; Yamagishi, S.; Maeda, S.; Kimura, Y.; Ishitobi, T.; Chayama, K. Atorvastatin Improves Disease Activity of Nonalcoholic Steatohepatitis Partly through Its Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ -Lowering Property. *Dig. Liver Dis.* **2012**, *44*, 492–496, doi:10.1016/j.dld.2011.12.013.
164. Paton, C.M.; Ntambi, J.M. Biochemical and Physiological Function of Stearoyl-CoA Desaturase. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2009**, *297*, E28–E37, doi:10.1152/ajpendo.90897.2008.
165. Kaul, U.; Parmar, D.; Manjunath, K.; Shah, M.; Parmar, K.; Patil, K.P.; Jaiswal, A. New Dual Peroxisome Proliferator Activated Receptor Agonist—Saroglitazar in Diabetic Dyslipidemia and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Integrated Analysis of the Real World Evidence. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*, 80, doi:10.1186/s12933-019-0884-3.
166. Goyal, O.; Nohria, S.; Goyal, P.; Kaur, J.; Sharma, S.; Sood, A.; Chhina, R.S. Saroglitazar in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Diabetic Dyslipidemia: A Prospective, Observational, Real World Study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21117, doi:10.1038/s41598-020-78342-x.
167. Venetsanaki, V.; Karabouta, Z.; Polyzos, S.A. Farnesoid X Nuclear Receptor Agonists for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *863*, 172661, doi:10.1016/j.ejphar.2019.172661.
168. Neuschwander-Tetri, B.A.; Loomba, R.; Sanyal, A.J.; Lavine, J.E.; Van Natta, M.L.; Abdelmalek, M.F.; Chalasani, N.; Dasarathy, S.; Diehl, A.M.; Hameed, B.; et al. Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *The Lancet* **2015**, *385*, 956–965, doi:10.1016/S0140-6736(14)61933-4.
169. Mudaliar, S.; Henry, R.R.; Sanyal, A.J.; Morrow, L.; Marschall, H.; Kipnes, M.; Adorini, L.; Sciacca, C.I.; Clopton, P.; Castelloe, E.; et al. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 574-582.e1, doi:10.1053/j.gastro.2013.05.042.
170. Dufour, J.; Oneta, C.M.; Gonvers, J.; Bihl, F.; Cerny, A.; Cereda, J.; Zala, J.; Helbling, B.; Steuerwald, M.; Zimmermann, A. Randomized Placebo-Controlled Trial of Ursodeoxycholic Acid With Vitamin E in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *4*, 1537–1543, doi:10.1016/j.cgh.2006.09.025.







## 8. REFERÈNCIES

193. Gregor, M.F.; Hotamisligil, G.S. Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipocyte Stress: The Endoplasmic Reticulum and Metabolic Disease. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1905–1914, doi:10.1194/jlr.R700007-JLR200.
194. Fernandez-Real, J.M.; Vayreda, M.; Richart, C.; Gutierrez, C.; Broch, M.; Vendrell, J.; Ricart, W. Circulating Interleukin 6 Levels, Blood Pressure, and Insulin Sensitivity in Apparently Healthy Men and Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 1154–1159, doi:10.1210/jcem.86.3.7305.
195. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031, doi:10.1038/nature05414.
196. Wigg, A.J.; Roberts-Thomson, I.C.; Dymock, R.B.; McCarthy, P.J.; Grose, R.H.; Cummins, A.G. The Role of Small Intestinal Bacterial Overgrowth, Intestinal Permeability, Endotoxaemia, and Tumour Necrosis Factor Alpha in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gut* **2001**, *48*, 206–211, doi:10.1136/gut.48.2.206.
197. Noverr, M.C.; Huffnagle, G.B. Does the Microbiota Regulate Immune Responses Outside the Gut? *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 562–568, doi:10.1016/j.tim.2004.10.008.
198. Rivera, C.A.; Adegboyega, P.; van Rooijen, N.; Tagalicud, A.; Allman, M.; Wallace, M. Toll-like Receptor-4 Signaling and Kupffer Cells Play Pivotal Roles in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2007**, *47*, 571–579, doi:10.1016/j.jhep.2007.04.019.
199. Topping, D.L.; Clifton, P.M. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1031–1064, doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1031.
200. Tremaroli, V.; Bäckhed, F. Functional Interactions between the Gut Microbiota and Host Metabolism. *Nature* **2012**, *489*, 242–249, doi:10.1038/nature11552.
201. Song, G.; Xiao, C.; Wang, K.; Wang, Y.; Chen, J.; Yu, Y.; Wang, Z.; Deng, G.; Sun, X.; Zhong, L.; et al. Association of Patatin-like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 Gene Polymorphisms with Susceptibility of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Han Chinese Population. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95*, e4569, doi:10.1097/MD.00000000000004569.
202. Liu, Y.-L.; Reeves, H.L.; Burt, A.D.; Tiniakos, D.; McPherson, S.; Leathart, J.B.S.; Allison, M.E.D.; Alexander, G.J.; Piguat, A.-C.; Anty, R.; et al. TM6SF2 Rs58542926 Influences Hepatic Fibrosis Progression in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4309, doi:10.1038/ncomms5309.
203. Tilg, H.; Adolph, T.E.; Moschen, A.R. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology* **2021**, *73*, 833–842, doi:10.1002/hep.31518.
204. Nelson, J.E.; Klintworth, H.; Kowdley, K.V. Iron Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2012**, *14*, 8–16, doi:10.1007/s11894-011-0234-4.
205. Bessone, F.; Dirchwolf, M.; Rodil, M.A.; Razori, M.V.; Roma, M.G. Review Article: Drug-Induced Liver Injury in the Context of Nonalcoholic Fatty Liver Disease - a Physiopathological and Clinical Integrated View. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2018**, *48*, 892–913, doi:10.1111/apt.14952.
206. Yilmaz, Y. Review Article: Is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease a Spectrum, or Are Steatosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis Distinct Conditions? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *36*, 815–823, doi:10.1111/apt.12046.
207. Azzu, V.; Vacca, M.; Virtue, S.; Allison, M.; Vidal-Puig, A. Adipose Tissue-Liver Cross Talk in the Control of Whole-Body Metabolism: Implications in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1899–1912, doi:10.1053/j.gastro.2019.12.054.
208. Fontes-Cal, T.C.M.; Mattos, R.T.; Medeiros, N.I.; Pinto, B.F.; Belchior-Bezerra, M.; Roque-Souza, B.; Dutra, W.O.; Ferrari, T.C.A.; Vidigal, P.V.T.; Faria, L.C.; et al. Crosstalk Between Plasma Cytokines, Inflammation, and Liver Damage as a New Strategy to Monitoring NAFLD Progression. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 708959, doi:10.3389/fimmu.2021.708959.
209. Braunersreuther, V.; Viviani, G.L.; Mach, F.; Montecucco, F. Role of Cytokines and Chemokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 727–735, doi:10.3748/wjg.v18.i8.727.
210. Lan, T.; Chen, L.; Wei, X. Inflammatory Cytokines in Cancer: Comprehensive Understanding and Clinical Progress in Gene Therapy. *Cells* **2021**, *10*, E100, doi:10.3390/cells10010100.
211. Schmidt, F.M.; Weschenfelder, J.; Sander, C.; Minkwitz, J.; Thormann, J.; Chittka, T.; Mergl, R.; Kirkby, K.C.; Faßhauer, M.; Stumvoll, M.; et al. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS One* **2015**, *10*, e0121971, doi:10.1371/journal.pone.0121971.
212. Ouchi, N.; Kihara, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y.; Walsh, K. Obesity, Adiponectin and Vascular Inflammatory Disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 561–566, doi:10.1097/00041433-200312000-00003.
213. Berg, A.H.; Scherer, P.E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 939–949, doi:10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
214. Rabelo, F.; Oliveira, C.P.M.S.; Faintuch, J.; Mazo, D.F.C.; Lima, V.M.R.; Stefano, J.T.; Barbeiro, H.V.; Soriano, F.G.; Alves, V.A.F.; Carrilho, F.J. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Steatosis and Steatohepatitis. *Obes. Surg.* **2010**, *20*, 906–912, doi:10.1007/s11695-010-0181-4.



