

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ESTUDIO ANATOMOCLÍNICO Y
FISIOPATOLÓGICO DE UNA SERIE DE 85
PACIENTES CON ESTEATOHEPATITIS NO
ALCOHÓLICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Mercedes Pérez Carreras

Bajo la dirección del doctor

José Antonio Solís Herruzo

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2076-5

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**ESTUDIO ANATOMOCLÍNICO Y FISIOPATOLÓGICO DE
UNA SERIE DE 85 PACIENTES CON ESTEATOHEPATITIS
NO ALCOHÓLICA**

TESIS DOCTORAL

**Memoria presentada por:
M^a MERCEDES PÉREZ CARRERAS
para optar al grado de DOCTOR en MEDICINA
Madrid, 2001**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna forma, han contribuido en la realización de este trabajo.

En especial, quiero agradecer a mi director de tesis, el **Profesor Dr. D. José Antonio Solís Herruzo**, Catedrático de Medicina y Jefe del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital “12 de Octubre” su ayuda, asesoramiento y apoyo constantes, sin los cuales no habría sido posible la realización de este trabajo. Le agradezco también el haberme introducido en el campo de la investigación con la ilusión y rigor científico que ha sabido transmitirme.

Al **Dr. Gregorio Castellano Tortajada**, Jefe de Sección del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital “12 de Octubre” y codirector de esta tesis, quiero agradecerle también de manera especial su ayuda y comprensión durante estos años y, en particular, su confianza en este proyecto. Le agradezco el haberme mostrado lo interesante que es la investigación y la importancia de la constancia y disciplina en el trabajo.

A mis compañeros del Servicio de Aparato Digestivo, adjuntos y residentes, por su colaboración en la recogida de muestras y en la recopilación de enfermos para este estudio. Además, quiero darles las gracias por la comprensión que me han ofrecido.

Al **Dr. Francisco Colina Ruiz-Delgado**, Jefe de Sección del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital “12 de Octubre”, por sus originales aportaciones en la elaboración de este trabajo y en el estudio histológico de las muestras del presente estudio. También le estoy agradecida por haber seleccionado y cedido las figuras histológicas que han sido incluidas en el texto. Agradezco a la **Dra. Antonia Gutiérrez** su colaboración en este apartado.

Al **Dr. Joaquín Arenas Barbero**, adjunto del Departamento de Bioquímica del Hospital “12 de Octubre”, quiero agradecerle el apoyo e interés que ha mostrado en todo momento y especialmente los consejos y la ilusión por la investigación que me ha transmitido. También agradezco al equipo del Centro de Investigación del hospital “12 de Octubre”, en especial al **Dr. Miguel Angel Martín, Pilar del Hoyo, Juan Carlos Rubio y Yolanda Campos** su colaboración en la ardua labor de efectuar las distintas determinaciones en tejido hepático y en ayudarme a comprender la metodología empleada. A **Alberto García Redondo** quiero agradecerle su apoyo en el manejo informático de los datos.

Al Servicio de Epidemiología del Hospital “12 de Octubre”, especialmente al **Dr. Agustín Gómez de la Cámara y a Paloma**, les agradezco su ayuda en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A La **Dra. Carmela Vargas**, adjunto del Departamento de Bioquímica del Hospital “12 de Octubre”, por su ayuda en las determinaciones hormonales. También quiero agradecer a las **Dras. Sagrario Larumbe y M^a Teresa Gómez-Izquierdo** su colaboración en los estudios lipídicos efectuados en este trabajo.

Al Servicio de Cirugía Digestivo “C” del Hospital “12 de Octubre”, en especial al **Dr. Angel de la Calle y al Dr. Diego Hernández**, gracias a los cuales ha sido posible obtener las muestras hepáticas de los controles.

Agradezco al **Dr. Jorge Martínez-Laso y al Dr. Pablo Morales**, adjuntos del Departamento de Inmunología del Hospital “12 de Octubre”, su colaboración a la hora de realizar e interpretar las determinaciones efectuadas en su laboratorio.

Al **Dr. Javier Manzanares**, Jefe de Sección del Departamento de Pediatría del Hospital “12 de Octubre”, y a **Minerva Gómez**, enfermera de Gastroenterología infantil, cuya colaboración ha permitido realizar el estudio del sobrecrecimiento bacteriano intestinal.

Me gustaría agradecer al **Dr. Miguel León**, Jefe de Sección del Servicio de Endocrinología del Hospital “12 de Octubre” y a la **Dra. M^a Angeles Valero**, adjunto, su apoyo y confianza en este trabajo.

A **D. Antonio Beneit**, DUE del Servicio de Digestivo (Endoscopias) del Hospital “12 de Octubre” le agradezco su ayuda en la confección final del texto.

Este proyecto ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo (nº expediente 98/1253).

A mis padres

Para Julio y Guillermo

INTRODUCCIÓN

I. Concepto de esteatohepatitis no alcohólica	1
II. Epidemiología	2
-Sexo femenino	
-Obesidad	
-Diabetes	
-Hiperlipemia	
-Síndrome X	
-Cirugía de la obesidad	
-Nutrición parenteral total	
-Pérdida de peso	
-Síndrome del aceite tóxico	
-Fármacos	
-Virus de la hepatitis C	
-Miscelánea	
III. Patogenia	14
- Esteatosis hepática no alcohólica	
1. Aumento del flujo de ácidos grasos al hígado	18
2. Incremento en la síntesis hepática de ácidos grasos	19
3. Alteración en el catabolismo de los ácidos grasos	23
3.1 Alteración en los mecanismos de transporte	41
-Deficiencia de carnitina	
-Deficiencia de carnitin-palmitoil-transferasa	
-Deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa	
3.2 Defectos en los enzimas de la β-oxidación	52
3.3 Disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial	53
4. Alteración en la síntesis y/o secreción hepática de VLDL	55
5. Papel patogénico de la insulina	59
- Esteatohepatitis no alcohólica	
1. Estrés oxidativo y peroxidación lipídica	66
2. Endotoxemia portal y citocinas pro-inflamatorias	73
IV. Características clínicas	79
- Signos y síntomas	80
- Laboratorio	80
- Técnicas de imagen	81
V. Diagnóstico	83
- Lesiones hepáticas similares a la hepatopatía alcohólica	83
- Ausencia de alcoholismo	96
- Exclusión de otras causas de hepatopatía alcohólica	102
VI. Diagnóstico diferencial	103
VII. Evolución y pronóstico	107
VIII. Tratamiento	111

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	119
------------------------------------	-----

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Sujetos de estudio y protocolos	123
- Pacientes	123
- Controles	133

II. Metodología	
- Determinaciones de laboratorio	135
- Biopsia hepática y estudio microscópico	138
- Determinaciones en tejido hepático	140
. Carnitina	
. Carnitin-palmitoil-transferasa	
. Cadena respiratoria mitocondrial	
- Estudio de la homeostasis de la glucosa	144
- Test del hidrógeno espirado	147
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)	149
- Determinaciones del gen de la hemocromatosis	150
- Determinación de los alelos HLA	151
- Análisis estadístico	152

RESULTADOS

I. Características epidemiológicas y condiciones de riesgo	154
II. Manifestaciones clínicas y exploración física	160
III. Datos de laboratorio	160
IV. Ecografía abdominal	163
V. Hallazgos histológicos	164
VI. Determinaciones en tejido hepático	167
- Carnitina	
- Carnitin-palmitoil-transferasa	
- Cadena respiratoria mitocondrial	
VII. Estudio de la homeostasis de la glucosa	171
- Test de tolerancia oral a la glucosa	
- Glucemia, insulina, péptido C y glucagón	
- Índices de la insulina	
VIII. Test del hidrógeno espirado	178
IX. Niveles de TNFα en suero	181
X. Perfil metabólico del hierro y mutaciones del gen HFE	182
XI. Alelos HLA	185
XII. Correlaciones	187

DISCUSIÓN

I. Características anatomoclínicas	198
II. Mecanismos patogénicos	210
- Alteración de los mecanismos de transporte al interior de la mitocondria: carnitina y carnitin-palmitoil-transferasa	210
- Disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial	215
- Sobreproducción de TNF α y sobrecrecimiento bacteriano intestinal	219
- Alteración del metabolismo del hierro y mutaciones del gen HFE	222
- Trastorno en el metabolismo de la glucosa e insulina	227

CONCLUSIONES	234
---------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	237
---------------------------	-----

I. CONCEPTO DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una entidad clínico-morfológica caracterizada por hallazgos histológicos en el hígado similares a los observados en la hepatopatía alcohólica, pero que afecta a pacientes que no consumen alcohol en cantidades conocidas como causantes de daño hepático (1).

Desde un punto de vista patogénico, la EHNA puede definirse como una enfermedad metabólica del hígado que resulta del depósito inicial de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos, a lo que suelen sumarse posteriormente lesiones degenerativas de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio, y fibrosis (2). La fibrosis puede progresar hasta el estadio de cirrosis. Así pues, la EHNA es un espectro lesional que, al igual que la hepatopatía alcohólica, va desde una esteatosis simple, a través de una esteatohepatitis con grados progresivos de fibrosis, hasta una cirrosis con grasa. Estas tres fases se denominan respectivamente esteatosis no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, y cirrosis esteatohepática (1,3,4).

A pesar de que hace cuatro décadas ya se había descrito esteatosis, inflamación y fibrosis en hígados de individuos obesos y de operados con bypass intestinal (5-9), no es hasta 1980 cuando Ludwig et al. (1) acuñaron el término de EHNA, basados en dos criterios principales: cambios grasos con hepatitis lobular y ausencia de alcoholismo. Previamente se habían empleado otros términos para denominar a esta enfermedad como los de hepatitis pseudoalcohólica (10), hepatitis "alcohol-like" (11), hepatitis grasa (12,13), esteatonecrosis (14), hepatitis diabética (15), etc. Pero en la actualidad se utiliza el de EHNA de manera universal (3,4,16).

Se trata de una enfermedad de interés creciente, ya que cada vez se diagnostica con mayor frecuencia (17). Constituye probablemente la tercera causa de enfermedad hepática, tras la hepatopatía alcohólica y el virus de la hepatitis C (18-20). Por su estrecha asociación con la obesidad y la elevada prevalencia de ésta, hay autores que consideran a la EHNA como la causa más frecuente de hepatopatía en la sociedad americana. Por ello, siempre debería considerarse entre las posibilidades diagnósticas de pacientes sin otra causa identificable de enfermedad hepática crónica, especialmente en presencia de alguno de los factores de riesgo que, como se comentará posteriormente, suelen presentarse asociados (16,21-23).

II. EPIDEMIOLOGÍA Y CONDICIONES ASOCIADAS

La prevalencia e incidencia de la EHNA son difíciles de determinar, estimándose en 5,1/100.00 habitantes la prevalencia y en aproximadamente 1/100.000 habitantes/año su incidencia. Se ha detectado en el 1,2-9% de las biopsias hepáticas, con una proporción de 1:10-15 con respecto a la hepatitis alcohólica (24-27). Aunque tradicionalmente se ha considerado como una enfermedad infrecuente, su prevalencia real probablemente sea mayor, ya que muchos pacientes con elevación sérica de las enzimas hepáticas y resultados negativos en el estudio etiológico de enfermedad hepática pueden tener una EHNA (22,28). En un estudio reciente efectuado por nosotros encontramos un incremento de casos de EHNA durante los últimos 5 años, comparando con los años previos (3,38% vs 0,97% de todas las biopsias hepáticas), con una incidencia de 3,67 casos/100.000 habitantes/año frente a la previa de 1/100.00 habitantes/año (29).

Aunque la etiología y mecanismos patogénicos de la EHNA no son bien conocidos, en todas las series publicadas se repite una serie de situaciones clínicas denominadas “factores de riesgo” para la aparición de la enfermedad (Tabla 1; pág. 3). De todas ellas, el sexo femenino (65-83%), la obesidad (47-100%), la diabetes mellitus tipo 2 (34-55%) y la hiperlipemia (20-81%) son las que más se repiten en los diferentes estudios de pacientes con EHNA (1,4,12, 27,30-35) (Tabla 2. A; pág 4). Además, es frecuente la asociación de varios factores de riesgo, hecho especialmente frecuente en el caso de la diabetes y la obesidad (70-95%). La suma de factores de riesgo parece tener un papel aditivo en cuanto a riesgo o severidad de la EHNA.

