

Enfermedad grasa del hígado no alcohólica. Desde la resistencia a la insulina a la disfunción mitocondrial

J. A. Solís Herruzo, I. García Ruiz, M. Pérez Carreras y M. T. Muñoz Yagüe

Servicio de Aparato Digestivo y Hepatología. Centro de Investigación. Hospital Universitario 12 de Octubre. Universidad Complutense. Madrid

RESUMEN

La enfermedad grasa del hígado no alcohólica representa un conjunto de lesiones hepáticas similares a las que produce el alcohol que se aparecen en personas que no consumen alcohol de forma abusiva. Cuando las lesiones consisten en degeneración grasa e hidrópica, inflamación y, eventualmente, fibrosis se habla de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). No se conoce con exactitud la patogenia de estas lesiones, pero en la mayoría de los casos se asocian a la resistencia a la insulina. Consecuencia de esta, se produce la lipólisis del tejido adiposo abdominal y la llegada excesiva de ácidos grasos al hígado. Esto, junto con un trastorno para la exportación de los triglicéridos en forma de VLDL, determina la formación de un hígado grasoso. El componente inflamatorio y degenerativo hepatocelular de la EHNA se atribuye al estrés oxidativo. En la génesis de este interviene la pérdida de actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto puede ser originado por el TNF α , la inducción de la iNOS, la formación de peroxinitrito y la nitración en tirosina de las enzimas de esa cadena. Consecuencias del estrés oxidativo son: peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, activación de las células estrelladas del hígado, fibrosis hepática, inflamación crónica y apoptosis.

Palabras clave: Enfermedad grasa del hígado no alcohólica. Resistencia a la insulina. Disfunción mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

Las lesiones hepáticas producidas por el alcohol pertenecen a tres categorías diferentes (1-3): a) *hígado grasoso*, en el que los hepatocitos están ocupados por una gran vacuola grasa que rechaza al núcleo y a las restantes organelas hacia la periferia celular (*esteatosis macrovacuolar*). En ocasiones, los hepatocitos contienen multitud de pequeñas gotas de grasa que no rechazan al núcleo hacia la periferia y le permiten conservar su posición central (*esteatosis microvacuolar*); b) *hepatitis alcohólica*. En estos casos, junto a la esteatosis hepática, existe degeneración hidrópica de los hepatocitos, hialina alcohólica o cuerpos de Mallory, megamitocondrias, infiltrados inflamatorios mixtos con predominio de los polimorfonucleares y fibrosis pericentral y pericelular. Todos estos cambios son más intensos y frecuentes en la zona 3,

centrolobulillar; y c) *cirrosis hepática alcohólica*, que primariamente es micronodular, aunque secundariamente puede evolucionar a cirrosis macro-micronodular. También las cirrosis de esta etiología pueden complicarse con un carcinoma hepatocelular.

Estas lesiones, principalmente las correspondientes a la hepatitis alcohólica, han sido consideradas muy sugestivas de abuso alcohólico. Sin embargo, ya en los años 50, Zelman (4) y Werswater y Fainer (5) describieron la presencia de esteatosis hepática y fibrosis acompañada de infiltrados inflamatorios en el hígado de los obesos. También Thaler, a lo largo de los años 60 y comienzo de los 70, comunicó en diversas ocasiones el hallazgo de lesiones aparentemente alcohólicas en sujetos no bebedores. Por esta razón, Thaler propuso sustituir el término de "hepatitis alcohólica" por el de "hepatitis grasa", "Fettleberhepatitis" o "esteatohepatitis" (6-8). A lo largo de la década de los 70 se siguieron describiendo casos similares en obesos (9-11), diabéticos (12-14) y en pacientes sometidos a derivación entérica por obesidad mórbida (15,16). Todas estas comunicaciones fueron recibidas con mucho escepticismo ante la convicción por parte de la mayoría de los autores de que esos enfermos eran realmente bebedores. En 1980, Ludwig et al. (17) acuñaron el término de "esteatohepatitis no alcohólica" (EHNA) para designar a estas lesiones que simulan las provocadas por el alcohol pero que se encuentran en personas que no abusan de bebidas alcohólicas. En la actualidad se considera que la EHNA forma parte de un espectro más amplio de lesiones que incluye, además de la EHNA, al hígado grasoso no alcohólico, al hígado grasoso e inflamación y probablemente también a un gran número de cirrosis hepáticas criptogénicas (18,19). Para designar a todo este espectro de lesiones se ha propuesto el término de "enfermedad grasa del hígado no alcohólica" (EGHNA). La trascendencia pronóstica de todas estas lesiones no es homogénea. Mientras que la esteatosis es una lesión estable que sólo en el 3% de los casos evoluciona a lesiones más graves, la EHNA evoluciona a cirrosis en el 15 al 25% de los casos (18,20). Es muy probable que muchas cirrosis criptogénicas tengan su origen en una EHNA, en las

que con el paso del tiempo se han perdido los signos de esteatohepatitis (21-23). Al igual que las cirrosis de otras etiologías, la desarrollada a partir de una EHNA también puede derivar en carcinoma hepatocelular (24).

El diagnóstico de EHNA no se basa en la existencia de una lesión hepática concreta sino en la presencia de una constelación de lesiones entre las que figura la esteatosis, la degeneración hídrica de los hepatocitos y los infiltrados inflamatorios. Además, frecuentemente, se encuentran cuerpos hialinos de Mallory, megamitocondrias y grados variables de fibrosis. Recientemente se ha propuesto un sistema de puntos para valorar las diversas lesiones hepáticas de la EGHNA y poder establecer el diagnóstico histológico de EHNA (19,25). Un elemento conceptual y diagnóstico crítico de la EGHNA es la ausencia de consumo abusivo de alcohol. No hay unanimidad en lo que se considera "consumo no abusivo de alcohol" en relación con la EGHNA, pero en general se considera que no lo es cuando el consumo de etanol en el hombre no supera los 20-40 g/día y en la mujer, los 20 g/día (26,27).

La EGHNA es una lesión frecuente en la población occidental, que en el futuro se hará aún más habitual debido a que se asocia a la resistencia a la insulina, a la diabetes y a la obesidad. En la actualidad representa, tras las infecciones virales y el abuso alcohólico, la tercera causa de hipertransaminasemia. Se estima que entre el 17 y el 33% de la población general presenta una EGHNA y que quizá en el 5,7 al 17% de esa misma población la lesión existente corresponde a la EHNA (28,29). Cuando se ha investigado la causa de hipertransaminasemia en sujetos sin marcadores de infección viral y sin abuso alcohólico se encuentran lesiones de EGHNA en el 40 a 90% de los casos (29). En un estudio realizado por nosotros hace unos 20 años, encontramos que la prevalencia de las lesiones de EHNA era de 5/100.000 habitantes, su incidencia, del 0,9/100.000 habitantes/año y su frecuencia en las biopsias hepáticas en el 1,9% y en una de cada doce hepatitis alcohólicas. (30,31). Revisiones más reciente de este problema nos han mostrado que en los últimos años estas incidencias y prevalencias han ido aumentando.

La EGHNA se ha detectado en asociación con un gran número de condiciones metabólicas, quirúrgicas y tóxicas (EGHNA secundarias). Sin embargo, el principal factor asociado con la EGHNA es el *síndrome metabólico*, definido este como la asociación en un mismo individuo de, al menos, tres de las siguientes alteraciones: hipertensión arterial ($\geq 130/85$ mmHg), obesidad central (cintura > 102 cm en el hombre; > 88 cm en la mujer), hiperglucemia en ayunas (≥ 110 mg/dl), hipertrigliceridemia (> 150 mg/dl) o descenso de las HDL (< 40 mg/dl en hombre; < 50 mg/dl en mujer) (32). Un trastorno fisiopatológico común en este síndrome es la resistencia a la insulina (33-35). En realidad, la EGHNA representaría el componente hepático del síndrome de resistencia a la insulina.

