

# Patogenia de la hepatopatía grasa no alcohólica primaria

Diego Moreno Sánchez

Sección de Aparato Digestivo. Hospital General de Móstoles. Móstoles. Madrid. España.

Los retos de la creciente prevalencia e indudable tendencia a la progresividad lesional de la hepatopatía grasa no alcohólica primaria contrastan con el limitado conocimiento de su patogenia. Parece desarrollarse en 2 fases. En la primera, la hiperproducción de adipocinas, en el contexto de un proceso inflamatorio subclínico, conduce a resistencia a la insulina en el tejido adiposo. Ello lleva tanto a lipólisis, con aumento de ácidos grasos circulantes y su captación hepática, como a hiperinsulinemia. En el hepatocito la lipogénesis resultante, junto a la disminución de excreción de lipoproteínas, induce la acumulación grasa (esteatosis), que supone cierta agresión oxidativa pero que queda contrarrestada por la activación de proteínas desacoplantes mitocondriales y sistemas antioxidantes. En la segunda fase, la exacerbación del catabolismo graso por beta y omega oxidación promueve una hiperactividad de la cadena respiratoria, con sobreproducción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno que superan la capacidad antioxidante. Esos agentes conducirán a lesión hepatocelular y necrosis, inflamación y fibrosis (esteatohepatitis), merced a la inducción tanto del ligando Fas como de citocinas (factor de necrosis tumoral alfa, factor betatransformador del crecimiento e interleucina 8) y de peroxidación lipídica y sus subproductos (malondialdehído e hidroxinonenal). La implicación de otros factores (hierro hepático, disfunción de células de Kupffer o endotoxemia) es incierta.

*Palabras clave:* Hepatopatía grasa no alcohólica. Esteatohepatitis no alcohólica. Hígado graso. Síndrome metabólico. Resistencia a la insulina.

## Pathogenesis of primary nonalcoholic fatty liver disease

The challenges of growing prevalence and evident trend to progressive damage of primary nonalcoholic fatty liver disease confront a poorly understood pathogenesis. It appears to develop in two steps. First, a high adipocyte protein production in the context of a silent inflammatory background causes insulin resistance in adipose tissue. It leads both to lipolysis, with increase of the circulating and hepatic uptake of free fatty acids, and hyperinsulinemia. Within hepatocytes, the subsequent lipogenesis, together with a decreased secretion of lipoproteins, induces an accumulation of excessive hepatic triglycerides (steatosis), implying some oxidative damage, but it remain balanced by uncoupling protein upregulation and antioxidant systems activation. Second, a more forceful fat catabolism by beta and omega oxidation results in respiratory chain hyperactivity with overproduction of free radicals and reactive oxygen species that exceed the antioxidant capacity. These agents lead to hepatocellular injury and necrosis, inflammatory infiltration and fibrosis (steatohepatitis) through induction of Fas ligand and cytokines (tumor necrosis factor  $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$ , interleukin-8), and lipid peroxidation and by-products (malondialdehyde and 4-hydroxynonenal). Other mechanisms (hepatic iron, Kupffer cells dysfunction or endotoxemia) play uncertain roles.

*Key words:* Nonalcoholic fatty liver disease. Nonalcoholic steatohepatitis. Fatty liver. Metabolic syndrome. Insulin resistance.

En 1979 Adler y Schaffner<sup>1</sup> describieron con precisión todo el espectro histológico de la hepatopatía alcohólica en individuos obesos, y en 1980 Ludwig et al<sup>2</sup>, de la Clínica Mayo, informaron de una serie de pacientes obesos y/o diabéticos que no ingerían alcohol en exceso y presentaban una enfermedad hepática caracterizada por la presencia de esteatosis asociada a infiltración inflamatoria de predominio neutrofilico, lo que les llevó a acuñar el término de esteatohepatitis

no alcohólica (EHNA). En nuestro país, el primer caso notificado fue el de Cuevas et al<sup>3</sup> en 1981, y la descripción de la primera serie amplia de casos la realizaron, en su aspecto clínico, Moreno et al<sup>4</sup> en 1987 y, en el histológico, Vargas Castrillón et al<sup>5</sup> en 1988.

La hepatopatía grasa no alcohólica (HGNA) es un espectro clinicopatológico que abarca desde el hígado graso hasta la cirrosis grasa establecida y que padecen individuos sin hábito alcohólico<sup>6-9</sup>. Produce un daño hepático de claro carácter progresivo<sup>10,11</sup>, que afecta al 16-24% de la población adulta en países desarrollados<sup>12,13</sup>, y con tendencia creciente<sup>13</sup>, pero sin una clasificación o escala histopatológica aceptada universalmente. Los tipos histológicos de Matteoni et al<sup>11</sup> constituyen un sistema sencillo con una excelente correlación pronóstica e interobservadores. En virtud de ellos, podemos definir: a) hígado graso no alcohólico, que incluye a pacientes con esteatosis sola o con esteatosis asociada a inflamación inespecífica (tipos 1 y 2, respectivamente); b) EHNA, cuando existe esteatosis más signos de lesión hepatocelular, como degeneración balonzante, hialina de Mallory y/o necrosis, y fibrosis de cualquier intensidad o extensión (tipos 3 y 4, respectivamente), y c) la cirrosis grasa no alcohólica, para referirse al estadio más evolucionado de la enfermedad. Aunque tampoco es una diferenciación de aceptación unánime, conviene separar la HGNA primaria, esto es, en la que no existe un agente etiológico aparente, de la HGNA secundaria, en la que sí es posible individualizar un factor causante<sup>14</sup>, como ciertos cuadros metabólicos congénitos y adquiridos, la cirugía bariátrica o diversos fármacos y tóxicos. Parece bien establecido<sup>15</sup> que la HGNA primaria es la manifestación hepática del llamado síndrome X o metabólico<sup>16</sup>, que engloba, al menos, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial.

La patogenia de la forma primaria es un tema controvertido y de conocimiento muy parcelario. En cualquier caso, parece multifactorial<sup>13,17</sup>, y su origen y evolución son el resultado de diversos acontecimientos epigenéticos, en especial dietéticos y de estilo de vida, que inciden en un contexto genético adecuado para promover múltiples alteraciones metabólicas e inmunológicas<sup>13,18</sup>. Todas esas alteraciones no tienen aún un marco unificador reconocido que organice y concatene adecuadamente el campo de conocimiento disponible en la actualidad. Se han postulado diversas teorías. La pionera fue la del doble impacto, basada en el modelo propuesto por Day y James<sup>19</sup> en 1998. El primer impacto parece ser una resistencia a la insulina (RI) periférica con resultado de acumulación grasa en el hígado (esteatosis) y, el segundo, un estrés oxidativo crónico que conduce a una lesión hepatocelular y fibrosis (esteatohepatitis). Con posterioridad, se ha enunciado la teoría del multiimpacto, defendida por Diehl<sup>18</sup>, que diferencia la génesis subsiguiente de cirrosis (tercer impacto) y, eventualmente, de hepatocarcinoma (cuarto impacto).

## Primer impacto: progresión del hígado normal a esteatosis

Los mecanismos que conducen a la acumulación grasa en el interior de los hepatocitos, principalmente en forma de triglicéridos, no están bien establecidos. Se han descrito di-

Correspondencia: Dr. D. Moreno Sánchez.  
Embajadores, 97, 7.º B. 28045 Madrid. España.  
Correo electrónico: dmorenosanchez@sepd.es

Recibido el 23-8-2004; aceptado para su publicación el 15-10-2004.

versos polimorfismos y mutaciones genéticas<sup>15,18</sup>, como en los genes que codifican la leptina y su receptor, en el del sustrato del receptor de la insulina (*insulin receptor substrate*, IRS), en los de la palmitilcarnitina transferasa, triglicérido transferasa, apoproteína E y de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos, en el del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y en el del receptor activado de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR- $\alpha$ ), entre otras. Sin embargo, en las últimas décadas la obesidad y su consecuencia metabólica, la RI, se han propagado como una verdadera epidemia en los países industrializados<sup>20</sup>. Este hecho no puede explicarse por un repentino incremento de mutaciones genéticas, sino por la interacción entre una susceptibilidad genética más bien estable y unos factores epigenéticos más dinámicos, que incluyen la dieta y el ejercicio físico<sup>18</sup>. Puesto que algunos elementos dietéticos influyen en la actividad de factores de transcripción que regulan la síntesis de enzimas de la homeostasis grasa, la dieta afecta a la captación, síntesis, degradación y exportación de grasa por el hígado. Se ha observado que los pacientes con EHNA siguen una dieta rica en grasas saturadas y colesterol y pobre en ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas antioxidantes C y E<sup>21</sup>. Los ácidos grasos poliinsaturados son ligandos de los PPAR- $\alpha$ , factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que codifican enzimas de la betaoxidación peroxisomal y mitocondrial de ácidos grasos, pero también moduladores negativos de la lipogénesis hepática, al parecer por inhibición de las proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides (*sterol regulatory element binding protein*, SREBP) tipo 1, a su vez factores de transcripción de enzimas lipogénicas<sup>22</sup>. Así, es posible que el hígado use los ácidos grasos poliinsaturados como sensores del estado nutricional y determinantes de si los ácidos grasos deben almacenarse u oxidarse<sup>23</sup>.