Sin embargo, a pesar de que clásicamente se ha considerado que es una enfermedad de mujeres de mediana edad, obesas y diabéticas, en las series más recientes se ha observado un nuevo perfil de la EHNA: el diagnóstico se realiza a una edad más temprana, la frecuencia en varones es mayor (53%), y la mayoría de los pacientes no son diabéticos ni obesos. Es más, hasta en el 46% de los casos no se identifica ningún factor predisponente conocido para la EHNA (16,29,36-38) (Tabla 2. B; pág 4).

Tabla 1. Condiciones asociadas a la EHNA

1. SEXO FEMENINO**2. FACTORES NUTRICIONALES METABÓLICOS**

- Obesidad
- Diabetes mellitud tipo 2
- Hiperlipemia
- Síndrome X
- Glucosa intravenosa la semana previa a la muerte
- Malnutrición proteica
- Pérdida de peso acelerada
- Ayuno
- Nutrición parenteral total

3. FACTORES GASTROINTESTINALES

- Bypass yeyunoileal o yeyunocólico
- Resección extensa de intestino delgado
- Gastroplastia para obesidad mórbida
- Derivación biliopancreática
- Divertículos intestinales (con sobrecrecimiento bacteriano)

4. FÁRMACOS

- Amiodarona, maleato de perhexelina y 4,4´-dietilaminoetoxihexestrol
- Estrógenos sintéticos
- Tamoxifeno
- Bloqueantes de los canales del calcio (nifedipino, diltiazem)
- Corticoesteroides
- Acido acetilsalicílico
- Acido valproico
- Acidos 2-arylpropiónicos (pirprofeno, naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno)
- Antidepresivos (amineptina y tianeptina)
- Tetraciclinas
- Agentes antivirales (zidovudina, zalcitabina, didanosina)

5. MISCELÁNEA

- Lipodistrofia de miembros inferiores
- Enfermedad de Weber-Christian
- Abeta e hipobetalipoproteinemia
- Enfermedad de Wilson
- Síndrome de Reye
- Higado graso del embarazo
- Síndrome del aceite tóxico

6. VIRUS DE LA HEPATITIS C (?)**7. IDIOPÁTICA**

Tabla 2. Series clínico-patológicas de EHNA (A y B)

A	n	edad (años)	Mujeres (%)	Obesidad (%)	Diabetes (%)	Hiperlipemia(%)	SAT(%)
Hilden et al. (1973)	32	53	53	-	-	-	-
Adler et al. (1979)	29	46	76	100	2	48	-
Ludwig et al. (1980)	20	54	65	90	50	67	-
Itoh et al. (1987)	16	52	75	100	5	63	-
Moreno et al. (1987)	40	51	67	85	32	40	23
Diehl et al. (1988)	39	52	81	71	55	20	-
Lee (1989)	49	53	78	69	51	-	-
Powell et al. (1990)	42	49	83	95	36	81	-
Laurin et al. (1996)	40	48	72	70	27	-	-
Pinto et al. (1996)	32	49	75	47	34	28	-
Total/Valor medio	339	50	72	84	32	49	
B							
Bacon et al. (1994)	33	47	42	39	21	21	-
Teli et al. (1995)	40	57	45	30	10	23	-
Baldrige et al. (1995)	14	13	29	100	0	36	-
George et al. (1998)	51	47	49	-	-	-	-
Pérez-Carreras et al. (1998)	50	44	33	17	7	34	3
Total/Valor medio	188	42	40	46.5	9.5	40	

Adaptado de James OFW, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. J Hepatol 1998;29:495-501

Analizaremos a continuación algunos de estos factores asociados a la EHNA, según las distintas series que se han ido publicando durante los últimos 10-15 años.

SEXO FEMENINO

La EHNA tradicionalmente ha sido asociada a mujeres de edad madura. Analizando globalmente la mayoría de las series publicadas de pacientes con EHNA, se observa que un 65-83% son mujeres, con una edad media de 46-57 años (1,4,30,32). No se conoce la razón de esta mayor frecuencia, aunque se ha especulado que un efecto hormonal o la mayor prevalencia de la obesidad en el sexo femenino podrían jugar algún papel. De hecho, es posible que el papel del sexo en el desarrollo de la esteatosis hepática y de la EHNA haya sido sobrevalorado en muchos estudios y quizá confundido por coexistir con la obesidad (26,39). A favor de esta hipótesis se encuentra el hallazgo de que la esteatosis hepática demostrada por TAC es igual de frecuente en ambos sexos y que en estudios de necropsias se ha encontrado igual prevalencia de EHNA entre ambos sexos. Series recientes de EHNA apoyan estos datos e incluso encuentran un predominio del sexo masculino.

OBESIDAD

Es la condición que se asocia con mayor frecuencia puesto que, según la mayoría de estudios, un 69-100% de pacientes con EHNA son obesos. Esta asociación es importante, ya que la prevalencia de la obesidad en USA llega a ser del 40% (1,4,30-32,40). Desde hace muchos años se sabe que la obesidad se acompaña de cambios histológicos hepáticos (5). Salvo en los clásicos trabajos de Thaler (1962 y 1972) (41,42) y también de Adler y Schaffner (1979) (12), antes de los años ochenta sólo se reconocían en los obesos lesiones hepáticas de tipo esteatótico (43,44). Es a partir de 1980 cuando, tras la publicación por Ludwig et al. de su famoso estudio en 20 pacientes no alcohólicos, comienzan a reconocerse otras lesiones hepáticas en la obesidad (1). En la actualidad se considera un hecho comprobado que la obesidad se asocia con frecuencia a lesiones hepáticas de esteatosis, esteatohepatitis, e incluso fibrosis y cirrosis (1,12,21,39,45-48).

En la última década se han publicado varios estudios que analizan las lesiones hepáticas encontradas en obesos (Tabla 3).

Tabla 3. Espectro de la hepatopatía asociada a la obesidad

	Adler y Schaffner (1979)	Brailon et al. (1985)	Klain et al. (1989)	Silverman et al. (1990)	García-Monzón et al. (2000)	Total/ Valor medio
Nº de pacientes	29	50	100	100	46	325
Varones/mujeres (%)	24/76	20/80	32/68	19/81	35/65	26/74
Edad media (años)	46	49,5	37,5	35,7	41	42
Peso medio (kg)	109			133		121
Sobrepeso medio*(%)		74	110			92
IMC** medio				48,7	50.4	49.5
Histología hepática (%)						
Normal	0	10	2	6	8.5	5.3
Esteatosis	24	48	56	31	91	50
Esteatohepatitis	28	26	13	36	69.5	34.5
Fibrosis	24	8	19	23	88	32.4
Cirrosis	24	8	6	4	2	8.8

*Porcentaje sobre el peso ideal definido por los estándares de la Metropolitan Life Insurance Co

**Índice de masa corporal (Kg/m²)

Adaptado de Moreno D y Castellano G. El hígado en la obesidad. Gastroenterol Hepatol 1993; 16: 550-558

Se trata de pacientes obesos no alcohólicos a quienes se les practicó una biopsia hepática previa a cirugía de la obesidad tipo bypass gástrico (21,45,46), obesos ingresados para perder peso (48), obesos con hepatomegalia o alteración de la bioquímica hepática (12), o bien series de necropsias en obesos (39). Según estas series, sólo un 2-10% de los obesos presentaban un hígado histológicamente normal, mientras que un 4-24% tenían una cirrosis hepática. Las lesiones encontradas con mayor frecuencia fueron la esteatosis (24-56%), esteatohepatitis (13-36%) y fibrosis (8-24%).

Hay pocas series modernas que examinen la prevalencia y severidad de la enfermedad hepática en obesos. En un estudio necrópsico de 207 obesos no alcohólicos, Wanless et al. (39) encontraron esteatosis en el 29%, frente a un 7,2% en los no obesos; lesiones de EHNA en el 18,5% de obesos vs. 2,7%; y fibrosis en el 13,8% de obesos y 6,6% de sujetos sin obesidad. Silverman et al. (46) hallaron que el 94% de los 100 individuos obesos que incluyeron en su estudio, tenían algún grado de esteatosis hepática en el momento de la cirugía de la obesidad (42% leve, 28% moderada y 14% severa). Braillon et al. (48) la encontraron en un 90% de sus casos. En otros estudios oscila entre un 60 y 84%. Recientemente García-Monzón et al. (21) han encontrado una frecuencia muy elevada de lesiones de EHNA y de fibrosis (69.5% y 88%, respectivamente) en una serie de obesos, y lo han relacionado con el incremento de la prevalencia de obesidad que se ha producido en los últimos años en la población de los países desarrollados (21,49).

Las conclusiones de todos estos estudios son las siguientes:

1. Los cambios morfológicos hepáticos son muy frecuentes en la obesidad, incluso en ausencia de alteraciones del laboratorio o de signos y síntomas de enfermedad hepática.
2. La gravedad de la lesión hepática se correlaciona con el grado de obesidad.
3. La esteatosis hepática es la lesión que se encuentra con mayor frecuencia y la prevalencia y severidad de la misma son proporcionales al grado de obesidad.
4. La aparición de EHNA y de fibrosis se correlaciona con el grado de obesidad, coexistencia de diabetes tipo 2, pérdida de peso antes de fallecer y severidad de la esteatosis hepática. Estos factores son aditivos.
5. Los obesos, como grupo, presentan mayor mortalidad por cirrosis hepática que la población general.

6. Para el mismo grado de obesidad, los varones y mujeres presentan esteatosis o EHNA con la misma frecuencia.

DIABETES

La diabetes tipo 2 es la segunda asociación más común, ya que un 34-75% de pacientes con EHNA son diabéticos o tienen glucemias elevadas (1,4,27,29,30-32,34).

En 1980, Falchuk et al. (50) advirtieron que las biopsias hepáticas de pacientes con diabetes tipo 2 y sin abuso de alcohol mostraban una lesión hepática muy similar a la hepatitis alcohólica, que denominaron "hepatitis diabética". Dada la frecuente asociación entre diabetes tipo 2 y obesidad (el 85% de diabéticos tipo 2 son también obesos), el papel de la diabetes en el desarrollo de la enfermedad hepática crónica progresiva, entendida como esteatosis, EHNA, fibrosis hepática y cirrosis, ha sido puesto en duda (51-53). Pero, en series de autopsia se encuentra infiltración grasa en el hígado de un tercio de diabéticos tipo 2 sin obesidad asociada. Asimismo, estudios de autopsia revelan una mayor prevalencia de cirrosis en diabéticos tipo 2 (6-21%) y Jaques et al. (54) publicaron una prevalencia de cirrosis hepática en diabéticos del 16%, frente a un 8% en sujetos no diabéticos. Además, cuando la diabetes se asocia a obesidad la lesión hepática aumenta. Así, Wanless et al. (39) hallaron que la prevalencia de EHNA en obesos aumentaba 2,6 veces si se asociaba a diabetes tipo 2 (12% vs. 4,7%) y, al igual que Silverman et al. (46), encontraron mayor severidad en la lesión hepática cuando se asociaba a diabetes o bien a intolerancia a la glucosa.

La diabetes es cuatro veces más frecuente en cirróticos que en aquellos con un hígado morfológicamente normal y aproximadamente un 50% de los cirróticos tienen una sobrecarga oral de glucosa patológica (55-58). Sin embargo, hay que ser muy cautos a la hora de interpretar este dato, ya que en muchos estudios no se descarta el alcohol ni se dice si la cirrosis precede o no a la diabetes. Este hecho es importante, ya que aunque se acepte que la cirrosis hepática es 2-3 veces más frecuente entre los diabéticos, en 2/3 de los casos ésta se diagnostica antes del comienzo de la diabetes (54,59). Se ha comunicado algún caso de EHNA precediendo en varios años a la aparición de intolerancia a la glucosa (60). Estas

observaciones sugieren que la cirrosis hepática puede ser diabetógena y que la EHNA pudiera precipitar la aparición de la diabetes.

