

PUNTO DE VISTA

Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad

X. Buqué, P. Aspichueta y B. Ochoa

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Leioa, Bilbao

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es una enfermedad inflamatoria hepática de carácter crónico de gran relevancia en la actualidad por su fuerte asociación con enfermedades de incidencia creciente como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. En este trabajo se recoge buena parte del conocimiento existente sobre los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento de la esteatosis hepática, el primer estadio de la enfermedad, y en su progreso a esteatohepatitis. Se ha prestado una atención especial al hígado graso asociado a la obesidad, clínica y experimental. En este caso, se valora la rata *fa/fa*, un modelo animal de obesidad con rasgos fenotípicos similares a los de la obesidad humana, incluyendo la resistencia a la insulina y la dislipemia. La esteatosis hepática se revela como una situación compleja, eminentemente metabólica, en la que se simultanean procesos metabólicos aparentemente contradictorios, así como estrés oxidativo, estrés de retículo endoplasmático, disfunción mitocondrial y descenso en la expresión de genes de supervivencia. En buena medida, en su base se sitúan señales extrahepáticas, como las producidas en una situación de resistencia periférica a la insulina asociada a un aumento de la masa adiposa y de ácidos grasos libres sistémicos, e internas, causantes de un desajuste de las funciones glucostática y lipodostática del hígado y de una mayor vulnerabilidad a otras agresiones.

Palabras clave: Lipogénesis. Resistencia a la insulina. Desregulación metabólica. Hígado graso no alcohólico.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease is a chronic inflammation liver condition that is currently highly relevant because of its strong association with increasingly incident diseases such as obesity and type-2 diabetes mellitus. The primary purpose of this paper is to discuss the best part of current knowledge on the molecular mechanisms involved in hepatic steatosis development, the condition's initial stage, and on progression to steatohepatitis. Special attention has been paid to clinical and experimental obesity-related fatty liver. In the latter, the *fa/fa* rat is assessed, which constitutes an animal model for obesity with phenotype features similar to human obesity, including insulin resistance and dyslipemia. Hepatic steatosis is a complex, mainly metabolic condition where apparently non-compatible metabolic processes concur, in addition to oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction, and decreased expression of survival genes. Extrahepatic signals underlie the disorder, such as those arising from peripheral insulin resistance associated with an increase in adipose mass and systemic free fatty acids, together with intrahepatic signals leading to derangement of liver glycostatic and lipidostatic functions, as well as to greater vulnerability to other aggressions.

Key words: Lipogenesis. Insulin resistance. Metabolic deregulation. Non-alcoholic fatty liver.

Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. Rev Esp Enferm Dig 2008; 100: 565-578.

Financiación: Este estudio ha sido realizado con ayudas del ISCIII (Red G03/015) y del Gobierno Vasco (PE02UN04 e IT325/07).

Recibido: 13-06-08.
Aceptado: 13-06-08.

Correspondencia: X. Buqué. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Sarriena, s/n. 48940 Leioa, Bilbao

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) (1-6) es una enfermedad inflamatoria hepática de carácter crónico que engloba un espectro de patologías que van desde la acumulación simple de grasa o esteatosis hepática, hasta fases finales de la enfermedad como la cirrosis, pasando por la esteatohepatitis no alcohólica

(EHNA) y la fibrosis (7-12). La esteatosis hepática se ha considerado históricamente una condición benigna, reversible, asintomática y con pocas complicaciones clínicas asociadas (11,13,14). Sin embargo, es una condición obligada para el desarrollo de la EHGNA que se caracteriza por un depósito de lípidos en el citoplasma del hepatocito en forma de vacuolas lipídicas de tipo microvesicular (Fig. 1A) o macrovesicular (Fig. 1B) (7,15,16). Este último, en el que una gran vacuola grasa desplaza al núcleo hacia la periferia celular (6), es el tipo de esteatosis que con mayor frecuencia se encuentra en individuos con EHGNA (3,7). Los cuerpos lipídicos no son almacenes estáticos de grasa, sino que tienen un metabolismo muy activo y una composición en lípidos similar a la de una lipoproteína: un núcleo formado por lípidos hidrofóbicos, principalmente triglicéridos (15,17,18) y colesterol esterificado, y una monocapa de lípidos polares, fosfolípidos y colesterol libre, a la cual se asocian una serie de proteínas constitutivas y facultativas (6,19-21). La EHNA es una complicación necroinflamatoria de una esteatosis hepática crónica cuyas principales características histológicas son la esteatosis macrovesicular y los infiltrados inflamatorios de leucocitos polimorfonucleares y/o neutrófilos (Fig. 1C). También se pueden encontrar cuerpos de Mallory, núcleos glucogenados, degeneración hepatocitaria balonizante y aumento de la muerte celular (20,22,23). Esta inflamación crónica del hígado provoca el desarrollo de distintos grados de fibrosis, principalmente, en zonas perivenosas y perisinusoidales de la zona 3 del acino hepático (24), distorsionando la arquitectura hepática. En las etapas finales de EHGNA la fibrosis puede degenerar en cirrosis (25), y hepatocarcinoma (26,27).

La EHGNA se ha convertido en una de las causas más frecuentes de hepatopatía crónica y de función hepática alterada en países industrializados (11,13,18,28-30), donde se estima que entre un 10 y un 23% de la población adulta la presenta (3,29,31,32), siendo unas 3 veces más común que la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y unas

5-10 veces más que la hepatitis C. Aunque es difícil conocer la prevalencia real de la enfermedad, por la carencia de análisis seriados de biopsias hepáticas y de un diagnóstico histológico consensuado (33,34), el incremento de su prevalencia discurre paralelo al de otras enfermedades con las que se encuentra fuertemente asociada, como son la obesidad, la DMT2 y el síndrome metabólico (35-40). Estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia de una EHGNA entre individuos con estas patologías es mucho mayor que en la población general (35,39,41-49). Tal es así que hoy día se considera a la esteatosis la manifestación hepática del síndrome metabólico (37-40,50), definido este como la asociación de al menos 3 de las siguientes alteraciones: resistencia a la insulina, obesidad central, hipertensión arterial y dislipemias, sea hipertrigliceridemia o bajos niveles de colesterol en HDL (31,50).

Sólo un porcentaje de los individuos con esteatosis hepática evolucionan a formas más avanzadas de la enfermedad (51-53). Cerca del 53% de los individuos a los que se les diagnostica esteatosis simple mantiene una histología estable, mientras que un 43% evolucionan a esteatohepatitis (54,55), de los que entre un 7 y 16% desarrollan cirrosis (56), llegando a necesitar, en algunos casos, trasplante hepático (31,57,58). La teoría del doble impacto es la más aceptada entre la comunidad científica para explicar la individualidad en la respuesta y cómo, según avanza la enfermedad, se potencia la predisposición del individuo a una progresión de EHGNA (11,59,60) (Fig. 2). Esta teoría postula que un primer impacto provoca la acumulación de grasa en el hígado y esta situación hace al hepatocito más sensible a que un segundo impacto desarrolle una respuesta inflamatoria conducente a esteatohepatitis (51,61). La investigación actual apunta a que una combinación de agentes medioambientales, genéticos y metabólicos provocan el establecimiento y el avance de la enfermedad (2). La resistencia a la insulina se considera el factor fisiopatológico individual más importante en el desarrollo de la esteatosis (62-64). De no adaptarse a él, el hepatocito se vuelve disfuncional pudiendo producirse muerte celular por necrosis y apoptosis y el subsiguiente fallo hepático (59,60). Si se adapta, el hepatocito preserva su viabilidad funcional pero se vuelve más vulnerable ante aquellos estímulos que desencadenan una respuesta inflamatoria. De la intensidad y duración en el tiempo de estos estímulos va a depender el grado de la respuesta inflamatoria y de muerte celular (51). En este segundo impacto pueden verse implicados factores autocrinos, paracrinicos y endocrinos capaces de desencadenar estrés oxidativo, peroxidación lipídica (64), producción anormal de citocinas, o de inducir disfunción mitocondrial y desórdenes en el metabolismo de ácidos grasos (60). La inflamación crónica del tejido hepático puede provocar, además, un aumento de la concentración de mediadores proinflamatorios, que activan de forma paracrina la fibrogénesis en las células estrelladas (12,34).

