

POINT OF VIEW

## Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction

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

Departments of Gastroenterology and Hepatology. Research Center. University Hospital "12 de Octubre". Universidad Complutense. Madrid, Spain

### ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease represents a set of liver lesions similar to those induced by alcohol that develop in individuals with no alcohol abuse. When lesions consist of fatty and hydropic degeneration, inflammation, and eventually fibrosis, the condition is designated non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The pathogenesis of these lesions is not clearly understood, but they are associated with insulin resistance in most cases. As a result, abdominal fat tissue lipolysis and excessive fatty acid uptake by the liver occur. This, together with a disturbance of triglyceride export as VLDL, results in fatty liver development. Both the inflammatory and hepatocellular degenerative components of NASH are attributed to oxidative stress. Mitochondrial respiratory chain loss of activity plays a critical role in the genesis of latter stress. This may be initiated by an increase in the hepatic TNF $\alpha$ , iNOS induction, peroxynitrite formation, tyrosine nitration and inactivation of enzymes making up this chain. Consequences of oxidative stress include: lipid peroxidation in cell membranes, stellate cell activation in the liver, liver fibrosis, chronic inflammation, and apoptosis.

**Key words:** Non-alcoholic fatty liver disease. Insulin resistance. Mitochondrial dysfunction.

---

Solís Herruzo JA, García Ruiz I, Pérez Carreras M, Muñoz Yagüe MT. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 844-874.

---

### INTRODUCTION

Alcohol-induced liver lesions belong to three different categories (1-3): a) *fatty liver*, where hepatocytes are

filled with a big fat vacuole displacing the nucleus and other organelles towards the cell's periphery (*macrovesicular steatosis*). On occasion, hepatocytes contain multiple fat droplets that will not displace the nucleus peripherally, allowing it to remain in its central position (*microvesicular steatosis*); b) *alcoholic hepatitis*. These patients exhibit, together with liver steatosis, hepatocyte ballooning degeneration, alcoholic hyaline or Mallory bodies, megamitochondria, mixed inflammatory infiltrates with predominant polymorphonuclear cells, and both pericentral and pericellular fibrosis. All these changes are more common and severe in the centrolobular zone 3; and c) *alcoholic liver cirrhosis*, primarily micronodular that may secondarily evolve to macro-micronodular cirrhosis. Also cirrhoses with this etiology may become complicated with hepatocellular carcinoma.

These lesions, mainly those corresponding to alcoholic hepatitis, have been considered highly suggestive of alcohol abuse. However, as early as in the 1950s Zelman (4) and Werswater and Fainer (5) described the presence of liver steatosis and fibrosis associated with inflammatory infiltrates in the liver of obese patients. Also Thaler reported on several occasions –during the 60s and early 70s– apparently alcoholic lesions in non-drinking subjects. Hence Thaler suggested that the term “*alcoholic hepatitis*” be replaced by “*fatty hepatitis*”, “*Fettleberhepatitis*”, or “*steatohepatitis*” (6-8). Similar cases were further described during the 70s in obese (9-11) and diabetic (12-14) individuals, as well as in patients undergoing enteric bypass for morbid obesity (15,16). All these reports were received with skepticism as most authors were convinced that these patients were in fact heavy drinkers. In 1980, Ludwig et al. (17) coined the term “*non-alcoholic steatohepatitis*” (NASH) to designate these lesions that mimic those induced by alcohol in individuals with no alcohol abuse. NASH is currently considered a part in a wider spectrum of lesions including –in addition to NASH itself– non-alcoholic fatty liver, fatty liver and inflammation, and

---

Recibido: 06-09-06.

Aceptado: 06-09-06.

*Correspondencia:* J. A. Solís Herruzo. Servicio de Medicina Aparato Digestivo. Centro de Investigación. Hospital Universitario 12 de Octubre. Universidad Complutense. Madrid. Ctra. de Andalucía, km 5,400. 28041 Madrid. e-mail: jsolis.hdoc@salud.madrid.org

probably a high number of cryptogenic cirrhotoses (18,19). To designate all this range of lesions the term “*non-alcoholic fatty liver disease*” (NAFLD) was proposed. The prognostic relevance of all these lesions is heterogeneous. While steatosis is a stable lesion that only develops into more severe forms in 3% of cases, NASH evolves to cirrhosis in 15-25% of cases (18,20). Many cryptogenic cirrhotoses probably originate in NASH, with steatohepatitis signs disappearing over time (21-23). As with cirrhosis from other etiologies, NASH-derived cirrhosis may also result in hepatocellular carcinoma (24).

The diagnosis of NASH is not based on the presence of a specific liver lesion, but on the existence of a constellation of lesions including steatosis, hepatocyte hydropic degeneration, and inflammatory infiltrates. In addition, hyaline Mallory bodies, megamitochondria, and fibrosis in varying degrees are commonly found. A scoring system has been recently suggested to assess the various hepatic lesions of NAFLD, and to establish the histological diagnosis of NASH (19,25). A conceptual and critical diagnostic feature of NAFLD is absence of alcohol abuse. There is no unanimous view on what may be considered “*non-abusive alcohol consumption*” regarding NAFLD, but consumption is usually considered non-abusive when ethanol ingestion remains below 20-40 g/day in males and 20 g/day in females (26,27).

NAFLD is a common lesion in Western populations, and will become commoner in the future, as it is associated with insulin resistance, diabetes, and obesity. After viral infection and alcohol abuse, it currently represents the third most common cause of hypertransaminasemia. It is estimated that 17 to 33% of the general population have NAFLD, and the lesion present in 5.7 to 17% of this same population is NASH (28,29). When hypertransaminasemia has been studied for a cause in subjects with no viral infection markers and no alcohol abuse, NAFLD lesions are found in 40 to 90% of cases (29). In a study by ourselves some 20 years ago we found that NASH lesions had a prevalence of 5/100,000 population, an incidence of 0.9/100,000 population/year, and a frequency in liver biopsies of 1.9% and one in twelve alcoholic hepatitis cases (30,31). More recent reviews of this problem have shown that such incidence and prevalence have been on the rise for the past few years.

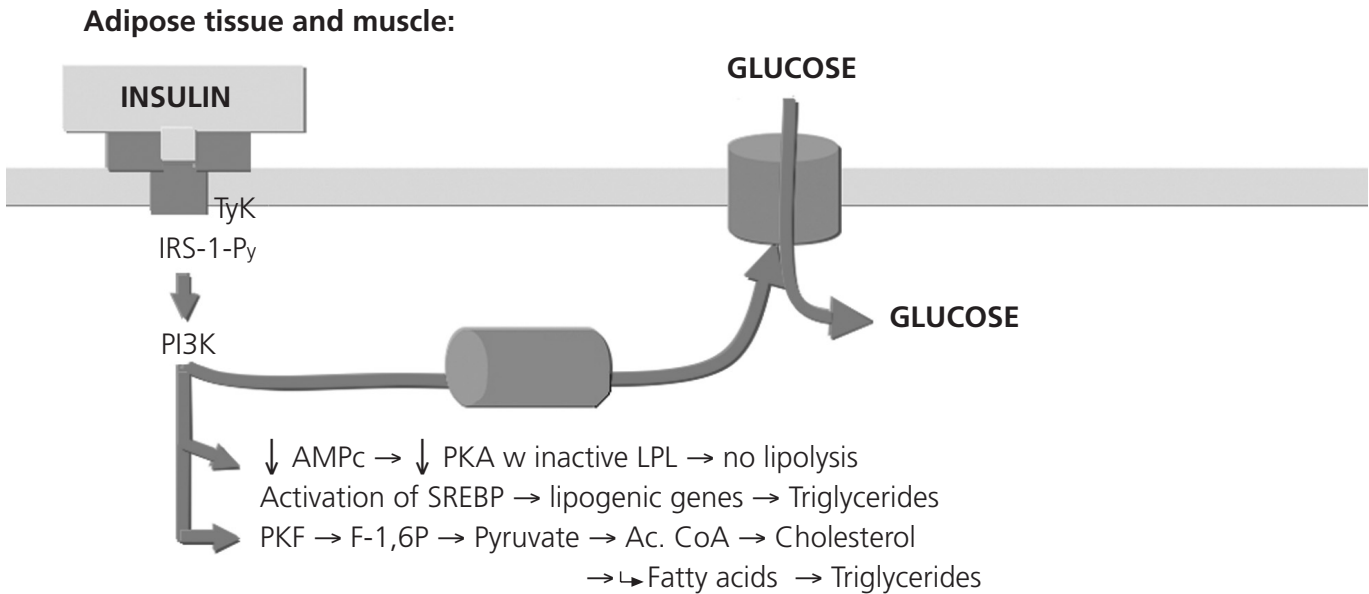
NAFLD has been identified in association with a high number of metabolic, surgical, and toxic conditions (*secondary NAFLDs*). However, the primary factor associated with NAFLD is *metabolic syndrome*, defined as the associated presence of at least three of the following changes in one individual: blood hypertension ( $\geq 130/85$  mmHg), central obesity (waist  $> 102$  cm in males;  $> 88$  cm in females), fasting hyperglycemia ( $\geq 110$  mg/dl), hypertriglyceridemia ( $> 150$  mg/dl), and reduced HDL ( $< 40$  mg/dl in males;  $< 50$  mg/dl in females) (32). A common pathophysiologic feature in this syndrome is insulin resistance (33-35). In fact, NAFLD would represent the hepatic component of insulin resistance syndrome.

## FROM INSULIN RESISTANCE TO FATTY LIVER

Insulin is the primary anabolizing hormone in the body. Its effect brings about an increased synthesis of proteins, glycogen, and lipids, facilitates glucose uptake by cells, and decreases glyconeogenesis and lipolysis. The mechanisms for such varied effects are only partially understood. In adipocytes and skeletal muscle cells the binding of its specific receptor by insulin is known to activate the receptor's tyrosine kinase, the latter's self-phosphorylation, and the phosphorylation in tyrosine/activation of IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*). This is followed by the activation of PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase). This kinase activates a glucose transporter that is usually found within vesicles in the cytoplasm –Gluc-4 (*glucose transporter 4*)– and moves it unto the plasma membrane, thus facilitating cell glucose uptake (34,36,37) (Fig. 1). Within cells glucose is used an energy source, or stored as glycogen when not required. In the presence of insulin resistance, IRS-1 phosphorylation in tyrosine does not take place; cell glucose uptake stops; glucose is retained in the extracellular space and hyperglycemia occurs, which in turn stimulates insulin secretion by pancreatic  $\beta$  cells (38). Once the pancreas is depleted and can no longer compensate for hyperglycemia, type-II diabetes mellitus develops.

The cascade phenomena following the binding of insulin to its receptor is more extensive than previously mentioned. PI3K activation after IRS-1 phosphorylation activates *phosphodiesterase*, and as a consequence AMPc degradation and depletion. Absence of AMPc precludes PKA (*Protein Kinase A*) activation, and hence lipoprotein lipase (LPL) activation too (39). That is, neither triglyceride hydrolysis nor free fatty acid (FFA) release from fat tissue occur (40). A consequence of insulin resistance in fat tissue is that cAMP remains high, which activates PKA, which in turn activates LPL. This results in triglyceride degradation and FFA release into the blood. The lipogenic and anti-lipolytic effects of insulin are coordinated by the hormone's PI3K-mediated effects on SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), a transcription factor that plays an essential role in the activation of various genes involved in lipogenesis (acetyl-CoA carboxylase; fatty acid synthase; glycerol-3 phosphate acetyltransferase, etc.) (41), and in VLDL excretion (MTP, *Microsomal Transfer Protein*). Hence, in the absence of insulin activity, all these genes are repressed, and so is lipogenesis (42) (Fig. 1).

The effects of *insulin on the liver* slightly differ from those exerted on fat tissue and skeletal muscle, as insulin receptor phosphorylates another substrate –IRS-2 (43)– into tyrosine, which through PI3K and Akt-2/PKB phosphorylates and inactivates GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*), and the latter stops inhibiting glycogen synthase thus allowing an increase in the latter's activity (44). As a result, insulin increases glycogen synthesis in the liver. Liver insulin resistance results in opposite effects. It de-



#### Insulin resistance in adipose tissue and muscle:

No activation of SREBP → No activation lipogenic genes

No inhibition of PKA → phosphorylation (activation) of LPL →

lipolyse →

**Release of Free Fatty acids**

Fig. 1.- Mechanism of insulin action in the fat tissue and skeletal muscle.  
Mecanismo de actuación de la insulina en el tejido adiposo y en el músculo esquelético.

creases glycogen synthesis and increases glycolysis, glyconeogenesis, and glucose release into the circulation. In addition, insulin stimulates –also through IRS-2 and SREBP activation– the expression of lipogenic genes determining the synthesis of fatty acids in the liver (45).