215. Niederreiter, L.; Tilg, H. Cytokines and Fatty Liver Diseases. *Liver Res.* **2018**, *2*, 14–20, doi:10.1016/j.livres.2018.03.003.
216. El-Emshaty, H.M.; Nasif, W.A.; Mohamed, I.E. Serum Cytokine of IL-10 and IL-12 in Chronic Liver Disease: The Immune and Inflammatory Response. *Dis. Markers* **2015**, *2015*, 707254, doi:10.1155/2015/707254.
217. Bradley, J.R. TNF-Mediated Inflammatory Disease. *J. Pathol.* **2008**, *214*, 149–160, doi:10.1002/path.2287.
218. Kakino, S.; Ohki, T.; Nakayama, H.; Yuan, X.; Otabe, S.; Hashinaga, T.; Wada, N.; Kurita, Y.; Tanaka, K.; Hara, K.; et al. Pivotal Role of TNF- $\alpha$  in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **2018**, *50*, 80–87, doi:10.1055/s-0043-118666.
219. Wandrer, F.; Liebig, S.; Marhenke, S.; Vogel, A.; John, K.; Manns, M.P.; Teufel, A.; Itzel, T.; Longerich, T.; Maier, O.; et al. TNF-Receptor-1 Inhibition Reduces Liver Steatosis, Hepatocellular Injury and Fibrosis in NAFLD Mice. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 212, doi:10.1038/s41419-020-2411-6.
220. Douglas, H.E. TGF- $\beta$  in Wound Healing: A Review. *J. Wound Care* **2010**, *19*, 403–406, doi:10.12968/jowc.2010.19.9.78235.
221. Syn, W.-K.; Choi, S.S.; Diehl, A.M. Apoptosis and Cytokines in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **2009**, *13*, 565–580, doi:10.1016/j.cld.2009.07.003.
222. Dinarello, C.A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 519–550, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
223. Tan, Q.; Hu, J.; Yu, X.; Guan, W.; Lu, H.; Yu, Y.; Zang, G.; Tang, Z. The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 6495793, doi:10.1155/2016/6495793.
224. du Plessis, J.; van Pelt, J.; Korf, H.; Mathieu, C.; van der Schueren, B.; Lannoo, M.; Oyen, T.; Topal, B.; Fetter, G.; Naylor, S.; et al. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 635–648.e14, doi:10.1053/j.gastro.2015.05.044.
225. Mehta, R.; Bireldinc, A.; Wang, L.; Younoszai, Z.; Moazzez, A.; Elariny, H.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; Baranova, A.; Younossi, Z.M. Expression of Energy Metabolism Related Genes in the Gastric Tissue of Obese Individuals with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *BMC Gastroenterol.* **2014**, *14*, 72, doi:10.1186/1471-230X-14-72.
226. Kishimoto, T. IL-6: From Its Discovery to Clinical Applications. *Int. Immunol.* **2010**, *22*, 347–352, doi:10.1093/intimm/dxq030.
227. El-Assal, O.; Hong, F.; Kim, W.-H.; Radaeva, S.; Gao, B. IL-6-Deficient Mice Are Susceptible to Ethanol-Induced Hepatic Steatosis: IL-6 Protects against Ethanol-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in the Liver. *Cell. Mol. Immunol.* **2004**, *1*, 205–211.
228. Schett, G. Physiological Effects of Modulating the Interleukin-6 Axis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **2018**, *57*, ii43–ii50, doi:10.1093/rheumatology/kex513.
229. Kopp, H.P.; Kopp, C.W.; Festa, A.; Krzyzanowska, K.; Kriwanek, S.; Minar, E.; Roka, R.; Schernthaner, G. Impact of Weight Loss on Inflammatory Proteins and Their Association with the Insulin Resistance Syndrome in Morbidly Obese Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1042–1047, doi:10.1161/01.ATV.0000073313.16135.21.
230. Department of Biochemistry, Jamia Hamdard New Delhi; Irtiza, S. Inflammation and IL 6: A Possible Role in NAFLD. *J. Med. Sci. Clin. Res.* **2019**, *7*, doi:10.18535/jmscr/v7i2.143.
231. Estep, M.; Abawi, M.; Jarrar, M.; Wang, L.; Stepanova, M.; Elariny, H.; Moazzez, A.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; Baranova, A.; et al. Association of Obestatin, Ghrelin, and Inflammatory Cytokines in Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Obes. Surg.* **2011**, *21*, 1750–1757, doi:10.1007/s11695-011-0475-1.
232. Abiru, S.; Migita, K.; Maeda, Y.; Daikoku, M.; Ito, M.; Ohata, K.; Nagaoka, S.; Matsumoto, T.; Takii, Y.; Kusumoto, K.; et al. Serum Cytokine and Soluble Cytokine Receptor Levels in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **2006**, *26*, 39–45, doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01191.x.
233. Torer, N.; Ozenirler, S.; Yucel, A.; Bukan, N.; Erdem, O. Importance of Cytokines, Oxidative Stress and Expression of BCL-2 in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 1095–1101, doi:10.1080/00365520701286680.
234. Couper, K.N.; Blount, D.G.; Riley, E.M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2008**, *180*, 5771–5777, doi:10.4049/jimmunol.180.9.5771.
235. Erhardt, A.; Biburger, M.; Papadopoulos, T.; Tiegs, G. IL-10, Regulatory T Cells, and Kupffer Cells Mediate Tolerance in Concanavalin A-Induced Liver Injury in Mice. *Hepatology. Baltim. Md* **2007**, *45*, 475–485, doi:10.1002/hep.21498.
236. Lee, C.G.; Homer, R.J.; Zhu, Z.; Lanone, S.; Wang, X.; Kotliansky, V.; Shipley, J.M.; Gotwals, P.; Noble, P.; Chen, Q.; et al. Interleukin-13 Induces Tissue Fibrosis by Selectively Stimulating and Activating Transforming Growth Factor Beta(1). *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 809–821, doi:10.1084/jem.194.6.809.



## 8. REFERÈNCIES

237. Gaffen, S.L. Structure and Signalling in the IL-17 Receptor Family. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 556–567, doi:10.1038/nri2586.
238. Ivanov, I.I.; Atarashi, K.; Manel, N.; Brodie, E.L.; Shima, T.; Karaoz, U.; Wei, D.; Goldfarb, K.C.; Santee, C.A.; Lynch, S.V.; et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* **2009**, *139*, 485–498, doi:10.1016/j.cell.2009.09.033.
239. Mallat, Z.; Corbaz, A.; Scoazec, A.; Besnard, S.; Lesèche, G.; Chvatchko, Y.; Tedgui, A. Expression of Interleukin-18 in Human Atherosclerotic Plaques and Relation to Plaque Instability. *Circulation* **2001**, *104*, 1598–1603, doi:10.1161/hc3901.096721.
240. Netea, M.G.; Joosten, L.A.B.; Lewis, E.; Jensen, D.R.; Voshol, P.J.; Kullberg, B.J.; Tack, C.J.; van Krieken, H.; Kim, S.-H.; Stalenoef, A.F.; et al. Deficiency of Interleukin-18 in Mice Leads to Hyperphagia, Obesity and Insulin Resistance. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 650–656, doi:10.1038/nm1415.
241. Dudakov, J.A.; Hanash, A.M.; van den Brink, M.R.M. Interleukin-22: Immunobiology and Pathology. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33*, 747–785, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112123.
242. Sabat, R.; Ouyang, W.; Wolk, K. Therapeutic Opportunities of the IL-22–IL-22R1 System. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 21–38, doi:10.1038/nrd4176.
243. Radaeva, S.; Sun, R.; Pan, H.; Hong, F.; Gao, B. Interleukin 22 (IL-22) Plays a Protective Role in T Cell-Mediated Murine Hepatitis: IL-22 Is a Survival Factor for Hepatocytes via STAT3 Activation. *Hepatology* **2004**, *39*, 1332–1342, doi:10.1002/hep.20184.
244. Lejeune, D.; Dumoutier, L.; Constantinescu, S.; Kruijjer, W.; Schuringa, J.J.; Renaud, J.-C. Interleukin-22 (IL-22) Activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and P38 MAP Kinase Pathways in a Rat Hepatoma Cell Line. Pathways That Are Shared with and Distinct from IL-10. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33676–33682, doi:10.1074/jbc.M204204200.
245. Wobser, H.; Dorn, C.; Weiss, T.S.; Amann, T.; Bollheimer, C.; Büttner, R.; Schölmerich, J.; Hellerbrand, C. Lipid Accumulation in Hepatocytes Induces Fibrogenic Activation of Hepatic Stellate Cells. *Cell Res.* **2009**, *19*, 996–1005, doi:10.1038/cr.2009.73.
246. Sartipy, P.; Loskutoff, D.J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Obesity and Insulin Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 7265–7270, doi:10.1073/pnas.1133870100.
247. Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1796–1808, doi:10.1172/JCI19246.
248. Rull, A.; Rodríguez, F.; Aragonès, G.; Marsillach, J.; Beltrán, R.; Alonso-Villaverde, C.; Camps, J.; Joven, J. Hepatic Monocyte Chemoattractant Protein-1 Is Upregulated by Dietary Cholesterol and Contributes to Liver Steatosis. *Cytokine* **2009**, *48*, 273–279, doi:10.1016/j.cyto.2009.08.006.
249. Westerbacka, J.; Kolak, M.; Kiviluoto, T.; Arkkila, P.; Sirén, J.; Hamsten, A.; Fisher, R.M.; Yki-Järvinen, H. Genes Involved in Fatty Acid Partitioning and Binding, Lipolysis, Monocyte/Macrophage Recruitment, and Inflammation Are Overexpressed in the Human Fatty Liver of Insulin-Resistant Subjects. *Diabetes* **2007**, *56*, 2759–2765, doi:10.2337/db07-0156.
250. Greco, D.; Kotronen, A.; Westerbacka, J.; Puig, O.; Arkkila, P.; Kiviluoto, T.; Laitinen, S.; Kolak, M.; Fisher, R.M.; Hamsten, A.; et al. Gene Expression in Human NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *294*, G1281–G1287, doi:10.1152/ajpgi.00074.2008.
251. Montecucco, F.; Brauersreuther, V.; Lenglet, S.; Delattre, B.M.A.; Pelli, G.; Buatois, V.; Guilhot, F.; Galan, K.; Vuilleumier, N.; Ferlin, W.; et al. CC Chemokine CCL5 Plays a Central Role Impacting Infarct Size and Post-Infarction Heart Failure in Mice. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 1964–1974, doi:10.1093/eurheartj/ehr127.
252. Kirovski, G.; Dorn, C.; Huber, H.; Moleda, L.; Niessen, C.; Wobser, H.; Schacherer, D.; Buechler, C.; Wiest, R.; Hellerbrand, C. Elevated Systemic Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Hepatic Steatosis without Significant Hepatic Inflammation. *Exp. Mol. Pathol.* **2011**, *91*, 780–783, doi:10.1016/j.yexmp.2011.08.001.
253. Seki, E.; De Minicis, S.; Gwak, G.-Y.; Kluwe, J.; Inokuchi, S.; Bursill, C.A.; Llovet, J.M.; Brenner, D.A.; Schwabe, R.F. CCR1 and CCR5 Promote Hepatic Fibrosis in Mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1858–1870, doi:10.1172/jci37444.
254. Moon, H.-S.; Dalamaga, M.; Kim, S.-Y.; Polyzos, S.A.; Hamnvik, O.-P.; Magkos, F.; Paruthi, J.; Mantzoros, C.S. Leptin's Role in Lipodystrophic and Nonlipodystrophic Insulin-Resistant and Diabetic Individuals. *Endocr. Rev.* **2013**, *34*, 377–412, doi:10.1210/er.2012-1053.
255. Dalamaga, M.; Chou, S.H.; Shields, K.; Papageorgiou, P.; Polyzos, S.A.; Mantzoros, C.S. Leptin at the Intersection of Neuroendocrinology and Metabolism: Current Evidence and Therapeutic Perspectives. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 29–42, doi:10.1016/j.cmet.2013.05.010.
256. Kadowaki, T.; Yamauchi, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocr. Rev.* **2005**, *26*, 439–451, doi:10.1210/er.2005-0005.
257. Grant, R.W.; Dixit, V.D. Adipose Tissue as an Immunological Organ. *Obes. Silver Spring Md* **2015**, *23*, 512–518, doi:10.1002/oby.21003.