HIPERLIPEMIA

La hiperlipemia (hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia), es otra anormalidad que se ha encontrado en el 20 al 81% de pacientes con EHNA (1,4,27-29,30-34). Al igual que la diabetes, la hiperlipemia con frecuencia coexiste con obesidad.

SÍNDROME X

Recientemente se ha definido una entidad que agrupa a los principales factores de riesgo para la EHNA y que se denomina *síndrome X*. Se trata de un síndrome metabólico constituido por la siguiente tétada: diabetes tipo 2, hiperlipemia, hipertensión arterial y obesidad (61-63). Los enfermos con este síndrome presentan esteatosis hepática en el 80% de casos, lesiones de esteatohepatitis en el 24%, fibrosis en el 74%, y cirrosis en el 2% (64-67). Aunque los distintos componentes del *síndrome X* se han relacionado de manera independiente con el hígado graso, su asociación aumenta exponencialmente el riesgo de lesión hepática (67).

CIRUGÍA DE LA OBESIDAD

El *bypass* o *anastomosis yeyunoileal* es un tipo de intervención quirúrgica realizada con frecuencia en el pasado para el tratamiento de la obesidad refractaria. Consiste en anastomosar un segmento proximal de yeyuno con los últimos centímetros del íleon terminal, de forma que el segmento remanente de intestino delgado se cierra proximalmente y se anastomosa distalmente, término-lateral, con sigma o colon transverso, creándose de esta manera un asa ciega (68). Es una técnica que prácticamente se ha abandonado por asociarse a malabsorción intestinal y potencial enfermedad hepática. Se ha descrito disfunción hepática postquirúrgica en el 40% de los casos y la mayoría corresponden a esteatosis

hepática. También se han detectado casos de EHNA severa seguida de fallo hepatocelular en un 2-8% de casos, que puede ser mortal (8,10,69-75)

Haines et al. (70) encontraron esteatosis hepática en 19 de 27 pacientes sometidos a este tipo de cirugía y lesiones hepáticas indistinguibles de la enfermedad alcohólica en 6 (26%). Además, al igual que Marubio et al. (76), identificaron la presencia de esclerosis hialina central previa al bypass intestinal como factor de riesgo para desarrollar lesión hepática severa postquirúrgica. Halverson et al. (77) hallaron lesiones de EHNA en el 7% de 101 obesos con anastomosis yeyunoileal, cursando la mayoría con insuficiencia hepatocelular grave, y la mortalidad fue 50%. La evidencia de fallo hepático suele aparecer durante los seis primeros meses tras la cirugía derivativa, coincidiendo con el periodo de mayor pérdida de peso (10,70,78). Por otro lado, se ha comprobado que, aunque la esteatosis puede mejorar tras la reconstrucción del tránsito intestinal, no sucede lo mismo con la EHNA (71,79). Además, se ha descrito la recurrencia de las lesiones de EHNA en el hígado trasplantado a pacientes con cirrosis y fallo hepático tras bypass yeyunoileal a quienes se les mantuvo la derivación (80).

En la actualidad el bypass yeyunoileal ha sido sustituido por otros procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, también se han comunicado casos aislados de EHNA severa y fallo hepático tras otras técnicas quirúrgicas empleadas para el tratamiento de la obesidad mórbida, como la derivación biliopancreática, la gastroplastia o el bypass gástrico (81-83)

NUTRICIÓN PARENTERAL TOTAL (NPT)

Desde la introducción de la NPT en el tratamiento de la malabsorción intestinal, se han comunicado diversos casos de enfermedad hepática grave (75,84-89). El estudio más extenso es el de Bowyer et al. (89), quienes encontraron esteatosis, necrosis focales e infiltrados inflamatorios mixtos en el 15% de 60 pacientes tratados con NPT, añadiéndose fibrosis centrolobulillar en 2 y cirrosis hepática en 1.

PÉRDIDA RÁPIDA E INTENSA DE PESO

Esta pérdida de peso suele ser generalmente como consecuencia de un tratamiento de la obesidad o una resección intestinal. En ambos casos se ha comprobado que existe más riesgo de desarrollar EHNA durante los periodos de mayor pérdida de peso (39,48,70,75,90,91). En su serie necrótica de obesos, Wanless y Lenz (39) encontraron mayor incidencia de EHNA en aquellos pacientes que habían perdido peso durante la última semana de vida. Andersen y Gluud (92) observaron fibrosis en 41 obesos con esteatosis severa y rápida pérdida ponderal.

SÍNDROME DEL ACEITE TÓXICO (SAT) Y OTROS TÓXICOS INDUSTRIALES

Se han encontrado casos de EHNA asociados a la intoxicación por aceite de colza adulterado que se produjo en nuestro país durante los años ochenta. Solís-Herruzo et al. (93) encontraron lesiones de EHNA en 11 de 124 pacientes afectados por el SAT (9%), y posteriormente se ha detectado como lesión hepática tardía hasta en el 24% de pacientes (27,94,95). En una serie reciente nuestra de EHNA, hallamos dicha asociación en el 3% de casos (29). Aunque el SAT suele aparecer asociado a otras condiciones de riesgo en pacientes con EHNA, la elevada prevalencia de esta lesión en dicho síndrome sugiere que el aceite tóxico pudiera haber jugado algún papel patogénico.

Cotrim et al. (96) han descrito una elevada frecuencia de EHNA asintomática en trabajadores expuestos de forma crónica a altas concentraciones atmosféricas de gases petroquímicos. La relación causal entre las lesiones de EHNA y las toxinas petroquímicas se apoya en el hecho de que ninguno de los pacientes presentaba otro factor de riesgo conocido para esteatohepatitis y que dicha lesión mejoró desde el punto de vista bioquímico e histológico tras interrumpir la exposición.

FÁRMACOS

Cada vez es mayor el número de drogas que se van relacionando con la aparición de EHNA, aunque en ocasiones es difícil establecer la relación patogénica ya que pueden coincidir otros factores de riesgo para EHNA (1,26,27,97,98).

Moreno et al. (27) encontraron que un 65% de los pacientes con EHNA consumían fármacos de forma crónica y los más frecuentes fueron los antidiabéticos orales, alopurinol, tiacidas y triamtereno. La mayoría de ellos están indicados para el tratamiento de enfermedades asociadas a la EHNA (diabetes, hiperlipemia, HTA, etc.) y lo más probable es que no jueguen ningún papel en la patogenia de la lesión. Con independencia de estos hallazgos, se han publicado casos de EHNA y posibles mecanismos patogénicos atribuidos directamente a determinados medicamentos (Tabla 1 pág. 3). Todos ellos son capaces de producir esteatosis hepática asociada o no a lesiones de hepatitis y fibrosis (97,99). Entre ellos se encuentran los glucocorticoides (100), ácido acetilsalicílico (101), ácido valproico (102), determinados AINE (pirprofeno, naproxeno, ibuprofeno y Kerprofeno) (103-106), antidepressivos (amineptina y tianeptina) (107,108), tetraciclinas (109), interferón alfa (110), calcio hopantenato (111), cocaína (112), fialouridina y algunos análogos de nucleósidos utilizados en el tratamiento de la infección VIH (zidovulina o AZT, zalcitabine o ddC y didanosina o ddI) (113,114).

La amiodarona (antiarrítmico), perhexilina y dietilaminoetoxihexestrol (antianginosos) son tres drogas cuya administración prolongada puede provocar lesiones de EHNA. Además, son capaces de acumularse en los lisosomas de los hepatocitos y alterar la degradación de los fosfolípidos, produciendo también fosfolipidosis hepática (115-119).

Se han comunicado casos de EHNA tras la administración de altas dosis de glucocorticoides, estrógenos, y tamoxifeno (120-123). También se han publicado casos aislados de enfermedad hepática pseudoalcohólica, sin fosfolipidosis, tras el uso de diltiazem o nifedipino (124).

La aparición de esteatosis microvesicular o de EHNA, ha llevado a retirar del mercado drogas como el dietilaminoetoxihexestrol o la perhexilina y a suspender ensayos clínicos con sustancias antivirales como la fialuridina (97).

VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

La posibilidad de que el VHC pueda ser un factor de riesgo para el desarrollo de EHNA puede plantearse si se tienen en cuenta cuatro hechos:

1. La hepatitis crónica C y la EHNA comparten algunas características histológicas como son la esteatosis, los cuerpos de Mallory y la fibrosis pericelular (125-127).

2. El VHC ha sido incriminado en enfermedades hepáticas antes consideradas como idiopáticas (hepatitis autoinmune tipo 2, carcinoma hepatocelular) (128,129).

3. Existe una prevalencia elevada de la infección crónica por VHC en la enfermedad hepática alcohólica y se cree que el VHC juega un papel patogénico en esta hepatopatía alcohólica (130-133).

4. Se ha documentado la existencia de una asociación entre la infección por el VHC y la diabetes tipo 2 mayor que en otras enfermedades e independientemente de la presencia de cirrosis (134,135)

5. En una serie reciente personal hallamos una prevalencia elevada del VHC en pacientes con EHNA (136).

Lefkowitz et al. (127) encontraron, en una serie de 317 enfermos con infección crónica por VHC, esteatosis en el 70% y material similar a los cuerpos de Mallory en el 18%. Es importante reseñar que, a diferencia de la hepatitis alcohólica y la EHNA, dichos cambios se encontraban siempre en la región periportal (zona 1 del acino).

Múltiples estudios han demostrado una elevada prevalencia de la infección por el VHC en pacientes con enfermedad hepática alcohólica, especialmente en aquellos casos con lesiones severas, por lo que hay autores que proponen que este virus podría jugar algún papel en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica. Así, Parés et al. (130) detectaron infección por el VHC en el 24% de alcohólicos: el 2% tenían el hígado normal; 20% fibroesteatosis; 21% hepatitis alcohólica y 33% cirrosis hepática.

Sin embargo, son pocas las series de pacientes con EHNA en las que se ha determinado si existe infección por el VHC e, incluso, en las más actuales se ha utilizado como criterio de exclusión para el diagnóstico de EHNA (16,29,34,36,136,137). Es por ello, que no se conoce la prevalencia real de este virus en pacientes con EHNA ni si es posible que éste participe en su progresión, especialmente en aquellos casos en los que no se detecta ninguno de los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de EHNA. En este sentido, en un estudio

realizado por nosotros, encontramos que en aproximadamente la cuarta parte de sujetos con EHNA coexistía infección por VHC y que en 2/3 de ellos no existían otros factores de riesgo conocidos para la EHNA (136).

Estudios recientes han encontrado una elevada prevalencia de infección por el VHC en pacientes con diabetes tipo 2 (11.5-28%), así como de diabéticos entre los infectados por este virus (26%). Sin embargo, el trastorno del metabolismo de la glucosa no ha podido atribuirse a la enfermedad hepática, puesto que dicho hallazgo no se correlaciona con la severidad de la lesión histológica (138,139). Además, la esteatosis hepática encontrada hasta en el 50% de los infectados por el VHC se ha asociado a un efecto citopático del virus y se ha encontrado correlación con mayor infiltrado inflamatorio, necrosis y fibrosis hepática (139,140).

MISCELÁNEA

Otras condiciones que pueden asociarse a la aparición de EHNA y de las que se han publicado casos aislados son la *diverticulosis yeyunal* (141), la *enfermedad de Weber-Christian* (142), la *lipodistrofia parcial* que no afecta a la cara (143) y la *abetalipoproteinemia e hipobetalipoproteinemia* (144-146). Además, en algunas series de enfermos con EHNA se han detectado determinadas características clínicas con una frecuencia mayor a la esperada, como son la hipertensión arterial (33%) y la hiperuricemia (50%) cuyo significado, por el momento, es incierto (1,12,27,32).

III. PATOGENIA

Actualmente todavía no se conocen los mecanismos exactos por los que aparecen las lesiones de EHNA. Se han propuesto múltiples hipótesis patogénicas en relación con los factores de riesgo analizados en el apartado anterior: malnutrición proteica (8,147); movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo (47,148-150); deficiencia de carnitina (88,151), ácidos grasos esenciales (152,153), o colina (154-157), absorción intestinal de ácidos biliares tóxicos o de hepatotoxinas bacterianas (81,91,158); hiperinsulinemia (39,66), etc.