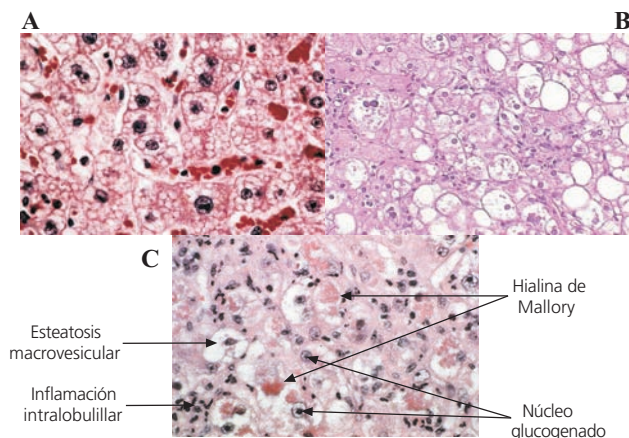


Fig. 1. Imágenes histológicas representativas de esteatosis hepática (A) microvesicular y (B) macrovesicular y (C) de esteatohepatitis. En (C) se señalan las principales características histológicas.

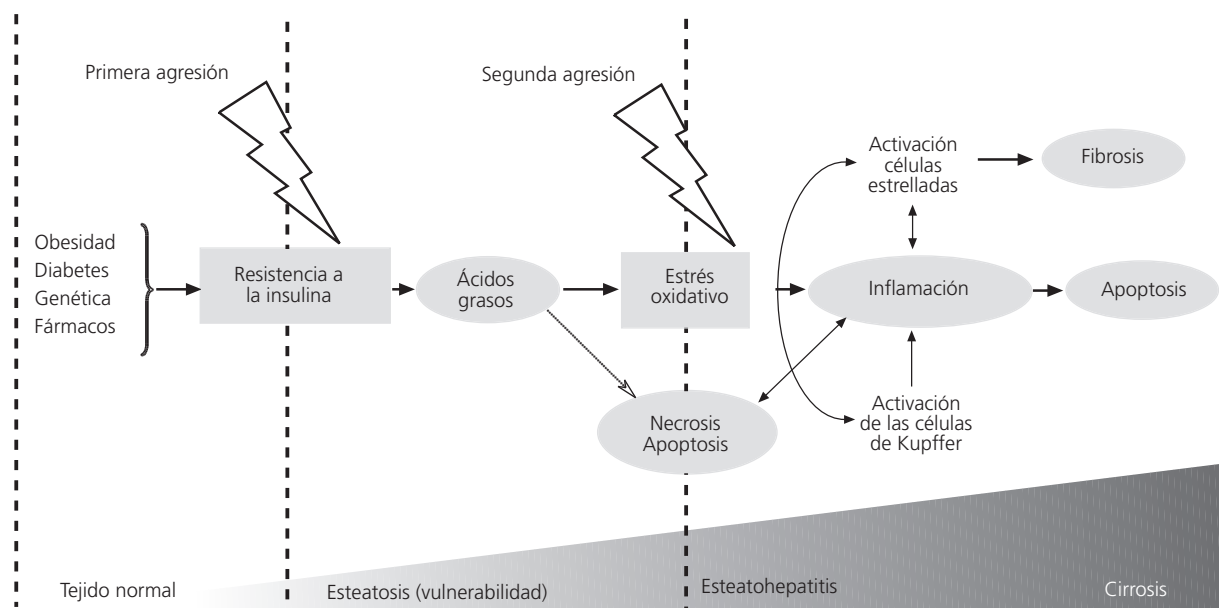


Fig. 2. Teoría del "doble impacto" en el progreso de EHGNA.

PATOGENIA

El hecho de que la esteatosis hepática sea una situación reversible mientras que la esteatohepatitis no lo sea (65) convierte a este tránsito en un punto sin retorno para el progreso de la enfermedad. Es, por tanto, importante conocer cuáles son los mecanismos implicados en la instauración del hígado graso y cuáles son los procesos y agentes defensivos que se ven afectados por la acumulación grasa que hacen al hepatocito vulnerable. Estudios epidemiológicos revelan que entre el 30 y el 97% de los individuos con EHGNA son obesos (49) y, viceversa, el 60-90% de los pacientes con obesidad mórbida presentan alguna de las características histológicas de la EHGNA (66). Un estudio encuentra que un 80% de los individuos obesos presentan hígado graso, un 33% inflamación portal, un 24% fibrosis y un 3% cirrosis (16). En este trabajo se revisan las bases moleculares de la EHGNA en la obesidad y, dada la escasez de estudios en pacientes, buena parte del conocimiento procede de estudios en animales con obesidad, de origen dietético o genético. En este último caso, los modelos más habituales son los que presentan una disfunción del sistema hipotalámico regulador del apetito, ya sea por deficiencia de la leptina (ratón *ob/ob*) o de su receptor (rata *falfa*) (67,68). También se presentarán algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio en la rata *falfa*, que además del fenotipo de obesidad con una esteatosis hepática que no progresa espontáneamente a EHGNA, presenta varias de las manifestaciones clínicas asociadas, como la resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia y la colestasis (69-71).

La resistencia periférica a la insulina en la base de la esteatosis hepática asociada a la obesidad

La resistencia a la insulina –un desajuste en la capacidad de la insulina para regular el metabolismo de glucosa y lípidos– es un defecto temprano y crucial asociado con la obesidad y la DM2 (72-74), así como con otros desórdenes del metabolismo (36-40). La etiología de la resistencia a la insulina no se conoce completamente, pero está demostrado que hay una fuerte asociación entre resistencia a la insulina y un excesivo acúmulo de lípidos ectópicos, fuera del tejido adiposo, particularmente en la musculatura y en el hígado (73,75,76).

En una situación postprandial, con una carga energética celular y glucemia elevadas, domina la acción de la insulina. En el tejido adiposo, la insulina frena la lipólisis de los triglicéridos almacenados al provocar la inactivación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) (77), aumenta la entrada de glucosa y su oxidación glucolítica –que proporciona glicerol-3-fosfato, el esqueleto de 3 carbonos necesario para la síntesis del triglicérido–, activa a la lipoproteína lipasa (LPL) (77) del endotelio vascular –que rompe los triglicéridos de los quilomicrones (QM) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) liberando los ácidos grasos que entran por difusión al adipocito–. En el músculo esquelético y cardíaco, la insulina incrementa la entrada de glucosa al hacerlo la expresión de los transportadores GLUT4 en la membrana plasmática (7), activándose también su oxidación mediante la glucólisis y su almacenamiento en forma de glucógeno, al tiempo que se frenan la β -oxidación de ácidos grasos y la glucogenólisis. En esen-

cia, la insulina es un paradigma de hormona anabolizante en estos tejidos y, por diversas vías, aumenta el contenido de grasa y la masa del tejido adiposo y el almacén de glucosa y ácidos grasos en el tejido muscular, a costa de reducir la glucemia y la lipemia postprandial. Por el contrario, ante una hipoglucemia, el glucagón trata de contrarrestar la baja carga energética y revierte los efectos anteriormente citados, poniendo en marcha los procesos que movilizan las reservas energéticas al tiempo que promueve la utilización de ácidos grasos por los tejidos en detrimento de la glucosa. El glucagón vía proteína quinasa A (PKA) activa la HSL en el tejido adiposo (77), generando cantidades significativas de glicerol, que será utilizado por el hígado para la síntesis de glucosa, y de ácidos grasos libres (AGL), que servirán de combustibles para la mayoría de tejidos. A nivel molecular, la baja carga energética de las células activa al sensor energético por excelencia, la proteína quinasa activada por AMP o AMPK (78), quien inactiva la lipogénesis.