258. Polyzos, S.A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipokines: A Novel Role for Fat Imbalance. *ImmunoGastroenterology* **2013**, *2*, 129, doi:10.7178/ig.52.
259. Hosogai, N.; Fukuhara, A.; Oshima, K.; Miyata, Y.; Tanaka, S.; Segawa, K.; Furukawa, S.; Tochino, Y.; Komuro, R.; Matsuda, M.; et al. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* **2007**, *56*, 901–911, doi:10.2337/db06-0911.
260. Pu, Y.; Veiga-Lopez, A. PPAR $\gamma$  Agonist through the Terminal Differentiation Phase Is Essential for Adipogenic Differentiation of Fetal Ovine Preadipocytes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2017**, *22*, 6, doi:10.1186/s11658-017-0037-1.
261. Polyzos, S.A.; Kountouras, J.; Mantzoros, C.S. Adipokines in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism* **2016**, *65*, 1062–1079, doi:10.1016/j.metabol.2015.11.006.
262. Pellemounter, M.A.; Cullen, M.J.; Baker, M.B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. Effects of the Obese Gene Product on Body Weight Regulation in Ob/Ob Mice. *Science* **1995**, *269*, 540–543, doi:10.1126/science.7624776.
263. Aleffi, S.; Petrai, I.; Bertolani, C.; Parola, M.; Colombatto, S.; Novo, E.; Vizzutti, F.; Anania, F.A.; Milani, S.; Rombouts, K.; et al. Upregulation of Proinflammatory and Proangiogenic Cytokines by Leptin in Human Hepatic Stellate Cells. *Hepatology* **2005**, *42*, 1339–1348, doi:10.1002/hep.20965.
264. Yan, K.; Deng, X.; Zhai, X.; Zhou, M.; Jia, X.; Luo, L.; Niu, M.; Zhu, H.; Qiang, H.; Zhou, Y. P38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Liver X Receptor- $\alpha$  Mediate the Leptin Effect on Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Expression in Hepatic Stellate Cells. *Mol. Med. Camb. Mass* **2012**, *18*, 10–18, doi:10.2119/molmed.2011.00243.
265. Acquarone, E.; Monacelli, F.; Borghi, R.; Nencioni, A.; Odetti, P. Resistin: A Reappraisal. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *178*, 46–63, doi:10.1016/j.mad.2019.01.004.
266. Marpaung, C.F.; Siregar, G.A.; Lindarto, D. The Relationship between Resistin Level and the Degree of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int. J. Res. Rev.* **2021**, *8*, 192–198, doi:10.52403/ijrr.20210726.
267. Curat, C.A.; Wegner, V.; Sengenès, C.; Miranville, A.; Tonus, C.; Busse, R.; Bouloumié, A. Macrophages in Human Visceral Adipose Tissue: Increased Accumulation in Obesity and a Source of Resistin and Visfatin. *Diabetologia* **2006**, *49*, 744–747, doi:10.1007/s00125-006-0173-z.
268. Yan, Q.-W.; Yang, Q.; Mody, N.; Graham, T.E.; Hsu, C.-H.; Xu, Z.; Houstis, N.E.; Kahn, B.B.; Rosen, E.D. The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 2533–2540, doi:10.2337/db07-0007.
269. Zhang, J.; Wu, Y.; Zhang, Y.; Leroith, D.; Bernlohr, D.A.; Chen, X. The Role of Lipocalin 2 in the Regulation of Inflammation in Adipocytes and Macrophages. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **2008**, *22*, 1416–1426, doi:10.1210/me.2007-0420.
270. Cowland, J.B.; Muta, T.; Borregaard, N. IL-1 $\beta$ -Specific up-Regulation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Controlled by I $\kappa$ B- $\zeta$ . *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **2006**, *176*, 5559–5566, doi:10.4049/jimmunol.176.9.5559.
271. Wang, Y.; Lam, K.S.L.; Kraegen, E.W.; Sweeney, G.; Zhang, J.; Tso, A.W.K.; Chow, W.-S.; Wat, N.M.S.; Xu, J.Y.; Hoo, R.L.C.; et al. Lipocalin-2 Is an Inflammatory Marker Closely Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Hyperglycemia in Humans. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 34–41, doi:10.1373/clinchem.2006.075614.
272. Guo, H.; Jin, D.; Zhang, Y.; Wright, W.; Bazuine, M.; Brockman, D.A.; Bernlohr, D.A.; Chen, X. Lipocalin-2 Deficiency Impairs Thermogenesis and Potentiates Diet-Induced Insulin Resistance in Mice. *Diabetes* **2010**, *59*, 1376–1385, doi:10.2337/db09-1735.
273. Leal, V. de O.; Mafra, D. Adipokines in Obesity. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2013**, *419*, 87–94, doi:10.1016/j.cca.2013.02.003.
274. Ajmera, V.; Perito, E.R.; Bass, N.M.; Terrault, N.A.; Yates, K.P.; Gill, R.; Loomba, R.; Diehl, A.M.; Aouizerat, B.E.; for the NASH Clinical Research Network Novel Plasma Biomarkers Associated with Liver Disease Severity in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2017**, *65*, 65–77, doi:10.1002/hep.28776.
275. Ouchi, N.; Higuchi, A.; Ohashi, K.; Oshima, Y.; Gokce, N.; Shibata, R.; Akasaki, Y.; Shimono, A.; Walsh, K. Sfrp5 Is an Anti-Inflammatory Adipokine That Modulates Metabolic Dysfunction in Obesity. *Science* **2010**, *329*, 454–457, doi:10.1126/science.1188280.
276. Chang, J.T.; Esumi, N.; Moore, K.; Li, Y.; Zhang, S.; Chew, C.; Goodman, B.; Rattner, A.; Moody, S.; Stetten, G.; et al. Cloning and Characterization of a Secreted Frizzled-Related Protein That Is Expressed by the Retinal Pigment Epithelium. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 575–583, doi:10.1093/hmg/8.4.575.
277. Satoh, W.; Matsuyama, M.; Takemura, H.; Aizawa, S.; Shimono, A. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 Regulate the Wnt/Beta-Catenin and the Planar Cell Polarity Pathways during Early Trunk Formation in Mouse. *Genes. N. Y. N* **2008**, *46*, 92–103, doi:10.1002/dvg.20369.
278. Zhao, C.; Bu, X.; Zhang, N.; Wang, W. Downregulation of SFRP5 Expression and Its Inverse Correlation with Those of MMP-7 and MT1-MMP in Gastric Cancer. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 224, doi:10.1186/1471-2407-9-224.