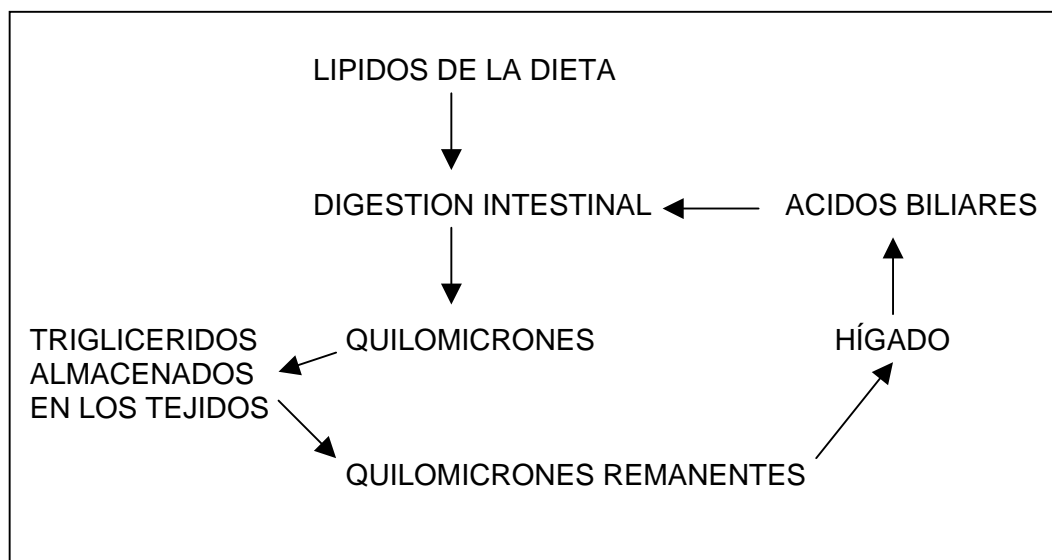
Para intentar explicar por qué y cómo aparecen las lesiones, debe tenerse en cuenta que la EHNA no es una entidad aislada sino un espectro de enfermedad hepática no alcohólica de depósito graso que va evolutivamente desde la esteatosis simple, hasta la esteatohepatitis, y cirrosis grasa (159,160).

A- ESTEATOSIS HEPATICA NO ALCOHÓLICA

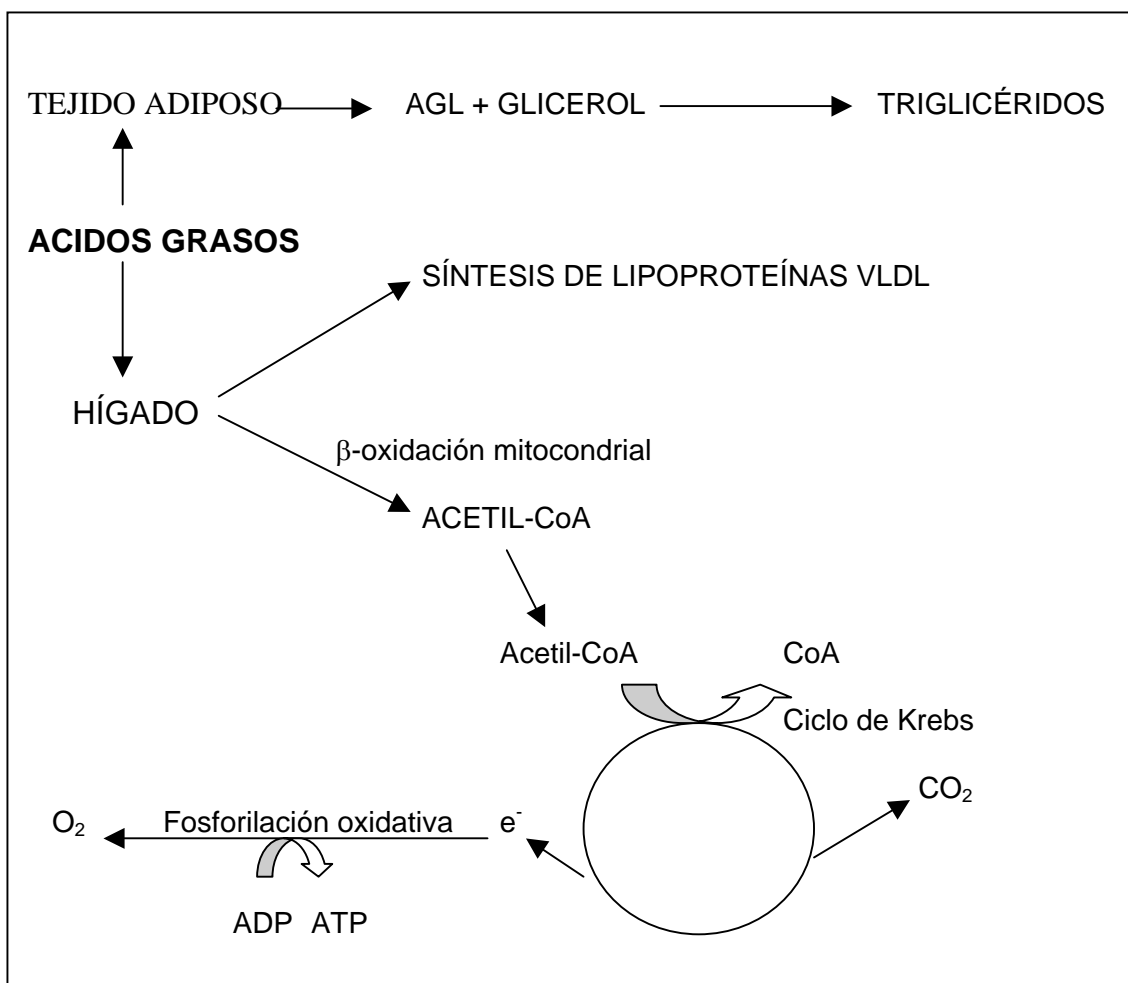
Aunque tradicionalmente se ha considerado a la esteatosis hepática como una entidad benigna, actualmente se acepta como un precursor necesario de las lesiones de EHNA, ya que se ha comprobado su evolución a inflamación y fibrosis (70,159-167).

La esteatosis hepática consiste en el depósito de triglicéridos en el interior de los hepatocitos. Comprender por qué la grasa se acumula en los hepatocitos requiere recordar las vías básicas del metabolismo lipídico normal (168-170).

La mayor parte de la grasa que consumen los animales en la dieta está constituida por triacilglicéridos o triglicéridos (TG) y en menor proporción, por fosfolípidos (PL) y colesterol. Una molécula de TG consiste en tres cadenas de ácidos grasos libres (AGL) unidas por una molécula de glicerol mediante enlaces éster. La digestión de los TG se produce en el intestino delgado, donde son hidrolizados por la acción de la lipasa pancreática a AGL de cadena larga (12 o más átomos de carbono), y transportados desde la luz, hasta el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal. Dicho transporte se produce en forma de micelas, las cuales se forman con el concurso de las sales biliares. Los AGL difunden a través de la membrana citoplasmática, y una vez en el interior de la célula epitelial, son reesterificados a TG y pasan entonces, junto con los ésteres de colesterol, colesterol libre, PL y proteínas, a formar parte de los agregados denominados quilomicrones. Son estas moléculas las que, de esta forma, transportan la grasa procedente de la dieta (grasa exógena) hasta el torrente linfático. Una vez en el sistema linfático, los quilomicrones viajan a través del conducto torácico, vía sanguínea, al hígado, tejido adiposo y resto de órganos (Figura 1).

Figura 1. Vía exógena del metabolismo lipídico

En la mayor parte de estos tejidos, los AGL son utilizados como fuente de energía. En el tejido adiposo, los AGL son reesterificados con glicerol y almacenados en los adipocitos en forma de TG hasta que puedan ser requeridos durante los periodos de ayuno como fuente de energía metabólica. En el hígado, los AGL tienen dos destinos: son oxidados por la mitocondria, mediante la β -oxidación, para obtener energía (ATP), o bien son convertidos de nuevo en TG y secretados a la circulación en forma de lipoproteínas (VLDL) y transportados de nuevo al tejido adiposo. Por otro lado, el hígado es capaz de sintetizar AGL cuando el aporte de glucosa al mismo es excesivo (Figura 2).

Figura 2. Vías metabólicas de los ácidos grasos

Múltiples evidencias acumuladas en los últimos 17 años indican que la EHNA se inicia con un aumento de los AGL intrahepáticos, los cuales son esterificados a TG, y el depósito de éstos en los hepatocitos constituye el hígado graso (171-173). En 1983 Mavrelis et al. (171) determinaron la composición lipídica en el hígado de 31 enfermos con hepatopatía alcohólica y en 18 obesos con lesión hepática y hallaron un aumento de AGL y TG (pero no de colesterol ni fosfolípidos) en ambos casos. Además, encontraron una correlación positiva entre los niveles tisulares de AGL y la severidad de la enfermedad hepática, dato que sugiere una relación causal.

Si tenemos en cuenta que los AGL intrahepáticos pueden proceder de tres fuentes diferentes (dieta, tejido adiposo, y síntesis hepática), y que en el hígado pueden seguir dos vías (β -oxidación y síntesis de VLDL), la acumulación de AGL en el hígado y subsiguiente aparición de esteatosis hepática podría explicarse por alguno de los siguientes mecanismos (2,18): 1) elevado flujo de AGL al hígado; 2)

aumento de la síntesis hepática de AGL; 3) disminución de la beta-oxidación de los AGL; y 4) alteración en la incorporación de los TG en las partículas de VLDL o en la secreción de dichas lipoproteínas por los hepatocitos (Tabla 4).

Tabla 4. Mecanismos patogénicos de la esteatosis hepática (18)

↑ FLUJO DE AGL AL HÍGADO

- . Obesidad . Pérdida intensa de peso
- . Ayuno . Bypass intestinal

↑ SÍNTESIS HEPÁTICA DE AGL

- . Exceso de carbohidratos (NPT; abuso en la dieta)

↓ β-OXIDACIÓN DE LOS AGL

- . Alteración de los mecanismos de transporte: deficiencia de carnitina, carnitin-palmitoil-transferasa, traslocasa, drogas que secuestran la CoA extramitocondrial
- . Alteración de los enzimas: deficiencias congénitas; drogas
- . Defectos en la cadena respiratoria mitocondrial

DEFECTO EN LA INCORPORACIÓN DE LOS TG A LAS LIPOPROTEÍNAS (VLDL) O ALTERACIÓN EN LA SECRECIÓN DE VLDL POR LOS HEPATOCITOS

- . Malnutrición proteica
 - . Deficiencia de colina
 - . Alteración en la síntesis de apoproteínas
 - . Defecto en la esterificación del colesterol
-

La insulina, como veremos luego, interviene en diferentes puntos del metabolismo lipídico normal y, por ello, puede contribuir a que varios de estos cuatro mecanismos de esteatosis hepática se activen.

1. Aumento del flujo de AGL al hígado

Es uno de los mecanismos que explican la acumulación de grasa en el hígado de los *obesos* (150,174,175) así como en situaciones de *ayuno* (176), *pérdida importante de peso* (39), o bien tras un *bypass intestinal* (177).

Durante el ayuno se ponen en marcha una serie de mecanismos de adaptación cuyo fin es asegurar los suplementos constantes de glucosa para aquellos órganos que tienen un requerimiento absoluto de ella, como el cerebro, y la provisión de una fuente alternativa de energía, los AG, para aquellos tejidos capaces de utilizarla. El hígado juega un papel central en estos mecanismos: durante el ayuno prolongado el hígado utiliza fundamentalmente la grasa como fuente de energía, a partir de la oxidación de los AG; si ésta se satura, puede producirse un aumento de AGL intrahepáticos y su consecuente depósito en forma de TG (171).