### Resistencia a la insulina

En humanos, parece que el mecanismo causante esencial de la acumulación hepatocelular de triglicéridos sería una RI en el adipocito principalmente<sup>24,26</sup> y su razón biológica, el ser un mecanismo de defensa del tejido adiposo esteatósico. Hasta hace bien pocos años, el adipocito se consideraba un espectador pasivo en procesos como la obesidad o la diabetes, pero cada vez son mayores las evidencias que demuestran su capacidad endocrina y su participación en la fisiología sistémica, en lo que se denomina sistema adipostático<sup>27-29</sup>. Así, los efectos fisiológicos de la obesidad derivan de dos factores: el aumento de la masa de tejido adiposo y el incremento de producción y secreción, constitutivo, de sus productos propios<sup>30</sup>. El adipocito cargado de grasa, como célula activa, busca liberarse de ella. Entre varios posibles mecanismos, parece «elegir» el hacerse resistente a la acción de la insulina. La pérdida de la señalización insulínica en esa célula induce lipólisis, con formación de ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos almacenados, debido a una mayor disponibilidad de adenosinmonofosfato cíclico, necesario cofactor de la lipasa. En principio, no parece una mala elección dado que los ratones FIRKO, con defecto específico y exclusivo de la señal insulínica en el tejido adiposo, no son sólo resistentes a la obesidad sino que tienen una supervivencia un 20% superior a ratones control<sup>31</sup>.

El peso de evidencia de la asociación RI-HGNA es, hoy día, incuestionable en virtud de múltiples investigaciones llevadas a cabo en los últimos años<sup>32-39</sup>. Muchos de los trastornos metabólicos que con frecuencia se asocian a la HGNA son condiciones de RI o son parte de la constelación de entidades que constituyen el síndrome metabólico o X<sup>37</sup>. Así,

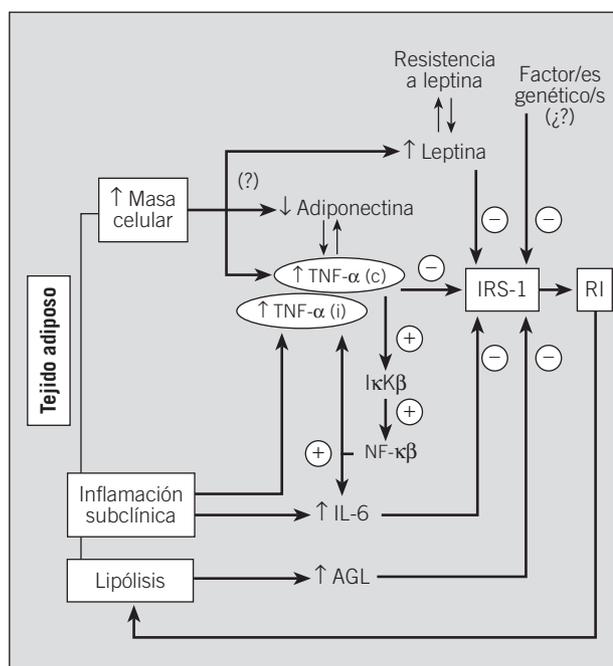


Fig. 1. Posibles mecanismos patogénicos de la resistencia a la insulina (RI) en el tejido adiposo. AGL: ácidos grasos libres; IκKβ: inhibidor de la proteína-kinasa kappa cinasa beta; IL: interleucina; IRS: sustrato del receptor de la insulina; NF-κβ: factor nuclear kappa beta; TNF: factor de necrosis tumoral; (c): constitutivo; (i) inducido.

la HGNA puede considerarse la manifestación hepática de ese síndrome<sup>34</sup> y, de hecho, cuanto más intensa es la RI, más severa es la hepatopatía<sup>32,40</sup>. No obstante, lo que no está aún establecido son qué órganos o tejidos son resistentes y a qué acciones de la insulina es resistente el paciente. Fisiológicamente<sup>41,42</sup>, la unión de la insulina con su receptor, tipo tirosinquinasa y ubicado en la superficie celular, trae consigo la autofosforilación de éste y el inicio de la actividad tirosinquinasa. Por ella, se crean ésteres fosfóricos sobre grupos alcohólicos (en restos de serina o treonina) o fenólicos (en restos de tirosina) que, después, se hidrolizan por fosfatasa. Los residuos de tirosina fosforilados por la cinasa activada actúan sobre las proteínas del sustrato (moléculas IRS-1 o IRS-2), que a su vez sirven de lugar de anclaje para las moléculas efectoras en cascada (ras/raf/proteincinasa activada por mitógenos y fosfatidilinositol-3-cinasa) que llevan al efecto diana. Este sistema es habitual en los procesos de modificación covalente reversible, caracterizados por una amplificación desde la señal hormonal hasta el efecto enzimático final, pero la complejidad de la secuencia hace que resulte posible en varios niveles<sup>9,41</sup>. Las alteraciones primarias del receptor de la insulina, o RI tipo A, son raras. En general, la RI se debe a anomalías de la señal más allá de su receptor, en las diferentes vías postactivación. En la HGNA, los principales mecanismos implicados en la génesis de RI en el adipocito (fig. 1) dependen de trastornos de la activación del IRS-1 por la hiperproducción de adipocinas consecutiva al aumento de la masa celular adiposa (TNF- $\alpha$ , leptina e interleucina [IL] 6), hipoproducción paradójica de otras (adiponectina), inducción de citocinas por un fenómeno inflamatorio subclínico (TNF- $\alpha$  e IL-6) y por los propios ácidos grasos libres derivados de la lipólisis.

Los ratones *ob/ob*, deficientes en leptina por mutación del gen que la codifica<sup>43,44</sup>, o los *fa/fa*, con inactividad de los receptores de leptina<sup>45</sup>, desarrollan un fenotipo que simula el síndrome metabólico humano. Al mismo tiempo, padecen

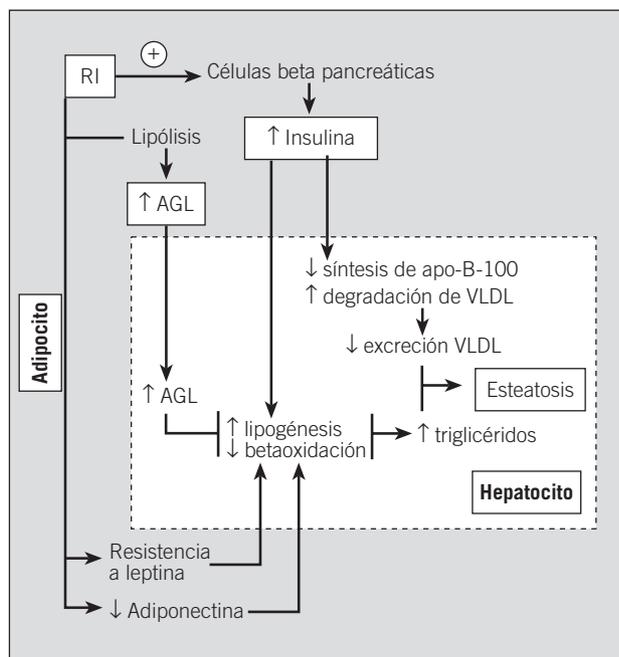


Fig. 2. Patología de la esteatosis hepática. El incremento de sustrato de ácidos grasos libres (AGL), junto a hiperinsulinemia –consecutiva a la resistencia a la insulina (RI)– hipoadiponectinemia y resistencia a la leptina, induciría un aumento de triglicéridos por activación de la lipogénesis e inhibición de la oxidación grasa. Esos triglicéridos se acumularían al estar mermada su excreción en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Apo: apolipoproteína.