Factors playing a role in insulin resistance are probably multiple (46-48). Steatosis itself has been implied, as well as oxidative stress, FFAs, TNF $\alpha$ , and –as intracellular mediators– ceramide, IKK $\beta$  (49), NF $\kappa$ B, PKC- $\theta$  (Protein Kinase C- $\theta$ ), JNK1 (Jun N-Terminal Kinase-1) (36,50-54), cytochrome CYP2E1 (55), and SOCS (56). The latter proteins interfere in insulin signal transmission, as they preclude IRS-1 and IRS-2 from coming into contact with insulin receptor (57) or induce proteasomal degradation for these substrates (58). Their overexpression in the liver induces insulin resistance and increased SREBP, which in turn originates steatosis (48). The role of *liver steatosis* in the pathogenesis of insulin resistance is supported by a number of observations. In the course

of liver steatosis of any origin, insulin resistance also develops in a secondary manner. For instance, insulin resistance commonly develops in lipodystrophies (59,60), disturbed mitochondrial  $\beta$ -oxidation (61), or VLDL secretion defects (62). Similarly, the feeding of rats with fat-rich diets induces hepatic insulin resistance (47). In lipodystrophies, subcutaneous and visceral fat is mobilized, hypertriglyceridemia develops, and fat deposition in the liver occurs. On the other hand, mice lacking fat tissue develop severe liver and muscle steatosis, inability to activate PI3K through IRS-2, and hepatic insulin resistance (63). We also have a number of studies demonstrating that insulin resistance correlates with liver fat deposition (64). Both FFAs and TNF $\alpha$  are likely to interfere in the transmission of insulin-generated signals on inducing IRS-1 phosphorylation in serine 307 –rather than tyrosine (65-68). Phosphorylation in this serine is incompatible with simultaneous phosphorylation in tyrosine. Both TNF $\alpha$  and FFAs possibly bring about this phosphoryla-

tion following JNK1 (*Jun-N-terminal Kinase-1*) activation (65,69,70). JNK1 overactivation has been demonstrated in mice with NASH (71). NFκB release secondary to IKK-β activation has been involved in the pathogenesis of oxidative stress-induced insulin resistance (72).

As previously mentioned, huge amounts of FFAs are released into the circulation as a result of insulin resistance-associated lipolysis. Abdominal fat lipolysis is particularly important in the pathogenesis of NAFLD (73). Thus, for instance, almost two thirds of liver fat deposits in NAFLD have been seen to derive from circulating FFAs (74), and the severity of liver steatosis has been shown to correlate with visceral fat tissue rather than subcutaneous or peripheral fat tissue values (75). Removal of subcutaneous fat by liposuction solves none of NAFLD-related metabolic disorders (76). Indeed, insulin resistance, peripheral adiponectin, TNFα, IL-6, CRP, insulin, glucose, etc. remain all unchanged following such fat removal. In contrast, a reduction of visceral fat improves insulin resistance and other metabolic disturbances associated with NAFLD (77). Visceral fat has been shown to be particularly resistant to insulin activity (78), and is thus more easily hydrolyzed. In addition, based on its strategic position in the circulation of portal blood, the

liver directly receives FFAs released during abdominal fat lipolysis. Fatty acid and glycerol plasma concentrations in patients and animals with NAFLD are strongly increased, and insulin can be seen to have a reduced capability in blocking the release of such lipolysis-derived products (79).

FFAs arriving in the liver activate nuclear receptor PPARα, which by forming a heterodimer with RXR (Retinoid X Receptor) induces the transcription of numerous genes involved in fatty acid catabolism and clearance (acyl-CoA oxidase, cytochrome P<sub>450</sub>, fatty acid-binding protein, microsomal triglyceride transfer protein, apolipoprotein B100, etc.) (80-82) (Fig. 2). Specifically, these proteins play a role in FFA utilization, triglyceride (steatosis) and phospholipid synthesis, glyconeogenesis (hyperglycemia), or oxidation in mitochondria, peroxisomes, or microsomes. These three oxidation types are highly significant, as they may contribute to the cell's oxidative stress. β-oxidation in mitochondria may lead to ROS (Reactive Oxygen Species) formation, mainly superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), during oxidative phosphorylation (83). β-oxidation in peroxisomes leads to hydrogen peroxide formation, whereas oxidation in microsomes—with the involvement of cytochrome P<sub>450</sub>—determines the for-

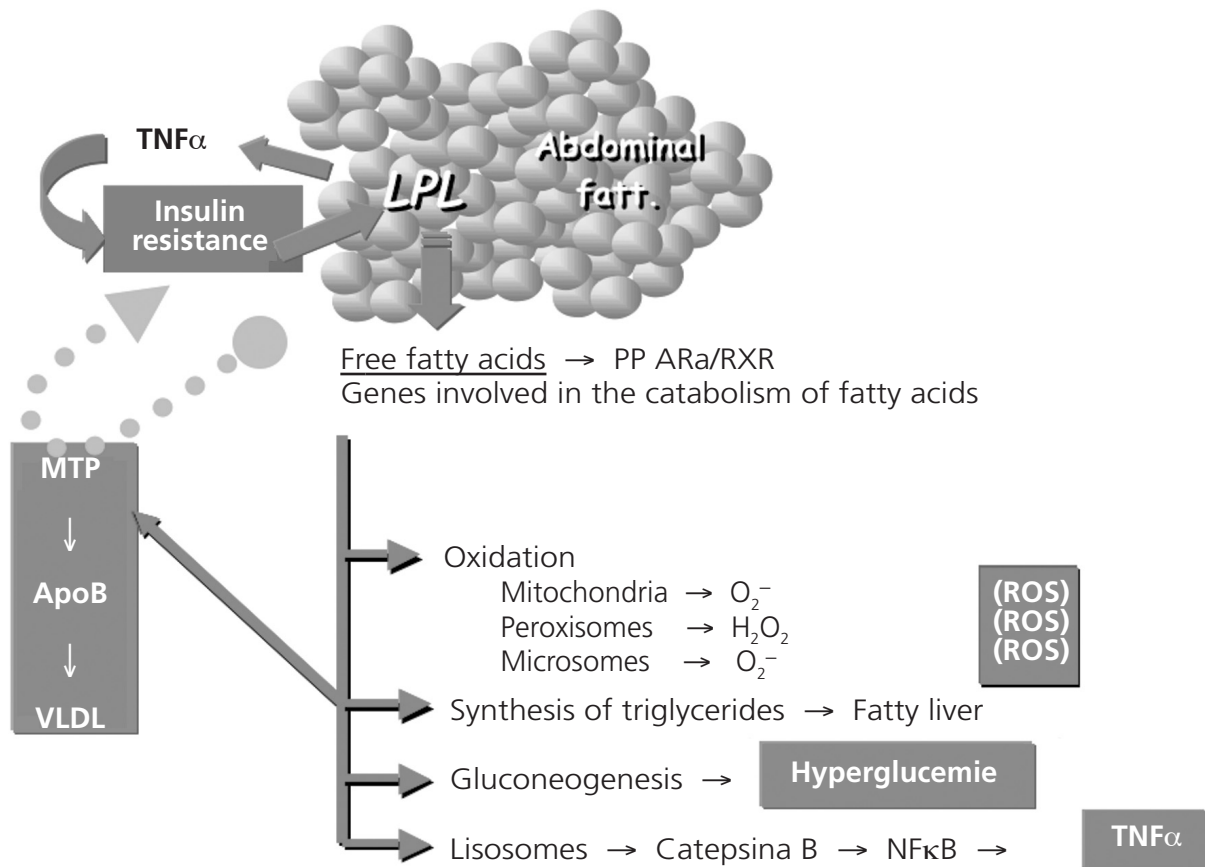


Fig. 2.- Consequences of increased free fatty acid uptake by the liver.  
Consecuencias del aumento de la llegada al hígado de ácidos grasos libres.

mation of superoxide anions and dicarboxylic acids. Triglyceride buildup in liver cells would result from liver FFA uptake in amounts greater than those that may be used or exported into the blood as VLDLs. To this day no altered incorporation of FFAs into triglycerides, phospholipids, or cholesterol esters has been demonstrated in patients with NAFLD (79). On the contrary, some studies have shown that triglyceride exports as VLDLs are reduced in patients with NAFLD due to their lower incorporation into apolipoprotein B100 (84,85). Polymorphisms in the MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) promoter have been seen in these patients that may explain such lipid export defect (86,87). MTP incorporates triglycerides into apolipoprotein B in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, thus giving rise to VLDL formation and facilitated lipid release from liver cells (88-90). When MTP activity is reduced, lipid export from hepatocytes decreases, cells retain their lipids, and liver steatosis ensues. Liver steatosis is a common occurrence in diseases with MTP mutations (91). In chronic HCV infection (mainly genotype 3), commonly associated with NAFLD, liver MTP activity is significantly decreased (92). Therefore, NAFLD's steatosis would on the one hand result from greater FFA uptake by the liver as a result of insulin resistance-derived lipolysis, and on the other hand from disturbed triglyceride export into the circulation as VLDLs (Fig. 2).

## FROM STEATOSIS TO NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

### Oxidative stress

If insulin resistance plays a fundamental role in the pathogenesis of fatty liver, then oxidative stress is probably pivotal in the evolution from steatosis to NASH and the more advanced lesions of NAFLD. It has been posited that NASH would result from two aggressions. The first one would be represented by fatty liver; the second by oxidative stress (93,94). We have plenty of evidence suggesting that oxidative stress is present in NAFLD. Patients and animals with this lesion have increased liver levels of malonic aldehyde (MDA) (95,96), 4-hydroxynonenal (4-HNE) (97), 3-tyrosine nitrated proteins (79,95,96), and 8-hydroxydeoxyguanosine (97,98), all of them markers for lipid, protein, and DNA oxidative lesion, respectively. Furthermore, blood thioredoxin levels, another oxidative stress marker, are elevated in NASH (99), while those of antioxidizing factors are decreased (96,100,101). Genes coding for most antioxidizing factors have an ARE (*Antioxidant-Response Element*) in common that responds to transcription factors Nrf1 and Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor*). These two factors act as heterodimers, and make up complexes with Small-Maf and other bZIF proteins (102). Nrfs factors are normally sequestered in the cytoplasm (103). When a cell suffers from oxidative stress, Nrfs factors are

translocated into the nucleus, bind AREs in antioxidizing genes, and induce their expression (104,105). The relevance of these antioxidizing factors in the pathogenesis of NAFLD is supported by studies in Nrf1<sup>-/-</sup> mice, which lack Nrf1 and develop a decreased expression of genes with AREs, steatosis, necrosis, apoptosis, liver inflammation, and pericellular and pericentral fibrosis, in addition to oxidative stress (106). Consistent with this is the finding that antioxidizing (*Glutathione S Transferase*) gene expression is diminished in patients with NAFLD (107).

The *consequences of oxidative stress* on cells are manifold. They induce cell membrane lipid peroxidation, and cell degeneration and necrosis, cell death by *apoptosis* (108,109), *proinflammatory cytokine* expression, liver stellate cell activation, and fibrogenesis (93,94,110).

### Source of oxidative stress

#### *The role of mitochondria*

While the source of oxidative stress in NASH is probably multiple (fatty acid oxidation, microsomal cytochromes, siderosis, cytokines, Kupffer cells, etc.), mitochondrial dysfunction seems to play a predominant role. Mitochondria are involved in both FFA  $\beta$ -oxidation and ROS generation (83,111-114). Several studies have shown that mitochondria in patients with NASH are abnormal from both a morphologic and a functional perspective. In these patients mitochondria are big, swollen, with scarce cristae, and usually with paracrystalline inclusions (79,115). These changes are very similar to those found in mitochondrial myopathies arising from disturbances in the mitochondrial respiratory chain (MRC) (116). In addition, [<sup>13</sup>C]CO<sub>2</sub> generation from <sup>13</sup>C-methionine and ATP resynthesis after fructose overload are severely reduced in patients with liver steatosis (117,118). Both problems suggest that mitochondrial function, in addition to mitochondrial morphology, is altered in patients with NASH.

Mitochondria are the primary site for FFA  $\beta$ -oxidation. A number of steps may be distinguished in this process (83,119):

( $\alpha$ ) *FFA uptake by mitochondria*. An enzyme, CPT-1 (*Carnitine Palmitoyl Transferase-I*) and a translocase play a role in this process, and long-chain fatty acids must be previously bound to carnitine. Once the fatty acid has entered the mitochondria and is found in the mitochondrial matrix, carnitine is released back into the cytoplasm. Carnitine depletion (120-122), CPT-I deficiency (123), or a defective translocase may alter fatty acid uptake by mitochondria, and prevent their  $\beta$ -oxidation. This may contribute to fatty acid retention in the cytoplasm, and their subsequent re-esterification in triglycerides (Fig. 3).