La pérdida de peso se asocia a un aumento del flujo de AGL desde el tejido adiposo al hígado (178). Wanless y Lenz (39) efectuaron un análisis retrospectivo de los factores de riesgo para la aparición de esteatosis hepática y EHNA en su serie de autopsias de 207 obesos y encontraron que el grado de obesidad y la pérdida de peso durante el último mes de vida se asociaban con una mayor frecuencia en la aparición de dichas lesiones (82,7% en los obesos vs. 18,5% en los no obesos y 32% vs. 8,5% en aquellos con o sin pérdida de peso, respectivamente).

Se han hallado lesiones idénticas a la EHNA en un 26% de obesos tras cirugía de bypass intestinal y entre las hipótesis patogénicas se encuentra la movilización de AG durante la pérdida de peso. Se ha comprobado que las lesiones hepáticas tras el bypass yeyunoileal ocurren durante el periodo de máxima pérdida ponderal y que son más severas en aquellos pacientes que pierden más peso (70,76).

2. Incremento en la síntesis hepática de AG

Es otro de los mecanismos implicados en la aparición de esteatosis hepática, el cual se asocia fundamentalmente con la *NPT rica en carbohidratos* y pobre en lípidos (85,86,179) así como con el *tratamiento con glucosa intravenosa* (39).

Los AG se sintetizan en el citosol celular por la adición secuencial de unidades de dos carbonos derivados del acetil-CoA. El acetil-CoA procede de la glicolisis aerobia y se forma en la mitocondria a partir del piruvato, por acción de la piruvato deshidrogenasa. La mayoría de los enzimas que intervienen en la síntesis de los AG están organizados en un complejo enzimático denominado “ácido graso sintetasa”,

que cataliza una serie de reacciones de condensación, reducción, deshidratación y de nuevo reducción, cuyo producto final es el palmitato (C16) (Tabla 5).

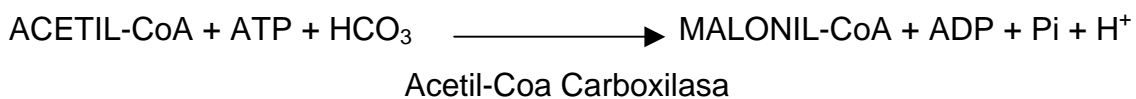
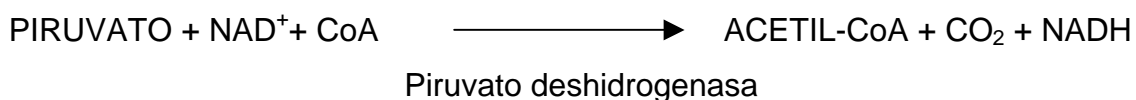
Tabla 5. Reacciones principales de la síntesis de los ácidos grasos (168)

ETAPA	REACCIÓN	ENZIMA
1	Acetil-CoA+HCO ₃ ⁻ +ATP → Acil-CoA+ADP+Pi+H ⁺	Acetil-CoA carboxilasa
2	Acetil-CoA+ACP ↔ Acetil-ACP+CoA	Acetiltransacilasa
3	Malonil-CoA+ACP → Malonil-ACP+CoA	Maloniltransacilasa
4	Acetil-ACP+malonil-ACP → Acetacetil-ACP+ACP+H ₂ O	Enzima condensante acil-malonil-ACP
5	Acetacetil-ACP+ NADPH+H ⁺ ↔ D-3-Hidroxiacil-ACP+NADP ⁺	β-Cetoacil-ACP reductasa
6	D-3-Hidroxiacil-ACP ↔ Crotonil-ACP+H ₂ O	3-hidroxiacil-ACP-deshidratasa
7	Crotonil-ACP +NADPH+H ⁺ → Butiril-ACP+NADP ⁺	Enoil-ACP reductasa

Algunas características sobresalientes de la biosíntesis de los AG son:

-La síntesis se produce en el citosol, a diferencia de la degradación, que tiene lugar en la matriz mitocondrial.

- La formación de malonil-CoA, por acción de la acetil-CoA carboxilasa, es la etapa limitante en la síntesis de los AG.



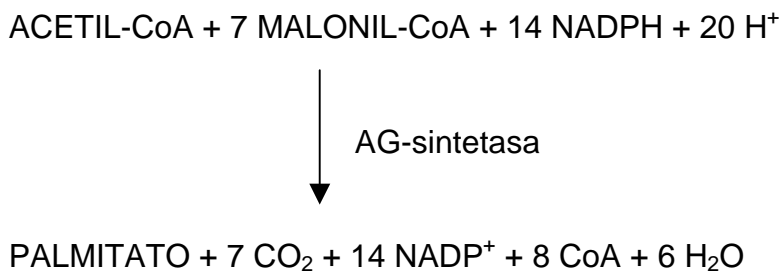
-Los intermediarios en la síntesis de AG están covalentemente unidos a los grupos sulfhidrilo de una “proteína transportadora de grupos acilo” (ACP), mientras que los intermediarios en la degradación, como luego veremos, están ligados al CoA.

-El reductor en la síntesis de los AG es el NADPH, mientras que los oxidantes en la degradación de los AG son el NAD⁺ y el FAD.

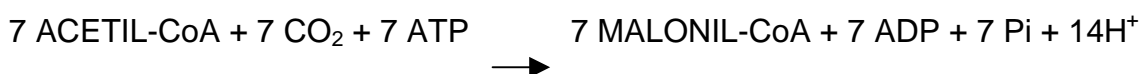
-La cadena del AG en crecimiento se alarga por la adición secuencial de unidades de 2 carbonos derivados del acetil-CoA. El dador activado de unidades de 2 átomos de carbono en la etapa de elongación es el Malonil-ACP y está dirigida por la eliminación de CO_2 .

-Completado el primer ciclo de elongación, el butiril-ACP se condensa con malonil-ACP para formar un C_6 - β -Cetoacil-ACP. Una reducción, una deshidratación y una segunda reducción lo convierten en un C_6 -acil-ACP, el cual está listo para un tercer ciclo de elongación. Los ciclos de elongación continúan hasta formar un C_{16} -acil-ACP, el cual se hidroliza para producir palmitato y ACP. La elongación por el complejo AG-sintetasa se detiene en la formación del palmitato (C_{16}). La elongación posterior y la inserción de dobles enlaces se llevan a cabo por otros sistemas enzimáticos.

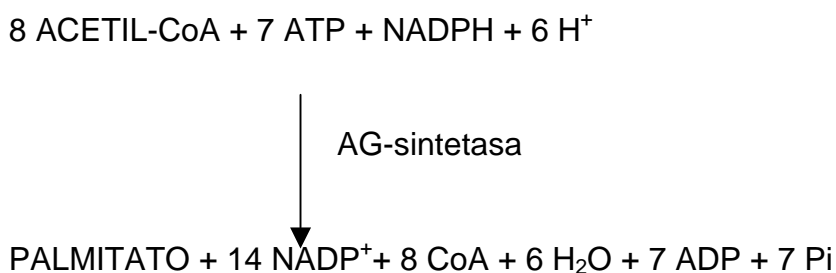
La estequiometría de la síntesis del palmitato es:



La ecuación para la síntesis del malonil-CoA utilizado en la reacción anterior es:

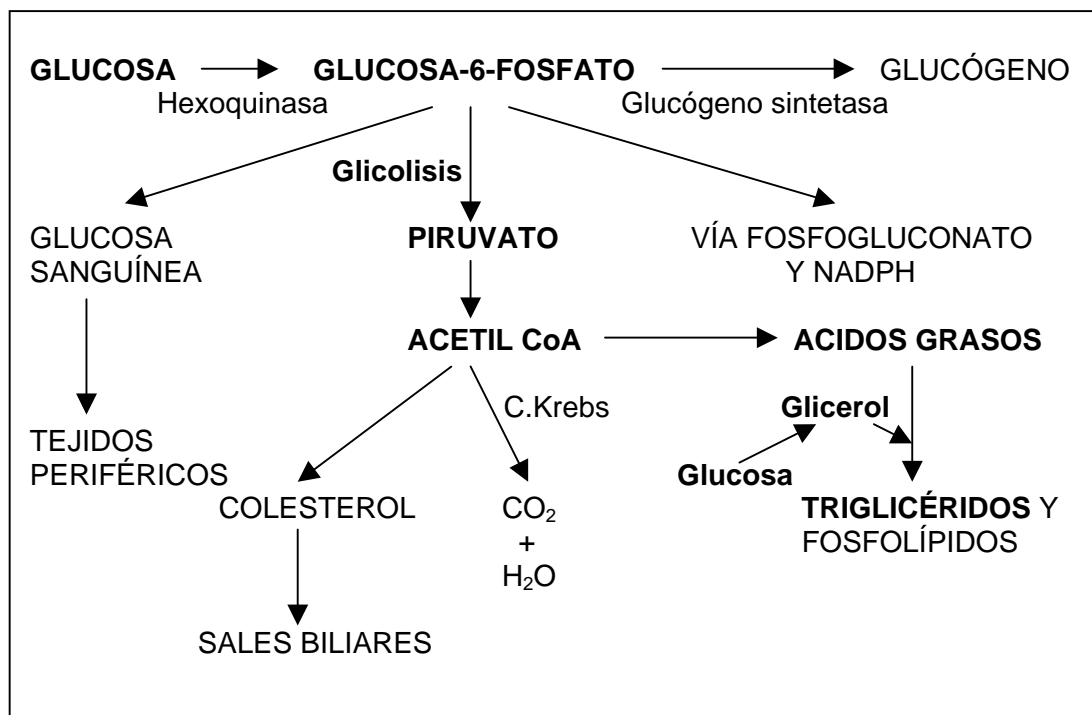


Por tanto, la ecuación global para la síntesis del palmitato es la siguiente:



La síntesis de AG es máxima cuando abundan los carbohidratos y el nivel de AG es bajo. En estas situaciones, la glucosa proporciona el acetyl-CoA necesario para iniciarse la síntesis de AG (Figura 3).

Figura 3. Vías metabólicas de la glucosa en el hígado (170)



La infusión de soluciones de NPT libres en lípidos y con dextrosa hipertónica al 20%, induce rápidamente esteatosis hepática en ratas, y en su mecanismo de producción parece jugar un papel clave el cociente insulina/ glucagón (I/G) (86). La insulina estimula la glicolisis y la síntesis de AG al activar a la acetil-CoA carboxilasa, acciones contrarias a las del glucagón. Es por ello que cuando se administra NPT con glucosa, se estimula la secreción de insulina, aumenta el cociente I/G en sangre portal y se favorece la aparición de esteatosis en el hígado. Por otro lado, se ha comprobado en animales de experimentación que cuando se suplementa la dieta con hidratos de carbono, el hígado responde aumentando la lipogénesis (Figura 3). En esta situación, se produce un aumento de la glucemia en la sangre portal, el hígado disminuye su producción y aumenta la captación de esta molécula; parte de la glucosa es almacenada en forma de glucógeno, y el resto transformada en AG.

3. Alteración en el catabolismo de los AGL

Los AGL son degradados por oxidación en el carbono β para dar lugar a unidades de dos átomos de carbono (acetil-CoA) mediante una serie de reacciones que constituyen la denominada β -oxidación. Dicho proceso se lleva a cabo en la matriz de la mitocondria, por lo que se precisa del transporte de los AG desde el citosol hasta el interior mitocondrial como paso previo a su oxidación. El acetil-CoA que se obtiene de la oxidación de los AG puede incorporarse al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, también denominado ciclo del ácido cítrico o de Krebs, obteniéndose CO_2 y H_2O como productos finales, liberándose además energía en forma de ATP. Los átomos de H_2 eliminados durante la deshidrogenación de los AG se incorporan finalmente a la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), produciéndose la fosforilación oxidativa del ADP a ATP (168,169) (Figura 2; pág. 17).

Antes de examinar las alteraciones que pueden cursar con un defecto de la β -oxidación de los AG, es preciso recordar las etapas principales de dicho proceso metabólico (Tabla 6).