La insulina actúa poniendo en marcha rutas de señalización específicas (Fig. 3). Su unión provoca la fosforila-

ción cruzada en residuos de tirosina de las cadenas del interior celular de su receptor que actúan como puntos de anclaje para sustratos del receptor de la insulina tales como IRS-1 e IRS-2 o para Grb-2. Desde las proteínas IRS, la señal se transmite a través de una serie de moléculas ancladas a la membrana (como la fosfoinosítido-3-quinasa PI₃K) a una proteína quinasa que finalmente deja la membrana. La Akt es la quinasa que se mueve a través de la célula para fosforilar dianas que incluyen componentes que controlan el tráfico del receptor de glucosa GLUT4 así como enzimas que regulan la síntesis de glucógeno y de proteínas y otros procesos metabólicos. Desde Grb-2, la señal se transmite a través de una serie de proteínas G de pequeño tamaño a la proteína quinasa activada por mitógeno MAPK, que, actuando sobre factores de transcripción, media procesos de proliferación y crecimiento celular (7).

El tejido adiposo es una fuente importante de señales moleculares que van a regular la acción de la insulina (49); a destacar el TNF- α (12,49), la IL-6 (79), la resistina (80), los ácidos grasos (11), la leptina (81), la adiponectina (81) y

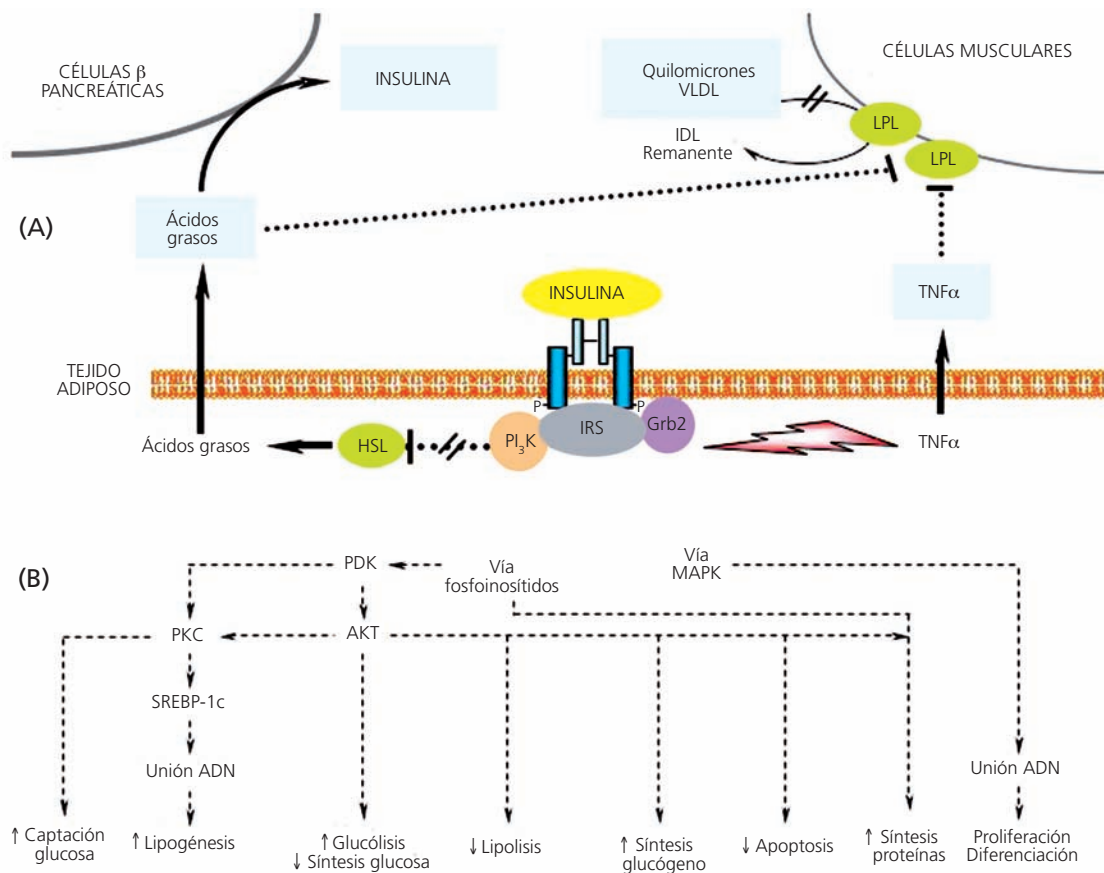


Fig. 3. Resistencia periférica a la insulina provocada por TNF- α . (B) Principales acciones de la insulina. (A) La unión de la insulina a su receptor frena a la lipasa sensible a hormonas (HSL) y detiene la lipólisis en el tejido adiposo. El TNF- α impide la fosforilación de residuos de tirosina del receptor de insulina, el reclutamiento de sustratos IRS y la acción antilipolítica de la insulina; al liberarse ácidos grasos al torrente sanguíneo en periodos postprandiales, aumenta la secreción de insulina por las células β pancreáticas y se bloquea la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) en músculo y tejido adiposo, causando hipertrigliceridemia asociada a quilomicrones y VLDL. SREBP, proteína de unión a elementos regulados por esteroides; PDK, proteína quinasa dependiente de PIP₃; PKC, proteína quinasa C; AKT, proteína quinasa B; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno.

el inhibidor del activador del plasminógeno (80). Numerosas evidencias señalan que el TNF- α , la IL-6 en menor medida (82), es la adipocitocina responsable del desarrollo de la resistencia a la insulina al desajustar de alguna forma la fosforilación cruzada del receptor (12). Habida cuenta de la elevada producción de TNF- α en individuos obesos y que el tejido adiposo visceral tiene una producción de TNF- α mayor que el tejido adiposo subdérmico (12), cabe esperar mayor resistencia a la insulina y hepatoesteatosis en individuos con obesidad troncal (83). También se ha encontrado en pacientes con EHGNA un polimorfismo en el promotor del TNF- α asociado con resistencia a la insulina (84-86) y una mayor cantidad del transcrito de esta citocina en hígado y tejido adiposo (87).

En la resistencia periférica a la insulina, la insulina no es capaz de revertir la activación de HSL provocada por la hipoglucemia (88), liberándose AGL desde el tejido adiposo al torrente sanguíneo de forma desregulada (7) (Fig. 3A). Concentraciones séricas elevadas de ácidos grasos y glicerol de origen adiposo (12) se han observado en pacientes obesos en situación postprandial (8) o con EHGNA (16,48). Los AGL bloquean la señal intracelular de la insulina en el propio tejido adiposo (11), pero además estimulan junto con la hiperglucemia la secreción de insulina por las células β del páncreas (89) provocando hiperinsulinemia (7) y, si el páncreas se agota, DMT2. Es frecuente que pacientes con DMT2 presenten elevados niveles séricos de AGL (16), resistencia a la insulina e hiperinsulinemia causados por TNF- α (12).

Un nivel sérico de AGL elevado también puede afectar al metabolismo de lípidos en otros tejidos (16), como por ejemplo, evitando la activación de la LPL de músculo esquelético (16), lo que al impedir la metabolización de las lipoproteínas ricas en triglicéridos –QM y VLDL–, aumenta su tiempo de permanencia en la circulación y con ello los niveles de triglicéridos asociados. La hipertrigliceridemia es uno de los factores más comúnmente asociados a la resistencia periférica a la insulina y a EHGNA, que se puede agravar si además aumenta la producción hepática de VLDL, como se ha descrito en algunos casos (16).

El metabolismo energético en el hígado y la resistencia hepática a la insulina

La insulina es lipogénica y antigluconeogénica en el hepatocito. En una situación fisiológica, la insulina aumenta la entrada de glucosa, al activar su fosforilación a glucosa 6-fosfato, y su uso en el hepatocito, derivándola a la formación de glucógeno, primero, y a la oxidación por la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato, después (90). De esta manera la glucosa proporciona el acetyl-CoA y el NADPH necesarios para la síntesis *de novo* de los ácidos grasos (91) (Fig. 4). A ello se une una activación transcripcional (92) mediada por el SREBP-1c (93,94) de ciertos genes lipogénicos, ya que enzimas

como la ATP-citrato liasa, la acetyl-CoA carboxilasa, la ácido graso sintasa y las elongasas y estearil-CoA desaturasas implicadas en esta vía biosintética están regulados por este factor de transcripción (95,96). Por tanto, los hepatocitos presentarán concentraciones elevadas de los intermediarios lipogénicos, que a su vez frenarán coordinadamente la lipólisis, la β -oxidación, la glucogenólisis y la gluconeogénesis, entre otras rutas. Por citar un caso, el malonil-CoA –el primer metabolito producido en la lipogénesis– frena la entrada de los ácidos grasos a la matriz mitocondrial para su oxidación actuando sobre la proteína que los transporta, la carnitina palmitiltransferasa II (CPT-II).