## 8. REFERÈNCIES

279. Yoshino, M.; Suzuki, M.; Tian, L.; Moriya, Y.; Hoshino, H.; Okamoto, T.; Yoshida, S.; Shibuya, K.; Yoshino, I. Promoter Hypermethylation of the P16 and Wif-1 Genes as an Independent Prognostic Marker in Stage IA Non-Small Cell Lung Cancers. *Int. J. Oncol.* **2009**, *35*, 1201–1209, doi:10.3892/ijo\_00000437.
280. Lin, Y.-W.; Chung, M.-T.; Lai, H.-C.; De Yan, M.; Shih, Y.-L.; Chang, C.-C.; Yu, M.-H. Methylation Analysis of SFRP Genes Family in Cervical Adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2009**, *135*, 1665–1674, doi:10.1007/s00432-009-0613-5.
281. Takagi, H.; Sasaki, S.; Suzuki, H.; Toyota, M.; Maruyama, R.; Nojima, M.; Yamamoto, H.; Omata, M.; Tokino, T.; Imai, K.; et al. Frequent Epigenetic Inactivation of SFRP Genes in Hepatocellular Carcinoma. *J. Gastroenterol.* **2008**, *43*, 378–389, doi:10.1007/s00535-008-2170-0.
282. Koza, R.A.; Nikonova, L.; Hogan, J.; Rim, J.-S.; Mendoza, T.; Faulk, C.; Skaf, J.; Kozak, L.P. Changes in Gene Expression Foreshadow Diet-Induced Obesity in Genetically Identical Mice. *PLoS Genet.* **2006**, *2*, e81, doi:10.1371/journal.pgen.0020081.
283. Okada, Y.; Sakaue, H.; Nagare, T.; Kasuga, M. Diet-Induced up-Regulation of Gene Expression in Adipocytes without Changes in DNA Methylation. *Kobe J. Med. Sci.* **2009**, *54*, E241-249. PMID: 19628964.
284. Agostino, M.; Pohl, S.Ö.-G.; Dharmarajan, A. Structure-Based Prediction of Wnt Binding Affinities for Frizzled-Type Cysteine-Rich Domains. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 11218–11229, doi:10.1074/jbc.M117.786269.
285. Schulte, D.M.; Kragelund, D.; Müller, N.; Hagen, I.; Elke, G.; Titz, A.; Schädler, D.; Schumacher, J.; Weiler, N.; Bewig, B.; et al. The Wingless-Related Integration Site-5a/Secreted Frizzled-Related Protein-5 System Is Dysregulated in Human Sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* **2015**, *180*, 90–97, doi:10.1111/cei.12484.
286. Bovolenta, P.; Esteve, P.; Ruiz, J.M.; Cisneros, E.; Lopez-Rios, J. Beyond Wnt Inhibition: New Functions of Secreted Frizzled-Related Proteins in Development and Disease. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 737–746, doi:10.1242/jcs.026096.
287. Stuckenholtz, C.; Lu, L.; Thakur, P.C.; Choi, T.-Y.; Shin, D.; Bahary, N. Correction: Sfrp5 Modulates Both Wnt and BMP Signaling and Regulates Gastrointestinal Organogenesis in the Zebrafish, *Danio Rerio*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, doi:10.1371/annotation/024a206e-293f-4a95-a188-7838a2763266.
288. Fujii, M.; Sakaguchi, A.; Kamata, R.; Nagao, M.; Kikuchi, Y.; Evans, S.M.; Yoshizumi, M.; Shimono, A.; Saga, Y.; Kokubo, H. Sfrp5 Identifies Murine Cardiac Progenitors for All Myocardial Structures except for the Right Ventricle. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14664, doi:10.1038/ncomms14664.
289. Maman, E.; Yung, Y.; Cohen, B.; Konopnicki, S.; Dal Canto, M.; Fadini, R.; Kanety, H.; Kedem, A.; Dor, J.; Hourvitz, A. Expression and Regulation of SFRP Family Members in Human Granulosa Cells. *Mol. Hum. Reprod.* **2011**, *17*, 399–404, doi:10.1093/molehr/gar010.
290. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 85–97, doi:10.1038/nri2921.
291. Kwon, Y.-J.; Lee, S.-W.; Park, Y.-B.; Lee, S.-K.; Park, M.-C. Secreted Frizzled-Related Protein 5 Suppresses Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes through down-Regulation of c-Jun N-Terminal Kinase. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **2014**, *53*, 1704–1711, doi:10.1093/rheumatology/keu167.
292. Ng, L.F.; Kaur, P.; Bunnag, N.; Suresh, J.; Sung, I.C.H.; Tan, Q.H.; Gruber, J.; Tolwinski, N.S. WNT Signaling in Disease. *Cells* **2019**, *8*, E826, doi:10.3390/cells8080826.
293. Tong, S.; Ji, Q.; Du, Y.; Zhu, X.; Zhu, C.; Zhou, Y. Sfrp5/Wnt Pathway: A Protective Regulatory System in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J. Interferon Cytokine Res.* **2019**, *39*, 472–482, doi:10.1089/jir.2018.0154.
294. Pawar, N.M.; Rao, P. Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP4) Update: A Brief Review. *Cell. Signal.* **2018**, *45*, 63–70, doi:10.1016/j.cellsig.2018.01.019.
295. Rao, T.P.; Kühl, M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 1798–1806, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219840.
296. Bilic, J.; Huang, Y.-L.; Davidson, G.; Zimmermann, T.; Cruciat, C.-M.; Bienz, M.; Niehrs, C. Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science* **2007**, *316*, 1619–1622, doi:10.1126/science.1137065.
297. Tolwinski, N.S.; Wieschaus, E. A Nuclear Escort for Beta-Catenin. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 579–580, doi:10.1038/ncb0704-579.
298. Kestler, H.A.; Kühl, M. From Individual Wnt Pathways towards a Wnt Signalling Network. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2008**, *363*, 1333–1347, doi:10.1098/rstb.2007.2251.
299. Matsui, T.; Raya, A.; Kawakami, Y.; Callol-Massot, C.; Capdevila, J.; Rodríguez-Esteban, C.; Izpisua Belmonte, J.C. Noncanonical Wnt Signaling Regulates Midline Convergence of Organ Primordia during Zebrafish Development. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 164–175, doi:10.1101/gad.1253605.
300. De Calisto, J.; Araya, C.; Marchant, L.; Riaz, C.F.; Mayor, R. Essential Role of Non-Canonical Wnt Signalling in Neural Crest Migration. *Dev. Camb. Engl.* **2005**, *132*, 2587–2597, doi:10.1242/dev.01857.