Tabla 6. Principales reacciones en la β -oxidación de los ácidos grasos (168)

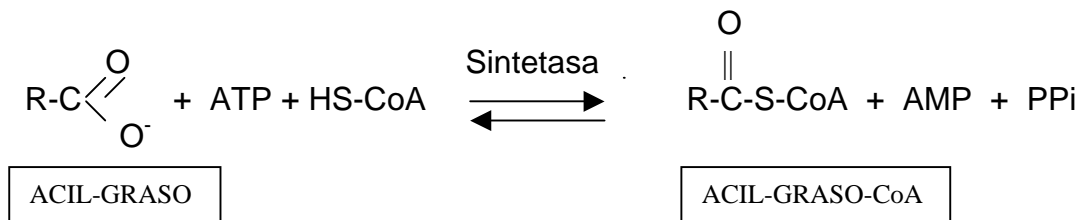
ETAPA	REACCIÓN	ENZIMA
1	$\text{AG} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Acil-CoA} + \text{AMP} + \text{PPi}$	Acil-CoA sintetasa
2	$\text{Carnitina} + \text{acil-CoA} \rightleftharpoons \text{Acilcarnitina} + \text{CoA}$	Carnitina aciltransferasa
3	$\text{Acil-CoA} + \text{E-FAD} \longrightarrow \text{Trans-}\Delta^2\text{-enoil-CoA} + \text{E-FADH}_2$	Acil-CoA deshidrogenasa
4	$\text{Trans-}\Delta^2\text{-enoil-CoA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{L-3-hidroxiacil-CoA}$	Enoil-CoA hidratasa
5	$\text{L-3-hidroxiacil-CoA} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{3-cetoacil-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$	L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
6	$\text{3-cetoacil-CoA} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Acetil-CoA} + \text{acil-CoA}$	β -Cetotilasa

1^a- Activación del AG

Como fase previa a su oxidación, los AG se activan en la membrana externa mitocondrial a través de una reacción de condensación con CoA. Consiste en la esterificación del AGL con CoA extramitocondrial para dar el acil-(graso)-CoA. Esta

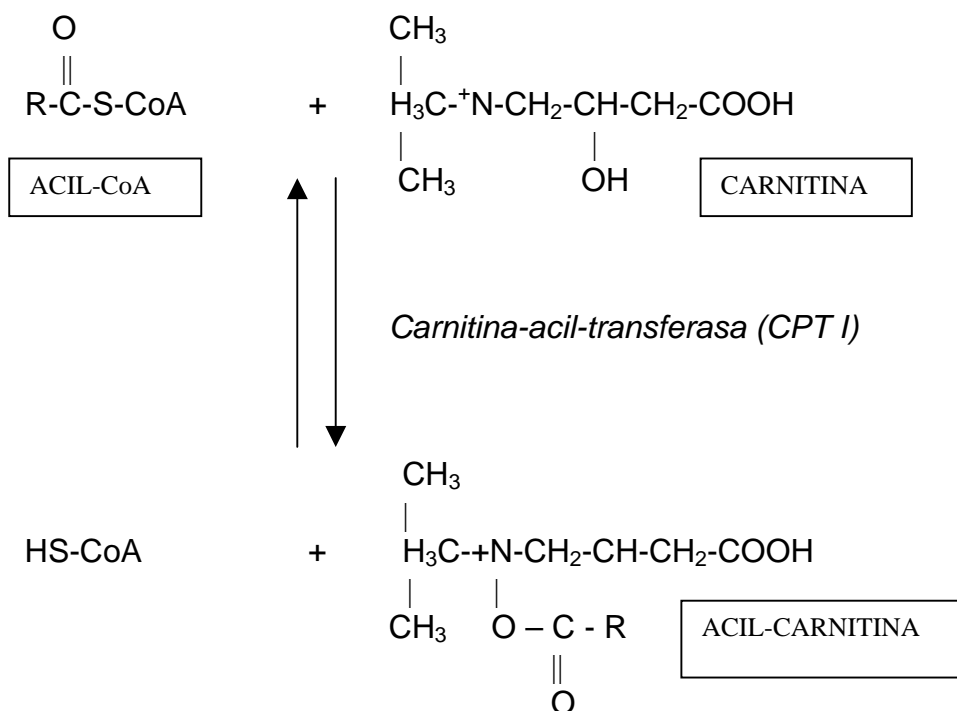
reacción está impulsada por el ATP y catalizada por la *acil-CoA-sintetasa*, también denominada AG tioquinasa. La activación tiene lugar en dos etapas, primero reacciona con el ATP para formar aciladenilato y pirofosfato y posteriormente se forma un enlace tioéster entre el grupo carboxilo del AG y el sulfhidrilo del CoA.

La reacción global es la siguiente:



2ª- Transferencia a la carnitina

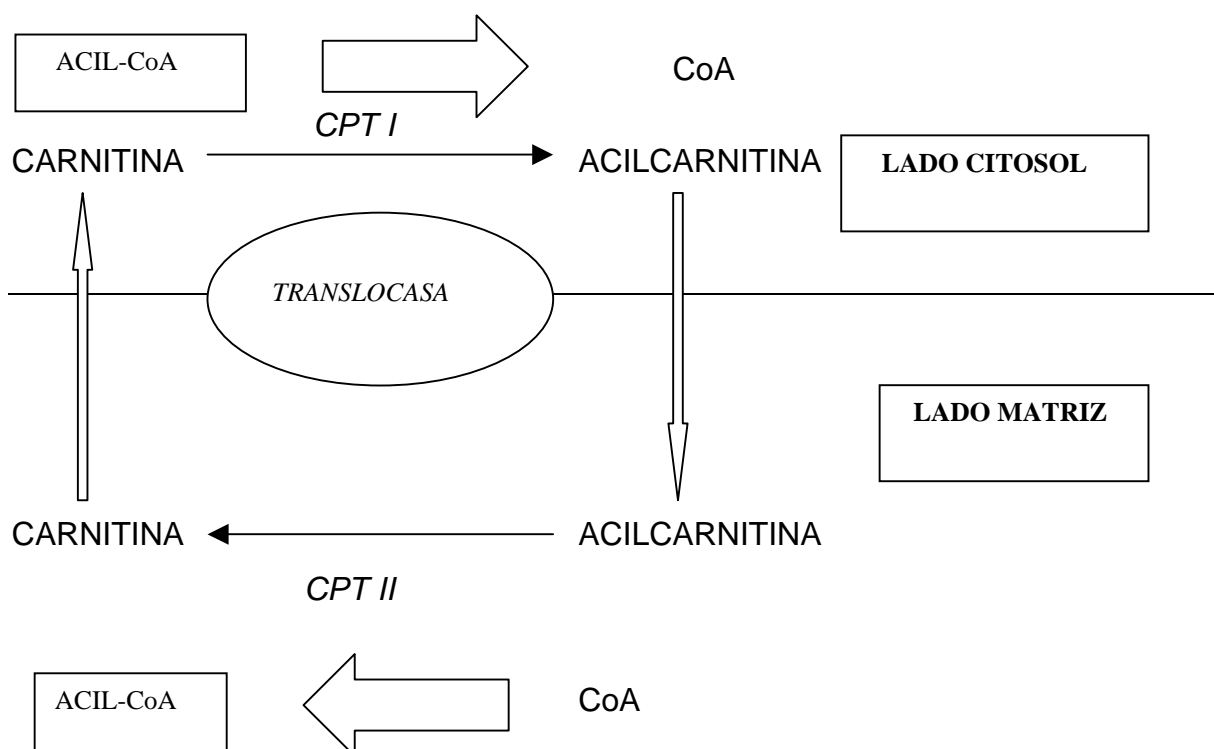
Aunque los AG de cadena corta pueden atravesar la membrana mitocondrial como ácidos libres, los AG de cadena larga necesitan de un mecanismo especial de transporte. La carnitina es la molécula transportadora del AG de cadena larga activado hasta la matriz mitocondrial, dónde están localizados los enzimas necesarios para la oxidación del AG.



El grupo acilo es transferido desde el átomo de azufre del CoA al grupo hidroxilo de la carnitina para formar acilcarnitina. Esta reacción está catalizada por la *carnitina-acil-transferasa I (CPT I)*, localizada en la cara citosólica de la membrana interna de la mitocondria.

3ª- Transferencia del CoA intramitocondrial

La acilcarnitina actúa como una lanzadera a través de la membrana interna mitocondrial por acción de una *translocasa*, de forma que transfiere el grupo acilo a un CoA situado en la matriz mitocondrial. Este sistema de “lanzadera del AG” mantiene separados el pool extra e intramitocondrial de CoA y de AG. Esta reacción está catalizada por la *carnitina-acil-transferasa II (CPT II)*. Por último, la carnitina vuelve al lado citosólico por acción de la misma translocasa, intercambiándose por otra molécula de acilcarnitina de la siguiente manera:



4^a- *β-oxidación* (Tabla 6; pág. 23)

La primera reacción en cada ciclo es la *oxidación* del acil-CoA por una acil-CoA-deshidrogenasa para dar un enoil-CoA con un doble enlace trans entre los átomos de carbono C₂ y C₃. El aceptor de electrones es la flavina adenina dinucleótido (FAD) en vez del NAD⁺ debido a que la energía producida en esta reacción es insuficiente para conseguir la reducción del NAD⁺. Los electrones procedentes del grupo prostético FADH₂ de la acil-CoA deshidrogenasa reducida se transfieren a una segunda flavoproteína denominada ETF (flavoproteína transferidora de electrones), la cual dona a su vez los electrones, como se detallará más adelante, a la cadena respiratoria a través de la ubiquinona reductasa.

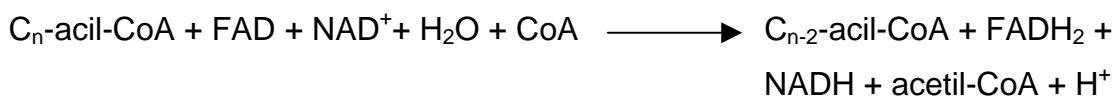
La siguiente etapa es la *hidratación* del doble enlace entre C₂ y C₃ por acción de la enoil-CoA-hidratasa.

Ahora se produce una segunda reacción de *oxidación* que convierte al grupo hidroxilo de C₃ en un grupo ceto y genera NADH. Esta reacción es catalizada por la L-3-hidroxil-CoA-deshidrogenasa.

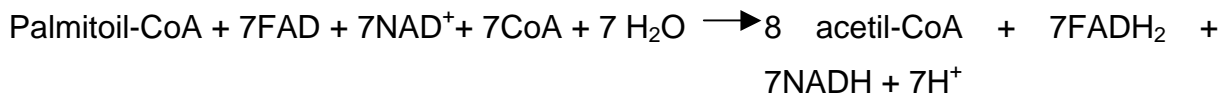
La etapa final es la *escisión* del 3-cetoacil-CoA por el grupo tiol de una segunda molécula de CoA que produce acetil-CoA y un acil-CoA acortado en dos átomos de carbono. Dicha división es catalizada por la β-cetotiolasa.

El acil-CoA acortado en dos átomos de carbono experimenta luego otro ciclo de oxidación que se inicia de nuevo con la reacción catalizada por la acil-CoA deshidrogenasa. De esta manera, y secuencialmente, se van eliminando fragmentos de dos átomos de carbono desde el extremo carboxílico del ácido graso.