En un individuo obeso con resistencia periférica a la insulina es de esperar una elevada concentración de AGL en el hepatocito (97), al encontrarse inducidas las tres principales fuentes de ácidos grasos, la dieta, el tejido adiposo y la síntesis *de novo* hepática (Fig. 4). Además de una activa lipogénesis y entrada de los AGL procedentes del tejido adiposo, es superior la entrada de los ácidos grasos que se generan en los sinusoides hepáticos por la acción de la lipasa hepática (HL) sobre los TG de remanentes de quilomicrones e IDL (98). La HL es un equivalente hepático a la LPL que se activa de forma crónica por una hiperinsulinemia (99,100). Como la acumulación de AGL es citotóxica, los hepatocitos los procesan incorporándolos en lípidos complejos y oxidándolos en mitocondrias y peroxisomas (β -oxidación) y en el retículo endoplasmático (ω -oxidación) (101,102). En ausencia de resistencia hepática a la insulina, la principal vía oxidativa de ácidos grasos (3), la mitocondrial, estará bloqueada –por el malonil-CoA– y habrá un flujo elevado de ácidos grasos hacia su incorporación en triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos. El destino de los lípidos complejos es específico del tipo celular en cuestión. En los hepatocitos, o bien se empaquetan en VLDL si la célula dispone de apolipoproteína B100 (apoB100) suficiente y se secretan al torrente sanguíneo; o se almacenan en el citoplasma celular en forma de vacuolas lipídicas, en donde sufren continuos ciclos de hidrólisis y resíntesis; o en el caso de los fosfolípidos, se secretan en la bilis junto con los ácidos biliares formados a partir de colesterol. En esencia, la esteatosis hepática se genera siempre que la formación de triglicéridos supere a su tasa de recambio y secreción en VLDL, lo cual no excluye que todos los procesos operen a ritmos frenéticos.

El ensamblaje de las VLDL tiene lugar en la ruta secretora del hepatocito. La apoB100 es la proteína estructural obligada y su síntesis es constitutiva (103); de modo que a medida que el polipéptido se sintetiza se trasloca al lumen del retículo endoplasmático (RE), secretándose solo la apoB100 que se lipida en grado suficiente (104). La MTP, proteína trasferidora de triglicéridos microsomal, es esencial para la formación de la lipoproteína al ser responsable de la adición progresiva de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol a la partícula naciente (105,106). El hígado secreta, por tanto, un espectro de partículas de VLDL con un grado de maduración, tamaño

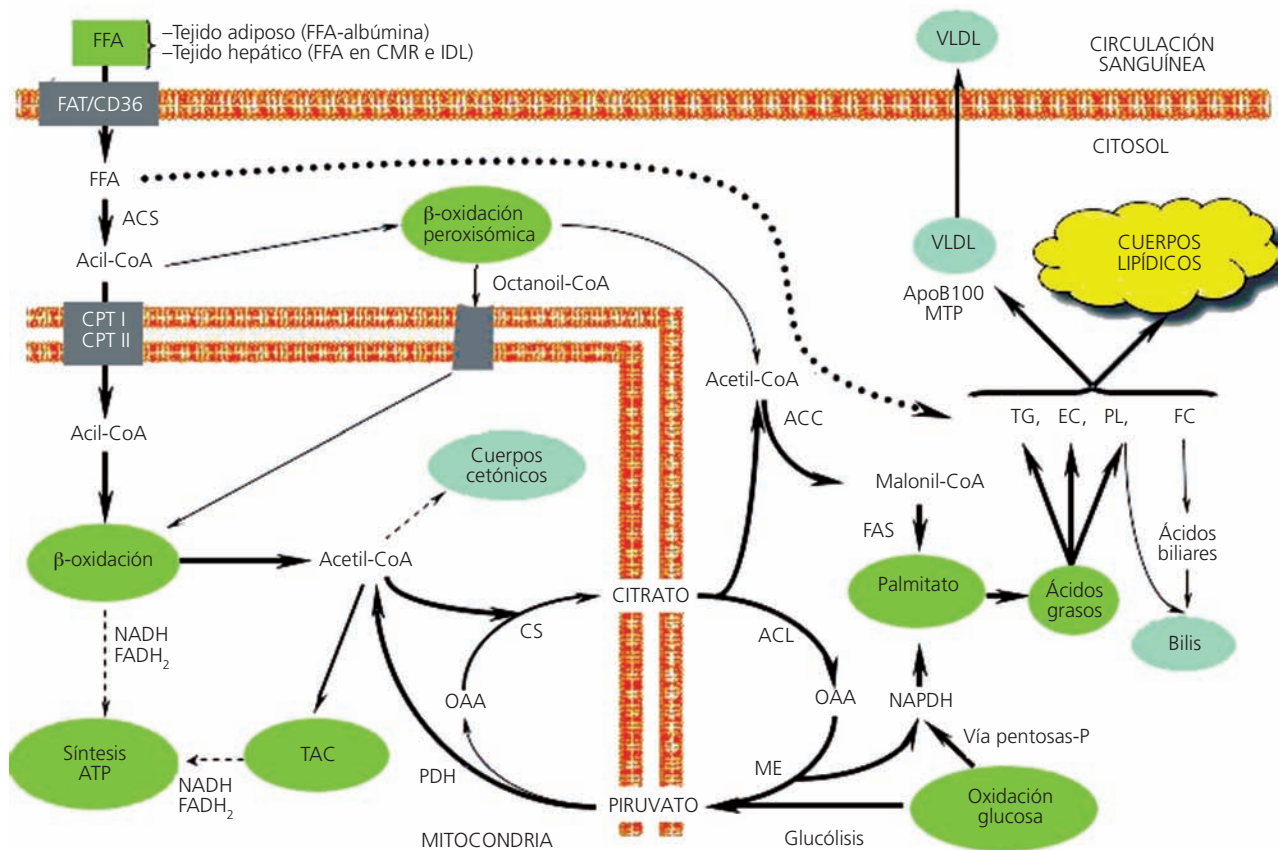


Fig. 4. Visión general del metabolismo de los ácidos grasos en hepatocitos en una situación de resistencia a la insulina. FFA: ácidos grasos; CMR: remanentes de quilomicrones; ACS: acil-CoA sintetasa; CPT: carnitina palmitiltransferasa; TAC: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; PDH: piruvato deshidrogenasa; OAA: oxalacetato; CS: citrato sintasa; PC: piruvato carboxilasa; ACL: ATP:citrato liasa; ME: enzima málico; ACC: acetil-CoA carboxilasa; FAS: ácido graso sintasa; TG: triglicéridos; EC: ésteres de colesterol; PL: fosfolípidos; FC: colesterol libre; MTP: proteína transferidora de triglicéridos microsomal; apoB100: apolipoproteína B100.

y contenido en triglicéridos muy variable. La producción de VLDL está regulada principalmente a nivel postraduccional mediante mecanismos que implican a la ubiquitina y al proteasoma, de modo que se degrada la apoB100 que no recluta un mínimo de lípidos. Se admite hoy día, que si la disponibilidad de lípido intracelular es elevada, aumenta la probabilidad de que una elevada proporción de apoB100 pueda alcanzar una forma de partícula competente para su secreción (107). A pesar de ello, sin embargo, y siendo la insulina una hormona lipogénica, su papel en la regulación de la producción de VLDL es controvertido. Se ha descrito que concentraciones elevadas de insulina promueven la degradación de apoB y una menor secreción de VLDL en cultivos primarios de hepatocitos humanos y murinos (108). En esta línea, también se ha registrado una menor secreción de VLDL-apoB100 en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (52). Sin embargo, otros estudios relacionan hiperinsulinemia y resistencia a la insulina con un aumento en la síntesis y secre-

ción de apoB100 (109,110). La medida en nuestro laboratorio de la producción de VLDL *in vivo* en ratas *falfa* con hepatoesteatosis corrobora esta última situación. Puede ayudar a conciliar esta aparente discrepancia recientes hallazgos que demuestran que el estrés del RE puede causar esteatosis y resistencia hepática a la insulina y que, recíprocamente, la esteatosis puede causar estrés del RE, cuyos efectos sobre la secreción de triglicéridos son opuestos según su grado (111). La exposición prolongada a oleato, sea del hígado o de células hepáticas McARH7777, produce estrés de RE y esteatosis; pero mientras que dosis bajas incrementan la secreción de apoB100, dosis elevadas la reducen al promover la proteólisis de la apoB100 como parte de la respuesta al excesivo estrés del RE inducido por el lípido, exacerbando aún más la esteatosis al limitar la secreción de triglicéridos. En el estrés de RE se ven implicados mecanismos de proteólisis dependientes e independientes del proteasoma (111).