301. Veeman, M.T.; Axelrod, J.D.; Moon, R.T. A Second Canon. Functions and Mechanisms of Beta-Catenin-Independent Wnt Signaling. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 367–377, doi:10.1016/s1534-5807(03)00266-1.
302. Habas, R.; Dawid, I.B. Dishevelled and Wnt Signaling: Is the Nucleus the Final Frontier? *J. Biol.* **2005**, *4*, 2, doi:10.1186/jbiol22.
303. Habas, R.; Kato, Y.; He, X. Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. *Cell* **2001**, *107*, 843–854, doi:10.1016/s0092-8674(01)00614-6.
304. Kohn, A.D.; Moon, R.T. Wnt and Calcium Signaling: Beta-Catenin-Independent Pathways. *Cell Calcium* **2005**, *38*, 439–446, doi:10.1016/j.ceca.2005.06.022.
305. Slusarski, D.C.; Pelegri, F. Calcium Signaling in Vertebrate Embryonic Patterning and Morphogenesis. *Dev. Biol.* **2007**, *307*, 1–13, doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.043.
306. Pataki, C.A.; Couchman, J.R.; Brábek, J. Wnt Signaling Cascades and the Roles of Syndecan Proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **2015**, *63*, 465–480, doi:10.1369/0022155415586961.
307. Komiya, Y.; Habas, R. Wnt Signal Transduction Pathways. *Organogenesis* **2008**, *4*, 68–75, doi:10.4161/org.4.2.5851.
308. Soleas, J.P.; D’Arcangelo, E.; Huang, L.; Karoubi, G.; Nostro, M.C.; McGuigan, A.P.; Waddell, T.K. Assembly of Lung Progenitors into Developmentally-Inspired Geometry Drives Differentiation via Cellular Tension. *Biomaterials* **2020**, *254*, 120128, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120128.
309. Choi, B.-R.; Cave, C.; Na, C.H.; Sockanathan, S. GDE2-Dependent Activation of Canonical Wnt Signaling in Neurons Regulates Oligodendrocyte Maturation. *Cell Rep.* **2020**, *31*, 107540, doi:10.1016/j.celrep.2020.107540.
310. Ge, X.; Wang, X. Role of Wnt Canonical Pathway in Hematological Malignancies. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2010**, *3*, 33, doi:10.1186/1756-8722-3-33.
311. He, S.; Tang, S. WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Development of Liver Cancers. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2020**, *132*, 110851, doi:10.1016/j.biopha.2020.110851.
312. Gajos-Michniewicz, A.; Czyz, M. WNT Signaling in Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, E4852, doi:10.3390/ijms21144852.
313. Zhang, Y.; Wang, X. Targeting the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2020**, *13*, 165, doi:10.1186/s13045-020-00990-3.
314. Chung, M.-T.; Sytwu, H.-K.; Yan, M.-D.; Shih, Y.-L.; Chang, C.-C.; Yu, M.-H.; Chu, T.-Y.; Lai, H.-C.; Lin, Y.-W. Promoter Methylation of SFRPs Gene Family in Cervical Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2009**, *112*, 301–306, doi:10.1016/j.ygyno.2008.10.004.
315. Zou, H.; Molina, J.R.; Harrington, J.J.; Osborn, N.K.; Klatt, K.K.; Romero, Y.; Burgart, L.J.; Ahlquist, D.A. Aberrant Methylation of Secreted Frizzled-Related Protein Genes in Esophageal Adenocarcinoma and Barrett’s Esophagus. *Int. J. Cancer* **2005**, *116*, 584–591, doi:10.1002/ijc.21045.
316. Sogabe, Y.; Suzuki, H.; Toyota, M.; Ogi, K.; Imai, T.; Nojima, M.; Sasaki, Y.; Hiratsuka, H.; Tokino, T. Epigenetic Inactivation of SFRP Genes in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 1253–1261, doi:10.3892/ijo\_32\_6\_1253.
317. Veeck, J.; Geisler, C.; Noetzel, E.; Alkaya, S.; Hartmann, A.; Knüchel, R.; Dahl, E. Epigenetic Inactivation of the Secreted Frizzled-Related Protein-5 (SFRP5) Gene in Human Breast Cancer Is Associated with Unfavorable Prognosis. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 991–998, doi:10.1093/carcin/bgn076.
318. Suzuki, H.; Toyota, M.; Carraway, H.; Caraway, H.; Gabrielson, E.; Ohmura, T.; Fujikane, T.; Nishikawa, N.; Sogabe, Y.; Nojima, M.; et al. Frequent Epigenetic Inactivation of Wnt Antagonist Genes in Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1147–1156, doi:10.1038/sj.bjc.6604259.
319. Suzuki, H.; Watkins, D.N.; Jair, K.-W.; Schuebel, K.E.; Markowitz, S.D.; Chen, W.D.; Pretlow, T.P.; Yang, B.; Akiyama, Y.; Van Engeland, M.; et al. Epigenetic Inactivation of SFRP Genes Allows Constitutive WNT Signaling in Colorectal Cancer. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 417–422, doi:10.1038/ng1330.
320. Urakami, S.; Shiina, H.; Enokida, H.; Kawakami, T.; Kawamoto, K.; Hirata, H.; Tanaka, Y.; Kikuno, N.; Nakagawa, M.; Igawa, M.; et al. Combination Analysis of Hypermethylated Wnt-Antagonist Family Genes as a Novel Epigenetic Biomarker Panel for Bladder Cancer Detection. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2109–2116, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2468.
321. Kawakami, K.; Yamamura, S.; Hirata, H.; Ueno, K.; Saini, S.; Majid, S.; Tanaka, Y.; Kawamoto, K.; Enokida, H.; Nakagawa, M.; et al. Secreted Frizzled-Related Protein-5 Is Epigenetically Downregulated and Functions as a Tumor Suppressor in Kidney Cancer. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 541–550, doi:10.1002/ijc.25357.
322. Su, H.-Y.; Lai, H.-C.; Lin, Y.-W.; Liu, C.-Y.; Chen, C.-K.; Chou, Y.-C.; Lin, S.-P.; Lin, W.-C.; Lee, H.-Y.; Yu, M.-H. Epigenetic Silencing of SFRP5 Is Related to Malignant Phenotype and Chemoresistance of Ovarian Cancer through Wnt Signaling Pathway. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 555–567, doi:10.1002/ijc.25083.



## 8. REFERÈNCIES

323. Liu, D.; Sun, C.; Kim, N.; Bhan, C.; Tuason, J.P.W.; Chen, Y.; Ma, S.; Huang, Y.; Cheng, C.; Zhou, Q.; et al. Comprehensive Analysis of SFRP Family Members Prognostic Value and Immune Infiltration in Gastric Cancer. *Life Basel Switz.* **2021**, *11*, 522, doi:10.3390/life11060522.
324. Lagathu, C.; Christodoulides, C.; Virtue, S.; Cawthorn, W.P.; Franzin, C.; Kimber, W.A.; Nora, E.D.; Campbell, M.; Medina-Gomez, G.; Cheyette, B.N.R.; et al. Dact1, a Nutritionally Regulated Preadipocyte Gene, Controls Adipogenesis by Coordinating the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Network. *Diabetes* **2009**, *58*, 609–619, doi:10.2337/db08-1180.
325. Mori, H.; Prestwich, T.C.; Reid, M.A.; Longo, K.A.; Gerin, I.; Cawthorn, W.P.; Susulic, V.S.; Krishnan, V.; Greenfield, A.; MacDougald, O.A. Secreted Frizzled-Related Protein 5 Suppresses Adipocyte Mitochondrial Metabolism through WNT Inhibition. *J Clin Invest* **2012**, *122*, 2405–2416, doi:10.1172/JCI63604.
326. Koutaki, D.; Michos, A.; Bacopoulou, F.; Charmandari, E. The Emerging Role of Sfrp5 and Wnt5a in the Pathogenesis of Obesity: Implications for a Healthy Diet and Lifestyle. *Nutrients* **2021**, *13*, 2459, doi:10.3390/nu13072459.
327. de Winter, T.J.J.; Nusse, R. Running Against the Wnt: How Wnt/ $\beta$ -Catenin Suppresses Adipogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 627429, doi:10.3389/fcell.2021.627429.
328. Tang, Q.Q.; Lane, M.D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 715–736, doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
329. Schinner, S.; Ülgen, F.; Papewalis, C.; Schott, M.; Woelk, A.; Vidal-Puig, A.; Scherbaum, W.A. Regulation of Insulin Secretion, Glucokinase Gene Transcription and Beta Cell Proliferation by Adipocyte-Derived Wnt Signalling Molecules. *Diabetologia* **2007**, *51*, 147–154, doi:10.1007/s00125-007-0848-0.
330. Ross, S.E.; Hemati, N.; Longo, K.A.; Bennett, C.N.; Lucas, P.C.; Erickson, R.L.; MacDougald, O.A. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* **2000**, *289*, 950–953, doi:10.1126/science.289.5481.950.
331. Carstensen-Kirberg, M.; Hatziagelaki, E.; Tsiavou, A.; Chounta, A.; Nowotny, P.; Pacini, G.; Dimitriadis, G.; Roden, M.; Herder, C. Sfrp5 Associates with Beta-Cell Function in Humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **2016**, *46*, 535–543, doi:10.1111/eci.12629.
332. Hermans, K.C.; Blankesteyn, W.M. Wnt Signaling in Cardiac Disease. In *Comprehensive Physiology*; Terjung, R., Ed.; Wiley, 2015; pp. 1183–1209 ISBN 978-0-470-65071-4.
333. Wang, X.; Peng, Q.; Jiang, F.; Xue, L.; Li, J.; Fan, Z.; Chen, P.; Chen, G.; Cai, Y. Secreted Frizzled-Related Protein 5 Protects against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Human Aortic Endothelial Cells via Downregulation of Bax. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2017**, *31*, doi:10.1002/jbt.21978.
334. He, W.; Zhang, L.; Ni, A.; Zhang, Z.; Mirotso, M.; Mao, L.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Exogenously Administered Secreted Frizzled Related Protein 2 (Sfrp2) Reduces Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 21110–21115, doi:10.1073/pnas.1004708107.
335. Li, Y.; Tian, M.; Yang, M.; Yang, G.; Chen, J.; Wang, H.; Liu, D.; Wang, H.; Deng, W.; Zhu, Z.; et al. Central Sfrp5 Regulates Hepatic Glucose Flux and VLDL-Triglyceride Secretion. *Metabolism* **2020**, *103*, 154029, doi:10.1016/j.metabol.2019.154029.
336. Chatani, N.; Kamada, Y.; Kizu, T.; Ogura, S.; Furuta, K.; Egawa, M.; Hamano, M.; Ezaki, H.; Kiso, S.; Shimono, A.; et al. Secreted Frizzled-Related Protein 5 (Sfrp5) Decreases Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Liver Int.* **2015**, *35*, 2017–2026, doi:10.1111/liv.12757.
337. Gutiérrez-Vidal, R.; Vega-Badillo, J.; Reyes-Fermín, L.M.; Hernández-Pérez, H.A.; Sánchez-Muñoz, F.; López-Álvarez, G.S.; Larrieta-Carrasco, E.; Fernández-Silva, I.; Méndez-Sánchez, N.; Tovar, A.R.; et al. SFRP5 Hepatic Expression Is Associated with Non-Alcoholic Liver Disease in Morbidly Obese Women. *Ann. Hepatol.* **2015**, *14*, 666–674, doi:10.1016/S1665-2681(19)30761-6.
338. Polyzos, S.A.; Toulis, K.A.; Goulis, D.G.; Zavos, C.; Kountouras, J. Serum Total Adiponectin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolism* **2011**, *60*, 313–326, doi:10.1016/j.metabol.2010.09.003.
339. Jiménez-Cortegana, C.; García-Galey, A.; Tami, M.; Del Pino, P.; Carmona, I.; López, S.; Alba, G.; Sánchez-Margalet, V. Role of Leptin in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biomedicines* **2021**, *9*, 762, doi:10.3390/biomedicines9070762.
340. Wang, D.; Zhang, Y.; Shen, C. Research Update on the Association between SFRP5, an Anti-inflammatory Adipokine, with Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Heart Disease. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 2730–2735, doi:10.1111/jcmm.15023.
341. Osorio-Conles, Ó.; Vega-Beyhart, A.; Ibarzabal, A.; Balibrea, J.M.; Graupera, I.; Rimola, J.; Vidal, J.; de Hollanda, A. A Distinctive NAFLD Signature in Adipose Tissue from Women with Severe Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10541, doi:10.3390/ijms221910541.