DESDE LA RESISTENCIA A LA INSULINA AL HÍGADO GRASO

La insulina es la principal hormona anabolizante del organismo. Bajo su efecto se produce un aumento de la síntesis de proteínas, de glucógeno y de lípidos, se facilita la entrada de glucosa en las células y disminuye la gluconeogénesis y la lipólisis. Se conocen sólo parcialmente los mecanismos por los que se producen efectos tan variados. Se sabe que, en las células adiposas y en el músculo esquelético, la unión de la insulina a su receptor específico determina la activación de la tirosina-quinasa de este receptor, su autofosforilación y la fosforilación en tirosina/activación del IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*). Ello se sigue de la activación de la PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*). Esta quinasa activa un transportador de glucosa que normalmente se encuentra en vesículas del citoplasma, el Gluc-4 (*Glucosa Transporter 4*), y determina que este se desplace a la membrana plasmática y facilite la entrada de glucosa en las células (34,36,37) (Fig. 1). En estas, la glucosa es utilizada como fuente de energía o, si no es necesaria, se almacena en forma de glucógeno. Cuando hay una resistencia a la insulina, la fosforilación en tirosina del IRS-1 no tiene lugar; se detiene la entrada de glucosa en las células; esta se retiene en el espacio extracelular, se produce hiperglucemia, la cual, a su vez, estimula la secreción de insulina por las células β del páncreas (38). Cuando el páncreas agota su capacidad para compensar esta hiperglucemia, surge la diabetes mellitus del tipo II.

La cascada de fenómenos que sigue a la unión de la insulina a su receptor es más amplia que la que acabamos de mencionar. La activación de la PI3K que sigue a la fosforilación del IRS-1 provoca la activación de la *fosfodiesterasa* y, en consecuencia, la degradación del AMPc y su agotamiento. La ausencia de AMPc determina que la PKA (*Protein Kinase A*) no se active y, en consecuencia, que tampoco lo haga la *lipoprotein lipasa* (LPL) (39). Es decir, no se produce la hidrólisis de los triglicéridos ni la liberación de ácidos grasos libres (AGL) por el tejido adiposo (40). Una de las consecuencias de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo es que el AMPc permanece alto, lo cual activa la PKA y esta, a su vez, la LPL. Consecuencia de ello es la degradación de los triglicéridos y la liberación a la sangre de AGL. Los efectos lipogénicos y antilipolíticos de la insulina están coordinados gracias a los efectos de la hormona, mediados por la PI3K, sobre el SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), un factor de transcripción que juega un papel esencial en la activación de diversos genes implicados en la lipogénesis (carboxilasa de la acetil CoA; sintetasa de ácidos grasos; acetiltransferasa del glicerol-3-fosfato, etc.) (41) y en la excreción de la VLDL (MTP, *Microsomal Transfer Protein*). Por ello, en ausencia de actividad insulínica, todos estos genes están reprimidos y con ello también la lipogénesis (42) (Fig. 1).

Los efectos de la *insulina sobre el hígado* difieren ligeramente de los que ejerce sobre el tejido adiposo y el músculo esquelético, ya que el receptor de insulina fosforila en tirosina a otro sustrato, el IRS-2 (43), el cual, a través de la PI3K y de la Akt-2/PKB, fosforila e inactiva la GSK3 (*glucogen-Synthase Kinase-3*), de forma que esta deja de inhibir a la glucógeno sintetasa y permite que la actividad de esta aumente (44). Consecuencia de ello es que la insulina en el hígado aumenta la síntesis de glucógeno. La resistencia hepática a la insulina da lugar a los efectos contrarios. Disminuye la síntesis de glucógeno y aumenta la glucólisis, la gluconeogénesis y la liberación de glucosa a la sangre. Además, la insulina, a través también de la activación de IRS-2 y del SREBP, estimula la expresión de genes lipogénicos que determinan la síntesis de ácidos grasos en el hígado (45).

Los factores que determinan la resistencia a la insulina probablemente son múltiples (46-48). Entre ellos se ha implicado a la propia esteatosis, al estrés oxidativo, a los AGL, al TNF α y, como mediadores intracelulares, a la ceramida, a la IKK β (49), al NF κ B, a la PKC- θ (*Protein kinase C- θ*), a la JNK1 (*Jun N-terminal kinase-1*) (36,50-54), al citocromo CYP2E1 (55) y a las proteínas SOCS (56). Estas últimas proteínas interfieren con la transmisión de señal de la insulina al impedir que los IRS-1 y IRS-2 se relacionen con el receptor de insulina (57) o al inducir la degradación proteosómica de esos sustratos (58). Su sobreexpresión en el hígado provoca resistencia a la insulina y aumento de SREBP, el cual, a su vez, origina esteatosis (48). El papel de la *esteatosis hepática* en la patogenia de la resistencia a la insulina viene avalado por diversas observaciones. En el curso de esteatosis hepáticas de cualquier etiología también aparece secundaria-mente resistencia a la insulina. Por ejemplo, en las lipodistrofias (59,60), en las alteraciones de la β -oxidación mitocondrial (61) o en los defectos de la secreción de las VLDL (62) es habitual que aparezca una resistencia a la insulina. Igualmente, la administración de dietas ricas en grasa a las ratas provoca en ellas resistencia hepática a la insulina (47). En las lipodistrofias, la grasa subcutánea y visceral se moviliza, hay hipertrigliceridemia y se deposita en el hígado. Por otro lado, los ratones carentes de tejido adiposo desarrollan intensa esteatosis hepática y muscular, incapacidad para activar PI3K a través de IRS-2 y resistencia hepática a la insulina (63). También contamos con varios estudios que demuestran que la resistencia a la insulina se correlaciona con la grasa depositada en el hígado (64). Es probable que tanto los AGL como el TNF α interfieran con la transmisión de la señal generada por la insulina al provocar la fosforilación en serina 307 –no en tirosina– del IRS-1 (65-68). La fosforilación en esta serina es incompatible con la simultánea fosforilación en tirosina. Es posible que tanto el TNF α como los AGL produzcan esa fosforilación tras activar la JNK1 (*Jun-N-terminal Kinase-1*) (65,69,70). En los ratones con EHNA se ha demostrado que existe una sobreactivación de la JNK1 (71). En la patogenia de la resistencia a la in-

ulina provocada por el estrés oxidativo se ha implicado a la liberación del NF κ B secundaria a la activación de IKK- β (72).

Como hemos mencionado más arriba, resultado del aumento de la lipólisis que acompaña a la resistencia a la insulina es la liberación a la sangre de grandes cantidades de AGL. La lipólisis de la grasa abdominal es de especial importancia en la patogenia de la EGHNA (73). Así, por ejemplo, se ha comprobado que casi dos tercios de la grasa acumulada en el hígado en la EGHNA proceden de los AGL circulantes (74) y que la gravedad de la esteatosis hepática se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo visceral y no con la grasa subcutánea o periférica (75). La eliminación de la grasa subcutánea mediante liposucción no resuelve ninguno de los trastornos metabólicos existentes en la EGHNA (76). En efecto, la resistencia a la insulina, los niveles periféricos de adiponectina, TNF α , IL-6, PCR, insulina, glucosa, etc., permanecen invariables tras la eliminación de esa grasa. Por el contrario, la reducción de la grasa visceral mejora la resistencia a la insulina y los restantes trastornos metabólicos asociados a la EGHNA (77). Se ha comprobado que la grasa visceral es particularmente resistente a la acción de la insulina (78) y, en consecuencia, es hidrolizada con más facilidad. Además, el hígado, al ocupar un lugar estratégico en el curso de la sangre portal, recibe directamente los AGL liberados durante la lipólisis de la grasa abdominal. En los pacientes y animales con EGHNA se puede comprobar que las concentraciones plasmáticas de estos ácidos y del glicerol están muy aumentadas y que la insulina tiene una capacidad reducida para impedir la liberación de estos productos de la lipólisis (79).