Existen evidencias que apuntan a una resistencia hepática a la insulina en ciertas fases de una EHGNA, coexistiendo activa gluconeogénesis, β -oxidación de ácidos grasos y menor coeficiente respiratorio con niveles altos de insulina. Las adipocitocinas, los AGL y la hiperglucemia, además del mencionado estrés de RE, pueden contribuir al desarrollo de dicha resistencia hepática a insulina, al modular la respuesta a la insulina, el metabolismo de lípidos o la respuesta inflamatoria e inmune en el hígado (112-114). Al igual que en el tejido adiposo (93), el TNF- α es capaz de alterar la señalización intracelular de la insulina en el hígado y el perfil de expresión de otras citocinas que también distorsionan la señal de la hormona en el hepatocito (112,115). Los principales AGL en pacientes con EHNA son el palmítico (C16:0) y el oleico (C18:1) (116,117). Mientras que el segundo promueve la esteatosis, el palmítico, al igual que otros ácidos grasos saturados, favorece la lipoapoptosis del hepatocito mediada por JNK (*Jun N-terminal kinase*). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden provocar resistencia hepática a la insulina directa e indirectamente. Indirectamente, al modificar la composición y fluidez de las membranas plasmática y mitocondrial y, en consecuencia, la actividad de los receptores, el reclutamiento de proteínas asociadas y su sensibilidad a los reguladores (93,118). En este sentido, se han descrito modificaciones en la CPT vía AMPK (119), que la hacen resistente a los efectos inhibidores del malonil-CoA. Los PUFA también inhiben la actividad y expresión del SREBP-1c hepático (120) y compiten con la insulina por el control de la expresión de genes del metabolismo de glucosa y de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (118). Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, en cambio, no parecen actuar sobre SREBP-1c ni ejercer efecto alguno sobre la expresión de genes lipogénicos (121). Sin embargo, incluso en condiciones de resistencia hepática a la insulina severa, este factor de transcripción, que se activa por proteólisis inducida por deficiencia de esteroides, se mantiene activo, haciendo que siga funcionando la síntesis *de novo* de ácidos grasos, con una contribución de hasta el 50% del total del triglicérido en modelos animales (32).

Como modelo de obesidad con esteatosis que no progresa espontáneamente a esteatohepatitis, la rata *fa/fa* no presenta niveles séricos apreciables de TNF- α y, en contra de lo registrado en pacientes, es elevada la concentración de adiponectina, una hormona con efectos antiinflamatorios que mejora la sensibilidad del hígado a la insulina (122). Cabría esperar, por tanto, una respuesta normal del hígado a los elevados niveles de insulina circulante. Sin embargo, el análisis transcriptómico en hepatocitos aislados (Tabla I) revela una sobreexpresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos como la acil-CoA oxidasa peroxisomal, la acetil-CoA aciltransferasa, la enoil-CoA hidratasa, numerosos componentes de la cadena respiratoria y de la proteína desacoplante 2 (UCP-2), sugiriendo un cierto grado de resistencia hepática a la insulina y la puesta en marcha de mecanismos

compensatorios. Estos animales, con una notable hiperinsulinemia y niveles elevados de AGL séricos (123), sobreexpresión de genes del programa lipogénico y de genes formadores de lípidos complejos, tienen una exacerbada secreción de VLDL ricas en triglicéridos, reflejo de un estrés de RE moderado (111). Sus hepatocitos, con mayor expresión de la ácido graso translocasa CD36 en la membrana basolateral, es previsible que tengan una mayor entrada de ácidos grasos al citoplasma celular. El análisis transcriptómico, estadístico, y funcional de este modelo pone de manifiesto dos evidencias: a) que la esteatosis hepatocitaria se produce porque la entrada y síntesis endógena de AGL y lípidos complejos supera a la también incrementada capacidad del hepatocito para su manejo y secreción en forma de VLDL; y b) que en una esteatosis establecida hay alteración no sólo de procesos biológicos implicados en el metabolismo energético –todos activados–, sino de inmunidad y defensa –coagulación, detoxificación y respuesta al estrés, todos reprimidos–. También hay que destacar la paralela activación del ciclo celular, el metabolismo de ácidos nucleicos y de la transcripción y su regulación, mientras que se reduce la remodelación de la cromatina, sugiriendo qué factores epigenéticos también pueden tener un papel en la etiopatogenia de la esteatosis.

Al filo de la esteatohepatitis: una combinación de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

En un hepatocito con los procesos de oxidación activados, la β -oxidación mitocondrial es la principal ruta de oxidación de ácidos grasos (3). Los coenzimas reducidos FADH₂ y NADH, generados en el propio proceso y en la oxidación del acetil-CoA mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TAC), donan sus electrones a la cadena respiratoria, produciéndose ATP por la fosforilación del ADP mediada por la ATP sintasa (Fo y F1) impulsada por el retorno a la matriz de los protones que los complejos respiratorios habían bombeado al espacio intermembranal (Fig. 5). Sin embargo, las mitocondrias son también la principal fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS) (32). Es inevitable que un pequeño porcentaje de electrones reaccione directamente con el oxígeno molecular para dar aniones superóxido (O₂⁻), H₂O₂ y otros productos de ellos derivados, que se incluyen bajo el término ROS (Fig. 5). Los ROS producidos en este y otros procesos son neutralizados por sistemas enzimáticos, sobresaliendo la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, y por defensas celulares vitamínicas, principalmente, la vitamina E y la C. En pacientes con EHNA se ha encontrado disfunción mitocondrial, anomalías ultraestructurales (11,64), actividad reducida de los complejos de la cadena respiratoria (5,32), fosforilación oxidativa deficiente, una menor capacidad para sintetizar ATP, un descenso en la concentración de ATP intracelular (124) –lo que compromete la respuesta de la célula ante

Tabla I. Procesos biológicos significativamente alterados en la esteatosis hepatocelular en ratas obesas. Se muestra el análisis bioinformático, según PANTHER (129,130), incluyendo el significado estadístico de la diferencia entre el número de secuencias esperado para cada proceso según la distribución normal de la matriz RGU34A de Affymetrix y el obtenido experimentalmente