En resumen, en cada ciclo de reacción, un acil-CoA saturado se degrada mediante una secuencia repetitiva de 4 reacciones: oxidación ligada al FAD; hidratación; oxidación ligada al NAD⁺ y tiolisis por CoA. Como resultado de estas reacciones la cadena del ácido se acorta en 2 átomos de carbono y se genera FADH₂, NADH y acetil-CoA:



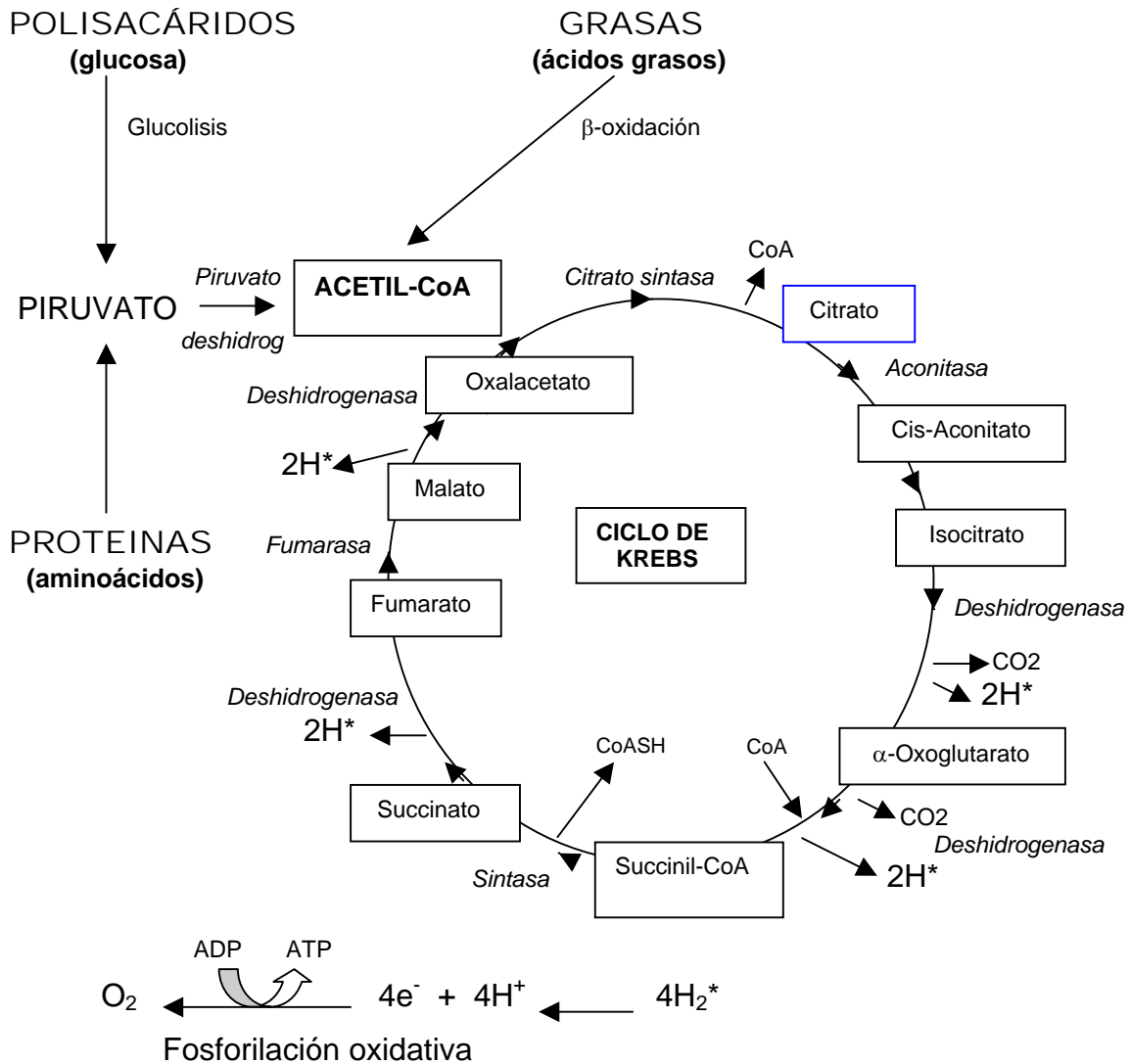
Así, la degradación de uno de los ácidos grasos saturados y de cadena larga más frecuentes en los seres vivos, como es el palmitoil-CoA, un acil-CoA de 16 átomos de carbono, requiere 7 ciclos de reacción, resultando en el último paso 2 moléculas de acetil-CoA:



Siempre que la degradación de las grasas y de los hidratos de carbono se encuentren equilibradas, el acetil-CoA formado en la oxidación de los ácidos grasos entra en ciclo del ácido cítrico.

El *ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclo del ácido cítrico o de Krebs* es la ruta central común para degradar los restos acetilo de 2 átomos de carbono que derivan de los glúcidos, los ácidos grasos y los aminoácidos (180,181). Se da en los organismos aerobios, y se localiza en la mitocondria. Está constituido por un sistema multienzimático que acepta el acetilo del acetil-CoA como combustible, degradándolo hasta CO_2 y H_2 . Los H_2 que se producen en dicho ciclo, son conducidos por una secuencia de proteínas transportadoras de electrones hasta el oxígeno molecular produciéndose energía en forma de ATP mediante la denominada fosforilación oxidativa (Figura 4).

Figura 4. Ciclo del ácido cítrico: ruta final común para la oxidación de las moléculas combustibles (ácidos grasos, aminoácidos, glúcidos)



En cada vuelta del ciclo se incorpora una molécula de acetil-CoA (2 átomos de carbono), que se condensa con el oxalacetato (4 átomos de carbono), dando lugar a citrato (6 átomos de carbono). Se liberan 2 CO₂ y se regenera el oxalacetato (por ello basta una molécula de oxalacetato para oxidar un número ilimitado de moléculas de acetil-CoA). En las cuatro óxido-reducciones del ciclo se obtienen 4 pares de átomos de H₂; tres pares de electrones (e⁻) procedentes de estos H₂ son transferidos al NAD⁺ y un par al FAD. Estos aceptores de electrones se regeneran cuando el NADH y el FADH₂ transfieren sus electrones al O₂ a través de la cadena

de transporte electrónico, con la consiguiente producción de ATP. En consecuencia, la velocidad del ciclo del ácido cítrico depende de las necesidades de ATP. La regulación de tres enzimas del ciclo es también importante para su control. Una carga energética elevada disminuye la actividad de la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. La formación irreversible de acetil-CoA a partir de piruvato es otro punto importante de regulación. La actividad del complejo piruvato-deshidrogenasa está controlada estrictamente por fosforilación reversible. Estos mecanismos se complementan entre sí, reduciendo la velocidad de formación de acetil-CoA cuando la carga energética de la célula es alta y cuando los intermediarios biosintéticos son abundantes.

El NADH y el FADH₂ procedentes de la oxidación de los ácidos grasos y del ciclo del ácido cítrico son moléculas ricas en energía porque contienen un par de electrones con elevado poder de transferencia (182). Cuando estos electrones se transfieren al oxígeno molecular, se libera gran cantidad de energía. Esta energía liberada puede utilizarse para generar ATP. La FOSFORILACIÓN OXIDATIVA es el proceso por el que se forma ATP cuando, mediante una serie de transportadores de electrones que constituyen la cadena respiratoria, se transfieren electrones desde el NADH ó el FADH₂ al O₂ (183,184). Constituye la fuente principal de ATP en los organismos aerobios. Algunos aspectos sobresalientes de este proceso son:

1. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo por sistemas respiratorios que están localizados en la membrana interna de las mitocondrias. El ciclo del ácido cítrico y la vía de oxidación de los ácidos grasos, que suministran la mayor parte del NADH y del FADH₂, tienen lugar en la matriz mitocondrial adyacente.
2. La oxidación del NADH produce 3 ATP, mientras que la oxidación del FADH₂ produce 2 ATP.
3. La fosforilación oxidativa es conceptualmente sencilla, pero mecanísticamente compleja. El flujo de electrones desde el NADH o el FADH₂ al O₂ a través de una serie de complejos proteicos localizados en la membrana interna mitocondrial provoca el bombeo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial. Se genera así una fuerza protomotriz que está formada por un gradiente de pH y por un potencial eléctrico transmembranal. Cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de un complejo enzimático, se sintetiza ATP. De esta forma,

la oxidación y la fosforilación están acopladas por un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Figura 5).

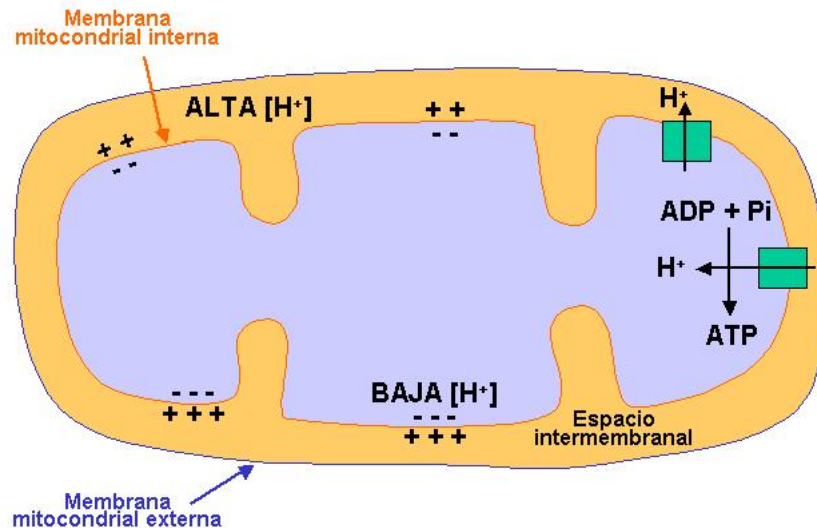


Figura 5. La oxidación y la síntesis de ATP están acopladas mediante el flujo de protones a través de la membrana de la mitocondria

Adaptada de Stryer L. Fosforilación oxidativa. En: Stryer L, ed. Bioquímica. Volumen 2. Barcelona: Reverté S.A., 1995 (4ªed): 529-55

A medida que los electrones fluyen por la CRM, los protones son bombeados a través de la membrana desde la matriz hacia el lado citosólico de la membrana mitocondrial interna. El gradiente de pH y el potencial de membrana constituyen una fuerza protomotriz que se utiliza para dirigir la síntesis de ATP.

En esencia, en la fosforilación oxidativa, la fuerza electromotriz se transforma primero en fuerza protomotriz y después en potencial de transferencia de grupos fosforilo. La primera etapa se lleva a cabo mediante tres bombas de protones dirigidas por electrones (NADH-Q oxidorreductasa, citocromo c oxidorreductasa y citocromo c oxidasa). La segunda etapa de la fosforilación oxidativa es llevada a cabo por la ATP sintasa, un complejo capaz de sintetizar ATP, y que es dirigido por el flujo de protones que regresan hacia la matriz de la mitocondria.

La mitocondria es el orgánulo aeróbico en el que ocurre la etapa final de la oxidación de los alimentos. Es el lugar donde se produce el ciclo del ácido cítrico, la

oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, procesos que generan la mayor parte de la energía celular en condiciones aeróbicas. El número de mitocondrias de las células varía espectacularmente. Una célula hepática de mamífero contiene de 800 a 2.500 mitocondrias. También varía mucho el tamaño (0.2-0.8 μm) y además no son estáticas, adoptando distintas formas en condiciones metabólicas diferentes. Las mitocondrias poseen dos sistemas membranosos: una membrana externa y una membrana interna. La membrana interna está doblada, originando una serie de repliegues denominados crestas. De ahí que existan dos compartimentos mitocondriales: el espacio intermembranoso, entre las membranas externa e interna, y la matriz, limitada por la membrana interna (Figura 5; pág. 30).

Además de los enzimas responsables del ciclo del ácido cítrico y de la oxidación de los ácidos grasos, la matriz también contiene varias moléculas de ADN circular, ribosomas y los enzimas necesarios para la biosíntesis de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial. La mitocondria no es, sin embargo, genéticamente autónoma, y los genes que codifican la mayoría de las proteínas mitocondriales están situados en el ADN nuclear. El genoma mitocondrial contiene 37 genes que codifican la síntesis de 13 proteínas estructurales de la cadena respiratoria (siete unidades del complejo I, una del complejo III, 3 del complejo IV, y 2 del complejo V), 2 ARN ribosómicos y 22 ARN de transferencia. El resto de enzimas que intervienen en el metabolismo mitocondrial se codifican en el ADN nuclear (185).

La CADENA RESPIRATORIA es una parte integrante de la membrana interna mitocondrial (186). Se trata de un sistema notablemente complicado, constituido por cinco complejos proteicos que catalizan la transferencia escalonada de electrones desde el NADH y el FADH_2 hasta el oxígeno molecular, permitiendo la recuperación del NAD y FADH así como la síntesis de ATP (Figura 6).