Los AGL que llegan al hígado activan al receptor nuclear PPAR α , el cual, formando un heterodímero con el RXR (*Retinoid X Receptor*), induce la transcripción de numerosos genes implicados en el catabolismo y eliminación de los ácidos grasos (acil CoA oxidasa, citocromo P₄₅₀, proteína fijadora de ácidos grasos, proteína microsomal de transferencia de triglicéridos, apolipoproteína B100, etc.) (80-82) (Fig. 2). En concreto, estas proteínas intervienen en la utilización de los AGL, en la síntesis de triglicéridos (esteatosis) y fosfolípidos, en la gluconeogénesis (hiperglucemia) o en su oxidación en las mitocondrias, en los peroxisomas o en los microsomas. Estas tres oxidaciones tienen gran trascendencia ya que pueden contribuir al estrés oxidativo celular. La β -oxidación en las mitocondrias puede conducir a la formación de ROS (*Reactive Oxygen Species*), principalmente del anión superóxido (O₂⁻), durante la fosforilación oxidativa (83). La β -oxidación en los peroxisomas conduce a la formación de peróxido de hidrógeno, mientras que la oxidación en los microsomas, con la participación de los citocromos P₄₅₀, determina la formación de anión superóxido y de ácidos dicarboxílicos. La acumulación de triglicéridos en los hepatocitos sería consecuencia de una llegada de AGL al hígado en cuantía superior a la que puede ser utilizada o exportada a la sangre en forma de lipoproteínas

VLDL. Hasta el momento no se ha podido demostrar que en los pacientes con EGHNA exista una alteración en la incorporación de los AGL a los triglicéridos, fosfolípidos o a los esteres de colesterol (79). Por el contrario, existen algunos estudios que han mostrado que en los pacientes con EHNA está reducida la exportación de triglicéridos a la sangre en forma de VLDL debido a la menor incorporación de estos a la apolipoproteína B100 (84,85). En estos enfermos se han descrito polimorfismos en el promotor de la MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) que pueden justificar ese defecto en la exportación de lípidos (86,87). La MTP incorpora triglicéridos a la apolipoproteína B en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, dando lugar a la formación de VLDL y facilitando la salida de los lípidos de las células hepáticas (88-90). Cuando la actividad de la MTP está reducida, la exportación de lípidos de los hepatocitos disminuye, se retienen en las células y se produce la esteatosis hepática. Las enfermedades en las que existen mutaciones en la MTP es habitual que exista esteatosis hepática (91). En la infección crónica por el VHC, principalmente por el genotipo 3, frecuentemente asociada con EGHNA, la actividad de la MTP hepática está significativamente descendida (92). Por tanto, la esteatosis existente en la EGHNA sería consecuencia, por un lado, de una mayor llegada de AGL al hígado como resultado de la lipólisis que sigue a la resistencia a la insulina y por otro de un defecto en la exportación de triglicéridos a la sangre en forma de VLDL (Fig. 2).

DESDE LA ESTEATOSIS A LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA

Estrés oxidativo

Si la resistencia a la insulina juega un papel fundamental en la patogenia del hígado graso, el estrés oxidativo probablemente sea definitivo en la evolución desde esteatosis a EHNA y a las lesiones más avanzadas de la EGHNA. Se ha postulado que la EHNA sería la consecuencia de dos agresiones. La primera estaría representada por el hígado graso; la segunda por el estrés oxidativo (93,94). Contamos con numerosas evidencias que indican que en la EHNA existe un estrés oxidativo. En los enfermos y animales con esta lesión existe un aumento en el contenido hepático de aldehído malónico (MDA) (95,96), de 4-hidroxinonenal (4-HNE) (97), de las proteínas 3-tionitradas (79,95,96) y de 8-hidroxideoxiguanosina (97,98), todos ellos marcadores de lesión oxidativa de los lípidos, proteínas y ADN, respectivamente. Además, las tasas en sangre de tioredoxina, otro marcador de estrés oxidativo, están elevadas en la EHNA (99) mientras que las de los factores antioxidantes están disminuidas (96,100,101). Los genes que codifican la mayoría de los factores antioxidantes tienen en común el poseer un elemento ARE (*Antioxidant-Response Element*) que responde a los fac-

tores de transcripción Nrf1 y Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor*). Estos dos factores actúan como heterodímeros formando complejos con las proteínas *Small-Maf* y otras proteínas *bZIF* (102). Normalmente los factores Nrfs se encuentran secuestrados en el citoplasma (103). Cuando la célula sufre un estrés oxidativo, los Nrfs se traslocan al núcleo, se unen a los elementos ARE de los genes antioxidantes e inducen su expresión (104,105). La importancia de estos factores antioxidantes en la patogenia de la EGHNA viene avalada por los estudios realizados en ratones Nrf1^{-/-}, que carecen de Nrf1 y desarrollan, además de estrés oxidativo, descenso de la expresión de los genes con elementos ARE, esteatosis, necrosis, apoptosis, inflamación hepática y fibrosis pericelular y pericentral (106). Concordante con ello es el hallazgo de que la expresión de los genes antioxidantes (*Glutation S Transferasa*) está disminuida en los pacientes con EGHNA (107).

Las consecuencias del estrés oxidativo sobre las células son múltiples. Determinan la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, la degeneración y *necrosis* de las células, la muerte de estas por *apoptosis* (108,109), la expresión de *citoquinas proinflamatorias*, la activación de las células estrelladas del hígado y la *fibrogenesis* (93,94,110).

Origen del estrés oxidativo

Papel de las mitocondrias

Aunque el origen de este estrés oxidativo en la EHNA es probablemente múltiple (oxidación de los ácidos grasos, citocromos microsomales, siderosis, citoquinas, células de Kupffer, etc.), la disfunción de las mitocondrias parece jugar un papel predominante. Las mitocondrias están implicadas tanto en la β -oxidación de los AGL como en la generación de las ROS (83,111-114). Diversos estudios han mostrado que las mitocondrias de los pacientes con EHNA son anormales tanto morfológica como funcionalmente. En estos enfermos, las mitocondrias son grandes, están hinchadas, presentan escasas crestas y, frecuentemente, contienen inclusiones paracristalinas (79,115). Se trata de cambios muy parecidos a los que se encuentran en las miopatías mitocondriales causadas por alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) (116). Además, la generación de [¹³C]CO₂ a partir de la ¹³C-metionina y la resíntesis de ATP tras una sobrecarga de fructosa están marcadamente disminuidas en los pacientes con esteatosis hepática (117,118). Ambos defectos sugieren que la función de las mitocondrias, además de su morfología, está alterada en los pacientes con EHNA.

Las mitocondrias representan el lugar principal de β -oxidación de los AGL. En este proceso se pueden diferenciar varios pasos (83,119):

(α) *Entrada de los AGL en las mitocondrias.* En este proceso interviene una enzima, la CPT-1 (*Carnitina-palmitoil transferasa-I*), y una traslocasa y se necesita que los ácidos grasos de cadena larga se unan previamente a la carnitina. Una vez que el ácido graso ha entrado en las mitocondrias y se encuentra en la matriz mitocondrial, la carnitina se libera y esta regresa al citoplasma. Una ausencia de carnitina (120-122), una deficiencia de CPT-I (123) o un defecto en la traslocasa pueden determinar que se altere el paso de los ácidos grasos a las mitocondrias y que estos no sean β -oxidados. Ello puede contribuir a que los ácidos grasos se retengan en el citoplasma y que posteriormente se reesterifiquen a triglicéridos (Fig. 3).

En un estudio realizado por nosotros en pacientes con EHNA pudimos demostrar que la cuantía intrahepática de carnitina libre y total era normal (124), lo cual coincidía con lo hallado por otros en obesos y en alcohólicos con hígado graso (122,125); igualmente la medición de la actividad de la CPT-I en el hígado de los pacientes con EHNA mostró que era normal (124), por ello, no podemos atribuir la acumulación de triglicéridos en el citoplasma a que los AGL no puedan entrar en las mitocondrias.