342. Hu, W.; Li, L.; Yang, M.; Luo, X.; Ran, W.; Liu, D.; Xiong, Z.; Liu, H.; Yang, G. Circulating Sfrp5 Is a Signature of Obesity-Related Metabolic Disorders and Is Regulated by Glucose and Liraglutide in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 290–298, doi:10.1210/jc.2012-2466.
343. Tan, X.; Wang, X.; Chu, H.; Liu, H.; Yi, X.; Xiao, Y. SFRP5 Correlates with Obesity and Metabolic Syndrome and Increases after Weight Loss in Children. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2014**, *81*, 363–369, doi:10.1111/cen.12361.
344. Schulte, D.M.; Müller, N.; Neumann, K.; Oberhäuser, F.; Faust, M.; Güdelhöfer, H.; Brandt, B.; Krone, W.; Laudes, M. Pro-Inflammatory Wnt5a and Anti-Inflammatory SFRP5 Are Differentially Regulated by Nutritional Factors in Obese Human Subjects. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32437, doi:10.1371/journal.pone.0032437.
345. Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Rodríguez, A.; Pérez-Hernández, A.I.; Gurbindo, J.; Ramírez, B.; Méndez-Giménez, L.; Rotellar, F.; Valentí, V.; Moncada, R.; et al. Activation of Noncanonical Wnt Signaling Through WNT5A in Visceral Adipose Tissue of Obese Subjects Is Related to Inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E1407–E1417, doi:10.1210/jc.2014-1191.
346. Farrell, G.C.; Rooyen, D. van; Gan, L.; Chitturi, S. NASH Is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* **2012**, *6*, 149–171, doi:10.5009/gnl.2012.6.2.149.
347. Wang, J.; Li, L.; Li, L.; Yan, Q.; Li, J.; Xu, T. Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Liver Fibrosis. *Gene* **2018**, *674*, 57–69, doi:10.1016/j.gene.2018.06.053.
348. Wang, S.; Song, K.; Srivastava, R.; Dong, C.; Go, G.-W.; Li, N.; Iwakiri, Y.; Mani, A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Noncanonical Wnt and Its Rescue by Wnt3a. *FASEB J.* **2015**, *29*, 3436–3445, doi:10.1096/fj.15-271171.
349. Kodama, Y.; Kisseleva, T.; Iwaisako, K.; Miura, K.; Taura, K.; De Minicis, S.; Österreicher, C.H.; Schnabl, B.; Seki, E.; Brenner, D.A. C-Jun N-Terminal Kinase-1 From Hematopoietic Cells Mediates Progression From Hepatic Steatosis to Steatohepatitis and Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 1467–1477.e5, doi:10.1053/j.gastro.2009.06.045.
350. Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Görgün, C.Z.; Uysal, K.T.; Maeda, K.; Karin, M.; Hotamisligil, G.S. A Central Role for JNK in Obesity and Insulin Resistance. *Nature* **2002**, *420*, 333–336, doi:10.1038/nature01137.
351. Coccia, F.; Testa, M.; Guarisco, G.; Bonci, E.; Di Cristofano, C.; Silecchia, G.; Leonetti, F.; Gastaldelli, A.; Capocchia, D. Noninvasive Assessment of Hepatic Steatosis and Fibrosis in Patients with Severe Obesity. *Endocrine* **2020**, *67*, 569–578, doi:10.1007/s12020-019-02155-w.
352. Bagchi, D.P.; Nishii, A.; Li, Z.; DelProposto, J.B.; Corsa, C.A.; Mori, H.; Hardij, J.; Learman, B.S.; Lumeng, C.N.; MacDougald, O.A. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Adipose Tissue Lipogenesis and Adipocyte-Specific Loss Is Rigorously Defended by Neighboring Stromal-Vascular Cells. *Mol. Metab.* **2020**, *42*, 101078, doi:10.1016/j.molmet.2020.101078.
353. Zuriaga, M.A.; Fuster, J.J.; Farb, M.G.; MacLauchlan, S.; Bretón-Romero, R.; Karki, S.; Hess, D.T.; Apovian, C.M.; Hamburg, N.M.; Gokce, N.; et al. Activation of Non-Canonical WNT Signaling in Human Visceral Adipose Tissue Contributes to Local and Systemic Inflammation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17326, doi:10.1038/s41598-017-17509-5.
354. Fuster, J.J.; Zuriaga, M.A.; Ngo, D.T.-M.; Farb, M.G.; Aprahamian, T.; Yamaguchi, T.P.; Gokce, N.; Walsh, K. Noncanonical Wnt Signaling Promotes Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysfunction Independent of Adipose Tissue Expansion. *Diabetes* **2015**, *64*, 1235–1248, doi:10.2337/db14-1164.
355. Ibrahim, M.M. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obes. Rev.* **2010**, *11*, 11–18, doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.
356. Stienstra, R.; Duval, C.; Müller, M.; Kersten, S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* **2007**, *2007*, 1–10, doi:10.1155/2007/95974.
357. Ahmadian, M.; Suh, J.M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A.R.; Downes, M.; Evans, R.M. PPAR $\gamma$  Signaling and Metabolism: The Good, the Bad and the Future. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 557–566, doi:10.1038/nm.3159.
358. Bertran, L.; Portillo-Carrasquer, M.; Aguilar, C.; Porrás, J.A.; Riesco, D.; Martínez, S.; Vives, M.; Sabench, F.; Gonzalez, E.; Del Castillo, D.; et al. Deregulation of Secreted Frizzled-Related Protein 5 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6895, doi:10.3390/ijms22136895.
359. Chen, N.; Wang, J. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Obesity. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 792, doi:10.3389/fphys.2018.00792.
360. Wang, Q.A.; Tao, C.; Gupta, R.K.; Scherer, P.E. Tracking Adipogenesis during White Adipose Tissue Development, Expansion and Regeneration. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1338–1344, doi:10.1038/nm.3324.
361. Klimcakova, E.; Kovacicova, M.; Stich, V.; Langin, D. Adipokines and Dietary Interventions in Human Obesity: Adipokines and Dieting. *Obes. Rev.* **2010**, *11*, 446–456, doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00704.x.
362. Monzillo, L.U.; Hamdy, O.; Horton, E.S.; Ledbury, S.; Mullooly, C.; Jarema, C.; Porter, S.; Ovalle, K.; Moussa, A.; Mantzoros, C.S. Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance. *Obes. Res.* **2003**, *11*, 1048–1054, doi:10.1038/oby.2003.144.