una alteración de la transcripción de genes que codifican ciertas citocinas, lo que incluye un aumento del TNF- $\alpha$  constitutivo<sup>46</sup>. Aunque el TNF- $\alpha$  suele originarse en los mediadores inflamatorios, como los macrófagos tisulares, estudios en un modelo animal han puesto en evidencia que, en ciertas circunstancias, puede derivar principalmente del tejido adiposo<sup>47</sup>. En la HGNA la cantidad de grasa visceral, no la total, se ha mostrado como un factor predictivo de esteatosis<sup>48,49</sup>, y la exéresis de la grasa visceral, en experimentación animal, puede revertir la RI<sup>50</sup>. Por tanto, el tejido adiposo, en especial la grasa mesentérica cuyo flujo venoso desemboca directamente en el hígado, parece ser el origen principal del TNF- $\alpha$  constitutivo en la HGNA<sup>27,29</sup>.

Sin embargo, el ratón *ob/ob* y *knockout* para el TNF- $\alpha$  no desarrollan RI a pesar de la obesidad<sup>51</sup>. Cómo sucede es incierto, pero lo más probable es que derive de una infrarregulación de la señalización IRS-1<sup>52</sup> por fosforilación en residuos de serina<sup>13</sup>. Asimismo, es conocido el papel de esa citocina en la inactivación del inhibidor de la proteincinasa kappa cinasa beta ( $I\kappa\kappa\beta$ ), pues la administración a humanos de dosis altas de aspirina, que activa el inhibidor, mejora la sensibilidad a la insulina<sup>53,54</sup>. La inactivación del  $I\kappa\kappa\beta$  permite la acción del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), que a su vez promueve la transcripción del TNF- $\alpha$ . Ello apunta a un mecanismo de *feedback* positivo que podría autoperpetuar y cronificar la RI<sup>53</sup>. Además, la prevalencia de polimorfismos del TNF- $\alpha$  es más alta en pacientes con HGNA que en controles (el 31% frente al 15%) y existe una correlación directa entre ellos y una mayor RI<sup>55</sup>, lo que significaría cierta susceptibilidad genética a la RI y a la HGNA.

Otra adipocina que se libera a partir de los adipocitos mesentéricos es la leptina, cuyo principal papel biológico parece ser el de adaptación a una disponibilidad reducida de energía<sup>27</sup>. Por ello, las consecuencias de una merma de su

producción son notablemente más acusadas que un aumento. La evidencia indica que la señalización por leptina en el adipocito está mediada por la fosfatidilinositol-3-cinasa<sup>27</sup>, con lo que comparte la ruta de la señal insulínica, y puede inducir la desfosforilación del IRS-1<sup>56</sup> y, por ello, generar RI. No obstante, los individuos lipodistróficos, sin leptina circulante, desarrollan intensa RI y esteatosis, y en ellos la infusión de leptina lleva a una mayor sensibilidad a la insulina en el hígado y el miocito, lo que conduce a un descenso importante de la concentración de triglicéridos en ambos tejidos<sup>57</sup>. El escenario en la HGNA es, en apariencia, contradictorio con esas observaciones, pues existe hiperleptinemia y RI. En efecto, los valores de leptina están elevados en los obesos<sup>58</sup> y en los pacientes con HGNA, en quienes guardan paralelismo con la gravedad histológica pero no con el índice de masa corporal<sup>59,60</sup>. Al igual que la RI conduce a hiperinsulinemia, se ha planteado que una resistencia a la leptina llevaría a hiperleptinemia<sup>15</sup>. Aunque en humanos obesos se han detectado mutaciones del gen de la leptina y de su receptor, lo más probable es que esa situación paradójica se deba a una resistencia a la leptina que, además, se correlacionaría con la RI<sup>61</sup>. En cualquier caso, el posible papel de la leptina en la patología de la HGNA es controvertido<sup>62</sup>.

La adiponectina es la única adipocina cuyos valores circulantes se correlacionan de manera negativa con la adiposidad corporal y positiva con la sensibilidad a la insulina<sup>27,28</sup>. Su infusión al ratón obeso revierte la RI, disminuye el contenido de triglicéridos y aumenta la oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado<sup>27,41</sup>; sin embargo, los ratones *knockout* para la misma padecen RI<sup>27</sup>. La adiponectina inhibe al TNF- $\alpha$ <sup>63</sup> y, a la inversa, el TNF- $\alpha$  puede reprimir la expresión de la adiponectina y potenciar aún más la RI<sup>64</sup>. Las tiazolidindionas, agonistas de los PPAR- $\gamma$ , incrementan la producción de adiponectina, lo que mejora la sensibilidad a la insulina en el adipocito, miocito y hepatocito<sup>65,66</sup>.

La activación de la cascada que incluye al  $I\kappa\kappa\beta$  y al NF- $\kappa\beta$  puede ligar la RI a un entorno proinflamatorio<sup>67</sup>. En efecto, los ratones obesos presentan una sobreexpresión de genes proinflamatorios y de activación específica de macrófagos en el tejido adiposo, que es paralela al peso corporal y precede a la hiperinsulinemia<sup>68</sup>. Los adipocitos son fuente, también, de IL-6<sup>29,30</sup>, y la infusión de ésta en ratones hasta alcanzar concentraciones unas 6 veces superiores a las normales, similares a las que se observan en obesos, produce una reducción de la actividad del IRS-1 del 60%<sup>69</sup>.

Con independencia de su origen, la RI en el adipocito conduce a hiperinsulinemia y lipólisis<sup>9</sup>. Además, el exceso de ácidos grasos libres derivados de la lipólisis sería un mecanismo adicional de RI en ese tejido<sup>13</sup>, dado que éstos deterioran la fosforilación por tirosina del IRS-1<sup>70</sup>, si bien algunos autores lo han puesto en duda en investigaciones recientes<sup>71</sup>.

En pacientes con HGNA, el principal efecto de la sobreaparición de ácidos grasos libres al hígado es el incremento de sustrato para la lipogénesis (fig. 2). En esta fase de la enfermedad, el hepatocito parece mantenerse sensible a la acción de la insulina, cuyos valores circulantes se encuentran elevados, en términos absolutos o relativos, merced al estímulo que supone para las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas el entorno de resistencia periférica<sup>32,37,38</sup>. La función de la insulina es, en esencia, anabólica al favorecer la síntesis y el almacenamiento de lípidos en el hígado y, al mismo tiempo, limitar los procesos catabólicos. Estimula la lipogénesis, bajo el control del SREBP-1<sup>72</sup>, a partir de la glucosa por activación de la piruvato deshidrogenasa, la citrato liasa y la acetil-coenzima A (CoA) carboxilasa; bloquea la betaoxidación de los ácidos grasos por inhibición de la carnitina acil-CoA transferasa, desvía la acil-CoA

desde la formación de precursores de la betaoxidación (acil carnitinas) hacia la síntesis de triglicéridos, e inhibe la lipólisis al activar la fosfodiesterasa<sup>7,41</sup>. Además, los triglicéridos formados tienden a acumularse por una menor exportación en forma de lipoproteínas de muy baja densidad, tanto al disminuir la síntesis de su proteína precursora, la apolipoproteína B-100<sup>73</sup>, como por aumento de la degradación de las partículas lipoprotéicas nacientes<sup>13</sup>.