In a study by ourselves in patients with NASH we found normal intrahepatic levels of both free and total

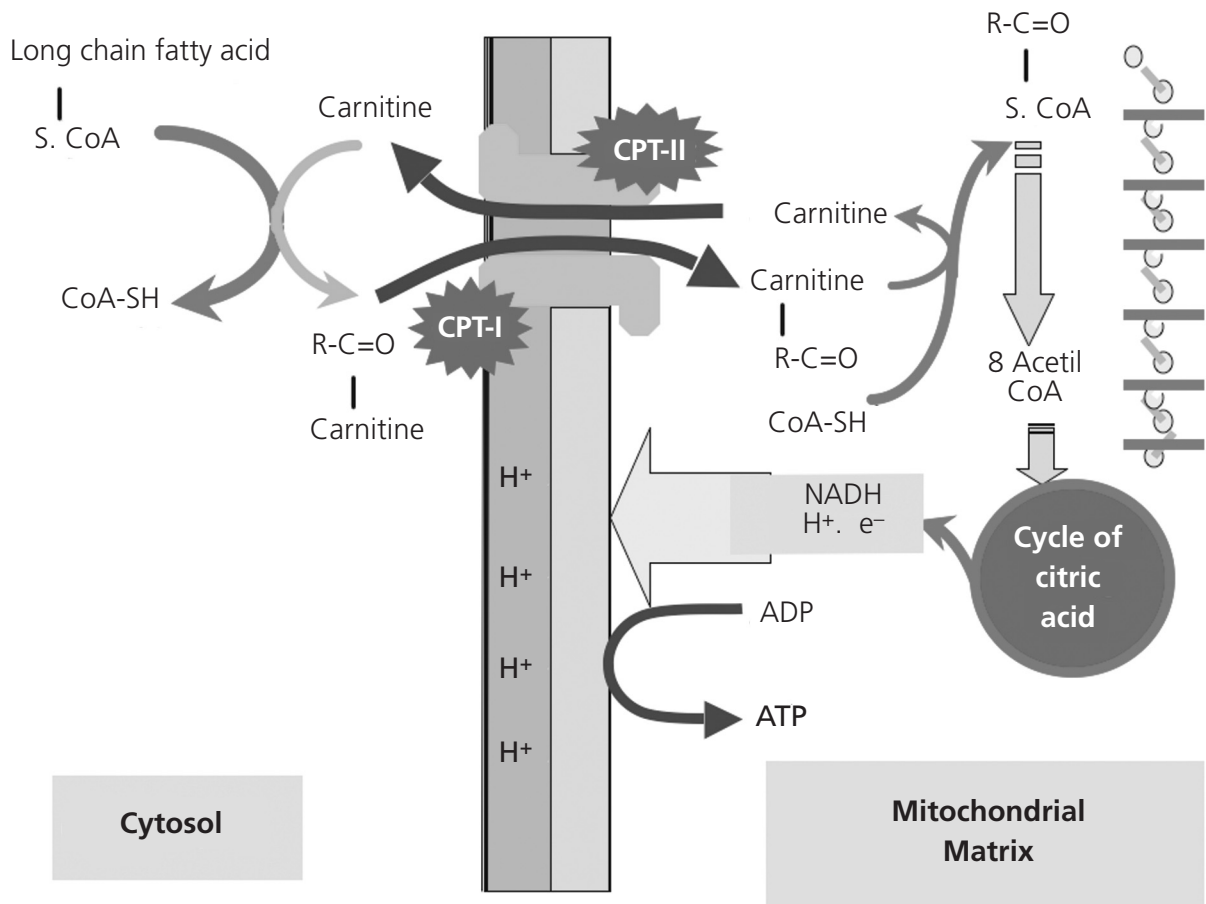


Fig. 3.- Mitochondrial metabolism of fatty acids.  
*Metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos.*

carnitine (124), which was consistent with other authors' findings in obese and alcoholic patients with fatty liver (122, 125); similarly, the measurement of CPT-I activity in the liver of patients with NASH revealed normal values (124), and hence we may not attribute cytoplasmic triglyceride build up to FFAs not entering the mitochondria.

(β) The second step in this *mitochondrial fatty acid oxidation* process includes a range of successive β-oxidations leading to acetyl-CoA and short-chain fatty acids-CoA formation, and NAD<sup>+</sup> to NADH conversion (126). Few studies have measured fatty acid β-oxidation in NAFLD. With indirect methods fatty acid β-oxidation has been presumed to be increased in these patients (79, 127). By directly measuring mitochondrial (palmitic acid) and peroxisomal (lignoceric acid) β-oxidation in *ob/ob* mice with NAFLD and NASH lesions we found that oxidation was significantly increased for both fatty acids (95). These results are consistent with the findings by Diehl's team in this same type of mice (128,129).

Such β-oxidation increase has been attributed to insulin resistance, and hence to increased lipolysis and FFA uptake in the liver (41,79). FFAs play a role in the activation of transcription factor PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$ ), which in turn activates the expression of genes involved in fatty acid β-oxidation (130,131) (Fig. 3).

(χ) NADH resulting from β-oxidation is re-oxidized to NAD<sup>+</sup> in a process designated *oxidative phosphorylation*, which leads to ATP formation. The latter represents the only energy source that may be used by cells. This phosphorylation includes a number of enzyme complexes located at the inner mitochondrial membrane (complexes I to V), which are designated the *mitochondrial respiratory chain* (MRC). In this chain NAD<sup>+</sup> and FADH<sub>2</sub> electrons pass from one complex to the next, and eventually combine with oxygen and protons to form water. This process is coupled with another concomitant one where mitochondrial matrix protons are sent to the intermembrane space of mitochondria, thus generating an electro-

chemical gradient between the matrix and this space. When these protons go back to the mitochondrial matrix via ATP synthase (complex V), they determine the conversion of ADP into ATP, and hence the electrochemical energy built up in the intermembrane space is used in the formation of cell-usable energy (83,119,132). Along this oxidative phosphorylation process some electrons usually escape, and give rise to ROS –mainly  $O_2^-$ – formation after binding mitochondrial matrix oxygen (133,134). When oxidative phosphorylation is deficient due to low MRC activity, not only ATP formation decreases, but electrons escaping the system increase and ROS formation is higher (126) (Fig. 4). As is the case with NASH, such ROS formation would be enhanced when liver FFA uptake and  $\beta$ -oxidation are increased. It is also enhanced in diabetes mellitus, where glucose oxidation represents a significant provision of electrons to MRC.

Information available on the function of oxidative phosphorylation and MRC in patients with NASH is very

limited. Caldwell et al. (115) found that MRC complex I and III activity was normal in platelet mitochondria from patients with NASH, and Sanyal et al. (79) found no defects in this chain's enzyme expression when studying muscle tissue from a patient with NASH. We have directly studied the activity of all MRC enzyme complexes in the liver of patients with NASH (124). In this study we were first to demonstrate that these complexes' activity was reduced by 30 to 50% *versus* control activity. This defect compromises both complexes with mitochondrial gene-encoded (complexes I, III, IV, V) and nuclear gene-encoded (complex II) components. Consistent with these findings were the reports by Haque et al. (135), who published that cytochrome c oxidase –one of MRC complexes– activity was reduced. While the cause of these enzymatic defects remained unexplained, we saw that these complexes' activity was inversely correlated to blood TNF $\alpha$  levels, body mass index, and HOMA index to assess insulin resistance (124).

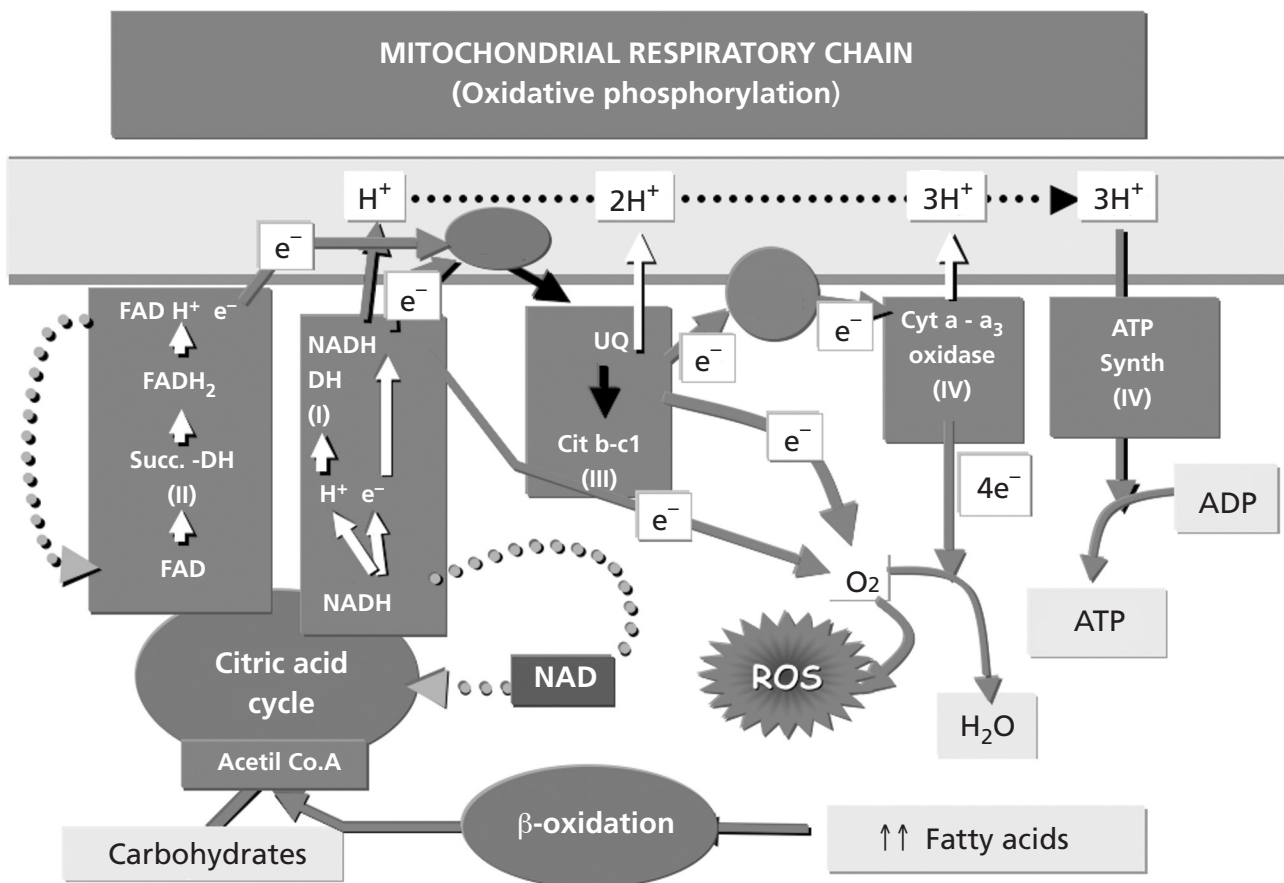


Fig. 4.- Mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation. Succ-DH: succinate dehydrogenase; NADH-DH: NADH-dehydrogenase; UQ: ubiquinone; Cyt: cytochrome; Synth: synthase; ROS: reactive oxygen species.

Cadena respiratoria mitocondrial y fosforilación oxidativa. Succ-DH: succinato deshidrogenasa; NADH-DH: NADH-deshidrogenasa; UQ: ubiquinona; Cyt: citocromo; Synth: sintetasa; ROS: sustancias reactivas derivadas del oxígeno.

In order to gain a deeper insight in the study of factors potentially responsible for MRC hypofunction, we used an animal NAFLD model that reproduces many of the disturbances commonly seen in humans. Mice of the *ob/ob* (*Lep<sup>o</sup>*) type have their leptin gene neutralized, and thus lack this hormone; as a result they experience polyfagia and weight gain, and develop insulin resistance, hyperglycemia, and hyperlipemia (136). Histological, the liver of animals studied by us had steatosis in 42% of hepatocytes, as well as hydropic degeneration, Mallory hyaline, and inflammatory infiltrates. That is, these animals met histological criteria for NASH. The study of MRC activity in these mice showed the presence of a defect similar to that found in patients with NASH. MRC enzyme activity was reduced by 40 to 60% *versus* healthy animals (137). Hence, these *ob/ob* mice seem to represent a fine experimental model to research the etiopathogenesis of mitochondrial dysfunction as found in patients with NAFLD.

MRC dysfunction as found in these mice allows to predict that both electron escape and ROS formation are likely increased in them (138). Indeed, the measurement of substances reacting with thiobarbituric acid (TBARS), a marker of oxidative stress, showed highly elevated levels. These findings are consistent with those already mentioned suggesting the presence of oxidative stress in the liver of patients with NASH (79,96,128,139-141).