Proceso biológico	Secuencias analizadas	P-valor secuencias reprimidas	P-valor secuencias sobreexpresadas
<i>Metabolismo de lípidos, ácidos grasos y esteroides</i>	337	9,11E-04	5,42E-06
– Metabolismo de ácidos grasos	94	8,76E-03	2,97E-05
– Transporte de lípidos y ácidos grasos	39	2,87E-01	4,86E-02
– Unión a lípidos y ácidos grasos	13	1,06E-01	3,05E-02
– Metabolismo de esteroides	130	1,43E-05	2,87E-01
Metabolismo de colesterol	33	2,49E-01	1,51E-01
Metabolismo de hormonas esteroideas	41	4,41E-04	4,24E-01
<i>Metabolismo de carbohidratos</i>	226	1,16E-01	3,14E-08
– Glucolisis	28	7,85E-01	3,23E-04
– Ruta de las pentosas fosfato	2	9,83E-01	8,37E-04
– Ciclo del ácido tricarbóxico	12	9,02E-01	2,63E-02
– Otros metabolismos de carbohidratos	14	8,86E-01	3,49E-02
– Metabolismo de monosacáridos	23	8,20E-01	1,44E-03
<i>Metabolismo de nucleótidos, nucleósidos y ácidos nucleicos</i>	694	3,15E-01	2,73E-04
– Transcripción de mRNA	373	2,18E-01	2,98E-03
Regulación de la transcripción de mRNA	296	1,10E-01	1,33E-02
– Empaquetamiento y remodelación de la cromatina	46	5,00E-02	3,82E-01
<i>Metabolismo de coenzimas y grupos prostéticos</i>	72	1,45E-01	1,27E-03
– Metabolismo de coenzimas	23	1,80E-01	1,26E-02
<i>Metabolismo aminoácidos</i>	96	5,95E-01	6,60E-03
<i>Otros metabolismos</i>	160	6,13E-02	3,35E-03
– Otros metabolismos del carbono	30	2,29E-01	4,41E-04
<i>Transporte de electrones</i>	132	2,08E-04	3,04E-03
– Fosforilación oxidativa	33	7,51E-01	5,20E-03
<i>Transporte</i>	530	5,58E-01	2,36E-02
– Exportación e importación extracelular	39	4,48E-02	4,43E-01
– Transporte iones	291	2,76E-01	1,46E-02
Transporte de cationes	231	1,30E-01	4,41E-02
<i>Transducción de señales</i>	1236	4,81E-03	9,88E-04
– Transducción de señales mediada por receptores de superficie celular	612	2,55E-02	5,12E-02
– Comunicación celular	471	2,15E-01	2,77E-02
<i>Inmunidad y defensa</i>	514	4,52E-02	1,72E-01
– Coagulación sanguínea	39	4,48E-02	4,43E-01
– Destoxificación	41	4,90E-02	5,76E-01
– Respuesta a estrés	96	9,41E-03	4,04E-01
<i>Ciclo celular</i>	280	4,88E-01	1,18E-02
<i>Procesos de desarrollo</i>	677	3,91E-02	2,51E-02
<i>Oncogénesis</i>	135	3,59E-01	1,90E-02
– Oncogenes	35	3,69E-02	4,81E-01

cualquier tipo de daño celular (34)– y daño en el DNA mitocondrial (7). Las anomalías ultraestructurales no se han observado en pacientes con esteatosis simple (7). De forma simplista, se puede considerar que las causas de una menor capacidad de producir ATP son dos: a) la inte-

rrupción o bloqueo de la cadena respiratoria en cualquier punto, lo que provoca una reducción en el transporte de electrones de todos los complejos anteriores, que se verán forzados a donar los electrones a la molécula de oxígeno; y b) la disipación del gradiente de protones a ambos lados

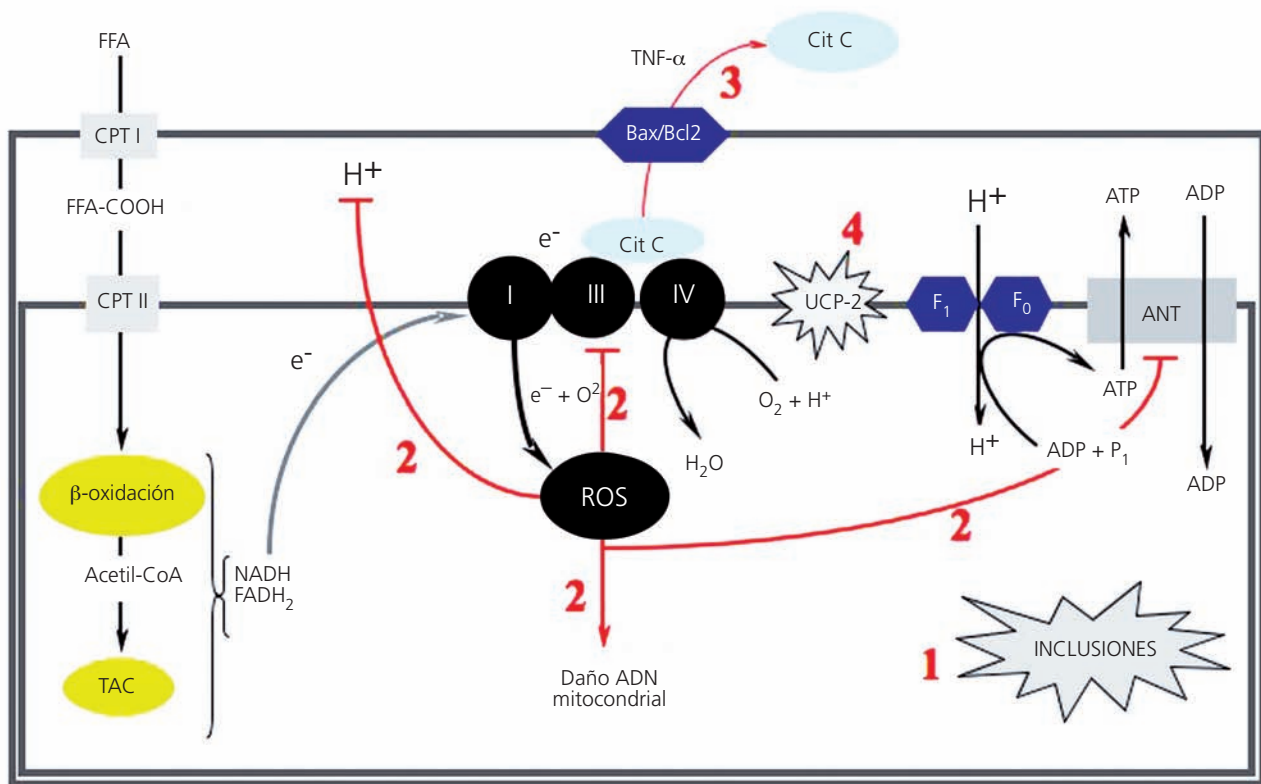


Fig. 5. *Disfunción mitocondrial en la esteatosis.* En la esteatosis, un transporte de electrones mitocondrial defectuoso produce una elevada génesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y baja de ATP. La incorporación de protones a la matriz mitocondrial por exceso de ácidos grasos (FFA), ROS y proteína desacoplante UCP-2 (4) "puntea" a la ATP sintasa (Fo y F1), decayendo el potencial electroquímico de membrana y la síntesis de ATP. Los ROS dañan además los complejos de la cadena respiratoria, la proteína transportadora de nucleótidos de adenina ANT y el DNA mitocondrial (2). La formación de poros por Bax/Bcl2 permite la salida del citocromo c (Cyt c) (3). Todo ello ocasiona el deterioro de la cadena respiratoria y la generación de más ROS, en un ciclo de autopropagación, y una reducida producción de ATP. CPT: carnitina palmitiltransferasa; TAC: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

de la membrana mitocondrial interna que impulsa a la ATP sintasa. Al igual que otros tipos celulares, los hepatocitos pueden desarrollar mecanismos adaptativos para mantener un flujo de electrones similar al de un tejido normal. Unos mecanismos implican el aumento del tamaño de las mitocondrias y de las crestas mitocondriales, lo que conlleva un aumento en la síntesis de las proteínas de los complejos respiratorios y en la disponibilidad de la coenzima Q, mientras que otros implican la activación del proceso de biogénesis mitocondrial (124).

En un hepatocito esteatótico con mitocondrias disfuncionales, una parte sustancial de los ácidos grasos se procesarán por los sistemas oxidativos peroxisomal y microsomal. Los peroxisomas realizan varios ciclos de la β-oxidación para acortar (Fig. 4) la longitud de ácidos grasos de cadena larga y muy larga, ácidos dicarboxílicos de cadena larga, eicosanoides y ésteres de CoA de intermediarios de los ácidos biliares, produciendo acetil-CoA y H₂O₂ (101,102,125). La oxidación microsomal está controlada por el sistema de citocromos P450, más concretamente por CYP2E1 y miembros de la familia de los CYP4A (126). En la acción de estos citocromos también

se reduce el oxígeno molecular (12) produciendo ROS (127). CYP2E1 parece ser la principal fuente microsomal de H₂O₂ y de peroxidación lipídica (126) y, además, presenta mayor expresión y/o actividad en individuos obesos, con grasa central, con DMT2 o hiperlipidémicos (126), en situaciones de resistencia a la insulina y también en pacientes y modelos animales de EHNA (2); todas ellas situaciones en las que coexiste estrés oxidativo y daño mitocondrial. Además, CYP2E1 muestra una mayor expresión en la zona 3 o perivenosa del acino hepático, que es la zona con mayor daño hepatocelular en la esteatohepatitis (126). Existen indicios que señalan a una complementariedad y/o redundancia en la función de CYP2E1 y CYP4A en la oxidación de lípidos, ya que en ratas *falfo* y ratones *ob/ob* se observa un descenso en la expresión de CYP2E1 y un aumento de CYP4A compensatorio (126).