## 8. REFERÈNCIES

363. Torres, J.-L.; Usategui-Martín, R.; Hernández-Cosido, L.; Bernardo, E.; Manzanedo-Bueno, L.; Hernández-García, I.; Mateos-Díaz, A.-M.; Rozo, O.; Matesanz, N.; Saleté-Granado, D.; et al. PPAR- $\gamma$  Gene Expression in Human Adipose Tissue Is Associated with Weight Loss After Sleeve Gastrectomy. *J. Gastrointest. Surg.* **2022**, *26*, 286–297, doi:10.1007/s11605-021-05216-6.
364. Sato, H.; Sugai, H.; Kurosaki, H.; Ishikawa, M.; Funaki, A.; Kimura, Y.; Ueno, K. The Effect of Sex Hormones on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Expression and Activity in Mature Adipocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 564–573, doi:10.1248/bpb.b12-00868.
365. Ruschke, K.; Fishbein, L.; Dietrich, A.; Klötting, N.; Tönjes, A.; Oberbach, A.; Fasshauer, M.; Jenkner, J.; Schön, M.R.; Stumvoll, M.; et al. Gene Expression of PPAR $\gamma$  and PGC-1 $\alpha$  in Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissues Is Related to Insulin Resistance Markers and Mediates Beneficial Effects of Physical Training. *Eur. J. Endocrinol.* **2010**, *162*, 515–523, doi:10.1530/EJE-09-0767.
366. Redonnet, A.; Bonilla, S.; Noël-Suberville, C.; Pallet, V.; Dabadie, H.; Gin, H.; Higuieret, P. Relationship between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Retinoic Acid Receptor Alpha Gene Expression in Obese Human Adipose Tissue. *Int. J. Obes.* **2002**, *26*, 920–927, doi:10.1038/sj.ijo.0802025.
367. Kosaka, K.; Kubota, Y.; Adachi, N.; Akita, S.; Sasahara, Y.; Kira, T.; Kuroda, M.; Mitsukawa, N.; Bujo, H.; Satoh, K. Human Adipocytes from the Subcutaneous Superficial Layer Have Greater Adipogenic Potential and Lower PPAR- $\gamma$  DNA Methylation Levels than Deep Layer Adipocytes. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2016**, *311*, C322–C329, doi:10.1152/ajpcell.00301.2015.
368. Chen, L.; Zhao, X.; Liang, G.; Sun, J.; Lin, Z.; Hu, R.; Chen, P.; Zhang, Z.; Zhou, L.; Li, Y. Recombinant SFRP5 Protein Significantly Alleviated Intrahepatic Inflammation of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 56, doi:10.1186/s12986-017-0208-0.
369. Zhao, A. Sfrp5 Interacts with Slurp1 to Regulate the Accumulation of Triglycerides in Hepatocyte Steatosis Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *7*.
370. Xu, Q.; Wang, H.; Li, Y.; Wang, J.; Lai, Y.; Gao, L.; Lei, L.; Yang, G.; Liao, X.; Fang, X.; et al. Plasma Sfrp5 Levels Correlate with Determinants of the Metabolic Syndrome in Chinese Adults. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2017**, *33*, e2896, doi:10.1002/dmrr.2896.
371. Wang, R.; Hong, J.; Liu, R.; Chen, M.; Xu, M.; Gu, W.; Zhang, Y.; Ma, Q.; Wang, F.; Shi, J.; et al. SFRP5 Acts as a Mature Adipocyte Marker but Not as a Regulator in Adipogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *53*, 405–415, doi:10.1530/JME-14-0037.
372. Choudhary, N.S.; Duseja, A.; Kalra, N.; Das, A.; Dhiman, R.K.; Chawla, Y.K. Correlation of Adipose Tissue with Liver Histology in Asian Indian Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Ann. Hepatol.* **2012**, *11*, 478–486. PMID: 22700629.
373. Yu, S.J.; Kim, W.; Kim, D.; Yoon, J.-H.; Lee, K.; Kim, J.H.; Cho, E.J.; Lee, J.-H.; Kim, H.Y.; Kim, Y.J.; et al. Visceral Obesity Predicts Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicine (Baltimore)* **2015**, *94*, e2159, doi:10.1097/MD.0000000000002159.
374. Idilman, I.S.; Low, H.M.; Gidener, T.; Philbrick, K.; Mounajjed, T.; Li, J.; Allen, A.M.; Yin, M.; Venkatesh, S.K. Association between Visceral Adipose Tissue and Non-Alcoholic Steatohepatitis Histology in Patients with Known or Suspected Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2565, doi:10.3390/jcm10122565.
375. Tang, Q.; Chen, C.; Zhang, Y.; Dai, M.; Jiang, Y.; Wang, H.; Yu, M.; Jing, W.; Tian, W. Wnt5a Regulates the Cell Proliferation and Adipogenesis via MAPK-Independent Pathway in Early Stage of Obesity: Wnt5a Involves Proliferation and Adipogenesis. *Cell Biol. Int.* **2018**, *42*, 63–74, doi:10.1002/cbin.10862.
376. Das, B.; Das, M.; Kalita, A.; Baro, M.R. The Role of Wnt Pathway in Obesity Induced Inflammation and Diabetes: A Review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2021**, *20*, 1871–1882, doi:10.1007/s40200-021-00862-8.
377. Garg, A.; Misra, A. Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Adipose Tissue Disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 3019–3022, doi:10.1210/jcem.87.7.8736.
378. Gustafson, B.; Smith, U. Activation of Canonical Wntless-Type MMTV Integration Site Family (Wnt) Signaling in Mature Adipocytes Increases  $\beta$ -Catenin Levels and Leads to Cell Dedifferentiation and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14031–14041, doi:10.1074/jbc.M110.102855.
379. Takada, I.; Kouzmenko, A.P.; Kato, S. Wnt and PPAR $\gamma$  Signaling in Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2009**, *5*, 442–447, doi:10.1038/nrrheum.2009.137.
380. Ye, D.; Rong, X.; Xu, A.; Guo, J. Liver-Adipose Tissue Crosstalk: A Key Player in the Pathogenesis of Glucolipid Metabolic Disease. *Chin. J. Integr. Med.* **2017**, *23*, 410–414, doi:10.1007/s11655-017-2810-4.
381. Prats-Puig A, Soriano-Rodríguez P, Carreras-Badosa G, et al. Balanced duo of anti-inflammatory SFRP5 and proinflammatory WNT5A in children. *Pediatr Res.* **2014**, *75*, 793–797, doi:10.1038/pr.2014.29.
382. Sharma, A.M.; Staels, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 386–395, doi:10.1210/jc.2006-1268.