(β) El segundo paso en este proceso de *oxidación mitocondrial de los ácidos grasos* consiste en una serie de sucesivas β -oxidaciones que conducen a la formación de acetyl-CoA, de ácidos grasos cortos-CoA y a la conversión del NAD⁺ en NADH (126). Hay pocos estudios en los que se haya medido la β -oxidación de los ácidos en la EGHNA. Utilizando métodos indirectos, se ha deducido que la β -oxidación de los ácidos grasos está aumentada en estos pacientes (79,127). Nosotros, midiendo directamente la β -oxidación mitocondrial (ácido palmítico) y peroxisomal (ácido lignocérico) en ratones *ob/ob* con lesiones de EGHNA y EHNA, encontramos que la oxidación de ambos ácidos grasos estaban significativamente aumentadas (95). Estos resultados coinciden con lo hallado por el grupo de Diehl en este mismo tipo de ratones (128,129). Este aumento de la β -oxidación ha sido atribuido a la resistencia a la insulina y, en consecuencia, al aumento de la lipólisis y a la mayor llegada de AGL al hígado (41,79). Los AGL participan en la activación del factor de transcripción PPAR α (*Peroxisome proliferator-activated receptor α*), el cual activa la expresión de genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos (130,131) (Fig. 3).

(γ) El NADH formado durante la β -oxidación se reoxida a NAD⁺ a lo largo de un proceso conocido como *fosforilación oxidativa* que conduce a la formación de ATP. Este último representa la única fuente de energía que puede ser aprovechada por las células. En esta fosforilación interviene una serie de complejos enzimáticos situados en la membrana mitocondrial interna (complejos I a V), que se conoce como *cadena respiratoria mitocondrial* (CRM). En ella, los electrones del NAD⁺ y del FADH₂ son pasados de un complejo a otro de esta cadena hasta que finalmente son combinados con el oxígeno y los pro-

tones para formar agua. Este proceso está acoplado con otro simultáneo, por el que los protones de la matriz mitocondrial son enviados al espacio intermembranoso de las mitocondrias generando un gradiente electroquímico entre la matriz y este espacio. Cuando estos protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintetasa (complejo V) determinan la conversión del ADP en ATP y, con ello, que la energía electroquímica acumulada en el espacio intermembrana sea empleada en la formación de una energía utilizable por las células (83,119,132). Normalmente, a lo largo de este proceso de fosforilación oxidativa, se pueden escapar algunos electrones que, tras unirse al oxígeno de la matriz mitocondrial, dan lugar a la formación de las ROS, principalmente de O₂⁻ (133,134). Cuando la fosforilación oxidativa es deficiente como consecuencia de la baja actividad de la CRM, no sólo se forma menos ATP, sino que la cuantía de electrones que se escapan del sistema es mayor y aumenta la formación de ROS (126) (Fig. 4). Esta formación de ROS estaría potenciada en el caso, como ocurre en la EHNA, de que la llegada de AGL al hígado y su β -oxidación estén aumentadas. También lo está en la diabetes mellitus en que la oxidación de glucosa representa un aporte importante de electrones a la CRM.

La información existente sobre la función de la fosforilación oxidativa y de la CRM en los pacientes con EHNA es muy limitada. Caldwell y cols. (115) encontraron que la actividad de los complejos I y III de la CRM era normal en las mitocondrias de las plaquetas de pacientes con EHNA y Sanyal y cols. (79) no encontraron defectos en la expresión de las enzimas de esta cadena cuando lo estudiaron en el músculo de un paciente con EHNA. Nosotros hemos estudiado directamente la actividad de todos los complejos enzimáticos de la CRM en el hígado de los pacientes con EHNA (124). En este estudio pudimos demostrar por primera vez que la actividad de estos complejos estaba reducida en un 30 al 50% de la actividad control. Este defecto compromete tanto a los complejos cuyos componentes están codificados por genes mitocondriales (complejos I, III, IV y V) como por genes nucleares (complejo II). Concordante con estos hallazgos han sido los comunicados por Haque y cols. (135) quienes comunicaron que la actividad de la citocromo c oxidasa, uno de los complejos enzimáticos de la CRM, estaba disminuida. Aunque la causa de estos defectos enzimáticos quedó sin explicar, nosotros observamos que la actividad de esos complejos se correlacionaba, de forma inversa, con las tasas en sangre de TNF α , con el índice de masa corporal y con el índice HOMA de resistencia a la insulina (124).

Con el fin de profundizar en el estudio de los factores que pudieran ser responsables de la hipofunción de la CRM, recurrimos a un modelo animal de EGHNA que reproduce muchas de las alteraciones que se encuentran en la enfermedad humana. Los ratones *ob/ob* (*Lep^o*) tienen neutralizado el gen de la leptina, por lo que carecen de esta hormona y, en consecuencia, presentan polifagia,

engordan y desarrollan resistencia a la insulina, hiperglucemia e hiperlipemia (136). Histológicamente, el hígado de los animales estudiados por nosotros presentaba esteatosis en el 42% de los hepatocitos, degeneración hidrópica, hialina de Mallory e infiltrados inflamatorios. Es decir, se trata de animales que reunían criterios histológicos de EHNA. El estudio de la actividad de la CRM en estos ratones nos mostró que también en ellos existe un defecto similar al hallado en los pacientes con EHNA. La actividad enzimática de la CRM estaba reducida a entre el 40 y el 60% de la actividad que tiene en los animales sanos (137). Por ello, parece que estos ratones *ob/ob* representan un buen modelo experimental para investigar la etiopatogenia de la disfunción mitocondrial que hemos encontrado en los pacientes con EHNA.

La disfunción de la CRM hallada en estos ratones permite predecir que en estos animales deben estar aumentados tanto el escape de electrones de esta cadena como la formación de ROS (138). En efecto, la determinación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), un marcador de estrés oxidativo, nos mostró que sus tasas se encuentran muy elevadas. Estos hallazgos son concordantes con los ya mencionados que indican la existencia de un estrés oxidativo en el hígado de los pacientes con EHNA (79,96,128,139-141).

Mecanismos de la disfunción mitocondrial

Los mecanismos que pudieran estar implicados en la disfunción mitocondrial de los pacientes con EGHNA o en los ratones *ob/ob* son variados. Uno de ellos pudiera ser el propio *estrés oxidativo*. Se sabe que el MDA y el 4-HNE, dos productos resultantes de la peroxidación de los lípidos celulares, son capaces de inhibir la actividad de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV de la CRM) tras formar con los pépticos de este complejo diversos conjugados (142,143). Además, los ROS pueden lesionar tanto al ADN mitocondrial (mtDNA) (144,145) como a las enzimas mitocondriales dotadas del núcleo hierro-sulfuro (138) y, consecuencia de ello, determinar la hipofunción de la CRM (146). Tales lesiones en el ADN mitocondrial (mtDNA), de difícil reparación en las mitocondrias (147), deben repercutir sobre la expresión de los complejos I, III, IV y V de esta cadena, ya que el mtDNA codifica 13 de los polipéptidos que forman esos complejos. Concordante con ello, Haqué y cols. (135) encontraron que en los pacientes con EHNA existía una depleción del mtDNA. La presencia de estrés oxidativo en las células es capaz de iniciar una serie de círculos viciosos que contribuyen a aumentar el daño al mtDNA y a provocar un mayor trastorno mitocondrial (132,148).

A pesar de estas evidencias, los resultados de nuestros estudios en los ratones *ob/ob* no apoyan que el estrés oxidativo sea el causante de la disfunción mitocondrial. En efecto, el tratamiento de estos animales durante 3 meses con N-Acetil-Cisteína (NAC) por vía peritoneal disminu-

yó de forma muy marcada la concentración de TBARS en el hígado, pero no logró mejorar la actividad de los complejos de la CRM ni revertir las lesiones histológicas del hígado (95). La incapacidad de la NAC para mejorar las lesiones histológicas de la EGHNA ha sido comunicada también por otros (96). Estos resultados, junto con el hecho de que en la EHNA y en los ratones *ob/ob* la actividad del complejo II de la CRM –cuyos componentes no están codificados por el mtDNA– también esté disminuida, hacen dudar del papel del estrés oxidativo en la patogenia de este defecto mitocondrial. No obstante, antes de rechazar definitivamente el papel de este estrés, es imprescindible repetir los experimentos empleando antioxidantes que actúen preferentemente a nivel de las mitocondrias; por ejemplo, los análogos de la Mn-superóxido dismutasa (149).