Inherente a la activación de los sistemas celulares para la oxidación de ácidos grasos es, por tanto, la producción de ROS. También la oxidación masiva de glucosa que acontece en la diabetes mellitus es una fuente importante de ROS. Se trata de sustancias de vida media corta, que

ejercen un efecto local (32), pero que pueden provocar una situación de estrés oxidativo en la célula si los sistemas defensivos celulares no los contrarrestan adecuadamente. Se ha descrito daño oxidativo causado por ROS en pacientes con esteatosis, EHNA o esteatohepatitis alcohólica y en modelos animales de EHNA (126). Los ROS pueden provocar una multitud de efectos, como son el aumento de la síntesis de TNF- α —que, a su vez, puede causar resistencia a la insulina, necrosis y apoptosis—, el agotamiento de sustancias antioxidantes naturales y de ATP y NAD⁺, daño al DNA, alteración de la estabilidad de proteínas, distorsión de membranas y secreción de citocinas proinflamatorias (32).

Un efecto de ROS importante es la peroxidación de lípidos (124), que se evidencia sobre todo en PUFA. La peroxidación lipídica genera como productos finales aldehídos reactivos (12), compuestos de vida media superior a la de ROS que tienen facilidad para difundir a través de las membranas celulares, pudiendo alcanzar dianas extracelulares y extender al tejido los efectos del daño oxidativo. La peroxidación lipídica parece desempeñar un papel crucial en el daño hepatocelular que ocurre en la EHNA (11). Existe una fuerte asociación entre la severidad de la esteatosis y el riesgo de desarrollo de EHNA (60) correlacionada con el grado de peroxidación lipídica. El hecho no es sorprendente, la gran cantidad de lípidos almacenados en un hepatocito esteatótico, además de ser una fuente de ROS a través de los sistemas oxidativos, son un sustrato idóneo para la generación de aldehídos reactivos (12). Estos productos tienen capacidad para bloquear la síntesis de nucleótidos y proteínas y aumentar el factor de crecimiento tumoral β 1, que promueve la formación de cuerpos de Mallory (124). Además, resultan ser potentes quimioatrayentes de células inflamatorias y activadores de células estrelladas (2), pudiendo perpetuar la respuesta inflamatoria al activar la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (12) y de moléculas de adhesión como ICAM-I, E-selectina y P-selectina (2). Todos estos fenómenos pueden producir muerte celular por apoptosis y necrosis, inflamación y fibrosis, todas ellas huellas histológicas de EHNA. El conjunto de evidencias es tal que se percibe indiscutible la afirmación que el daño oxidativo masivo causado por aldehídos reactivos está en la base del tránsito a esteatohepatitis. El mecanismo por el cual el estrés oxidativo genera daño celular parece ser la activación crónica de NF- κ B, que también es activado por factores de crecimiento, óxido nítrico y ciertas citocinas.

Esta situación va a entrar, además, en un ciclo autopercutante en el que difícilmente se puede encontrar un resquicio para la mejora. En la mitocondria, los aldehídos reactivos pueden interactuar con fosfolípidos de la membrana, con proteínas como el transportador de nucleótidos de adenina ANT (124)—que exporta el ATP recién sintetizado—, y con los complejos de la cadena respiratoria a los que cambian sus propiedades, comprometiendo el transporte de electrones y el bombeo de protones al espacio intermembranal (Fig. 5). Una consecuencia del blo-

queo de la β -oxidación mitocondrial es el procesamiento de una proporción superior de ácidos grasos en los microsomas, cuyos productos, los ácidos dicarboxílicos, agravan el daño mitocondrial (32). La incorporación de protones a la matriz mitocondrial promovida por los propios ácidos grasos y por el exceso de ROS y de UCP-2 puentea a la ATP sintasa, decayendo la fuerza impulsora que promueve la síntesis de ATP y, por tanto, tanto su síntesis como su posterior exportación vía ANT, se ven comprometidas. Un transporte de electrones defectuoso exagera la producción de ROS que va a incentivar la peroxidación lipídica y la disfunción mitocondrial. La paradoja en el metabolismo orgánico de un individuo diabético se reproduce en la mitocondria dañada por ROS. La eficiencia energética, y el cociente respiratorio, que se obtiene de la oxidación mitocondrial de los abundantes nutrientes es baja y el hepatocito percibe de continuo señales de hambre que llegan a saturar el sistema.

Para no incurrir en un estrés oxidativo, la célula debe compensar la producción de agentes oxidantes con una mayor expresión de genes implicados en la defensa antioxidante, aumentando los niveles de glutatión reducido debido a la mayor actividad γ -glutamilcisteína sintetasa y a la sobreexpresión de glutatión S-transferasa y catalasa (126). Las defensas vitamínicas pueden llegar a deplecionarse. En una situación de estrés oxidativo crónico, como en el hígado graso y otras condiciones asociadas a EHNA, se han encontrado niveles reducidos de antioxidantes vitamínicos como el α -tocoferol y el β -caroteno debido al agotamiento de los mismos (12). Las lipoproteínas juegan un papel crítico en la distribución de vitaminas antioxidantes entre tejidos. En el caso de los hepatocitos de la rata *falfa*, se ha encontrado reprimida la expresión de numerosos genes implicados en la detoxificación y la respuesta al estrés, incluyendo los de la catalasa, sulfotransferasas, carboxilesterasas, glutamina sintasa—elimina el amonio— y una gran variedad de miembros de la familia de los citocromos P450 con actividad monooxigenasa. En esta situación, aunque no hay daño celular aparente ni respuesta inmune en el tejido, cualquier estímulo, como el cambio a una dieta rica en grasa (128), actúa como un segundo impacto desencadenando la esteatohepatitis.

Otros factores, como endotoxinas, isquemia-reperfusión, tratamiento agudo con etanol o el hierro potencian la situación de estrés oxidativo. Un 40% de los pacientes con EHNA presentan un leve depósito de hierro en las células, un metal que cataliza la formación de ROS, además de activar las células de Kupffer y la producción de NF- κ B, por lo que pacientes con mayor cantidad de hierro intracelular tienen un mayor riesgo de desarrollar fibrosis (12). Por su parte, el etanol provoca el aumento de ROS de dos formas, como resultado de su metabolismo aumenta la proporción NADH:NAD⁺ y con ello el paso de Fe³⁺ a Fe²⁺, que a su vez provoca la formación directa e indirecta de ROS, al activar a CYP2E1. Existen formas secundarias de EHNA producidas por fármacos, *bypass*

ayunoileal o nutrición parenteral total, en los que la esteatohepatitis es más severa y presenta implicaciones clínicas más graves (124). La tabla II recoge algunas de las causas más importantes de desarrollo de EHNA y los principales factores que contribuyen al avance de la enfermedad (34). Todo parece indicar que se trata de una combinación multifactorial, con la generación de especies de oxígeno reactivas y productos de peroxidación lipídica en su eje central. Sin embargo, la variabilidad entre individuos en el desarrollo de EHNA hace sospechar de la existencia de factores genéticos, como ciertos polimorfismos descritos CYP2E1 y TNF- α (2), epigenéticos y/o ambientales que predisponen al individuo para el desarrollo de la enfermedad.