### **Mitochondrial dysfunction mechanisms**

Mechanisms potentially involved in mitochondrial dysfunction either in patients with NAFLD or *ob/ob* mice are varied. One may well be *oxidative stress* itself. MDA and 4-HNE, two products resulting from cell lipid peroxidation, are known to inhibit cytochrome c oxidase (MRC complex IV) activity after making up a number of conjugates with this complex's peptides (142,143). Furthermore, ROS may damage both mitochondrial DNA (mtDNA) (144,145) and mitochondrial iron-sulfur cluster enzymes (138), thus leading to MRC hypofunction (146). Such mitochondrial DNA (mtDNA) lesions, which are difficult to repair in mitochondria (147), should impact the expression of complexes I, III, IV, and V in this chain, as mtDNA codes for 13 polypeptides making up these complexes. In accordance with this, Haqué et al. (135) found that patients with NASH had mtDNA depletion. The presence of oxidative stress in cells may initiate a series of vicious circles contributing to increase mtDNA damage, and to induce a greater mitochondrial disturbance (132,148).

Despite such evidence, findings in our studies with *ob/ob* mice do not support the role of oxidative stress as the causal factor for mitochondrial dysfunction. In effect, treating these animals with N-acetyl-cysteine (NAC) via the peritoneal route for 3 months markedly reduced liver TBARS concentration, but could not improve MRC com-

plex activity or liver histological lesions (95). NAC inability to improve NAFLD histology has been reported also by other authors (96). These results, together with the fact that MRC complex II activity –with components not encoded in mtDNA– is also diminished in NAFLD and *ob/ob* mice, render the role of oxidative stress in the pathogenesis of this mitochondrial defect uncertain. Nevertheless, it is essential that experiments are repeated using antioxidants preferentially acting on mitochondria –e.g., superoxide dismutase analogues– before definitely excluding the role of oxidative stress (149).

Another important factor to consider in the pathogenesis of mitochondrial dysfunction is TNF $\alpha$ . There is strong evidence available advocating for the role of this cytokine in the pathogenesis of NASH (150,151). High blood TNF $\alpha$  levels have been found in patients with NASH (124,152-155), and we found that reduced MRC activity correlated with increased blood TNF $\alpha$  (124). In *ob/ob* mice we saw that TNF $\alpha$  concentrations in liver tissue were some 20-fold higher than in normal mice (137). In a previous study we demonstrated that treating cells with TNF $\alpha$  increases ROS, decreases messenger RNA for some ATPase components, and reduces the number of peptides making up ATPase and cytochrome c oxidase (156). The source of this hepatic TNF $\alpha$  is likely not one, since fat tissue, as well as hepatocytes and Kupffer cells may produce TNF $\alpha$  (150,157,158). Abdominal fat tissue may be a significant source for liver TNF $\alpha$ , as its passage through the liver is mandatory. In obese subjects fat tissue is infiltrated by macrophages (159,160), which may release TNF $\alpha$  besides adipocytes themselves (161). Preadipocytes exhibit some antimicrobial and phagocytic properties, just as macrophages do, and may also potentially transdifferentiate themselves into macrophages (162). Potential stimuli for TNF $\alpha$  release are varied (adipocyte cytokines, lipoperoxide phagocytosis, endotoxins). Furthermore, FFAs released during abdominal fat lipolysis may themselves induce TNF $\alpha$  expression both in the adipose tissue (163) and hepatocytes (164). This effect would occur via NF $\kappa$ B activation. FFAs would give rise to Bax translocation into lysosomes, and facilitate cathepsin B release to the cytoplasm, which would –via IKK $\beta$ – activate NF $\kappa$ B (165).

Increased TNF $\alpha$  production would be a part of the *chronic liver inflammation* status that is present in liver steatosis. As a result of oxidative stress and FFA liver uptake Kupffer cells, IKK- $\beta$ , and NF $\kappa$ B would become activated (165, 166). This transcription factor increases gene expression for TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-8, IL-6, and IL-1 $\beta$ , among other factors. These may reproduce many of the histological changes usually found in NAFLD. For example, IL-8 induces neutrophil chemotaxis, TNF $\alpha$ , hepatocyte necrosis/apoptosis, TGF $\beta$ , stellate cell activation, liver fibrosis, and Mallory body formation.

Biological effects by TNF $\alpha$  may be antagonized by *adiponectin* (167). This is an adipocyte-produced hormone with antilipogenic effects that inhibits fat from



building up in the liver and other non-fat tissues, and hence prevents NAFLD, NASH, and liver inflammation and fibrosis development (168-171). The administration of recombinant adiponectin to *ob/ob* mice reduces hepatomegaly, fatty acid synthesis, and inflammation, while increasing fatty acid oxidation at the same time (168). Mice producing no adiponectin develop severe fibrosis following exposure to  $CCl_4$ , but this effect may be avoided if mice are infected with an adiponectin-expressing adenovirus (169). The antiinflammatory effect is probably exerted through a number of mechanisms, including reduced TNF $\alpha$  production by fat-tissue macrophages (167,172), NF $\kappa$ B pathway inhibition via AMPc (173), and inhibited macrophage activation (174). Decreased steatosis results from PPAR $\alpha$  and cAMP-dependent kinase activation. This increases fatty acid oxidation and lipid export, and decreases lipogenesis (175). Via this same pathway, adiponectin enhances insulin sensitivity (176-179), and may revert many NAFLD-related disturbances. Decreased fibrosis is mediated by its antiproliferating and apoptotic effects on liver stellate cells (171). In metabolic syndrome, including NAFLD, blood adiponectin levels are decreased (153,180-182), which relates to central fat extent, increased liver steatosis, and liver insulin resistance (183,184). In contrast with other adipokines, circulating adiponectin levels are lower in obese subjects, particularly in visceral obesity. When visceral fat is diminished by losing weight, circulating adiponectin –and adiponectin mRNA– levels significantly increase in fat tissue (162). These changes are concurrent with and opposed to those experienced by TNF $\alpha$  and IL-6. These two cytokines inhibit adiponectin mRNA expression.

In a previous study, we found proof of TNF $\alpha$ 's negative effect on mitochondria. This cytokine induced relevant morphologic and functional changes on mitochondria. After incubating cells with TNF $\alpha$  for 8 hours, mitochondria swelled, became rounded, lost their septa, lightened their matrix, and broke their external membrane (185). In addition, our study revealed that TNF $\alpha$  may interfere with electron flow in MRC complexes I and III (185,186). This cytokine determines electron retention in cytochrome *b*, so the latter may donate such retained electrons to oxygen so that superoxide anions are formed (185). In fact, many NAFLD-related disorders may be explained by TNF $\alpha$ 's biological effects, as this factor not only induces MRC dysfunction, but also increases cell resistance to insulin, induces the expression of several proinflammatory cytokines and enzymes (including iNOS [*Inducible Nitric Oxide Synthase*], and brings about cell death by apoptosis or necrosis, among other things.

The critical role of TNF $\alpha$  in the pathogenesis of NAFLD and mitochondrial dysfunction is supported by results obtained in *ob/ob* mice treated for 3 months with anti-TNF $\alpha$  (infliximab) through the peritoneal route. While this therapy was insufficient to fully normalize

TNF $\alpha$  levels in liver tissue, it did suffice to strikingly normalize or improve complex I, II, III, and V activity, to decrease  $\beta$ -oxidation activity, and to regress liver histology almost to normal (95). The effect we observed on  $\beta$ -oxidation has also been seen by Li et al. (128), and may be attributed to TNF $\alpha$  actions on insulin sensitivity (99, 187), oxidative stress (99), and stearyl-CoA desaturase (128), an enzyme involved in fatty acid synthesis (188).

Simultaneous improvement of mitochondrial dysfunction and histological lesions after therapy with anti-TNF $\alpha$  antibodies allows to advocate for a role of TNF $\alpha$  in the pathogenesis of both disorders, and suggest that mitochondrial defects may well participate in lesion development.

The multiple biological effects of TNF $\alpha$  include iNOS expression induction (189), particularly when its activity is combined with that of IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , and endotoxin (190). This enzyme catalyzes L-arginine oxidation in the presence of oxygen to give nitric oxide (NO). A normal liver expresses only endothelial NOS. However, under given circumstances –for example, under the effects of TNF $\alpha$ – liver iNOS expression strikingly increases, and the liver generates great amounts of NO (191). This TNF $\alpha$  effect is mediated by transcription factor NF $\kappa$ B (192), whose activity is greatly increased in *ob/ob* mice (128). In our study we found that the liver of these mice had, in addition to significantly increased levels of TNF $\alpha$ , also a marked induction of mitochondrial iNOS. Such enzymatic induction is no doubt dependent upon TNF $\alpha$ , as its expression dramatically decreased in obese mice treated with anti-TNF $\alpha$ , and approached control levels. The study by Laurent et al. also supports a non-activation of the iNOS pathway in *ob/ob* mice (128), as very high nitrite, nitrate, and 3-tyrosine nitrated protein concentrations were found in the liver.

These findings may have pathogenic implications, since NO and other nitrogen-derived reagents may alter both mitochondrial and MRC function (193). Indeed, NO reacts with cytochrome c oxidase (*complex IV*), interrupts electron passage, and blocks their binding of oxygen (194). On the other hand, peroxynitrite (ONOO $^-$ ), a product resulting from NO reaction with O $_2^-$ , is an activity inhibitor for various proteins, including some MRC components (195,196). *In vitro* studies have shown that peroxynitrite may inactivate complexes I, II, V, cytochrome *c* (196-198), and also complex III under selected circumstances (199). Mechanisms through which peroxynitrite exerts these effects are varied and include its oxidative potential (200), and its ability to damage DNA (201), nitrate protein tyrosine residues, and generate 3-tyrosine nitrated proteins (202). The presence of 3-tyrosine nitrated proteins in tissues is a marker of tissue aggression by peroxynitrite radicals (203). Hence, we searched for such proteins in the liver of *ob/ob* mice.

Using immunofluorescence techniques we found that 3-tyrosine nitrated proteins was largely increased in obese mice when compared to control mice. These find-

ings suggest that liver proteins in obese mice have been damaged by peroxynitrite radicals or derivatives. To gain a deeper insight on the origin of 3-tyrosine nitrated proteins, we looked for these proteins in a mitochondrial protein extract. Also in this case we saw that proteins in these organelles had been damaged by peroxynitrite. Moreover, after immunoprecipitating these proteins with anti-3-nitrotyrosine, we observed that a number of MRC components, at least cytochrome *c* and protein ND4, a component of complex I, had been 3-tyrosine nitrated.

Considering that MRC enzyme nitration is associated with a decrease in their catalytic activity (204), such nitration is likely to have been responsible for their low enzyme activity. In order to assess the role of peroxynitrite and reactive derivatives (205) in the pathogenesis of this disorder, we treated *ob/ob* mice with uric acid through the intraperitoneal route for three months. This acid rapidly reacts with peroxynitrite to form inactive nitrogenous urates (205,206). Therefore, uric acid is considered a natural neutralizer for peroxynitrite (205,207) and reactive derivatives (205,206). Treating mice with uric acid has been shown to reduce 3-tyrosine nitrated protein formation (205,206), and to prevent neurologic lesion progression in multiple sclerosis experimental model (203,208). Uric acid therapy effects in *ob/ob* mice were dramatic, as liver lipoperoxide and 3-tyrosine nitrated protein levels decreased, specifically decreasing cytochrome *c* and MRC ND4 peptide 3-tyrosine nitration. These effects were associated with a normalization of MRC complexes I and V activity, and a marked improvement of complexes II and III. Finally, this therapy led to the regression of liver lesions, and a recovery of the liver structure's normal appearance. Uric acid effects on liver lesions support the role of peroxynitrite not only in MRC dysfunction, but also in the pathogenesis of lesions.

Results from our studies prompt us to suggest that liver TNF $\alpha$  –probably from abdominal fat tissue or enhanced expression in hepatocytes by FFAs– induces iNOS, and hence a greater formation of NO. This radical, when in the presence of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, originates peroxynitrite radicals, which would bind MRC proteins and determine a decrease in their activity. Similar effects to those reported with uric acid have been seen when *ob/ob* mice were treated with MnTBAP (*Manganese [III] 5,10,15,20 Benzoic Acid Porphyrin*), an analogue of Mn superoxide dismutase (MnSOD) that turns O<sub>2</sub><sup>-</sup> into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (96). Besides a reduction in oxidative phosphorylation and ATP formation, decreased MRC enzyme activity increases the number of electrons escaping the system; these electrons bind oxygen and then give rise to ROS formation. Such electron leak would be particularly high in situations where FFA provision to the liver for mitochondrial oxidation –as is the case with NAFLD– is elevated. This would be the origin of higher lipoperoxide levels as found in the liver of these obese mice.