La leptina puede desempeñar cierto papel en la regulación del reparto de grasa en el interior de los hepatocitos entre la betaoxidación mitocondrial y la síntesis de triglicéridos. Es una potente reductora tisular de triglicéridos, en lo que parece participar la inhibición de la estearoil-CoA desaturasa tipo 1, la enzima limitante de la síntesis de grasas monosaturadas<sup>74</sup>. Así, los defectos de la señalización por leptina, como ocurre en el ratón *ob/ob*, están asociados a una disminución de la betaoxidación hepática de grasa. Las posibles consecuencias de la hipoadiponectinemia en la HGNA son, hoy por hoy, desconocidas, aunque se ha puesto en relación con diferentes componentes del síndrome metabólico como la distribución abdominal de la grasa corporal, la hipertrigliceridemia y el decremento de los valores de lipoproteínas de alta densidad (HDL)<sup>27</sup>.

#### Adaptación hepatocelular

El hepatocito esteatósico, al igual que el adipocito, despliega dispositivos para disponer del exceso de grasa (fig. 3). Su principal mecanismo catabólico es la betaoxidación mitocondrial de ácidos grasos<sup>18,72</sup>, un proceso cíclico en el que se producen sucesivamente moléculas de acetil-CoA, tras la oxidación en carbono beta, con el concurso de las coenzimas FAD y NAD que se reducen a FADH<sub>2</sub> y NADH+H<sup>+</sup> y se incorporan a la cadena respiratoria mitocondrial. Hemos comentado que, como consecuencia sobre todo de la hiperinsulinemia, esa vía catabólica se encuentra inhibida. Sin embargo, en virtud del importante exceso de sustrato y por motivos sólo cuantitativos, la betaoxidación se produce en una cuantía superior a la de un hígado sin acumulación grasa, lo que se ha demostrado en humanos e *in vivo*<sup>75</sup>. Cuando se satura la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, se activa la vía alternativa de betaoxidación en los peroxisomas que contienen una batería de enzimas, entre las que la acil-CoA oxidasa es la iniciadora de la espiral oxidativa. En esa desviación parece tener un papel fundamental el efecto de los PPAR- $\alpha$ <sup>9,76</sup>. Los PPAR son una familia de receptores nucleares que han sido reconocidos como moléculas transductoras, de la mayor importancia en la señalización insulínica posreceptor<sup>77</sup>. La betaoxidación peroxisomal genera acil-CoA de cadena corta por acción de la acil-CoA sintetasa. La acil-CoA sirve de sustrato para la oxidación peroxisomal pero, si no se metaboliza, funciona como un ligando PPAR- $\alpha$ <sup>9</sup>. No obstante, algunos autores no han encontrado relación entre los PPAR- $\alpha$  y la sensibilidad a la insulina en el modelo animal<sup>78</sup> y otros, por el contrario, han evidenciado una disminución de la actividad de ese sistema<sup>79</sup>. En cualquier caso, la consecuencia directa principal del exceso de betaoxidación de ácidos grasos es la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO)<sup>72</sup> y, en respuesta a ello, el hepatocito activa diversos sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa citosólica, la glutatión peroxidasa y las catalasas<sup>80</sup>.

Otro efecto de la activación de los PPAR- $\alpha$  es la síntesis mitocondrial de proteínas desacoplañtes (*uncoupling proteins*, UCP) de la fosforilación oxidativa<sup>81</sup>. En esa vía metabólica los macronutrientes sufren un proceso de oxidación en dos fases. En la primera, se obtienen coenzimas reducidas

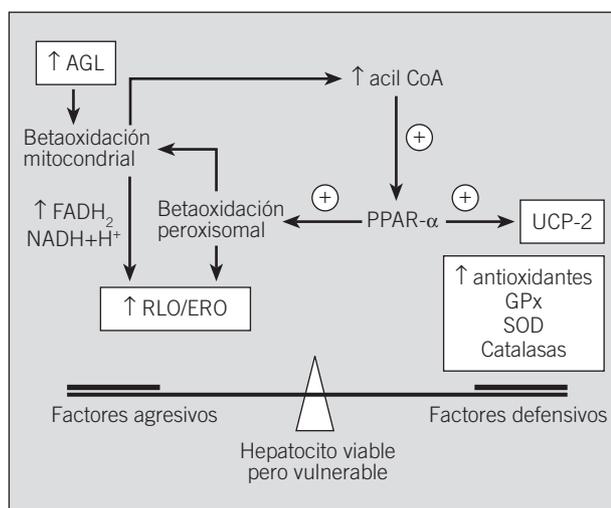


Fig. 3. Adaptación hepatocelular en el hígado graso. El hepatocito esteatósico es viable aunque vulnerable al guardar un delicado equilibrio entre los factores agresivos oxidantes, como los radicales libres (RLO) y especies reactivas del oxígeno (ERO), contrarrestados por otros defensivos, como la actividad de la proteína desacoplante (UCP) tipo 2 y los sistemas antioxidantes de la glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasas. AGL: ácidos grasos libres; PPAR: receptor activado de proliferación de peroxisomas; CoA: coenzima A.

NADH y FADH<sub>2</sub>, que en el hepatocito esteatósico son el resultado en particular de la oxidación de los ácidos grasos libres; en la segunda, esas coenzimas se incorporan a la cadena respiratoria mitocondrial, donde sus electrones se transfieren al oxígeno pasando por una serie de intermediarios (flavoproteínas, ubiquinona, citocromos, etc.) de potenciales de oxidoreducción decrecientes. La reducción final, tetraelectrónica, del oxígeno genera agua y la energía resultante se utiliza para sintetizar adenosintrifosfato. Una isoforma de la familia de las UCP, la UCP-2, está sobreexpresada en el hígado graso<sup>81</sup>. Se localiza en la membrana mitocondrial interna y funciona como un canal para protones. Así, cuando se activa, despolariza esa parte de la membrana y elimina el gradiente electroquímico que se desarrolla a lo largo de ella, transporta los protones que se generan en la cadena respiratoria al interior de la mitocondria y disipa la energía en forma de calor<sup>82</sup>. Ello disminuye la formación de anión superóxido<sup>18</sup>, lo que resulta beneficioso para la célula; pero, por el contrario, las mitocondrias quedan parcialmente despolarizadas con una menor eficiencia en la síntesis de ATP<sup>81,83-85</sup>, lo que hace a la célula más vulnerable a una depleción de ATP y a la necrosis cuando aumenten bruscamente las necesidades energéticas o se exponga a una mayor agresión oxidativa o a impactos secundarios como endotoxina o TNF- $\alpha$ . Por ello, la activación de la UCP-2 puede ser un componente de la respuesta adaptativa global que preserva la viabilidad de los hepatocitos en el hígado graso, pero también incrementa su vulnerabilidad a agresiones posteriores<sup>46</sup>.

#### Segundo impacto: progresión de esteatosis a esteatohepatitis

Los mecanismos que promueven, en el seno del hígado graso, el desarrollo de inflamación, lesión-necrosis hepatocelular y fibrosis son, hoy día, objetivos de una intensa investigación. Sobre la base de modelos animales y de resultados en humanos cada vez más esclarecedores, parece que el factor clave es un estrés oxidativo<sup>17,72</sup>, producto del desequilibrio entre procesos prooxidantes y antioxidantes.

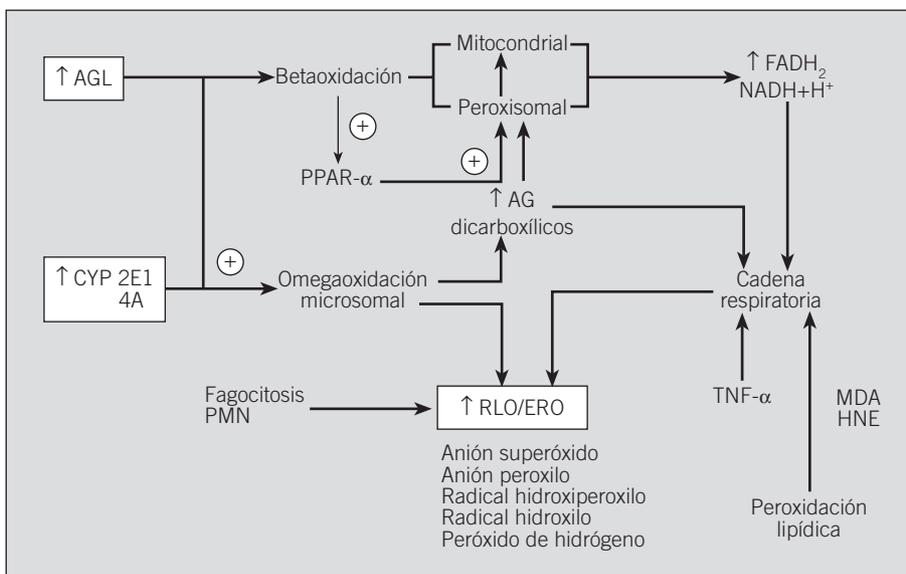


Fig. 4. Mecanismos de agresión oxidativa en la esteatohepatitis no alcohólica. AG: ácidos grasos; AGL: ácidos grasos libres; CYP: citocromo P450; HNE: 4-hidroxinonenal; MDA: malondialdehído; PMN: leucocitos polimorfonucleares; PPAR: receptor activado de proliferación de peroxisomas; RLO/ERO: radicales libres y especies reactivas del oxígeno; TNF: factor de necrosis tumoral.