Tabla II. Factores implicados en el desarrollo de la esteatohepatitis. Basado en Harrison y cols. (34)

	Factor
<i>1º impacto</i>	
Esteatosis hepatocitaria	↑ Insulina circulante, ↑ lipólisis adiposa, ↑ síntesis de ácidos grasos, ↓ β -oxidación mitocondrial
<i>2º impacto</i>	
Genotipo susceptible	Alteraciones en PPAR α , polimorfismos en CYP2E1/CYP3A4
Estrés oxidativo	↑ Peroxidación lipídica, ↑ CYP2E1
Agotamiento de antioxidantes esenciales	↑ Peroxidación lipídica, ↑ producción de VLDL
Disfunción mitocondrial	Baja capacidad de síntesis de ATP, ↑ UCP-2, ↑ estrés oxidativo y ↑ AGL
Adaptaciones hepatocitarias para la supervivencia	Descenso de los sistemas de defensa, bloqueo de la capacidad regenerativa
Regulación positiva de citocinas	Activación de TNF- α , IKK- β y NF- κ B
Disfunción de las células de Kupffer	Sensibilidad a endotoxinas, ↓ capacidad fagocítica, perfiles de producción de citocinas anómalos, ↑ fibrinogénesis
Fibrogénesis	Citocinas y factores de crecimiento fibrogénicos en las células estrelladas

BIBLIOGRAFÍA

- Adams LA, Lymp JF, St SJ, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-21.
- García MC. Non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 395-402.
- Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G852-G858.
- Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, et al. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 641-9.
- Solís Herruzo JA, García R, I, Pérez CM, Muñoz Yague MT. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 844-74.
- Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 193-9.
- Haque M, Sanyal AJ. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 709-31.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.
- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-5.
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-9.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
- Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 493-505.
- Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 184-95.
- Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol* 2003; 38: 681-7.
- Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15: 246-58.
- Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2000; 32: 3-10.
- Adams LA, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J* 2006; 82: 315-22.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-95.
- American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1702-4.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
- Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-25.
- Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-62.
- Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 398-403.
- Contos MJ, Sanyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 37-51.
- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-9.
- Ratzliff V, Bonyhay L, Di M, V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1485-93.
- Yang S, Lin HZ, Hwang J, Chacko VP, Diehl AM. Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? *Cancer Res* 2001; 61: 5016-23.
- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 112-7.

29. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 1649-57.
30. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 521-6.
31. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-31.
32. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-52.
33. Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic JL, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4539-50.
34. Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2714-24.
35. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-9.
36. Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 124-38.
37. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112.
38. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-50.
39. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-23.
40. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 437-43.
41. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62.
42. Del GA, Boschi L, Del Gaudio GA, Mastrangelo L, Munari D. Liver damage in obese patients. *Obes Surg* 2002; 12: 802-4.
43. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121: 91-100.
44. Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Bajjal R, Kulshrestha P, Pramanik S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 854-8.
45. Kim HJ, Kim HJ, Lee KE, Kim DJ, Kim SK, Ahn CW, et al. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2169-75.
46. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour AA, et al. Probucol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol* 2003; 38: 414-8.
47. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37: 1286-92.
48. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-10.
49. Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 733-47.
50. Reaven G. Syndrome X: 10 years after. *Drugs* 1999; 58 (Supl. 1): 19-20.
51. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-5.
52. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
53. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714-9.
54. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-9.
55. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20: 594-8.
56. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118: 1117-23.
57. Kim WR, Poterucha JJ, Porayko MK, Dickson ER, Steers JL, Wiesner RH. Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 1802-5.
58. Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2957-61.
59. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41.
60. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999; 353: 1634-6.
61. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2557-62.
62. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 898-904.
63. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35: 367-72.
64. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-92.
65. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-45.
66. García-Monzón C, Martín-Pérez E, Iacono OL, Fernández-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000; 33: 716-24.
67. Meister B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 2000; 59: 265-304.
68. Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* 1997; 46: 1077-80.
69. den BM, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 644-9.
70. Lanne B, Dahllof B, Lindahl C, Ebefors K, Kanmert I, von BH, et al. PPARalpha and PPARgamma regulation of liver and adipose proteins in obese and dyslipidemic rodents. *J Proteome Res* 2006; 5: 1850-9.
71. Pizarro M, Balasubramanian N, Solis N, Solar A, Duarte I, Miquel JF, et al. Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function. *Gut* 2004; 53: 1837-43.
72. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 217S-22S.
73. Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol* 2004; 22: 289-95.
74. Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol* 2007; 157 (Supl. 1): S39-S45.
75. Blaak EE. Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 391-403.
76. Noto A, Zahradska P, Yurkova N, Xie X, Nitschmann E, Ogborn M, et al. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. *Lipids* 2006; 41: 179-88.
77. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G1-G4.

78. Hardie DG. New roles for the LKB1-->AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 167-73.
79. Bulcao C, Ferreira SR, Giuffrida FM, Ribeiro-Filho FF. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2: 19-28.
80. Ahima RS, Osei SY. Adipokines in obesity. *Front Horm Res* 2008; 36: 182-97.
81. Soodini GR. Adiponectin and leptin in relation to insulin sensitivity. *Metab Syndr Relat Disord* 2004; 2: 114-23.
82. Wiecekowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103 (6): 1372-9.
83. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001; 294: 2166-70.
84. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W.--to: Skoog T, et al. (2001) Tumour necrosis factor-alpha(TNF-alpha) polymorphisms -857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. *Diabetologia* 44: 654-5. *Diabetologia* 2002; 45: 149-50.
85. Skoog T, Eriksson P, Hoffstedt J, Ryden M, Hamsten A, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) polymorphisms-857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. *Diabetologia* 2001; 44: 654-5.
86. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 274-80.
87. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-63.
88. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 473-81.
89. Eto K, Yamashita T, Matsui J, Terauchi Y, Noda M, Kadowaki T. Genetic manipulations of fatty acid metabolism in beta-cells are associated with dysregulated insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51 (Supl. 3): S414-S420.
90. Graham TE, Kahn BB. Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2007; 39: 717-21.
91. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 223-7.
92. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12027-32.
93. Leclercq IA, da Silva MA, Schroyen B, Van HN, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol* 2007; 47: 142-56.
94. Teng B, Burant CF, Davidson NO. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 1993; 260: 1816-9.
95. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 103-13.
96. Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 1998; 273: 35299-306.
97. Roden M. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes--pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 335-48.
98. Shuldiner AR, Hoppman N, Pollin TI. Hepatic lipase genotype, diabetes risk, and implications for preventative medicine. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2015-8.
99. Deeb SS, Zambon A, Carr MC, Ayyobi AF, Brunzell JD. Hepatic lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet. *J Lipid Res* 2003; 44: 1279-86.
100. Perret B, Mabille L, Martinez L, Terce F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res* 2002; 43: 1163-9.
101. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* 2000; 32 Spring: 73-87.
102. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 193-230.
103. Pullinger CR, North JD, Teng BB, Rifichi VA, Ronhild de Brito AE, Scott J. The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J Lipid Res* 1989; 30: 1065-77.
104. Davidson NO, Shelness GS. Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 169-93.
105. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2003; 44: 22-32.
106. Liang J, Ginsberg HN. Microsomal triglyceride transfer protein binding and lipid transfer activities are independent of each other, but both are required for secretion of apolipoprotein B lipoproteins from liver cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 28606-12.
107. Fischer A, Kuemmel M, Jarn M, Linden M, Boissiere C, Nicole L, et al. Surface nanopatterning by organic/inorganic self-assembly and selective local functionalization. *Small* 2006; 2: 569-74.
108. Sparks JD, Sparks CE. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215: 9-32.
109. Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Lewis GF. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 170-6.
110. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 1-19.
111. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008; 118: 316-32.
112. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 2004; 30: 13-9.
113. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-7.
114. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* 2000; 130: 3110S-5S.
115. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniari LG, Furlanetto RW, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 13740-6.
116. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106: 635-43.
117. Pust T, Wild N, Vennegeerts T, Wimmer R, Goke B, Brand S, et al. Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 441-5.
118. Clarke SD. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G865-G869.
119. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 1-17.
120. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* 1999; 274: 23577-83.
121. Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 4365-72.
122. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K.

- Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-92.
123. Berk PD, Zhou SL, Kiang CL, Stump D, Bradbury M, Isola LM. Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1997; 272: 8830-5.
124. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G193-G199.
125. Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CW, et al. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 250-67.
126. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1135-G1139.
127. Tocher DR, Leaver MJ, Hodgson PA. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res* 1998; 37: 73-117.
128. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 2005; 19: 136-8.
129. Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N, et al. PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 334-41.
130. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003; 13: 2129-41.