### *Other sources of oxidative stress*

While mitochondrial dysfunction plays a predominant role in ROS generation, ROS may also come from FFA oxidation in peroxysomes and microsomes, and from Kupffer cell activation. In the obese and in patients with NASH, *CYP2E1* activity is increased (209-213), likely induced by FFAs or ketones (214). This microsomal enzyme, besides taking part in the degradation of xenobiotics, induces FFA  $\omega$ -oxidation (215), during which ROS are generated (216,217). The real significance of ROS from this source in the pathogenesis of human NASH remains to be demonstrated. *Kupffer cells* may also generate ROS via the NADPH-oxidase system (218). In experimental NASH models these cells have been shown to be activated, and to possess a high number of endotoxin receptors (166,219,220). Various factors may play a role in these cells' activation. One would be lipoperoxide phagocytosis; another, the phagocytosis of endotoxins from the intestine (219).

### **Consequences of oxidative stress**

ROS may induce *lipid peroxidation*, particularly for unsaturated fatty acids in cell membranes. The impact of such aggression is manifold.

1. On the one hand it has an impact on membrane *physico-chemical properties*, which in turn has an impact on membrane receptor and enzyme activity, antigen expression, intercellular interactions (221-223), and *membrane permeability*. Changes may occur that compromise cell viability (passage of calcium into cells) (224) and condition cell death through *necrosis* as a result of the latter.

2. A lesion characteristic of NASH is *liver fibrosis*. It initially has a pericellular and pericentral distribution in Rapaport's lobule area 3, but in advanced stages alters lobule architecture and takes on the pattern of *micronodular cirrhosis*. Cells primarily involved in the production of such fibrosis include *liver stellate cells* (LSCs). In a normal liver LSCs are in a latent state, and cannot produce extracellular matrix components. When the liver is damaged these cells become activated, change their morphology and function, and synthesize the various components of extracellular matrix (225-227). In human and experimental NASH, these cells have been shown to be activated and in greatly increased numbers (228-230). Mechanisms conducing to liver fibrosis in NASH are probably multiple.

$\alpha$ ) *Oxidative stress* may induce LSC activation, and hence help stimulate liver fibrogenesis. This effect may occur following the activation of transcriptional factors NF $\kappa$ B and c-Myb. ROS may lead to I $\kappa$ B degradation in the cytoplasm, which conditions the release of transcription factor NF $\kappa$ B and its nuclear translocation (231). This effect would follow IKK (I $\kappa$ B Kinase) activation and I $\kappa$ B

phosphorylation. In activated LSCs NF $\kappa$ B activity is increased and NF $\kappa$ B p50/p65 heterodimer may be found in the nucleus. Similarly, oxidative stress may induce gene expression of factor c-Myb and its binding to DNA (232). This transcription factor may play a role in the expression of smooth muscle actin, and in LSC contractility, differentiation, and proliferation (233). These cells may become activated by the phagocytosis of *apoptotic bodies* resulting from hepatocyte death (234).

$\beta$ ) In addition, lipid peroxidation-derived *reactive aldehydes*, including MDA and 4-HNE, may take part in liver fibrogenesis. Indeed, Chojkier et al. (235) showed that MDA significantly increased the expression of messenger RNA (mRNA) for collagen  $\alpha$ 1(I) in human fibroblast cultures. Maher et al. (236,237) found that collagen synthesis doubled up when fibroblasts were cultured with MDA. Findings consistent with these were reported by other investigators (238-241). While mechanisms of this effect are not unique, conjugates made up of reactive aldehydes with protein amino acids or sulphhydryl radicals are likely to play a role (242). Such conjugate formation has been demonstrated in animal models with lipid peroxidation induction, and in a number of clinical circumstances with active fibrogenesis (241,243-247). On the other hand, antioxidant therapies decrease the formation of such conjugates, and prevent fibrogenesis (241,246,248). In a previous study we found evidence that aldehyde conjugates are involved in increased collagen expression (110,249.), since treating cells with p-hydroximercuribenzoate (pHMB) or pyridoxal-5'-phosphato (P5P) abolished the effects of both MDA and an oxidizing combination (ferrous chloride, ascorbic acid, cytric acid) on collagen expression. In these studies we determined that these aldehydes exert their effects through elements located between sequences -116 and -110 pb in the collagen  $\alpha$ <sub>1</sub>(I) promoter, and that transcription factors Sp1 and Sp3 act as mediators for this stimulus. These factors recognize G+C-rich sequences (250), and act as expression stimulating factors for a wide variety of genes, including the collagen  $\alpha$ 1(I) gene (250-254).

$\chi$ ) In patients with insulin resistance and NASH, blood *leptin* levels are usually increased (255). Leptin is a 16 kDa peptide expressed by gene *obese* (Ob) (256) that is released by adipocytes and has varied metabolic effects, with the most significant of these being related to body weight and energy expenditure (257). TNF $\alpha$  is a major inducer (258). Together with metabolic effects, it has been seen to exert a powerful fibrogenic effect (259). Leptin-lacking *ob/ob* mice are particularly resistant to liver fibrosis development (260,261), but lose such resistance when exogenous leptin is administered (260). On the other hand, leptin administration enhances fibrosis as induced by other aggressions (262). High circulating leptin levels, which relate to fibrosis severity (266), have been found in patients with chronic hepatitis C, alcoholic liver disease, or NASH (255,263-265).

The mechanisms through which leptin exerts these fibrogenic effects require further study, but several have been mentioned. Some have found that leptin directly stimulates LSCs (259,267), and others that this effect would be indirectly exerted after inducing TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) release from Kupffer, stellate, and endothelial cells (259-261,268). Some have shown evidence that it may delay extracellular matrix degradation after increasing TIMP-1 expression (269), and others that it stimulates LSC proliferation (270) and inhibits LSC apoptosis (271). Finally, leptin may induce oxidative stress by acting on MRC (272,273). It might well activate the aforementioned fibrogenic mechanisms through such oxidative stress.

$\delta$ ) Other fat tissue hormones may also behave in a fibrogenic manner. *Angiotensin II* and *norepinephrine* may act directly on LSCs and induce their activation (274, 275). *Osteopontin* may lead to this through its proinflammatory effects (276). Mice lacking osteopontin have been seen to be protected against liver inflammation and fibrosis when on a choline-methionine-deficient diet.

$\epsilon$ ) *Steatosis* itself may be a fibrogenesis-stimulating factor. NAFLD may exhibit fibrosis in the absence of necroinflammatory activity (228-277), fibrosis extent as experimentally induced is influenced by dietary fat types (278).

$\phi$ ) Another factor closely linked to obesity, liver steatosis, and the progression of liver disease –including chronic hepatitis C and NASH– is type-2 diabetes mellitus and insulin resistance (279,280). Type-2 diabetes includes peripheral insulin resistance, and high blood insulin levels, hence insulin may likely play some role in fibrosis progression. In fact, Hickman et al. found a significant association between blood insulin levels and increased fibrosis (281). Similarly, other authors have confirmed such association of insulin resistance with fibrosis severity in chronic hepatitis C (282,283). In this regard LSCs have been shown to possess insulin receptors, and thus this hormone may contribute to these cells' proliferation (284). This proliferative effect of insulin may take place by stimulating the MAPK (*MAP kinase*) pathway (285), which is closely related to cell growth. In addition, insulin increases TGF $\beta$  (286) and CTGF production (287).

$\gamma$ ) Finally, LSC and hence fibrogenesis activation may be an indirect consequence of hepatocyte *apoptosis*. This type of cell death yields apoptotic body formation –these bodies are phagocytosed by macrophages or LSCs themselves, determine TGF $\beta$  release, and the latter activates LSCs (288,289).

3. NF $\kappa$ B activation, which brings about oxidative stress, may explain the *chronic inflammatory status* of the liver in NAFLD (165,166), as it induces the expression of genes for numerous proinflammatory factors, including TNF $\alpha$  (290), interleukins 2, 6 and 8, ICAM-1 (291), MCP-1 (292), MIP-2 (293), CINC (*Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*) (294), and several

proinflammatory enzymes (lipoxygenase, cyclooxygenase, iNOS) (231). At this point, TNF $\alpha$ , on activating NF $\kappa$ B, starts a new vicious circle that helps increase inflammation. Our studies (95), as those by Li et al. (128), show that treating *ob/ob* mice with anti-TNF $\alpha$  reverts or deletes liver infiltrates. On the other hand, the binding of reactive aldehydes (MDA, 4-HNE) to hepatocyte surface proteins may modify these proteins' antigenic structure and initiate an immune response contributing to the inflammatory response seen in patients with NASH (295).

4. While mechanisms leading to *Mallory hyaline* formation are little understood, reactive aldehydes resulting from oxidative stress and TGF $\beta$  are also likely involved. In effect, TGF $\beta$  may activate transglutaminase, and the latter may result in the formation of cytokeratin polymers by establishing transversal links between lysine molecules in some cytokeratin chains and glutamine molecules in other cytokeratin chains (296).

5. In NASH hepatocyte death results not only from necrosis but also from *apoptosis* (297-300). Several pathways and factors may lead to this programmed death, including oxidative stress itself, TNF $\alpha$ , and FFAs. ( $\alpha$ ) ROS increase the expression of Fas receptors in the surface of hepatocytes, and thus may induce death by apoptosis (297). This effects has been attributed to NF $\kappa$ B activation, as this factor may increase cell death receptor expression (301,302); however, NF $\kappa$ B mainly behaves as a cell survival factor by inducing the expression of various enzymes (Mn-SOD, iNOS) or multiple antiapoptotic factors (Mcl-1, cFLIP, IAPs, Bcl-XL, A1) (192,303). The binding of *Fas ligand* to *Fas receptor* initiates a cascade of events in which the binding of adapting protein FADD (Fas-Associated Death Domain) to Fas, caspase 8 activation with eventually caspase 3 activation (304), Bid (*BH3 interacting domain death*) cleavage (305), fragment tBid translocation to the outer mitochondrial membrane, and binding of Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) and Bax (*Bcl-2-associated X protein*) by this fragment –which induces these proteins' activation and increased mitochondrial membrane permeability– all play a role. In this way cytochrome *c* and other proapoptotic proteins leave the mitochondrial intermembrane space [Smac/DIABLO (*Second mitochondrial-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI*); AIF (*Apoptosis inducing factor*), endonuclease G] (306-309) and enter the cytoplasm. In the cytoplasm cytochrome *c* forms a complex with cytosol factor Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*), ATP, and procaspase 9 (apoptosome), which leads to the latter's activation, and then to procaspase 3 activation (310-312). Caspase 3 starts cell degradation and death by apoptosis (313). This latter process includes DNA degradation, nuclear and cellular fragmentation, and *apoptotic body* formation. These bodies may undergo phagocytosis by macrophages and other neighboring cells, and become fully degraded in their lysosomes. Another consequence of cytochrome *c* leaving mitochondria is that it interferes with electron flow through MRC.

As a result, ROS formation increases (314), and a new vicious cycle begins, which will worsen the disturbance.

Oxidative stress through NF $\kappa$ B activation may induce TNF $\alpha$  formation, and this factor may in turn induce apoptosis in hepatocytes (315,316). In fact, this cytokine may originate cell death both by apoptosis and necrosis, depending upon the cell's energy status, as apoptosis is an active process using up huge energy amounts (317). TNF $\alpha$  action follows a pathway partly similar to that of FasL, as on binding its receptor (TNFR-1) forms a complex (complex I) made up with TRADD (*TNF Receptor-Associated Protein with Death Domain*), RIP (*Receptor-Interacting Protein*), and TRAF-2 (*TNF Receptor-Associated Factor-2*). This complex initiates a survival pathway where NF $\kappa$ B, Bcl<sub>XL</sub>, Mcl-1, Gadd45 $\beta$ , c-FLIP, IAPs, and A1 play a role (303,318,319). On the other hand, this molecular complex undergoes a number of changes and gives rise to another complex known as DISC (*Death-inducing signaling complex*) (complex II), which is bound by FADD. This leads to the activation of caspase 8, and the latter cleaves Bid to its truncated form, tBid, which permeabilizes mitochondria as was mentioned above (316). In addition, after the binding of TNF $\alpha$  to its receptor, sphingomyelinase becomes activated and generates ceramide from cell membrane-derived sphingomyelin (316). Ceramide induces cell apoptosis through various pathways, including its direct action on mitochondrial membrane pores, and inducing glutathione depletion (320,321). Furthermore, in previous studies in our laboratory (156) we showed that, at least partly, TNF $\alpha$ -related cytotoxicity is mediated by ROS.