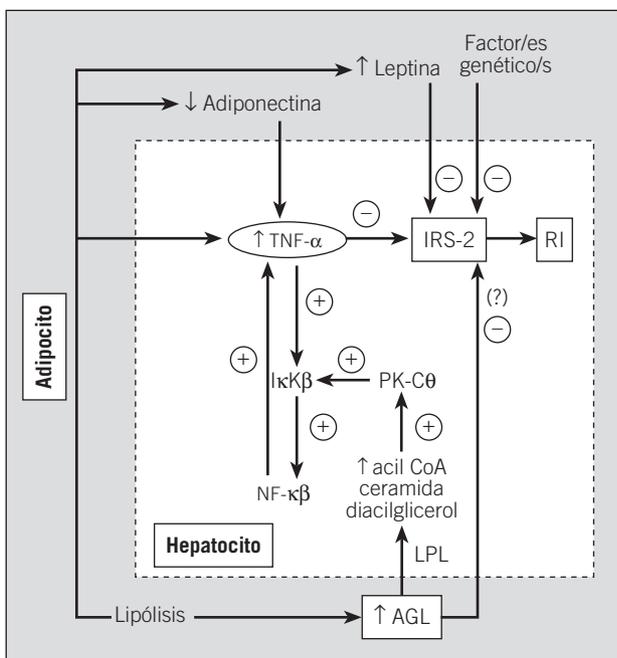


Fig. 5. Posibles mecanismos patogénicos de la resistencia a la insulina (RI) en el hepatocito. AGL: ácidos grasos libres; IκBβ: inhibidor de la proteínasa kappa cinasa beta; IRS: sustrato del receptor de la insulina; LPL: lipoproteinlipasa; NF-κβ: factor nuclear kappa beta; PK-C: proteínasa C; TNF: factor de necrosis tumoral.

**Estrés oxidativo**

La agresión oxidativa es de origen multifactorial (fig. 4) y resulta evidente que podría ser mayor si la betaoxidación de ácidos grasos estuviera estimulada, por ausencia de señalización insulínica, y no inhibida por hiperinsulinemia. La RI hepatocelular en la HGNA de humanos e *in vivo* no ha sido aún demostrada. Sin embargo, existen pruebas indirectas. En primer lugar, los mecanismos necesarios para su génesis están presentes (fig. 5) y son similares a los que la inducen en el tejido adiposo; en particular son claves el TNF-α y la activación de la lipoproteinlipasa por el aumento de áci-

dos grasos libres circulantes<sup>12</sup>. En el ratón, tras manipulación genética para sobreexpresar la lipoproteinlipasa hepática, la señal insulínica se inhibe de forma selectiva y se desarrolla hígado graso<sup>70</sup>. Además, la hiperactividad de los factores de regulación transcripcional SREBP también puede inhibir los IRS-2, que parecen ser los mediadores principales de esa señal en el hígado<sup>86</sup>, y los metabolitos intracelulares derivados de los ácidos grasos libres, tales como la acil-CoA, la ceramida y el diacilglicerol, activan la proteínasa C-θ que estimula la transcripción del IκBβ<sup>12,87</sup>. Algunos autores, tras experimentación animal, exponen que la simple existencia de esteatosis induciría RI en el hepatocito<sup>87,88</sup>. En segundo lugar, un incremento en el catabolismo graso explicaría el hecho de que los pacientes con enfermedad avanzada tienden a padecer una menor acumulación grasa hepática e, incluso, a su ausencia en estadio cirrótico<sup>10,89</sup>. El aumento hepatocelular de ácidos grasos libres actúa como modulador positivo de su omegaoxidación por el sistema microsomal del citocromo P450 (CYP)<sup>90-92</sup>, ya que son sustrato pero también inductores de esa lipooxigenasa. Así, el título hepático de CYP 2E1 está elevado de forma constante en pacientes con EHNA<sup>90,93,94</sup>. La oxidación microsomal de ácidos grasos genera ERO por donación de electrones al oxígeno mediado por la flavoproteína<sup>72</sup>. El CYP 3A4 hidroxila los ácidos grasos libres y los transforma en ácidos dicarboxílicos, que en roedores se degradan mediante la betaoxidación peroxisomal inducida por los PPAR-α. Sin embargo, en humanos esa inducción es defectuosa, por lo que aumenta la producción y disminuye la degradación de ácidos dicarboxílicos<sup>95</sup>. Todo este complejo proceso oxidativo de los ácidos grasos tiene como consecuencia la formación de radicales libres del oxígeno (RLO) y ERO, de manera directa en la betaoxidación peroxisomal y en la omegaoxidación microsomal, pero, en mayor medida y de manera indirecta, en la betaoxidación mitocondrial<sup>9,72</sup>. Como hemos comentado, esta última genera coenzimas reducidas FADH<sub>2</sub> y NADH+H<sup>+</sup>, que se incorporan a la cadena de transporte electrónico respiratorio mitocondrial, donde se produce la reducción del oxígeno. Esa reducción se realiza merced a 4 etapas escalonadas monoeléctricas, con liberación energética gradual. Sin embargo, el proceso puede ser incompleto al reducirse con sólo 1, 2 o 3 electrones (lo que ocurre en condiciones fisiológicas con el

2-5% del oxígeno mitocondrial). La reducción incompleta lleva a la formación de RLO, como anión superóxido, radical hidroxilo, anión peróxido y radical hidroxiperóxido, y de ERO como peróxido de hidrógeno. Cualquier situación que implique un aumento de la actividad de la cadena respiratoria supondrá un incremento en la formación de RLO/ERO, ya que, si bien la proporción a la que se generan es la misma, el volumen total es mayor<sup>96</sup>. El exceso de RLO/ERO puede inducir lesión hepatocelular, inflamación y/o fibrosis al menos por tres mecanismos conocidos: peroxidación lipídica, inducción de citocinas y expresión del ligando Fas<sup>9,97</sup> (fig. 6).

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos y lipoproteínas de las membranas se conoce como peroxidación lipídica, y quizá sea el fenómeno más acreditado de la toxicidad por RLO/ERO. Ello trae consigo, primero, un aumento de la permeabilidad de la membrana celular con balonización y, después, necrosis<sup>9,13</sup>. Los ácidos grasos poliinsaturados naturales poseen dobles enlaces C=C de tipo *cis*. Cada doble enlace está separado del siguiente por un CH<sub>2</sub> alílico, lo que lo hace particularmente susceptible al ataque oxidativo. Así, el proceso puede ser inhibido por moléculas que mimetizan la acción de la superóxido dismutasa<sup>98</sup>.

La peroxidación lipídica da origen a numerosos subproductos metabólicos, entre los que se encuentran los generados por la rotura de dobles enlaces C=C adyacentes a un hidroperóxido, los llamados aldehídos reactivos de las familias de los alcanales y alquenes, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE), respectivamente<sup>99</sup>. Ambos pueden ocasionar entrecruzamiento y conglomeración de proteínas, lo que conduce a la formación de hialina de Mallory<sup>100</sup>, y activar las células estrelladas<sup>101-103</sup>, que promueven la síntesis de colágeno. El HNE tiene, además, actividad quimiotáctica de neutrófilos<sup>104</sup>, que induce inflamación tisular y mayor generación de RLO/ERO a través del proceso de fagocitosis. Por último, ambos pueden entrar en la cadena respiratoria y disminuir la síntesis de sus enzimas, con lo que la proporción de reducción incompleta del oxígeno aumenta y es mayor la producción de RLO/ERO<sup>105</sup>, instaurándose un círculo vicioso<sup>95</sup>.