Otro factor importante que se debe considerar en la patogenia de la disfunción mitocondrial es el TNF α . Contamos con numerosas evidencias que abogan por el papel de esta citoquina en la patogenia de la EHNA (150,151). En los pacientes con EHNA se ha comprobado que existen tasas elevadas de TNF α en sangre (124,152-155) y nosotros encontramos que el descenso de la actividad de la CRM se correlacionaba con los ascensos del TNF α en sangre (124). En los ratones *ob/ob*, observamos que las concentraciones del TNF α en el tejido hepático eran unas 20 veces más altas que las encontradas en los ratones normales (137). En un estudio previo, pudimos demostrar que el tratamiento de las células con TNF α produce un aumento de los ROS, un descenso del ARN mensajero de algunos componentes de la ATPasa y una reducción de la cuantía de los péptidos que forman parte de la ATPasa y de la citocromo *c* oxidasa (156). El origen de este TNF α hepático probablemente no sea único, ya que tanto el tejido adiposo, como los hepatocitos y las células de Kupffer pueden producir TNF α (150,157,158). El tejido adiposo abdominal pudiera ser una fuente importante de TNF α hepático, ya que su paso por el hígado es obligado. El tejido adiposo de los obesos se encuentra infiltrado por macrófagos (159,160), los cuales, además de los propios adipocitos y preadipocitos, pueden liberar TNF α (161). Los preadipocitos muestran algunas propiedades antimicrobianas y fagocíticas, al igual que los macrófagos, y poseen el potencial de transdiferenciarse en estos (162). Los estímulos potenciales para la liberación del TNF α son variados (citocinas de los adipocitos, fagocitosis de lipoperoxidos, endotoxinas). Además, los mismos AGL liberados durante la lipólisis de la grasa abdominal pueden inducir la expresión del TNF α tanto en el tejido adiposo (163) como en los hepatocitos (164). Este efecto lo produciría a través de la activación de NF κ B. Los AGL darían lugar a la traslocación de Bax a los lisosomas y facilitarían la salida de la cathepsina B al citoplasma, la cual, por vía de la IKK β , activaría NF κ B (165).

La producción aumentada de TNF α formaría parte de un estado de *inflamación crónica hepática* que existe en la esteatosis hepática. Consecuencia del estrés oxidativo

y de la llegada de AGL al hígado se produciría una activación de las células de Kupffer, de la IKK- β y del factor NF κ B (165,166). Este factor de transcripción, además de aumentar la expresión genética del TNF α , también lo hace del TGF β , la IL-8, IL-6 y la IL-1 β , entre otros factores. Estos pueden reproducir muchos de los cambios histológicos que se encuentran en la EHNA. Por ejemplo, la IL-8 induce la quimiotaxis de neutrófilos, el TNF α , la necrosis/apoptosis de los hepatocitos, el TGF β , la activación de las células estrelladas, la fibrosis hepática y la formación de cuerpos de Mallory.

Los efectos biológicos del TNF α pueden ser antagonizados por la *adiponectina* (167). Se trata de una hormona producida por los adipocitos que tiene efectos antilipogénicos y que evita la acumulación de grasa en el hígado y en otros tejidos no adiposos, por lo que previene el desarrollo de EGHNA, EHNA, inflamación y fibrosis hepática (168-171). La administración de adiponectina recombinante a ratones *ob/ob* reduce la hepatomegalia, la síntesis de ácidos grasos y la inflamación, a la vez que aumenta la oxidación de los ácidos grasos (168). Los ratones que no producen adiponectina desarrollan una intensa fibrosis tras la exposición al C14C, pero este efecto puede ser evitado si los ratones son infectados con un adenovirus que exprese la adiponectina (169). El efecto antiinflamatorio lo ejerce, probablemente, por varios mecanismos, incluyendo la reducción de la producción de TNF α por macrófagos del tejido adiposo (167,172), la inhibición de la vía de la NF κ B a través del AMPc (173) y de la activación de los macrófagos (174). La disminución de la esteatosis es el resultado de la activación de los PPAR α y de las quinasas dependientes del AMPc. Consecuencia de ello es el aumento de la oxidación de los ácidos grasos, la exportación de los lípidos y el descenso de la lipogénesis (175). A través de la misma vía, la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina (176-179) y pudiera revertir muchas de las alteraciones que existen en la EGHNA. La disminución de la fibrosis está mediada por sus efectos antiproliferativos y apoptóticos sobre las células estrelladas del hígado (171). En el síndrome metabólico, incluido el EGHNA, las tasas en sangre de adiponectina están disminuidas (153,180-182) y ello se asocia con la cuantía de la grasa central, el aumento del grado de esteatosis hepática y la resistencia hepática a la insulina (183,184). En contra de lo que ocurre con otras adipoquinas, las tasas de adiponectina circulante están reducidas en los obesos, en especial cuando se trata de una obesidad visceral. Cuando se reduce la cuantía de esta grasa, mediante la pérdida de peso, las tasas circulantes de esta adipoquina y su RNAm en el tejido adiposo aumentan de forma significativa (162). Estos cambios son simultáneos y opuestos a los que se producen en el TNF α y en la IL-6. Estas dos citoquinas inhiben la expresión del RNAm de la adiponectina.

En un estudio previo encontramos evidencias del efecto negativo del TNF α sobre las mitocondrias. Esta citoquina producía importantes cambios morfológicos y fun-

cionales sobre las mitocondrias. Tras 8 horas de incubación de las células con el TNF α , las mitocondrias se hincharan, redondeaban, perdían las crestas, la matriz se aclaraba y se rompía la membrana mitocondrial externa (185). Además, nuestro estudio reveló que el TNF α puede interferir con el flujo de electrones a nivel de los complejos I y III de la CRM (185,186). Esta citoquina determina que los electrones queden retenidos en el citocromo *b* y que este pueda ceder los electrones retenidos al oxígeno para formar anión superóxido (185). En realidad, muchos de los trastornos existentes en la EHNA pudieran ser justificados por los efectos biológicos del TNF α , ya que este no sólo provoca disfunción de la CRM, sino que además aumenta la resistencia de las células a la insulina, provoca la expresión genética de diversas citoquinas proinflamatorias y enzimas, entre otras, de la iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*), e induce la muerte celular por apoptosis o necrosis, entre otras.

El papel crítico del TNF α en la patogenia de la EHNA y de la disfunción de las mitocondrias viene apoyado por los resultados obtenidos en ratones *ob/ob* tratados durante tres meses con anti-TNF α (Infliximab) por vía peritoneal. A pesar de que este tratamiento no fue suficiente para normalizar completamente las tasas de TNF α en el tejido hepático, si lo fue para que la actividad de los complejos I, II, III y V se normalizara o mejorara de forma llamativa, que la actividad de la β -oxidación disminuyera y que la histología hepática regresara casi completamente a la normalidad (95). El efecto apreciado por nosotros sobre la β -oxidación ha sido también observado por Li y cols. (128) y pueden ser atribuidos a los efectos del TNF α sobre la sensibilidad a la insulina (99,187), el estrés oxidativo (99) y la esteroil CoA desaturasa (128), una enzima que participa en la síntesis de los ácidos grasos (188).

La simultánea mejoría de la disfunción mitocondrial y de las lesiones histológicas tras el tratamiento con los anticuerpos anti-TNF α permite defender el papel del TNF α en la patogenia de ambas alteraciones y sugerir que los defectos mitocondriales pudieran participar en el desarrollo de las lesiones.