383. Christodoulides, C.; Lagathu, C.; Sethi, J.K.; Vidal-Puig, A. Adipogenesis and WNT Signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 16–24, doi:10.1016/j.tem.2008.09.002.
384. Manolopoulos, K.N.; Karpe, F.; Frayn, K.N. Gluteofemoral Body Fat as a Determinant of Metabolic Health. *Int. J. Obes.* **2010**, *34*, 949–959, doi:10.1038/ijo.2009.286.
385. Guiu-Jurado, E.; Auguet, T.; Berlanga, A.; Aragonès, G.; Aguilar, C.; Sabench, F.; Armengol, S.; Porrás, J.; Martí, A.; Jorba, R.; et al. Downregulation of de Novo Fatty Acid Synthesis in Subcutaneous Adipose Tissue of Moderately Obese Women. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29911–29922, doi:10.3390/ijms161226206.
386. Jarrar, M.H.; Baranova, A.; Collantes, R.; Ranard, B.; Stepanova, M.; Bennett, C.; Fang, Y.; Elariny, H.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; et al. Adipokines and Cytokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: ADIPOKINES AND CYTOKINES IN NAFLD. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *27*, 412–421, doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03586.x.
387. Ruiz de Morales, J.M.G.; Puig, L.; Daudén, E.; Cañete, J.D.; Pablos, J.L.; Martín, A.O.; Juanatey, C.G.; Adán, A.; Montalbán, X.; Borrueal, N.; et al. Critical Role of Interleukin (IL)-17 in Inflammatory and Immune Disorders: An Updated Review of the Evidence Focusing in Controversies. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102429, doi:10.1016/j.autrev.2019.102429.
388. Rutz, S.; Wang, X.; Ouyang, W. The IL-20 Subfamily of Cytokines — from Host Defence to Tissue Homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 783–795, doi:10.1038/nri3766.
389. Rolla, S.; Alchera, E.; Imarisio, C.; Bardina, V.; Valente, G.; Cappello, P.; Mombello, C.; Follenzi, A.; Novelli, F.; Carini, R. The Balance between IL-17 and IL-22 Produced by Liver-Infiltrating T-Helper Cells Critically Controls NASH Development in Mice. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 193–203, doi:10.1042/CS20150405.
390. Murad, A.; Hassan, H.; Husein, H.; Ayad, A. Serum Resistin Levels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Their Relationship to Severity of Live. *J. Endocrinol. Metab. Diabetes South Afr.* **2010**, *15*, 53–56, doi:10.1080/22201009.2010.10872225.
391. Mavilia, M.G.; Wu, G.Y. Liver and Serum Adiponectin Levels in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Dig. Dis.* **2021**, *22*, 214–221, doi:10.1111/1751-2980.12980.
392. Ziegler, A.K.; Damgaard, A.; Mackey, A.L.; Schjerling, P.; Magnusson, P.; Olesen, A.T.; Kjaer, M.; Scheele, C. An Anti-Inflammatory Phenotype in Visceral Adipose Tissue of Old Lean Mice, Augmented by Exercise. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12069, doi:10.1038/s41598-019-48587-2.
393. Foster, M.T.; Pagliassotti, M.J. Metabolic Alterations Following Visceral Fat Removal and Expansion: Beyond Anatomic Location. *Adipocyte* **2012**, *1*, 192–199, doi:10.4161/adip.21756.
394. Jung, S.H.; Park, H.S.; Kim, K.-S.; Choi, W.H.; Ahn, C.W.; Kim, B.T.; Kim, S.M.; Lee, S.Y.; Ahn, S.M.; Kim, Y.K.; et al. Effect of Weight Loss on Some Serum Cytokines in Human Obesity: Increase in IL-10 after Weight Loss. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 371–375, doi:10.1016/j.jnutbio.2007.05.007.
395. Mirea, A.-M.; Tack, C.J.; Chavakis, T.; Joosten, L.A.B.; Toonen, E.J.M. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 458–471, doi:10.1016/j.molmed.2018.03.005.
396. Fuchs, A.; Samovski, D.; Smith, G.I.; Cifarelli, V.; Farabi, S.S.; Yoshino, J.; Pietka, T.; Chang, S.-W.; Ghosh, S.; Myckatyn, T.M.; et al. Associations Among Adipose Tissue Immunology, Inflammation, Exosomes and Insulin Sensitivity in People With Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2021**, *161*, 968–981.e12, doi:10.1053/j.gastro.2021.05.008.
397. Machado, M.V.; Yang, Y.; Diehl, A.M. The Benefits of Restraint: A Pivotal Role for IL-13 in Hepatic Glucose Homeostasis. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 115–117, doi:10.1172/JCI67238.
398. Kanda, H. MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1494–1505, doi:10.1172/JCI26498.
399. Setyaningsih, W. a. W.; Sari, D.C.R.; Romi, M.M.; Arfian, N. Liver Fibrosis Associated with Adipose Tissue and Liver Inflammation in an Obesity Model. *Med. J. Malaysia* **2021**, *76*, 304–310. PMID: 34031327.
400. Liu, L.-B.; Chen, X.-D.; Zhou, X.-Y.; Zhu, Q. The Wnt Antagonist and Secreted Frizzled-Related Protein 5: Implications on Lipid Metabolism, Inflammation, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180011, doi:10.1042/BSR20180011.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

## ***8. Annexos***

---



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos



## 9.1 ALTRES PUBLICACIONS

Auguet T, Bertran L, Binetti J, et al. Hepatocyte Notch Signaling Deregulation Related to Lipid Metabolism in Women with Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver. *Obesity (Silver Spring)*. 2020 Aug;28(8):1487-1493. doi:10.1002/oby.22873

Auguet T<sup>†</sup>, Bertran L<sup>†</sup>, Binetti J, et al. Relationship between IL-8 Circulating Levels and TLR2 Hepatic Expression in Women with Morbid Obesity and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4189. doi:10.3390/ijms21114189

Auguet T, Bertran L and Binetti J. Intestinal Dysbiosis and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *IntechOpen (Human Microbiome 2020)*, DOI:10.5772/intechopen.92972. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/intestinal-dysbiosis-and-non-alcoholic-fatty-liver-disease>

Binetti J<sup>†</sup>, Bertran L<sup>†</sup>, Riesco D, et al. Deregulated Serotonin Pathway in Women with Morbid Obesity and NAFLD. *Life (Basel)*. 2020;10(10):245. doi: 10.3390/life10100245

Perpiñan C<sup>†</sup>, Bertran L<sup>†</sup>, Terra X, et al. Predictive biomarkers of COVID-19 severity in SARS-CoV-2 infected patients with obesity and metabolic syndrome. *J. Pers. Med.* 2021;11(3), 227. doi:10.3390/jpm11030227

Bertran L, Pastor A, Portillo-Carrasquer M, et al. The Potential Protective Role of RUNX1 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22, 5239. doi:10.3390/ijms22105239

Bertran L, Portillo-Carrasquer M, Martínez S, et al. Expression of Jejunal Taste Receptors in Women with Morbid Obesity. *Nutrients*. 2021;13, 2437. doi:10.3390/nu1307243

Villar B, Bertran L, Aguilar C, et al. Circulating Levels of Pro-Neurotensin and Its Relationship with Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatic Lipid Metabolism. *Metabolites*. 2021;11,373. doi: 10.3390/metabo11060373

Auguet T, Lopez-Dupla M, Ramos J, Bertran L, et al. Lipocalin, Resistin and Gut Microbiota-Derived Propionate Could Be Used to Predict Metabolic Bariatric Surgery Selected Outcomes. *Processes*. 2022;10,143. doi:10.3390/pr10010143

Perpiñan C<sup>†</sup>, Bertran L<sup>†</sup>, Terra X, et al. Resistin and IL-15 as Predictors of Invasive Mechanical Ventilation in COVID-19 Pneumonia Irrespective of the Presence of Obesity and Metabolic Syndrome. *J Pers Med*. 2022;12(3):391. doi:10.3390/jpm12030391

Bertran L, Eigbefoh-Addeh A, Portillo-Carrasquer M, et al. Identification of the Potential Molecular Mechanisms Linking RUNX1 Activity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, by Means of Systems Biology. *Biomedicines*. 2022;10,1315. doi:10.3390/biomedicines10061315

Bertran L<sup>†</sup>, Jorba-Martin R<sup>†</sup>, Barrientos-Riosalido A, et al. New Insights of OLFM2 and OLFM4 in Gut-Liver Axis and Their Potential Involvement in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(13):7442. doi:10.3390/ijms23137442



## 9. ANNEXOS

---

Sabench F<sup>†</sup>, [Bertran L](#)<sup>†</sup>, Vives M, et al. NASH Presence is Associated with a Lower Weight Loss One and 2 Years After Bariatric Surgery in Women with Severe Obesity. *Obes. Surg.* 2022. doi:10.1007/s11695-022-06175-w

Auguet T, [Bertran L](#), Barrientos-Riosalido A, et al. Are Ingested or Inhaled Microplastics Involved in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19,13495. doi:10.3390/ijerph192013495

<sup>†</sup> *Autoria compartida en primera posició*

### 9.2 ASSISTÈNCIA A CONGRESSOS

**The European and International Congress on Obesity 2020** (1-4/9/2020). “Hepatocyte Notch signaling deregulation related to lipid metabolism in women with obesity and non-alcoholic fatty liver”. [Bertran L](#), et al. (Poster, Online).

**The European and International Congress on Obesity 2020** (1-4/9/2020). “Decreased levels of serotonin in women with morbid obesity and dysregulation of liver expression in NAFLD”. Binetti J, [Bertran L](#), et al. (Poster, Online).

**41 Congreso Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) 2020** (23-27/11/2020): “Disminución de los niveles de serotonina periférica en mujeres con obesidad mórbida y desregulación de la expresión hepática en hígado graso no alcohólico (HGNA)”. Rojas R, Camarón J, [...], [Bertran L](#), et al. (Poster, Online).

**51 Congreso Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) 2021** (12-16/4/2021). “Predictive Biomarkers Of COVID-19 Severity In SARS-CoV-2 Infected Patients with Obesity and Metabolic Syndrome”. Auguet T, Lopez-Dupla JM, [...], [Bertran L](#), et al. (Poster, Online).

**European Congress of Obesity 2021** (10-13/5/2021). “Circulating interleukins, other adipocytokines and gut microbiota-related metabolite levels as predictors of metabolic bariatric surgery outcome”. [Bertran L](#), et al. (Poster, Online).

**XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad, y de la sección de Obesidad de la AEC 2022** (25-27/5/2022). “La presencia de enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se asocia a una menor pérdida de peso al año y dos años post-cirugía bariátrica”. Vives M, Sabench F, [...], [Bertran L](#), et al. (Comunicación oral; Toledo, España).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLICACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA PROTEÏNA SFRP5 EN LA MALALTIA  
DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLIC I EN LA COMUNICACIÓ TEIXIT ADIPÓS-FETGE  
Laia Bertran Ramos