To conclude, *fatty acids* may also play a relevant role in cell death. Evidence suggests that fatty acid accumulation in non-adipose cells is associated with cell dysfunction and death (322,323). This phenomenon has been designated *lipotoxicity*. This toxicity may contribute to the pathogenesis of various conditions. For instance, long-chain fatty acid deposition in pancreatic  $\beta$  cells or cardiomyocytes of diabetic rats induces death in these cells (324,325). The severity of cardiomyopathy in diabetic patients has been seen to be related to the extent of myocardial triglyceride deposition (326). The mechanism through which triglyceride or FFA deposition results in these lesions or dysfunction is unknown. Fibroblasts and endothelial cells exposed to high long-chain saturated fatty acid concentrations reduce their proliferation and die (327). Death has been suggested to occur by apoptosis, which has been at least demonstrated in cardiomyocytes, pancreas  $\beta$  cells, and hematopoietic cells exposed to palmitic or stearic acid (328, 329). These proapoptotic effects would develop through at least two different mechanisms: a) by increasing lysosomal permeability, thus facilitating cathepsin B release, and favoring TNF $\alpha$  expression (164); b) by increasing mitochondrial permeability through JNK, thus facilitating cytochrome *c* release (330). Some authors have implicated ceramide as a second messenger for cell death. This mediator derives

from sphingomyelin hydrolysis in cell membranes, and is used by TNF $\alpha$  to induce cell apoptosis (331). As was mentioned above, ceramide favors mitochondrial pore aperture, but other cell targets such as increased nitric oxide (332,333), CAPK (Ceramide-Activated Protein Kinase), PKC $\zeta$  (Protein Kinase C $\zeta$ ), "CAPP (Ceramide-Activated Protein Phosphatase), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), and NF $\kappa$ B (334,335) have been considered as well.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was performed with Investigation Grant number 08/2005 from "Fundación Mutua Madrileña", Madrid, Spain.

## REFERENCES

- French SW, Nash J, Shitabata P, Kachi K, Hara C, Chedid A, et al. Pathology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993; 13: 154-9.
- Harrison DJ, Burt AD. Pathology of alcoholic liver disease. In: Hayes PC, editor. *Alcoholic Liver Disease*. Bailliere's Clin Gastroenterol 1993; 7: 641-62.
- Liu YC. Histopathology of alcoholic liver disease. In: McCullough AJ, editor. *Alcoholic liver Disease*. Clin Liver Dis 1998; 2: 753-63.
- Zelman S. The liver in obesity. *Arch Intern Med* 1952; 90: 141-56.
- Werswater JD, Fainer D. Liver impairment in the obese. *Gastroenterology* 1958; 34: 686-93.
- Thaler H. Die Fettleber und ihre pathogenetische Beziehung zur Lebercirrhosis. *Virchows Arch Path Anat* 1962; 335: 180-210.
- Thaler H. *Leber Biopsie*. Berlin:Springer-Verlag; 1969. p. 176.
- Thaler H. Die Fettleber, ihre Ursachen und Begleitkrankheiten. *Dtsch med Wschr* 1962; 87: 1049-55.
- Kern WH, Heder AH, Payne JH, DeWind LT. Fatty metaporphosis of the liver in morbid obesity. *Arch Oathol* 1973; 96: 342-6.
- Galambos JT, Wills CE. Relationship between 505 paired liver tests and biopsies in 242 obese patients. *Gastroenterology* 1978; 74: 1191-5.
- Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med* 1979; 67: 811-6.
- Creutzfeldt W, Frerichs H, Sickinger K. Liver diseases and diabetes mellitus. In: Popper H, Schaffner F, editors. *Progress in liver diseases*. Vol. III. London: William Heinemann Med Books Ltd; 1970. p. 371-407.
- Falchuk KR, Fiske SC, Haggitt RC, Federman M, Trey C. Pericellular hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetic mellitus. *Gastroenterology* 1980; 78: 535-41.
- Itoh S, Tsukada Y, Motomure Y, Ichinoe A. Five patients with non-alcoholic diabetic cirrhosis. *Acta Hepatogastroenterol* 1979; 26: 90-7.
- DeWind LT, Payne JH. Intestinal bypass surgery for morbid obesity. Long-term results. *JAMA* 1978; 236: 2298-301.
- Campbell JM, Hung TK, Karam JH, Forsham PH. Jejunoileal bypass as a treatment of morbid obesity. *Arch Intern Med* 1977; 137: 602-10.
- Ludwig J, Viggiano RT, McGill DB. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 342-8.
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparal N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-9.
- Brunt EM, Janney CG, 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.
- Caldwell SH, Hylton AI. The clinical outcome of NAFLD including cryptogenic cirrhosis. In: Farrell GC, George J, Hall PM, McCullough AJ, editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden; 2005. p. 168-80.
- Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case study. *Hepatology* 2000; 32: 689-692.
- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-9.
- Ioannou GN, Weiss N, Kowdley KV, Dominitz JA. Is obesity a risk factor for cirrhosis-related death or hospitalization? A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2003; 125: 1053-9.
- Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino 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.
- Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-21.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
- George J, Farrell GC. Practical approach to the diagnosis and management of people with fatty liver disease. In: Farrell GC, George J, Hall PM, McCullough AJ, editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ. Ltd. Malden. 2005: 181-93.
- Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: An agenda for clinical research. *Hepatology* 2002; 35: 746-52.
- McCullough AJ. The epidemiology and risk factors of NASH. In: Farrell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ, editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden 2005: 23-37.
- Moreno Sánchez D, Solís Herruzo JA, Vargas Castrillón J, Colina Ruiz-Delgado F, Lizasoain Hernández M. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio clínicoanalítico 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: 563-8.
- National Institute of Health. The third report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Bethesda MA: National Institute of Health. 2001: NIH Publications 01-2610.
- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi G, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-5.
- Samuel VT, Shulman GI. Insulin resistance in NAFLD: Potential mechanisms and therapies. In: Farrell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ, editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden; 2005. p. 38-54.
- Marchesini G, Bugianesi E. NASH as part of the metabolic (insulin resistance) syndrome. In: Farrell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ, editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden; 2005. p. 55-65.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999; 103: 931-43.
- Saltier AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
- 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. *Hepatology* 2002; 35: 373-9.
- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani H, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6286-96.
- Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern

- activation properties in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273: 215-21.
41. Senyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. In: Arroyo V, Navasa M, Foros X, Bataller R, Sánchez-Fueyo A, Rodés J. editors. Update in treatment of liver disease. Barcelona: Ars Medica; 2005. p. 279-96.
  42. De Fronzo RA, Ferranini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-94.
  43. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275: 38990-4.
  44. Cross DA, et al. Inhibition of glycogen synthetase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378: 385-9.
  45. López JM, Bennett MK, Sánchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: A mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1049-53.
  46. Perseghin G, Peterson K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: S6-S11.
  47. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic resistance in non alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 3245-53.
  48. Ueki K, Kondo T, Tseng Y-H, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10422-7.
  49. Gao Z, et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor  $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem* 2002; 277: 48115-21.
  50. Shepherd PR, Kahn BB. Glucosa transporters and insulin action: implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 248-57.
  51. Buglianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 987-1000.
  52. Combettes-Souverain M, Issad T. Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* 1998; 24: 477-89.
  53. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al. Tissue-specific overexpression of lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7522-7.
  54. Kim SP, Ellmerer M, Van Citters GW, Bergman RN. Primacy of hepatic insulin resistance in the development of metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes* 2003; 52: 2453-60.
  55. Schattenberg JM, Wang Y, Sing R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signalling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-94.
  56. Farrell GC. Signalling links in the liver. Knitting SOCS with fat and inflammation. *J Hepatol* 2005; 43: 193-6.
  57. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling I (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5434-46.
  58. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson SE, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002; 277: 42394-8.
  59. 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.
  60. Sutinen J, Hakkinen AM, Westerbacka J, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Halavaara J, et al. Increased fat accumulation in the liver in HIV-infected patients with antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16: 2183-93.
  61. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300: 1140-2.
  62. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, et al. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 2005; 128: 1381-90.
  63. Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 2000; 275: 8456-60.
  64. Tikkanen M, Tamminen M, Hakkinen AM, Bergholm R, Vehkavaara S, Halavaara J, et al. Liver-fat accumulation and insulin in obese woman with previous gestational diabetes. *Obes Res* 2002; 10: 859-67.
  65. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for the JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 353-6.
  66. Sykiotis GP, Papavassiliou AG. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1864-9.
  67. Hotamisligil GS, Peraldi P, 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.
  68. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-6.
  69. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of serine307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptors and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 2002; 277: 1531-7.
  70. Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: A new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 420-5.
  71. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006; 43: 163-72.
  72. De la Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Hou HY, et al. NF- $\kappa$ B activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1663-74.
  73. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hersrud DD, Jensen MD. Splachnic lipólisis in human obesity. *J Clin Invest* 2004; 113: 1582-8.
  74. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boidt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non alcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343-51.
  75. Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RAF, Kuller LH, Calan SC. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: Relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E906-E916.
  76. Klein S, Fontana L, Young L, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2549-57.
  77. Uusitupa M, Lindi V, Louheranta A, Salopuro T, Lindstrom J, Tuomilehto J. Long-term improvement in insulin sensitivity by changing lifestyles of people with impaired glucose tolerance: 4-year results from the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003; 52: 2532-8.
  78. 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.
  79. 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.
  80. Landier JF, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Souidi M, et al. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ -dependent. *J Biol Chem* 2004; 279: 45512-8.
  81. Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005; 280: 1224-9.
  82. Linden D, Lindberg K, Oscarsson J, Claesson C, Asp L, Li L, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo)B-100 and ApoB-48. *J Biol Chem* 2002; 277: 23044-53.
  83. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Non-alcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G193-G199.
  84. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 898-904.

85. Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 244-51.
86. Bernard S, Touzet S, Personne I, Lapras V, Bondon PJ, Berthezane F, et al. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 2000; 43: 995-9.
87. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vysellar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004; 40: 781-6.
88. Ohashi K, Ishibashi S, Osuga J, Tozawa R, Harada K, Yahagi N, et al. Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2000; 41: 1199-204.
89. Tran K, Thorne-Tjomslund G, DeLong CJ, Cui Z, Shan J, Burton L, et al. Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hematoma McA-RH777. *J Biol Chem* 2002; 277: 31187-200.
90. Hussain MM, Iqbal J, Anwar K, Rava P, Day K. Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein. *Front Biosci* 2003; 8: S500-S506.
91. Watterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992; 258: 999-1001.
92. Mirandola S, Realdon S, Iqbal J, Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, et al. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1661-89.
93. Chittury S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 27-41.
94. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999; 353: 1634-6.
95. Solís-Herruzo JA, García-Ruiz I, Díaz-Sanjuan T, Del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T. Uric acid and anti-TNF $\alpha$  antibody improve mitochondrial respiratory chain dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 2005; 42: 634.
96. Laurent A, Nicco C, van Nhieu JT, Borderie D, Chéreau C, Conti F, et al. Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 1277-85.
97. Seki S, Kitada T, Sakaguchi H. Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatology* 2005; 33: 132-4.
98. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62.
99. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Furutani M, Hirohama A, Kakisaka Y, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 32-8.
100. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Fakir E, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 850-5.
101. Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR, et al. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005; 355: 105-11.
102. Motohashi H, O'Connor, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 2002; 294: 1-12.
103. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13: 76-86.
104. Gong P, Cederbaum AI. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1. *Hepatology* 2006; 43: 144-53.
105. Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 433-41.
106. Xu Z, Chen L, Leung L, Yen TS, Lee C, Chan JY. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to non-alcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4120-5.
107. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Giacco L, Schlauch K, Born TL, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 665-74.
108. Malassagne B, Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Bedda S, Trebeden H, et al. The superoxide dismutase mimetic MnTBAP prevents Fas-induced acute liver failure in the mouse. *Gastroenterology* 2001; 121: 1451-9.
109. Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Tran A, Trebeden H, Jaffray P, et al. Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 2001; 33: 1173-80.
110. García-Ruiz I, De la Torre P, Díaz T, Esteban E, Fernández I, Muñoz-Yagüe T, et al. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen  $\alpha$ 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 30551-8.
111. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 4820-25.
112. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004; 30: 121-38.
113. Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, Kahwaji J, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998; 114: 764-74.
114. Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: Role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1997; 26: 13-22.
115. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 430-4.
116. Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine* 1998; 77: 59-72.
117. Spahr L, Negro F, Leandro G, Marinescu O, Goodman KJ, Rubbia-Brandt L, et al. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the 13C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR6-11.
118. 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.
119. Morris A. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. *Liver* 1999; 19: 357-68.
120. Bowyer BA, Miles JM, Haymond MW, Fleming CR. L-carnitine therapy in home parenteral nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentration. *Gastroenterology* 1988; 94: 434-8.
121. Krähenbühl S, Mang G, Kupferschmidt H, Meier PJ, Krause M. Plasma and hepatic carnitine and coenzyme A pools in a patient with fatal, valproate induced hepatotoxicity. *Gut* 1995; 37: 140-3.
122. Harper P, Wadström C, Backman L, Cederblad G. Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 18-25.
123. Yamamoto S, Abe H, Kohgo T, Ogawa A, Ohtake A, Hayashibe H, et al. Two novel gene mutations (Glu 74<sup>Srs</sup>, Phe 383<sup>Srs</sup>) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet* 1996; 98: 116-8.
124. Pérez-Cerreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martínez A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007.
125. De Sousa C, Leung NWY, Chalmers RA, Peters TJ. Free and total carnitine and acylcarnitine content of plasma, urine, liver and muscle of alcoholics. *Clin Sci* 1988; 75: 437-40.
126. Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1995; 67: 101-54.
127. Miele L, Grieco A, Armuzzi A, Candelli M, Forgione A, Gasbarrini A, et al. Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with non-alcoholic steatohepatitis assessed by 13C-octanoate breath test. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2335-6.
128. Li Z, Peraldi P, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and im-