Entre los múltiples efectos biológicos del TNF α figuran los de inducir la expresión de la iNOS (189), en especial cuando su acción se combina con la de la IL-1 β , el IFN γ y la endotoxina (190). Esta enzima cataliza la oxidación de la L-arginina en presencia de oxígeno para formar óxido nítrico (NO). El hígado normal sólo expresa la NOS endotelial. Sin embargo, en determinadas circunstancias, por ejemplo, bajo los efectos del TNF α , la expresión en el hígado de la iNOS aumenta de forma muy llamativa y el hígado genera grandes cantidades de NO (191). Este efecto del TNF α está mediado por el factor de transcripción NF κ B (192), cuya actividad está muy aumentada en los ratones *ob/ob* (128). En nuestro estudio pudimos comprobar que en el hígado de estos ratones, además de un significativo aumento del TNF α , también existía una marcada inducción de la iNOS mitocondrial.

Sin duda, esa inducción enzimática es dependiente del TNF α , ya que en los ratones obesos tratados con anti-TNF α descendió su expresión de forma muy llamativa y se aproximó a los niveles controles. El estudio de Laurent y cols. también apoya que la vía de la iNOS se encuentra activada en los ratones *ob/ob* (128), ya que en estos animales encontraron concentraciones hepáticas muy elevadas de nitritos, nitratos y de proteínas 3-tironitradas.

Estos hallazgos pueden tener implicaciones patogénicas, ya que el NO y otras sustancias reactivas derivadas del nitrógeno pueden alterar la función de las mitocondrias y de la CRM (193). En efecto, el NO reacciona con la citocromo *c* oxidasa (*complejo IV*), interrumpe el paso de electrones a su través e impide su unión al oxígeno (194). Por otro lado, el peroxinitrito (ONOO $^-$), un producto derivado de la reacción del NO con el O $_2^-$, es un inhibidor de la actividad de diferentes proteínas, incluidos algunos componentes de la CRM (195,196). Estudios *in vitro* han mostrado que el peroxinitrito puede inactivar a los complejos I, II, V, al citocromo *c* (196-198) y, en algunas circunstancias, también al complejo III (199). Los mecanismos por los que el peroxinitrito ejerce esos efectos son variados e incluyen su potencial oxidativo (200), su capacidad para lesionar al ADN (201) y para nitrar a los residuos de tirosina de las proteínas y generar proteínas 3-tironitrosadas (202). La presencia en los tejidos de proteínas 3-tironitrosadas es considerada un marcador de agresión tisular por el radical peroxinitrito (203). Por ello, nosotros buscamos la presencia de tales proteínas en el hígado de los ratones *ob/ob*.

Utilizando técnicas de inmunofluorescencia encontramos que la cuantía de las proteínas 3-tironitrosadas estaba muy aumentada en los ratones obesos en relación con las existentes en los ratones controles. Estos hallazgos indican que las proteínas del hígado de los ratones obesos han sufrido la agresión por el radical peroxinitrito o por algunos de sus derivados. Con el fin de profundizar en la filiación de las proteínas 3-tironitrosadas, buscamos estas proteínas en un extracto proteico mitocondrial. También en este caso comprobamos que las proteínas de estas organelas habían sufrido los efectos de la agresión por el peroxinitrito. Es más, tras inmunoprecipitar esas proteínas con anti-3-nitrotirosina comprobamos que varios elementos de la CRM, al menos el citocromo *c* y la proteína ND4, un componente del complejo I, se encontraban 3-tironitradas.

Considerando que la nitración de las enzimas de la CRM se asocia con descensos de su actividad catalítica (204), existe la posibilidad de que esta nitración fuera la causa de su baja actividad enzimática. Con el fin de valorar el papel del peroxinitrito y de sus derivados reactivos (205) en la patogenia de este trastorno, tratamos a ratones *ob/ob*, durante tres meses, con ácido úrico administrado por vía intraperitoneal. Este ácido reacciona rápidamente con el peroxinitrito y da lugar a la formación de uratos nitrogenados inactivos (205,206). Por ello, el ácido úrico es considerado un neutralizador natural del peroxinitrito

(205,207) y de sus derivados reactivos (205,206). Se ha demostrado que el tratamiento de ratones con ácido úrico reduce la formación de proteínas 3-tironitradas (205,206) y previene la evolución de las lesiones neurológicas en un modelo experimental de esclerosis múltiple (203,208). Los efectos del tratamiento con el ácido úrico en los ratones *ob/ob* fueron muy llamativos, ya que logró reducir la tasa de lipoperóxidos y de proteínas 3-tironitradas en el hígado y específicamente disminuyó la 3-tironitración del citocromo *c* y del péptido ND4 de la CRM. Estos efectos fueron acompañados de la normalización de la actividad de los complejos I y V de la CRM y de una marcada mejoría de los complejos II y III. Por último, este tratamiento logró la regresión de las lesiones hepáticas y consiguió que la estructura del hígado recuperara su aspecto normal. Los efectos del ácido úrico sobre las lesiones hepáticas apoyan el papel del peroxinitrito, no sólo en la disfunción de la CRM sino también en la patogenia de las lesiones.

Los resultados de nuestros estudios nos llevan a proponer que el TNF α del hígado, probablemente procedente del tejido adiposo abdominal o de la estimulación de su expresión en los hepatocitos por los AGL, da lugar a la inducción de la iNOS y, en consecuencia, a una mayor formación de NO. Este radical, en presencia de O $_2^-$, origina la formación del radical peroxinitrito, el cual se uniría a las proteínas de la CRM y determinaría la reducción de su actividad funcional. Consecuencias similares a las observadas con el ácido úrico se han obtenido cuando los ratones *ob/ob* fueron tratados con la MnTBAP (*Manganese [III] 5,10,15,20 Benzoic Acid Porphyrin*), un análogo de la Mn superóxido dismutasa (MnSOD) que transforma el O $_2^-$ en H $_2$ O $_2$ (96). El descenso de la actividad enzimática de la CRM, además de disminuir la fosforilación oxidativa y la generación de ATP, condiciona que aumente el número de electrones que se escapan de este sistema, los cuales, tras unirse al oxígeno, dan lugar a la formación de ROS. Este escape de electrones sería particularmente alto en las situaciones en que la llegada de AGL al hígado para su oxidación mitocondrial –como ocurre en la EHNA– esté elevada. Los elevados niveles de lipoperóxidos hallados en el hígado de estos ratones obesos tendrían este origen.

Otras fuentes de estrés oxidativo

Aunque la disfunción de las mitocondrias juegue un papel dominante en la generación de ROS, estos pueden formarse también como consecuencia de la oxidación de los AGL en los peroxisomas y microsomas y como consecuencia de la activación de las células de Kupffer. En los obesos y en pacientes con EHNA la actividad de la *CYP2E1* se encuentra aumentada (209-213) inducida probablemente por los AGL o las cetonas (214). Esta enzima microsomal, además de participar en la degradación de xenobióticos, provoca la ω -oxidación de los AGL

(215) en el curso de la cual se forman ROS (216,217). La significación real de los ROS de esta procedencia en la patogenia de la EHNA humana está por demostrar. Las *células de Kupffer* también pueden generar ROS a través del sistema de la NADPH-oxidasa (218). En modelos experimentales de EHNA se ha demostrado que estas células se encuentran activadas y que poseen un gran número de receptores para la endotoxina (166,219,220). En la activación de estas células pueden intervenir diversos factores. Uno de ellos sería la fagocitación de los lipoperóxidos, otro, las endotoxinas procedentes del intestino (219).

Consecuencias del estrés oxidativo

Los ROS pueden inducir la *peroxidación de los lípidos*, en especial de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares. Las consecuencias de esta agresión son variadas.

1. Por un lado, repercute sobre las *propiedades físico-químicas* de las membranas y ello sobre la *actividad de las enzimas* y receptores situados en ella, la expresión de antígenos, las interacciones intercelulares (221-223) y la *permeabilidad de las membranas*. Consecuencia de esto último puede ser que se produzcan cambios que comprometen la viabilidad de las células (paso de calcio a las células) (224) y determinan su muerte por *necrosis*.