En segundo lugar, los RLO/ERO funcionan como moléculas de señal y son capaces de activar la transcripción<sup>46,96</sup>. Así, son inductores del factor de transcripción NF-κβ, que a su vez actúa sobre algunos genes intrínsecamente ligados al fenómeno inflamatorio como los que codifican el TNF-α, el factor transformador del crecimiento beta (TGF-β) y la IL-8<sup>9</sup>. El NF-κβ se encuentra en una forma citosólica inactiva ligada a su inhibidor IκB. La activación implica su translocación

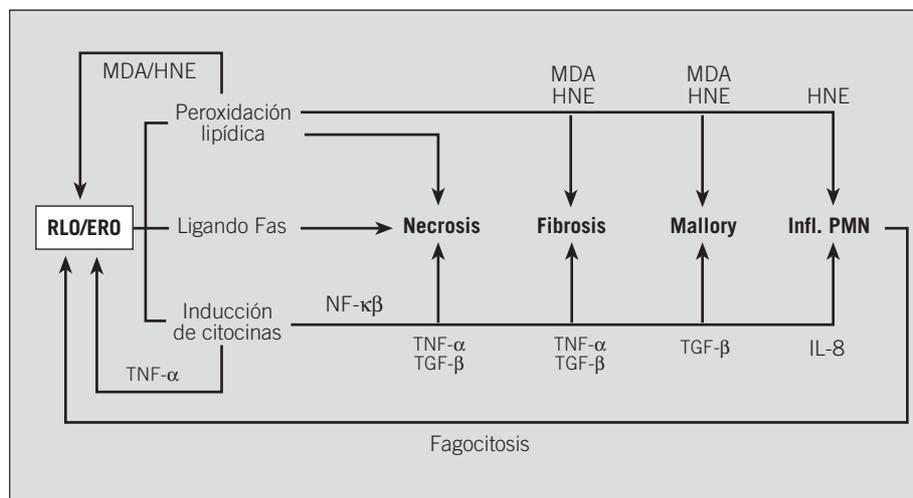
al núcleo, lo que determina el control de la expresión génica. Los RLO/ERO, al menos el peróxido de oxígeno, estimulan la fosforilación y disociación de la cinasa redox-sensitiva IκBβ de su unión con el NF-κβ<sup>53,54</sup>. El TNF-α inducido es capaz de provocar directamente la apoptosis<sup>106</sup> y la necrosis celular al activar la vía de las caspasas<sup>46</sup> y, por otro lado, promover la fibrogénesis<sup>107</sup>. En pacientes con EHNA se han encontrado concentraciones intrahepáticas aumentadas de esa citocina, en especial en los casos con mayor índice de actividad inflamatoria y fibrótica<sup>108</sup>. Además, como los aldehídos reactivos, puede promover una mayor producción de RLO/ERO al alterar el flujo de electrones y disminuir la síntesis de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>105,109</sup>. A ese círculo vicioso también se suman los ácidos dicarboxílicos producto de la hidroxilación de los ácidos grasos libres por el sistema microsomal del CYP 3A4, que contribuyen a empeorar el flujo de electrones<sup>72,95</sup>. Otra citocina, el TGF-β, es cofactor de la activación de la vía de las caspasas y muerte celular<sup>110</sup>, de promoción de la síntesis de colágeno por las células estrelladas<sup>103,111</sup>, y activación de la transglutaminasa tisular que conglo merla las proteínas del cito esqueleto y lleva a la formación de hialina de Mallory. Por último, la IL-8 aumenta la quimiotaxis de neutrófilos y su contribución a la hiperproducción de RLO/ERO a través de la fagocitosis<sup>25</sup>.

En tercer lugar, los RLO/ERO inducen la expresión del ligando Fas en el hepatocito. Las células hepáticas, en condiciones fisiológicas, poseen el receptor de membrana Fas<sup>112,113</sup>. La expresión de su ligando por un hepatocito lo capacita para interactuar con el receptor de otro, lo que causa una muerte «fratricida». Tanto el receptor Fas como el sistema enzimático apoptótico de las caspasas están sobreexpresados en los hepatocitos de pacientes con EHNA, en comparación con aquellos con esteatosis simple y con controles<sup>114</sup>. Toda la actividad oxidativa descrita en el hígado esteatótico pone en juego las defensas antioxidantes y conduce, finalmente, a la depleción de los antioxidantes intracelulares, como la vitamina E<sup>115</sup> y la superóxido dismutasa<sup>116</sup>, y de sus cofactores, como el glutatión<sup>91</sup>.

*Fibrogénesis y otros posibles mecanismos fisiopatológicos*

Algunos autores defienden la existencia de otros impactos o factores adicionales para el desarrollo de fibrosis<sup>18</sup>, dado que sólo una minoría de pacientes con EHNA progresan a cirrosis<sup>11,89</sup>, si bien poco se conoce sobre ellos. Las células estre-

Fig. 6. Mecanismos de lesión hepatocelular, fibrosis e inflamación inducidos por radicales libres (RLO) y especies reactivas del oxígeno (ERO) en la esteatohepatitis no alcohólica. HNE: hidroxinonenal; IL: interleucina; Infl. PMN: infiltrado inflamatorio por polimorfonucleares; MDA: malondialdehído; NF-κβ: factor nuclear kappa beta; TGF: factor transformador del crecimiento; TNF: factor de necrosis tumoral.



lladas y sus tipos celulares relacionados (miofibroblastos) son el origen principal de la matriz extracelular hepática. Ante una agresión, se activan y se transforman desde una célula quiescente rica en vitamina A a un tipo celular con alto poder proliferativo, fibrogénico y contráctil. Conceptualmente, la activación comprende dos fases: iniciación y perpetuación<sup>117</sup>. La iniciación se refiere a cambios tempranos, tanto fenotípicos como en la expresión de ciertos genes, que capacitan a esas células para responder a citocinas y otros estímulos. La perpetuación es el resultado de los efectos de esos estímulos para mantener el fenotipo activado.

Las células estrelladas hepáticas están activas en la EHNA<sup>118</sup>. La activación inicial parece depender de los RLO/ERO<sup>15</sup> y de los productos de la peroxidación lipídica, en especial del HNE<sup>101-103</sup>, que estimula la expresión del gen del colágeno  $\alpha$ -1. En la perpetuación de la activación participan diferentes citocinas, como el TNF- $\alpha$ <sup>107,108</sup>, y el TGF- $\beta$ <sup>103,111</sup>. La esteatohepatitis modifica la respuesta de las células estrelladas a las citocinas, de tal forma que tanto los mecanismos transcripcionales como postranscripcionales que promueven el depósito de colágeno tipo I están inducidos de manera preferente<sup>46</sup>. Además, el microambiente se transforma y favorece la supervivencia de esas células, pues su número aumenta a medida que la cirrosis se desarrolla<sup>46</sup>. La leptina podría ser un factor importante en la modulación de la fibrogenesis hepática en la EHNA<sup>17,119,120</sup>. El ratón *ob/ob*, deficiente en leptina, no desarrolla fibrosis incluso cuando se alimenta con una dieta fibrogénica deficiente en metionina y colina<sup>44</sup>. La evidencia indica que las células estrelladas activas sintetizan la leptina y, además, expresan receptores para ésta con lo que se generan los componentes de un círculo vicioso autocrino<sup>121</sup>. Por otro lado, la leptina puede interactuar de una manera paracrina con receptores de las células de Kupffer y de las células endoteliales sinusoidales, lo que lleva a un aumento de la producción de TGF- $\beta$ , que perpetuaría la fibrogenesis<sup>122,123</sup>.