- prove nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-50.
129. Brady LJ, Brady PS, Romsos DR, Hoppel CL. Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice. *Biochem J* 1985; 231: 439-44.
  130. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1302: 93-109.
  131. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, González FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the adoptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-98.
  132. Fromenty B, Pessayre D. Mitochondrial injury and NASH. In: Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. Eds *Fatty Liver Disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden 132-42.
  133. Wallace DC. Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-8.
  134. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-4.
  135. Haque M, Mirshahi F, Campbell-Sargent C, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with hepatocyte mitochondrial depletion. *Hepatology* 2002; 36: 430A.
  136. Farrell GC. Animal Models of steatohepatitis. In: Farrell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ, editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden 2005: 91-108.
  137. García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, Del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, et al. Uric acid and anti-TNF $\alpha$  antibody improve mitochondrial respiratory chain dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 2006; 44: 581-91.
  138. Paradies G, Petrosillo G, Pistolesi M, Ruggiero FM. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* 2000; 466: 323-6.
  139. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, et al. CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-75.
  140. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 1996; 24: 200-8.
  141. Seke S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62.
  142. Chen J, Petersen DR, Schenker S, Henderson GI. Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: Role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 544-52.
  143. Chen J, Schenker S, Frost TA, Henderson GI. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE): Role of HNE adduct formation with the enzyme catalytic site. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1380: 336-44.
  144. Hruszkewycz AM. Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 191-7.
  145. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 1999; 424: 9-21.
  146. Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M, et al. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 1278-90.
  147. Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* 1999; 434: 137-48.
  148. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001; 88: 529-35.
  149. Patel M, Day BJ. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 359-64.
  150. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayor-ga M, Domínguez-Díaz 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.
  151. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467-76.
  152. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: A pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38: 413-9.
  153. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF $\alpha$  or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54.
  154. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-15.
  155. Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 88-94.
  156. Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Hernández-Muñoz I, Ruiz-Cabellos J, Siles-Rivas E, de la Torre P, et al. Reactive oxygen species mediates the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor- $\alpha$  in L929 cells. *Biochem J* 2003; 370: 609-19.
  157. Sanyal AJ. The pathogenesis of NASH: Human studies. In: *Fatty Liver Disease. NASH and related disorders*. Farrell GC, George J, Hall P de la M, McCullough AJ, editors. Blackwell Publ Ltd Malden 2005: 76-90.
  158. Kern PA, Saghizadeh M, Org JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95: 2111-9.
  159. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-808.
  160. Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 346-54.
  161. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1785-8.
  162. Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 2006; 130: 1848-52.
  163. Nguyen MTA, Satoh H, Favellyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JJ, et al. JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 35361-71.
  164. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Ryzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185-94.
  165. Cai D, Yuan M, Frantz D, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat Med* 2005; 11: 183-90.
  166. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Lond JM, et al. IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-8.
  167. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8: 731-7.
  168. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100.
  169. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125: 1796-807.
  170. Lopez-Bermejo A, Botas P, Funahashi T, Delgado E, Kihara S, Riccart W, et al. Adiponectin, hepatocellular dysfunction and insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 256-63.
  171. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-69.
  172. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- $\alpha$  in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40: 177-84.



173. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102: 1296-301.
174. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96: 1723-32.
175. Yamauchi T, Kamon J, Kaki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7: 887-8.
176. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Kaki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucosa utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-95.
177. Chen MB, McAinch AJ, Macaulay SL, Castelli LA, O'Brien PE, Dixon JB, et al. Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle from obese type 2 diabetics. *J Clin Endocrin Metab* 2005; 90: 3665-72.
178. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucosa and lipid metabolism. *Trends Endocrin Metab* 2002; 13: 84-9.
179. Bouskila M, Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: a relevant player in PPAR $\gamma$ -agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005; 29 (Supl. 1): S17-S23.
180. Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-8.
181. Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237-42.
182. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53(Suppl 1): S143-S151.
183. Westerbacka J, Corner A, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Hakkinen AM, et al. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: Implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* 2004; 47: 1360-9.
184. 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.
185. Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, Carmona P, Hernández-Muñoz I, Siles E, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases the steady state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 13353-61.
186. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998 ; 17: 2515-24.
187. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; 378: 259-68.
188. Cohen P, Miyazaki M, Succi ND, Haggge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002; 297: 240-3.
189. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45: 491-503.
190. Geller DA , Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, et al. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoides regulate the expresión of inducible nitric oxide synthetase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 522-6.
191. Curran RB, Billiar TR, Stuehr DJ, Hoffmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 1989; 170: 1769-74.
192. Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF- $\kappa$ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF $\alpha$ - and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1251-62.
193. Radi R, Cassina A, Hodara R, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radi Biol Med* 2002; 33: 1451-64.
194. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of NO reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS. Lett* 1994; 356: 295-8.
195. Radi R, Cassina A, Hodara R, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radi Biol Med* 2002; 33: 1451-64.
196. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002; 383: 401-9.
197. Castro L, Eiserich JP, Sweeney S, Radi R, Freeman BA. Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. *Arch Biochem Biophys* 2004; 421: 99-107.
198. Murrria J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, Capaldi RA. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite. *J Biol Chem* 2003; 278: 37223-30.
199. Guidarelli A, Fiorani M, Cantoni O. Enhancing effects of intracellular ascorbic acid on peroxynitrite-induced U937 cell death are mediated by mitochondrial events resulting in enhanced sensitivity to peroxynitrite-dependent inhibition of complex III and formation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 2004; 378: 959-66.
200. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-50.
201. Szabó C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by ONOO. *Free Rad Biol Med* 1996; 21: 855-69.
202. Viner RI, Williams TD, Schoneich C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* 1999; 38: 12408-15.
203. Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Ohnishi ST, Kean R, et al. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2528-33.
204. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998; 37: 1613-22.
205. Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann NY Acad Sci* 2002; 242-59.
206. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharm* 2005; 70: 343-54.
207. Chou SM, Wang HS, Taniguch, A. Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci* 1996; 139 (Supl.): 16-26.
208. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2000; 14: 691-8.
209. Weltman MD, Farell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27: 128-33.
210. O'Shea D, Davis SN, Kim RB, Wilkinson GR. Effect of fasting and obesity in human son the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56: 359-67.
211. Wang Z, Hall SD, Maya JF, Li I, Asghar A, Gorsky JC. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P4502E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55: 77-85.
212. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in non-diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37: 544-50.
213. Emery MG, Fisher JM, Chein JY, Kharasch ED, Delling EP, Kowdley, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly

- obese subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 38: 428-35.
214. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005; 569: 101-10.
  215. Amet Y, Berthou F, Goasduff T, Salaun JP, Le Breton L, Menez JF. Evidence that cytochrome p450 2E1 is involved in the ( $\omega$ -1)-hydroxylation of lauric acid in rat liver microsomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1168-74.
  216. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, González FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-75.
  217. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-94.
  218. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabela E, Yamashina S, Dickalova A. NADPH-oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 867-72.
  219. 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.
  220. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-11.
  221. Hegner D, Platt D. Effect of essential phospholipids on the properties of ATPases of isolated rat liver plasma membranes of young and old animals. *Mech Ageing Dev* 1975; 4: 191-200.
  222. Neuberger J, Hegarty JE, Eddleston ALWF, Williams R. Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on immune-mediated hepatocyte damage. *Gut* 1983; 24: 751-5.
  223. Jenkins PJ, Portman BP, Eddleston ALWF, Williams R. Use of polyunsaturated phosphatidylcholine in HBsAg negative chronic active hepatitis. Results of a prospective double blind controlled trial. *Liver* 1982; 2: 77-81.
  224. Masumoto N, Tasaka K, Miyake A, Tanizawa O. Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cell. *J Biol Chem* 1990; 265: 22533-6.
  225. Solís-Herruzo JA, De La Torre P, Muñoz-Yagüe MT. Hepatic stellate cells: Architects of hepatic fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 438-9.
  226. Solís Herruzo JA, García Ruiz I, De La Torre P, Díaz San Juan T, Muñoz-Yagüe MT. Cytokine networks involved in liver extracellular matrix remodelling in fibrogenesis. In: Moreno-Otero R, Albillos A, García-Monzón C. *Immunology and The Liver: Cytokines*. Madrid: Acción Médica; 2001.
  227. Solís Herruzo JA. Factores Involucrados en la fibrogénesis hepática. *Gastroenterología Hepatología* 2000; 23: 186-99.
  228. Cortez-Pinto H, Batista A, Camilo ME, de Moura MV. Hepatic stellate cell activation occurs in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepato-gastroenterology* 2001; 48: 87-90.
  229. Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000; 31: 822-88.
  230. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yung-Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003; 39: 756-64.
  231. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
  232. Lee KS, Buch M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 2461-8.
  233. Lee KS, Buch M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 2461-8.
  234. Canboy A, Taimr P, Torok N, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003; 83: 655-63.
  235. Chojkier M, Houghlum K, Solis-Herruzo J, Brenner, DA. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? *J Biol Chem* 1989; 264: 16957-62.
  236. Maher JJ, Tzagarakis C, Giménez A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol Alcohol* 1994; 29: 605-10.
  237. Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective profibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 60-8.
  238. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 1044-50.
  239. Parola M, Pinzani M, Casini A, Leonarduzzi G, Marra F, Caligiuri A, et al. Induction of procollagen type I gene expression and synthesis in human hepatic stellate cells by 4-hydroxy-2,3-nonenal and other 4-hydroxy-2,3-alkenals is related to their molecular structure. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 261-4.
  240. Tsukamoto H. Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol* 1993; 10: 465-7.
  241. Tsukamoto H, Rippe RA, Niemela O, Lin M. Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10 (Supl. 1): S50-S53.
  242. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 81-128.
  243. Houghlum K, Venkataraman A, Lyche K, Chojkier M. A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 113: 1069-73.
  244. Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995; 96: 620-30.
  245. Bedossa P, Houghlum K, Trautwein Ch, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19: 1262-71.
  246. Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, Albano E, Bicoca ME, Poli G, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16: 1014-21.
  247. Houghlum K, Filip M, Witztum JL, Chojkier M. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest* 1990; 86: 1991-8.
  248. Pietrangelo A, Gualdi R, Casalgrandi G, Montosi G, Venture E. Molecular and cellular aspects of iron-induced hepatic cirrhosis in rodents. *J Clin Invest* 1995; 95: 1824-31.
  249. García Ruiz I, De La Torre MP, Díaz T, Esteban E, Morillas JD, Muñoz-Yagüe MT, et al. Sp family of transcription factors is involved in iron-induced collagen  $\alpha$ 1(I) gene expression. *DNA Cell Biology* 2000; 19: 167-78.
  250. Jian J-G, Chen Q, Bell A, Zarnegar R. Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors. *Oncogene* 1997; 14: 3039-49.
  251. Ihn H, Trojanowska M. Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acid Res* 1997; 25: 3712-7.
  252. Ihn H, Leroy EC, Trojanowska M. Oncostatin M stimulates transcription of the human alpha2(I) collagen gene via the Sp1/Sp3-binding site. *J Biol Chem* 1997; 272: 24666-72.
  253. Chen S, Artlett CM, Jimenez SA, Varga J. Modulation of human alpha1(I) procollagen gene activity by interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors in vitro. *Gene* 1998; 215: 101-10.
  254. Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology* 1995; 22: 241-51.
  255. Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindo KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance and liver fibrosis in human non alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 943-9.
  256. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopond L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.
  257. Friedman JM. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 1998; 56: S38-S46.

258. Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, et al. Endotoxin and cytokine induce expression of leptin, the OB gene product, in hamster. A role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* 1996; 97: 2152-7.
259. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermate of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35: 762-71.
260. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37: 206-13.
261. Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-410.
262. Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, et al. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288-97.
263. Piche T, Gelsi E, Schneider SM, Hebuterne X, Giudicelli J, Ferrua B, et al. Fatigue is associated with high circulating leptin levels in chronic hepatitis C. *Gut* 2002; 51: 434-9.
264. Testa R, Franceschini R, Giannini E, Cataldi A, Botta F, Fasoli A, et al. Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 33-7.
265. McCullough AJ, Bugianesi E, Marchesini G, Kalham SC. Gender-dependent alterations in serum leptin in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1998; 115: 947-53.
266. Piche T, Vandenlos S, Abakar-Mahamet A, Vanbierliet G, Barjoan EM, Calle G, et al. The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. *J Viral Hep*. 2004; 11: 91-6.
267. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin enhances  $\alpha 1(I)$  collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent MAPK pathways. *J Cell Biochem* 2006; 97: 188-97.
268. Tang M, Potter JJ, Mezey E. leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 906-11.
269. Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 4292-304.
270. Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, et al. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 151-4.
271. Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, et al. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation FASEB J 2004; 181: 1612-4.
272. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Fed Am Soc Exp Biol J* 1999; 13: 1231-8.
273. Yamagishi S, Edelstein D, Du X, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. 2001; 276: 25096-100.
274. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Palk YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-94.
275. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, et al. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 284-92.
276. Sahai A, Malladi P, Melón-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of non alcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 264-73.
277. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung NS, et al. Liver pathology and metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-7.
278. Mezey E. Dietary fat and alcoholic liver disease. *Hepatology* 1998; 28: 901-5.
279. Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002; 36: 729-36.
280. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brian PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121: 91-100.
281. Hickman IJ, Powell EE, Prins JB, Clouston AD, Ash S, Purdie DM, et al. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy. *J Hepatol* 2003; 39: 1042-8.
282. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C and virus infection fibrosis progression. *Gastroenterology* 2003; 125: 1695-704.
283. D'Souza R, Sabin CA, Foster GR. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1509-15.
284. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 1999; 29: 1743-51.
285. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratiapanawair T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105: 311-20.
286. Morrisey K, Evans RA, Wakefield L, Phillips AO. Translational regulation of renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor-beta 1 generation by insulin. *Am J Pathol* 2001; 159: 1905-15.
287. Paradis VP, Bonvoust G, Dargere F, Parfait D, Vidaud B, Conti M et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulates connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34: 738-44.
288. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuch H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003; 83: 655-63; .
289. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF $\beta$ , PGE2 and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-8.
290. Yin M, Gäbele E, Wheeler MD, Connor H, Bradford BU, Dikalova A, et al. Alcohol-induced free radicals in mice: direct toxicants or signaling molecules?. *Hepatology* 2001; 34: 935-42.
291. C, Wand SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 670-6.
292. Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, Pinzani M, Abboud HE. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemoattractant protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1993; 92: 1674-80.
293. Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner AM. Induction of neutrophil-attracting chemokine in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 277-85.
294. Maher JJ, Scott MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in primary culture and liver injury in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 905A.
295. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54: 987-93.
296. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69.
297. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-43.
298. Rodriguez CM, Cortez-Pinto H, Sola S. Apoptosis is a prominent feature of human alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34: 672A.
299. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors,

- and activation of NFκB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-17.
300. Ramalho RM, Cortez-Pinto H, Castro RE, Solá S, Costa A, Moura MC, et al. Apoptosis and Bcl-2 expression in the livers of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 21-9.
  301. Ashkenazi A, Dixt VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-8.
  302. Green DR. Death and NFκB in T cell activation: Life at the edge. *Molecular Cell*. 2003; 11: 551-2.
  303. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by transcription factor NFκB. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-6.
  304. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26-35.
  305. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
  306. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S31-S44.
  307. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6353-64.
  308. Li S, Zhao Y, He X, Kim TH, Kuharsky DK, Rabinowich H et al. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocytes apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 26912-20.
  309. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001; 153: 1265-76.
  310. Crow MT, Mani K, Nam Y-J, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Cir Res* 2004; 95: 957-70.
  311. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005; 121: 671-4.
  312. Armstrong JS. Mitochondrial membrana permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 2006; 28: 253-60.
  313. Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringier A, Berson A, et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* 2000; 31: 674-83.
  314. Kirkland RA, Windelborn JA, Kasprzak JM, Franklin JL. A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J Neurol* 2002; 22: 6480-90.
  315. Nagai H, Matsumaru K, Feng G, Kaplowitz N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultures mouse hepatocyte. *Hepatology* 2002; 36: 55-64.
  316. Ding W-X, Yin X-M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 445-54.
  317. Matsumaru K, Ji C, Kaplowitz N. Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes. *Hepatology* 2003; 37: 1425-34.
  318. Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 491-508.
  319. Park YC, et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 2000; 101: 777-87.
  320. Mari M, Colell A, Morales A, Paneda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase IA, contribution to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 892-904.
  321. Siskind L. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioener Biomem* 2005; 37: 143-53.
  322. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 14890-5.
  323. Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Cena V, Soria B, et al. Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 2003; 144: 335-45.
  324. Shimabukuro M, Zhou Y-T, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 2498-502.
  325. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1784-9.
  326. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Myocardial substrate metabolism: implications for diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 169-79.
  327. Zhang CL, Lyngmo V, Nordoy A. The effects of saturated fatty acids on endothelial cells. *Thromb Res* 1992; 65: 65-75.
  328. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 3324-49.
  329. Hickson-Bick DL, Buja ML, McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 511-9.
  330. Malhi HB, Werneburg N, Gores GJ. Hepatocyte lipoapoptosis is mediated by c-jun-n-terminal kinase (JNK) activation. *Gastroenterology* 2005; 128: 469.
  331. Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 643-65.
  332. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 2002; 53: 319-39.
  333. Unger RH. Weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 2003; 144: 5159-65.
  334. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 1998; 335: 465-80.
  335. Obeid LM, Hannun YA. Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J Cell Biochem* 1995; 58: 191-8.

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

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

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

## RESUMEN

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

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

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

## DESDE LA RESISTENCIA A LA INSULINA AL HÍGADO GRASO

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

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

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

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

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

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

Los AGL que llegan al hígado activan al receptor nuclear PPAR $\alpha$ , el cual, formando un heterodímero con el RXR (*Retinoid X Receptor*), induce la transcripción de numerosos genes implicados en el catabolismo y eliminación de los ácidos grasos (acil CoA oxidasa, citocromo P<sub>450</sub>, proteína fijadora de ácidos grasos, proteína microsomal de transferencia de triglicéridos, apolipoproteína B100, etc.) (80-82) (Fig. 2). En concreto, estas proteínas intervienen en la utilización de los AGL, en la síntesis de triglicéridos (esteatosis) y fosfolípidos, en la gluconeogénesis (hiperglucemia) o en su oxidación en las mitocondrias, en los peroxisomas o en los microsomas. Estas tres oxidaciones tienen gran trascendencia ya que pueden contribuir al estrés oxidativo celular. La  $\beta$ -oxidación en las mitocondrias puede conducir a la formación de ROS (*Reactive Oxygen Species*), principalmente del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), durante la fosforilación oxidativa (83). La  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas conduce a la formación de peróxido de hidrógeno, mientras que la oxidación en los microsomas, con la participación de los citocromos P<sub>450</sub>, determina la formación de anión superóxido y de ácidos dicarboxílicos. La acumulación de triglicéridos en los hepatocitos sería consecuencia de una llegada de AGL al hígado en cuantía superior a la que puede ser utilizada o exportada a la sangre en forma de lipoproteínas

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

## DESDE LA ESTEATOSIS A LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA

### Estrés oxidativo

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

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

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

### Origen del estrés oxidativo

#### *Papel de las mitocondrias*

Aunque el origen de este estrés oxidativo en la EHNA es probablemente múltiple (oxidación de los ácidos grasos, citocromos microsomales, siderosis, citoquinas, células de Kupffer, etc.), la disfunción de las mitocondrias parece jugar un papel predominante. Las mitocondrias están implicadas tanto en la  $\beta$ -oxidación de los AGL como en la generación de las ROS (83,111-114). Diversos estudios han mostrado que las mitocondrias de los pacientes con EHNA son anormales tanto morfológica como funcionalmente. En estos enfermos, las mitocondrias son grandes, están hinchadas, presentan escasas crestas y, frecuentemente, contienen inclusiones paracristalinas (79,115). Se trata de cambios muy parecidos a los que se encuentran en las miopatías mitocondriales causadas por alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) (116). Además, la generación de [ $^{13}$ C]CO $_2$  a partir de la  $^{13}$ C-metionina y la resíntesis de ATP tras una sobrecarga de fructosa están marcadamente disminuidas en los pacientes con esteatosis hepática (117,118). Ambos defectos sugieren que la función de las mitocondrias, además de su morfología, está alterada en los pacientes con EHNA.

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



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

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

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

( $\gamma$ ) El NADH formado durante la  $\beta$ -oxidación se reoxida a NAD<sup>+</sup> a lo largo de un proceso conocido como *fosforilación oxidativa* que conduce a la formación de ATP. Este último representa la única fuente de energía que puede ser aprovechada por las células. En esta fosforilación interviene una serie de complejos enzimáticos situados en la membrana mitocondrial interna (complejos I a V), que se conoce como *cadena respiratoria mitocondrial* (CRM). En ella, los electrones del NAD<sup>+</sup> y del FADH<sub>2</sub> son pasados de un complejo a otro de esta cadena hasta que finalmente son combinados con el oxígeno y los pro-

tones para formar agua. Este proceso está acoplado con otro simultáneo, por el que los protones de la matriz mitocondrial son enviados al espacio intermembranoso de las mitocondrias generando un gradiente electroquímico entre la matriz y este espacio. Cuando estos protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintetasa (complejo V) determinan la conversión del ADP en ATP y, con ello, que la energía electroquímica acumulada en el espacio intermembrana sea empleada en la formación de una energía utilizable por las células (83,119,132). Normalmente, a lo largo de este proceso de fosforilación oxidativa, se pueden escapar algunos electrones que, tras unirse al oxígeno de la matriz mitocondrial, dan lugar a la formación de las ROS, principalmente de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (133,134). Cuando la fosforilación oxidativa es deficiente como consecuencia de la baja actividad de la CRM, no sólo se forma menos ATP, sino que la cuantía de electrones que se escapan del sistema es mayor y aumenta la formación de ROS (126) (Fig. 4). Esta formación de ROS estaría potenciada en el caso, como ocurre en la EHNA, de que la llegada de AGL al hígado y su  $\beta$ -oxidación estén aumentadas. También lo está en la diabetes mellitus en que la oxidación de glucosa representa un aporte importante de electrones a la CRM.

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

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

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

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

### **Mecanismos de la disfunción mitocondrial**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Otras fuentes de estrés oxidativo

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

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

### Consecuencias del estrés oxidativo

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

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

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

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

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

β) Además, los *aldehídos reactivos derivados de la peroxidación* de los lípidos, tales como el MDA y el 4-HNE, pueden participar en la fibrogénesis hepática. En efecto, Chojkier y cols. (235) mostraron que el MDA aumentaba de forma muy significativa la expresión del ARN mensajero (mRNA) del colágeno α1(I) en cultivos de fibroblastos humanos. Maher y cols. (236,237) encontraron que la síntesis de colágeno se duplicaba cuando los fibroblastos eran cultivados con MDA. Hallazgos compatibles con los anteriores fueron comunicados por otros investigadores (238-241). Aunque los mecanismos de este efecto no son únicos, es muy probable que intervengan los conjugados que estos aldehídos reactivos forman con los aminoácidos o radicales sulfidrilos de las proteínas (242). La formación de estos conjugados se ha demostrado en modelos animales en los que se induce la peroxidación lipídica y en diversas circunstancias clínicas en las que existe fibrogénesis activa (241,243-247). Por otro lado, los tratamientos antioxidantes disminuyen la formación de esos conjugados y previenen la fibrogénesis (241,246,248). En un estudio previo encontramos evidencias de que los conjugados de los aldehídos participan en el aumento de la expresión genética del colágeno (110,249.), ya que el tratamiento de las células con p-hidroximercuribenzoato (pHMB) o con piridoxal-5'-fosfato (P5P) abolía tanto los efectos del MDA como los de una combinación oxidante (cloruro ferroso, ácido ascórbico, ácido cítrico) sobre la expresión genética del colágeno. En estos estudios, pudimos determinar que estos aldehídos ejercen esos efectos a través de unos elementos localizados entre las secuencias -116 y -110 pb del promotor del colágeno α<sub>1</sub>(I) y que los factores de transcripción Sp1 y Sp3 intervienen como mediadores de ese estímulo. Estos factores reconocen las secuencias ricas en G+C (250) y actúan como factores que estimulan la expresión de una amplia variedad de genes, incluido el del colágeno α<sub>1</sub>(I) (250-254).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

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