2. Una de las lesiones que caracteriza a la EHNA es la *fibrosis hepática*. Inicialmente tiene una distribución pericelular y pericentral, en el área 3 del lobulillo de Rapaport, pero en fases avanzadas alteran la arquitectura lobulillar y adopta la distribución propia de la *cirrosis micronodular*. Las células que principalmente están implicadas en la producción de esa fibrosis son las *células estrelladas del hígado* (CEH). En el hígado normal, las CEH se encuentran en un estado latente, sin capacidad para producir los componentes de la matriz extracelular. Cuando el hígado sufre una agresión, estas células se activan, cambian su morfología y función y sintetizan los diversos componentes de la matriz extracelular (225-227). En la EHNA humana y experimental se ha mostrado que estas células están activadas y muy aumentadas en número (228-230). Los mecanismos que conducen a la fibrosis hepática en la EHNA son probablemente múltiples.

α) El *estrés oxidativo* puede inducir la activación de las CEH y, de esta manera, contribuir a estimular la fibrogénesis hepática. Este efecto lo pudiera provocar tras activar los factores transcripcionales NFκB y c-Myb. Los ROS pueden provocar la degradación citoplásmica de la proteína IκB, lo que determina la liberación del factor de transcripción NFκB y su traslocación nuclear (231). Este efecto lo ejercería tras activar la IKK (*IκB Kinase*) y la fosforilación de la IκB. En las CEH activadas se puede comprobar que la actividad de NFκB está aumentada y que el heterodímero p50/p65 del NFκB se encuentra en el núcleo. Igualmente, el estrés oxidativo puede inducir la

expresión genética del factor c-Myb y su unión al ADN (232). Este factor de transcripción puede participar en la expresión de la actina del músculo liso, en la contractilidad, diferenciación y proliferación de las CEH (233). La activación de estas células se puede producir a través de la fagocitosis de *cuerpos apoptóticos* resultantes de la muerte de los hepatocitos (234).

β) Además, los *aldehídos reactivos derivados de la peroxidación* de los lípidos, tales como el MDA y el 4-HNE, pueden participar en la fibrogénesis hepática. En efecto, Chojkier y cols. (235) mostraron que el MDA aumentaba de forma muy significativa la expresión del ARN mensajero (mRNA) del colágeno α1(I) en cultivos de fibroblastos humanos. Maher y cols. (236,237) encontraron que la síntesis de colágeno se duplicaba cuando los fibroblastos eran cultivados con MDA. Hallazgos compatibles con los anteriores fueron comunicados por otros investigadores (238-241). Aunque los mecanismos de este efecto no son únicos, es muy probable que intervengan los conjugados que estos aldehídos reactivos forman con los aminoácidos o radicales sulfidrilos de las proteínas (242). La formación de estos conjugados se ha demostrado en modelos animales en los que se induce la peroxidación lipídica y en diversas circunstancias clínicas en las que existe fibrogénesis activa (241,243-247). Por otro lado, los tratamientos antioxidantes disminuyen la formación de esos conjugados y previenen la fibrogénesis (241,246,248). En un estudio previo encontramos evidencias de que los conjugados de los aldehídos participan en el aumento de la expresión genética del colágeno (110,249.), ya que el tratamiento de las células con p-hidroximercuribenzoato (pHMB) o con piridoxal-5'-fosfato (P5P) abolía tanto los efectos del MDA como los de una combinación oxidante (cloruro ferroso, ácido ascórbico, ácido cítrico) sobre la expresión genética del colágeno. En estos estudios, pudimos determinar que estos aldehídos ejercen esos efectos a través de unos elementos localizados entre las secuencias -116 y -110 pb del promotor del colágeno α₁(I) y que los factores de transcripción Sp1 y Sp3 intervienen como mediadores de ese estímulo. Estos factores reconocen las secuencias ricas en G+C (250) y actúan como factores que estimulan la expresión de una amplia variedad de genes, incluido el del colágeno α₁(I) (250-254).

χ) En los pacientes con resistencia a la insulina y EHNA es habitual que exista un aumento de las tasas de *leptina* en sangre (255). La leptina es un péptido de 16 kDa, producto del gen *obese* (*Ob*) (256), liberado por los adipocitos, cuyos efectos metabólicos son variados, pero los más importantes se relacionan con el control del peso corporal y del gasto energético (257). El TNFα es uno de sus principales inductores (258). Junto a estos efectos metabólicos, se ha observado que posee un potente efecto fibrogénico (259). Los ratones *ob/ob*, que carecen de leptina, son especialmente resistentes a desarrollar fibrosis hepática (260,261), pero esta resistencia la pierden si se les administra leptina exógena (260). Por otro lado, la ad-

ministración de leptina potencia el grado de fibrosis hepática provocada por otras agresiones (262). En los pacientes con hepatitis crónicas C, con hepatopatía alcohólica o con EHNA se han encontrado tasas altas circulantes de leptina (255,263-265) que se asocian con la gravedad de la fibrosis (266).

Los mecanismos por los que la leptina ejerce estos efectos fibrogénicos requieren más estudios, pero se han mencionado varios. Unos han encontrado que la leptina estimula directamente a las CEH (259,267) y otros, que este efecto lo ejercería indirectamente tras inducir la liberación del TGF β (*Transforming Growth Factor- β*) por las células de Kupffer, estrelladas y endoteliales (259-261,268). Algunos han mostrado evidencias de que puede frenar la degradación de la matriz extracelular tras aumentar la expresión de TIMP-1 (269) y otros que estimula la proliferación (270) e inhibe la apoptosis de las CEH (271). Finalmente, la leptina puede inducir estrés oxidativo actuando a nivel de la CRM (272,273). A través de este estrés pudiera activar los mecanismos fibrogénicos mencionados.

δ) Otras hormonas del tejido adiposo también pueden comportarse como fibrogénicas. La *angiotensina II* y la noradrenalina pueden actuar directamente sobre las CEH y provocar su activación (274,275). La *osteopontina* pudiera conducir a lo mismo a través de sus efectos proinflamatorios (276). Se ha mostrado que los ratones carentes de osteopontina se encuentran protegidos frente a la inflamación y la fibrosis hepática cuando son sometidos a una dieta deficiente en colina-metionina.

ε) Es posible que la propia *esteatosis* represente un factor estimulante de la fibrogénesis. En la EGHNA se puede encontrar fibrosis en ausencia de actividad necroinflamatoria (228-277) y el grado de fibrosis logrado experimentalmente está influenciado por el tipo de grasas de la dieta (278).

φ) Otro factor estrechamente ligado a la obesidad, a la esteatosis hepática y a la progresión de las hepatopatías, incluidas las hepatitis crónicas C y la EHNA, es el tipo 2 de la diabetes mellitus y la resistencia a la insulina (279,280). En la diabetes tipo 2 existe una resistencia periférica a la insulina y tasas elevadas de insulina en sangre, por lo que sería posible que la insulina jugara algún papel en esa progresión de la fibrosis. De hecho, Hickman y cols. encontraron que existía una significativa asociación entre las tasas de insulina en sangre y el aumento de fibrosis (281). Igualmente, otros autores han confirmado estas relaciones entre la resistencia a la insulina y la intensidad de la fibrosis en la hepatitis crónica C (282,283). En este sentido se ha demostrado que las CEH poseen receptores para la insulina, por lo que esta hormona pudiera contribuir a la proliferación de estas células (284). Este efecto proliferativo de la insulina pudiera ejercerlo a través del estímulo de la vía de la MAPK (*MAP kinase*) (285), la cual está muy relacionada con el crecimiento celular. Además, la insulina aumenta la producción de TGF β (286) y del CTGF (287).

γ) Por último, la activación de las CEH y, con ello, de la fibrogénesis puede ser consecuencia indirecta de la *apoptosis de los hepatocitos*. Resultado de este tipo de muerte celular es la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales, tras ser fagocitados por los macrófagos o por las propias CEH, determinan la liberación del TGF β y este, la activación de las CEH (288,289).