Investigaciones recientes indican una disfunción de las células de Kupffer en modelos animales de HGNA<sup>124,125</sup>. Esas células, en el ratón *ob/ob*, sintetizan menor cantidad de IL-15<sup>126</sup>, que es esencial para la viabilidad de los linfocitos T-citotóxicos, el tipo de linfocito dominante en el hígado. Ello puede aumentar la vulnerabilidad al TNF- $\alpha$ , puesto que esos linfocitos producen IL-10, una citocina que protege a las células frente a sus efectos<sup>15</sup>. Además, tras la exposición a la endotoxina, se ha observado una menor expresión génica de IL-10, con la resultante disminución de su secreción y de capacidad fagocítica de las células de Kupffer<sup>127</sup>.

Otro mecanismo propuesto es el hiperflujo de hepatotoxinas por vía portal a un hígado vulnerable por la acumulación grasa. Con anterioridad expusimos cómo la respuesta adaptativa hepatocelular incluía una elevada actividad de las UCP mitocondriales que conducía a una fosforilación oxidativa ineficiente, depleción de ATP y fragilidad ante agresiones posteriores como incremento del estrés oxidativo, endotoxinas o TNF- $\alpha$ <sup>81,83-85,127</sup>. La obesidad se ha relacionado con hipomotilidad intestinal<sup>128</sup>, que podría predisponer a sobrecrecimiento bacteriano. La flora bacteriana intestinal es una potencial fuente de endotoxinas y de alcohol por desdoblamiento de hidratos de carbono. En pacientes con EHNA se han demostrado tanto un sobrecrecimiento bacteriano intestinal<sup>129</sup> como la producción endógena de alcohol<sup>128</sup>. La endotoxina, posiblemente a través de la modulación de macrófagos mediada por leptina<sup>130</sup>, induce citocinas proinflamatorias, tales como el TNF- $\alpha$ <sup>127</sup>. No obstante, aunque se han descrito valores elevados de TNF- $\alpha$  en el intestino delgado de individuos con EHNA, no se ha detectado un aumento de permeabilidad intestinal ni de endotoxemia<sup>131</sup>.

Dado que el exceso de hierro intrahepatocitario promueve el estrés oxidativo y facilita la peroxidación lipídica, se ha propuesto que ese metal podría ser un cofactor en la patogenia de la EHNA<sup>132</sup>. Sin embargo, las investigaciones que han valorado esa posibilidad han demostrado la ausencia de siderosis parenquimatosa y de influencia del metal en los cambios histológicos de la hepatopatía<sup>133,134</sup>. Un aumento de la concentración intrahepática de hierro puede estar presente en la llamada sobrecarga de hierro asociada a RI, caracterizada por hiperferritinemia con un índice de saturación de la transferrina normal o ligeramente elevado. Aunque los pacientes con ese cuadro tienen una alta prevalencia de trastornos metabólicos asociados a RI, su relación con la EHNA es incierta<sup>133</sup>.

## Conclusiones

Esta revisión describe los diferentes eslabones conocidos de la patogenia de la HGNA. Su unión para formar una cadena de progresividad lesional está aún lejos de conseguirse, pero creemos que existe suficiente peso de evidencia para concluir:

1. La HGNA se desarrolla, al menos, en dos fases: esteatosis (hígado graso con/sin inflamación inespecífica) y esteatohepatitis (lesión hepatocelular y fibrosis).
2. El factor clave de la primera fase es una RI periférica por infrarregulación de los IRS-1, en particular en el tejido adiposo. Ello es consecuencia de una sobreproducción constitutiva de adipocinas, al aumentar la masa celular, y quizá de la inducción de citocinas en el contexto de un proceso inflamatorio subclínico. El principal mediador parece ser el TNF- $\alpha$  y ciertos polimorfismos de éste podrían representar una susceptibilidad genética a la RI.
3. La pérdida de la señalización insulínica periférica induce lipólisis e hiperinsulinemia. El exceso de ácidos grasos libres circulantes, tras su captación por un hígado que permanece sensible a la acción de la insulina, sirve de sustrato para la lipogénesis. Los triglicéridos producidos se acumulan al estar deteriorada la capacidad hepática de excreción en forma de lipoproteínas de muy baja densidad.
4. El papel que pueden desempeñar otras adipocinas y citocinas (en especial, leptina y/o resistencia a la leptina, adiponectina e IL-6), tanto en la génesis de la RI como en la acumulación grasa hepática, no está bien establecido y, en cualquier caso, parece secundario.
5. La esteatosis hepática induce cierta agresión oxidativa que se ve contrarrestada (adaptación hepatocelular) por diversos sistemas antioxidantes y por la sobreexpresión de UCP mitocondriales de la fosforilación oxidativa. Ello mantiene viable al hepatocito, aunque lo hace vulnerable a agresiones posteriores.
6. El factor clave de la segunda fase es el estrés oxidativo hepatocelular, que surge del desequilibrio entre una mayor agresión oxidativa y el agotamiento de los sistemas antioxidantes.
7. La agresión oxidativa se produce por un exceso de RLO/ERO generados a partir de la oxidación de ácidos grasos, de manera directa por betaoxidación peroxisomal y omegaoxidación microsomal, y de forma indirecta por betaoxidación mitocondrial, que conduce a sobreproducción de cofactores enzimáticos de la fosforilación oxidativa que saturan la cadena respiratoria.
8. Los RLO/ERO provocan peroxidación lipídica de la membrana celular con producción de aldehídos reactivos (MDA y HNE), inducción de citocinas mediante la activación del NF- $\kappa$ B (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-8) y expresión del ligando Fas.

Todos estos factores promueven los fenómenos histológicos típicos de la esteatohepatitis: *a)* apoptosis/necrosis celular (RLO/ERO, ligando Fas, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ); *b)* inflamación de predominio polimorfonuclear (HNE e IL-8), y *c)* fibrosis (MDA, HNE, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ).

9. Además, la incorporación de los ácidos grasos dicarboxílicos, generados en la omegaoxidación microsomal, del TNF- $\alpha$  y de los aldehídos reactivos a la cadena respiratoria mitocondrial, causa mayor producción de RLO/ERO, con lo que se crea un círculo vicioso.

10. El desarrollo de cirrosis hepática y, eventualmente, de carcinoma hepatocelular es probable que precise de otros factores aún en investigación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med.* 1979;67:811-6.
- 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.
- Cuevas J, Rull M, Pérez-Mateo M. Lesiones hepáticas infrecuentes en una paciente diabética. *Gastroenterol Hepatol.* 1981;4:161.
- Moreno Sánchez D, Solís Herruzo JA, Vargas Castrillón J, Colina Ruiz-Delgado F, Lizasoain Hernández M. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio clinicoanalítico de 40 casos. *Med Clin (Barc).* 1987;89:188-93.
- Vargas Castrillón J, Colina Ruiz-Delgado F, Moreno Sánchez D, Solís Herruzo JA. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio histopatológico de 40 casos. *Med Clin (Barc).* 1988;90:563-68.
- Moreno Sánchez D. Esteatohepatitis no alcohólica. *An Med Intern (Madrid).* 1989;6:100-3.
- Moreno Sánchez D, Castellano Tortajada G. El hígado en la obesidad. *Gastroenterol Hepatol.* 1993;16:550-8.
- American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;123:1702-4.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346:1221-31.
- Moreno Sánchez D, Casis Herce B, Martín Algibez A, Nevado Santos M, Colina Ruiz-Delgado F, Galvao Filho O, et al. Esteatohepatitis no alcohólica. Evolución clínica e histológica a medio plazo de diez pacientes. *Med Clin (Barc).* 1991;96:733-6.
- 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.
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;122:1649-57.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003;37:1202-19.
- McCullough AJ. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. En: Arroyo V, Forns X, García-Pagán JC, editors. *Progress in the treatment of liver diseases.* Barcelona: Ars Medica, 2003; p. 219-25.
- Harrison SA, Di Bisceglie AM. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs.* 2003;63:2379-94.
- Reaven GM. Syndrome X: 10 years after. *Drugs.* 1999;58 Suppl 1:19-20.
- Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liv Dis.* 2001;21:27-41.
- Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. En: Arroyo V, Forns X, García-Pagán JC, editors. *Progress in the treatment of liver diseases.* Barcelona: Ars Medica, 2003; p. 227-32.
- Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114:842-5.
- Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res.* 2002;10 Suppl 2:975-1045.
- Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003;37:909-16.
- Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, et al. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology.* 2003;38:1529-39.
- Clarke SD. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:13-8.
- Sanyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: fat or fiction. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:274-6.
- Harrison SA, Diehl AM. Fat and the liver: a molecular overview. *Semin Gastrointest Dis.* 2002;13:3-16.
- Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? *Dig Liver Dis.* 2004;36:165-73.
- Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes.* 2004;53Suppl 1:143-51.
- Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J Anim Sci.* 2004;82:935-41.
- Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004;82:170-90.
- Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2583-9.
- Blüher M, Khan BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science.* 2003;299:572-4.
- 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.
- Knobler H, Schattner A, Zhornicki T, Malnick SD, Ketter D, Sokolovskaya N, et al. Fatty liver: an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *QJM.* 1999;92:73-9.
- 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.
- 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.
- Loguercio C, De Girolamo V, De Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol.* 2001;25:568-74.
- 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 insulin resistance syndrome. *Hepatology.* 2002;35:373-9.
- 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.
- 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.
- Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1513-7.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799-806.
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulators of insulin action and their role in insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27Suppl 3:61-4.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995;269:540-3.
- Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:89-104.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet.* 1996;13:18-9.
- Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2000;343:1467-76.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259:87-91.
- Kral JG, Schaffner F, Pierson RN Jr, Wang J. Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism.* 1993;42:548-51.
- Neuschwander-Tetri BA. Evolving pathophysiological concepts in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2002;4:31-6.
- Barzilai N, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 1999;48:94-8.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature.* 1997;389:610-4.
- Hotamisligil GS, Peraldi SP, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271:665-8.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I $\kappa$ B. *Science.* 2001;293:1673-7.
- Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest.* 2001;108:437-46.
- 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.
- Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science.* 1996;274:1185-8.

57. Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest.* 2002;109:1345-50.
58. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334:292-5.
59. Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology.* 1998;115:997-1001.
60. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova G, Erdil A, Yaman H, Saka M, et al. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:3584-9.
61. Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 2002;16:1163-76.
62. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, et al. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol.* 2003;98:2771-6.
63. López-Bermejo A, Botas P, Funahashi T, Delgado E, Kihara S, Ricart W, et al. Adiponectin, hepatocellular dysfunction and insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60:256-63.
64. Hug C, Lodish HF. Diabetes, obesity and acrp30/adiponectin. *Biotechniques.* 2002;33:654-62.
65. Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong AP, Bandukwala R, Aroda V, Carter L, et al. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectine levels by antidiabetic therapy. *Diabetes.* 2003;52:667-74.
66. Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, Hardies LJ, Glass L, Cersosimo E, et al. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:200-6.
67. Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27Suppl 3:6-11.
68. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821-30.
69. Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes.* 2003; 52:2784-9.
70. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al. Tissue-specific over-expression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:7522-7.
71. Lundgren M, Eriksson JW. No *in vitro* effects of fatty acids on glucose uptake, lipolysis or insulin signaling in rat adipocytes. *Horm Metab Res.* 2004;36:203-9.
72. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004;114:147-52.
73. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2002;35: 898-904.
74. Cohen P, Ntambi JM, Friedman JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2003;3:271-80.
75. Miele L, Grieco A, Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Forgione A, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatic mitochondrial beta-oxidation [resumen]. *J Hepatol.* 2003;38 Supl 2:197.
76. Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:43-55.
77. Moller DE, Berger JP. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27 Supl 3:17-21.
78. Haluzik M, Gavrilova O, LeRoith D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha deficiency does not alter insulin sensitivity in mice maintained on regular or high-fat diet: hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies. *Endocrinology.* 2004;145:1662-67.
79. Yeon JE, Choi KM, Baik SH, Kim KO, Lim HJ, Park KH, et al. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:799-804.
80. Perlemuter G, Corre MP, Conti M, Davit-Spraul A, Cosson C, Opert JM, et al. Increase of liver anti-oxidant enzyme activities in non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a defense against an oxidative stress [resumen]. *J Hepatol.* 2003;38 Supl 2:201.
81. Chavin KD, Yang SQ, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem.* 1999;274:5692-700.
82. Mataix J, Salas J. Obesidad. En: Mataix Verdú J, editor. *Nutrición y alimentación humana. II. Situaciones fisiológicas y patológicas.* Madrid. Ergon; 2002:1081-107.
83. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA.* 1999;282:1659-64.
84. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 1999;31:430-4.
85. 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.
86. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, et al. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol.* 2004;6:351-7.
87. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004;279:32345-53.
88. Den Boer M, 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.
89. 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.
90. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1998;27:128-33.
91. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, González FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2000;105:1067-75.
92. Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol.* 2004;28:1-11.
93. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003;37:544-50.
94. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2003;38: 428-35.
95. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liv Dis.* 2001;21:57-69.
96. Mataix J, Battino M. Estrés oxidativo. En: Mataix Verdú J, editor. *Nutrición y alimentación humana. II. Situaciones fisiológicas y patológicas.* Madrid: Ergon, 2002; p. 1047-63.
97. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutrition Res.* 2002;60:289-93.
98. Laurent A, Nicco C, Tran Van Nhieu J, Borderie D, Chereau C, Conti F, et al. Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology.* 2004;39:1277-85.
99. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11:81-28.
100. Zhang-Gouillon ZQ, Yuan QX, Hu B, Marceau N, French BA, Gaal K, et al. Mallory body formation by ethanol feeding in drug induced mice. *Hepatology.* 1998;27:116-22.
101. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albato E, Poli G, Gentilini A, et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen  $\alpha 1(1)$  gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 1993;194:1044-50.
102. Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1 (1) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology.* 1994;19:1262-71.
103. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Chiarpotto E, Camandola S, Vogel S, et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor  $\beta 1$  expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J.* 1997;11:851-7.
104. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxylalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React.* 1985;7:137-42.
105. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003;38:999-1007.
106. Magnusson C, Vaux DL. Signaling by CD95 and TNF receptors; not only life and death. *Immunol Cell Biol.* 1999;77:41-6.
107. Houghlum K, Buck M, Adir V, Chojkier M. LAP (NF-IL6) transactivates the collagen alpha 1 (I) gene from a 5' regulatory region. *J Clin Invest.* 1994;94:808-14.
108. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Gene expression of TNF $\alpha$  and TNF receptors, p55 and p75, in non alcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2001;34:1158-63.
109. Lancaster JR Jr, Laster SM, Gooding LR. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett.* 1989; 248:169-74.
110. Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM, Cain K. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor  $\beta 1$ -induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 1997;25:1516-26.
111. Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF $\alpha$  and collagen type 1 is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest.* 1995;96:2461-8.
112. Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, et al. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1999;272:28191-3.
113. Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing, and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol.* 1999;31:760-70.
114. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2003;125:437-43.

115. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicale M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology*. 2001;33:808-15.
116. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34:57-62.
117. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med*. 1993;328:1828-33.
118. Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol*. 2000;31:822-8.
119. Anania FA. Leptin, liver, and obese mice: fibrosis in the fat lane. *Hepatology*. 2002;36:246-8.
120. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol*. 2002;37:206-13.
121. Potter JJ, Womack L, Mezey E. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244:178-82.
122. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean litter-mates of *ob/ob* mice. *Hepatology*. 2002;35:762-71.
123. Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology*. 2002;122:1399-410.
124. Lee F-Y, Li Y, Yang EK, Yang SQ, Lin HZ, Trush MA, et al. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin deficient, obese mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1999;276:C386-C94.
125. Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:G1-G5.
126. Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology*. 2002;123:1304-10.
127. 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 USA*. 1997;94:2557-62.
128. Nair S, Cope K, Risby TH, Diehl AM, Terence RH. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1200-04.
129. Nazim M, Stamp G, Hodgson HJ. Non-alcoholic steatohepatitis associated with small intestinal diverticulosis and bacterial overgrowth. *Hepatogastroenterology*. 1988;36:349-51.
130. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998;12:57-65.
131. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48:206-11.
132. Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol*. 2003;30:137-44.
133. Chitturi S, George J. Interaction of iron, insulin resistance, and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2003;5:18-25.
134. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, et al. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2004;39:179-87.