3. A través de la activación del NF κ B que provoca el estrés oxidativo se pueden justificar el *estado inflamatorio crónico* que se encuentra en el hígado de la EHNA (165,166), ya que induce la expresión de genes de numerosos factores proinflamatorios, incluido el del TNF α (290), las interleuquinas 2, 6 y 8, el ICAM-1 (291), la MCP-1 (292), el MIP-2 (293), el CINC (*Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*) (294) y varias enzimas proinflamatorias (lipoxigenasa, ciclooxigenasa, iNOS) (231). En este punto, el TNF α , al activar el NF κ B, inicia otro ciclo vicioso que contribuye a aumentar la reacción inflamatoria. Nuestros estudios (95), al igual que los de Li y cols. (128), demuestran que el tratamiento de los ratones *ob/ob* con anti-TNF α hace regresar o desaparecer los infiltrados del hígado. Por otro lado, la unión de los aldehídos reactivos (MDA, 4-HNE) a las proteínas de la superficie de los hepatocitos puede modificar la estructura antigénica de esas proteínas e iniciar una respuesta inmune que contribuye a la reacción inflamatoria que se encuentra en los pacientes con EHNA (295).

4. Aunque no se conocen bien los mecanismos que conducen a la formación de la *hialina de Mallory*, es probable que también se encuentren implicados los aldehídos reactivos formados durante el estrés oxidativo y el TGF β . En efecto, el TGF β puede activar la transglutaminasa y esta dar lugar a la formación de polímeros de citoqueratina al crear uniones transversales entre las moléculas de lisina de unas cadenas de citoqueratina con las de glutamina de otras (296).

5. En la EHNA, la muerte hepatocelular se produce, no sólo por necrosis sino también por *apoptosis* (297-300). Son varias las vías y factores que pueden conducir a esta muerte programada, incluyendo al propio estrés oxidativo, al TNF α y a los AGL (α). Los ROS aumentan la expresión de los ligandos Fas en la superficie de los hepatocitos y de esta manera pueden inducir la muerte por apoptosis (297). Este efecto ha sido atribuido a la activación del NF κ B, ya que este puede aumentar la expresión celular de los receptores de muerte (301,302); sin embargo, el NF κ B se comporta principalmente como un factor de supervivencia celular mediante la inducción de la expresión genética de diversas enzimas (Mn-SOD, iNOS) o de numerosos factores antiapoptóticos (Mcl-1, cFLIP, IAPs, Bcl-XL, A1) (303,192). La fijación del *ligando Fas* al *receptor Fas* pone en marcha una cascada de acontecimientos en la que interviene la unión de la proteína adaptadora FADD (*Fas-Associated Death Domain*) a Fas, la activación de la caspasa 8 con la eventual activación de la caspasa 3 (304), la partición de Bid (*BH3 interacting domain death*) (305), la traslocación del fragmen-

to tBid a la membrana mitocondrial externa y la unión de este fragmento a Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) y a Bax (*Bcl-2-associated X protein*), lo que induce la activación de estas proteínas y el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. De esta forma, salen el citocromo *c* y otras proteínas proapoptóticas del espacio intermembrana de las mitocondrias [Smac/DIABLO (*Second mitochondrial-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI*); AIF (*Apoptosis inducing factor*), endonucleasa G] (306-309) al citoplasma. En el citoplasma, el citocromo *c* forma un complejo con el factor citosólico Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*), el ATP y la procaspasa 9 (apoptosoma) que conduce a la activación de esta última y, tras ello, de la procaspasa 3 (310-312). La caspasa 3 pone en marcha la degradación y muerte por apoptosis de las células (313). En este último proceso se producen la degradación del ADN, la fragmentación de los núcleos y de las células y la formación de los *cuerpos apoptóticos*. Estos pueden ser fagocitados por los macrófagos y otras células vecinas y degradados completamente en sus lisosomas. Otra consecuencia de la salida del citocromo *c* de las mitocondrias es que interfiere con el flujo de electrones a través de la CRM. En consecuencia, aumenta la formación de ROS (314) y se inicia otro círculo vicioso que empeora el trastorno.

El estrés oxidativo, a través de la activación de NFκB, puede inducir la formación del TNFα y este provocar la apoptosis de los hepatocitos (315,316). En realidad, esta citoquina puede originar la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis dependiendo de la situación energética de las células, ya que la apoptosis es un proceso activo en el que se consume gran cantidad de energía (317). La vía de actuación del TNFα es en parte parecida a la del FasL, ya que cuando se une a su receptor (TNFR-1), se forma un complejo (complejo I) constituido por TRADD (*TNF Receptor-Associated Protein with Death Domain*), RIP (*Receptor-Interacting Protein*), TRAF-2 (*TNF Receptor-Associated Factor-2*). Este complejo inicia una vía de supervivencia en la que participa NFκB, Bcl_{XL}, Mcl-1, Gadd45β, c-FLIP, IAPs, y A1 (303,318,319). Por otro lado, este complejo molecular sufre algunas modificaciones dando lugar a otro complejo conocido como DISC (*Death-inducing signaling complex*) (complejo II) al que se une FADD. Ello determina que se active la caspasa 8 y que esta fragmente Bid a su forma truncada, tBid, el cual, como se ha mencionado más arriba permeabiliza a las mitocondrias. (316). Además, tras la unión del TNFα a su receptor se produce la activación de la esfingomielinasa, la cual genera ceramida a partir de la esfingomielina de las membranas celulares (316). La ceramida provoca la apoptosis celular por diversas vías, entre otras, actuando directamente sobre

los poros de la membrana mitocondrial e induciendo una depleción de glutation (320,321). Además, en estudios previos de nuestro laboratorio (156), demostramos que, al menos en parte, la citotoxicidad del TNFα estaba mediada por ROS.

Para finalizar, los *ácidos grasos* pueden jugar también un papel importante en la muerte celular. Hay pruebas que indican que la acumulación de ácidos grasos en células no adiposas se asocia con disfunción y muerte celular (322,323). Se trata de un fenómeno que se conoce con el nombre de *lipotoxicidad*. Esta toxicidad puede contribuir a la patogenia de diversas enfermedades. Por ejemplo, el depósito de ácidos grasos de cadena larga en las células β del páncreas o en los cardiomiocitos de ratas diabéticas determina la muerte de esas células (324,325). En los diabéticos se ha encontrado que la gravedad de la cardiomiopatía se relaciona con el grado de depósito de triglicéridos en el miocardio (326). No se conoce el mecanismo por el que el depósito de triglicéridos o de AGL determina esas lesiones o disfunciones. Los fibroblastos y células endoteliales expuestas a altas concentraciones de ácidos grasos saturados de cadena larga disminuyen su proliferación celular y mueren (327). Se ha sugerido que la muerte se produce por apoptosis, al menos esto se ha demostrado en cardiomiocitos, células β del páncreas y en células hematopoyéticas expuestas al ácido palmítico o esteárico (328,329). Estos efectos proapoptóticos los desarrollarían al menos a través de dos mecanismos diferentes: a) aumentando la permeabilidad lisosomal, facilitando la salida de la catepsina B y favoreciendo la expresión del TNFα (164); y b) aumentando la permeabilidad de las mitocondrias a través de la JNK y facilitando la salida del citocromo *c* (330). Algunos han implicado a la ceramida como segundo mensajero de muerte celular. Este mediador se forma por hidrólisis de la esfingomielina de las membranas celulares y es utilizado por el TNFα para inducir la apoptosis celular (331). Como se ha mencionado más arriba, la ceramida favorece la apertura de los poros de las mitocondria, pero se han considerado también otras dianas moleculares, tales como el aumento del óxido nítrico (332,333), la CAPK (*Ceramide-Activated Protein Kinase*), la PKCζ (*Protein Kinase Cζ*), la "CAPP (*Ceramide-Activated Protein Phosphatase*), las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), la JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) y el NFκB (334,335).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con una Ayuda a la Investigación número 08/2005 de la "Fundación Mutua Madrileña", Madrid, España.