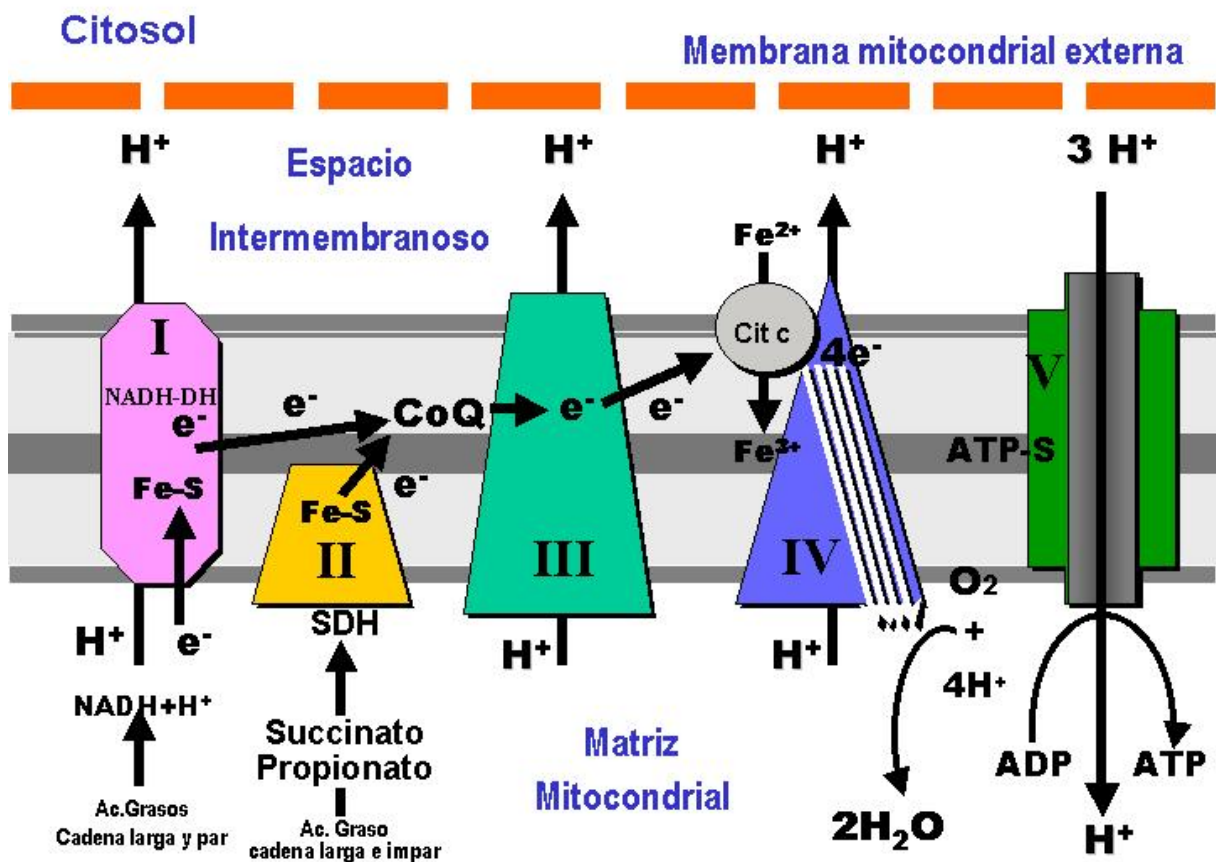


Figura 6. Representación de la cadena respiratoria mitocondrial y su funcionamiento

Adaptada de Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, de Bustos F, Campos Y, Arenas J. Déficits de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial. En: Jiménez-Jiménez FJ, Molina-Arjona JA, Arenas J, eds. Enfermedades mitocondriales. Rev Neurol 1998;26 (Supl I): 15-20

Los complejos enzimáticos que integran la cadena respiratoria se denominan NADH-ubiquinona (CoQ) oxidorreductasa o reductasa, Succinato CoQ oxidorreductasa, Ubiquinol (QH₂) citocromo c oxidorreductasa o reductasa, Citocromo c oxidasa (COX) y F₀-F₁-ATP sintasa, o complejos I a V, respectivamente (186).

Se desconocen muchos aspectos de la estructura y del mecanismo de estos complejos multiproteicos (Tabla 7).

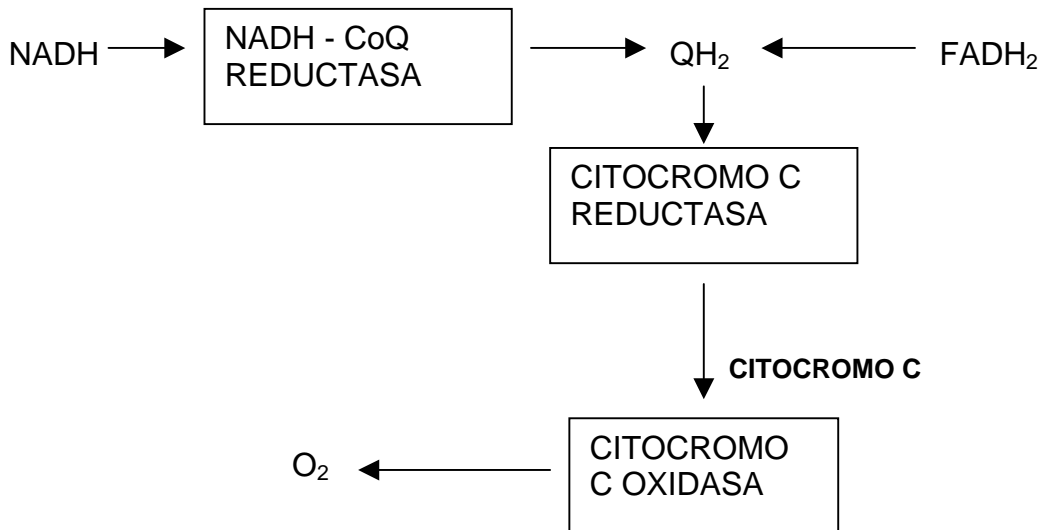
Tabla 7. Características de los complejos proteicos de la cadena respiratoria transportadora de electrones (183)

Complejo	Subunidades	Peso molecular	Cofactores
NADH CoQ reductasa	16-25	850.000	1 FMN 22-24 Fe-S
Succinato deshidrogenasa	4	125.0000	1 FAD 8 Fe-S Citocromo b ₅₆₀
QH ₂ -citocromo c reductasa	8	250.000	2 Fe-S Citocromo b ₅₆₂ Citocromo b ₅₆₆ Citocromo c ₁
COX	7	300.000	Citocromo a Citocromo a ₃ 2 iones cobre

Los grupos portadores de electrones de estos enzimas son flavinas, complejos de hierro-azufre (Fe-S), grupos hemo e iones cobre. Los polipéptidos que contienen centros Fe-S se conocen como “proteínas sulfoférricas”. Estas proteínas son componentes esenciales de los complejos I, II y III de la cadena respiratoria.

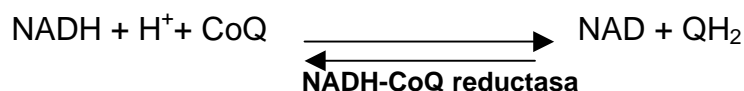
Los electrones son transportados desde el complejo I hasta el III mediante la forma reducida de la ubiquinona (QH₂). La ubiquinona (CoQ) también transporta electrones desde el FADH₂ hasta la citocromo reductasa. Una molécula pequeña, el citocromo c, cede los electrones de la citocromo reductasa a la citocromo oxidasa, componente final de la cadena (Figura 7).

Figura 7. Ruta del flujo de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular



- COMPLEJO I. NADH ubiquinona (CoQ) oxidorreductasa.

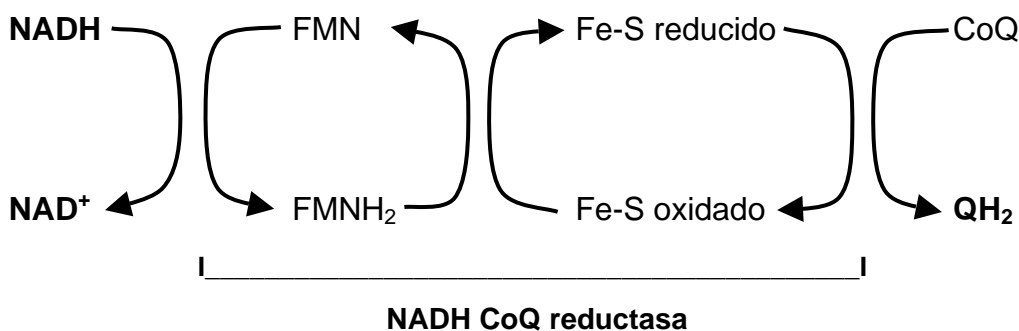
Es el complejo más grande de la cadena respiratoria. Cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona (Coenzima Q o CoQ), la cual se reduce a ubiquinol (QH₂).



Está integrado por al menos 25 polipéptidos, de los que 7 están codificados por el ADN mitocondrial (ADNmt), y varios componentes no proteicos, entre los que se encuentran: flavín mononucleótido (FMN), 8 núcleos de Fe-S de naturaleza no hémica y fosfolípidos. Las subunidades del complejo I se disponen en L, de forma que un brazo de la estructura se encuentra inmerso en la membrana mitocondrial, mientras que el otro penetra dentro de la matriz. El brazo periférico, que incluye un mononucleótido de flavina y al menos 4 núcleos Fe-S, forma la fracción “NADH deshidrogenasa”. El brazo unido a la membrana contiene las 7 subunidades codificadas por el ADNmt y uno o dos núcleos Fe-S, y constituye la fracción

“ubiquinona reductasa”. Algunos de los centros sulfoférricos de la NADH CoQ reductasa tienen estequiometría Fe_2S_2 , mientras que otros la tienen Fe_4S_4 . Los átomos de hierro en estos complejos Fe-S pueden existir como Fe^{2+} (forma reducida) o bien como Fe^{3+} (forma oxidada). Por tanto, en procesos de transferencia de electrones, cada centro Fe_4S_4 de una proteína sulfoférrica totalmente oxidada puede aceptar hasta 4 electrones.

No está totalmente esclarecida la ruta que siguen los electrones desde el NADH hasta la ubiquinona (CoQ), ni la participación del FMN y de los centros sulfoférricos de la NADH CoQ reductasa en esa ruta. Se acepta que desde el NADH se transfieren 2 electrones al FMN, obteniéndose la forma reducida de éste (FMNH_2). A continuación los electrones son transportados desde el FMNH_2 hasta una serie de complejos Fe-S, el segundo tipo de grupo prostético de la NADH CoQ reductasa. Finalmente, los electrones son transferidos desde los centros Fe-S a la CoQ (ubiquinona o coenzima Q), la cual se reduce a QH_2 (ubiquinol) al aceptar 2 electrones.



El flujo de dos electrones desde el NADH hasta el QH_2 a través del complejo I, provoca el bombeo de cuatro H^+ desde el lado de la matriz al lado citosólico de la membrana interna mitocondrial. El mecanismo que convierte un potencial electrónico en una fuerza protomotriz aún se desconoce, aunque es posible que cambios conformacionales en la estructura del enzima, provocados por estas transferencias electrónicas, provoquen el bombeo de protones.

En la siguiente etapa, los electrones son transferidos desde el QH_2 hasta el complejo III (Ubiquinol citocromo c reductasa).

Un bloqueo a nivel del complejo I impide que se produzca la oxidación del NADH formado en el ciclo de Krebs. Por el contrario, la oxidación del FADH_2

generado en la reacción de la succinato deshidrogenasa (SDH), no se afecta porque está mediada por el complejo II.

- COMPLEJO II. Succinato CoQ oxidorreductasa.

Integrado por 4 polipéptidos, es el único complejo que no tiene subunidades codificadas por el ADNmt. Cataliza la oxidación del succinato al fumarato, transfiriendo los electrones al pool de la ubiquinona. El complejo II puede dividirse en dos fracciones: una soluble, formada por la succinato deshidrogenasa (SDH), la enzima que oxida el succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico, y otra que sirve como anclaje a la membrana. A su vez, la SDH está formada por dos subunidades: una subunidad flavoproteica, que contiene el lugar de unión al succinato y la parte de FAD, que está unida de manera covalente al enzima; y otra subunidad Fe-S. La SDH se une a la membrana interna de la mitocondria mediante dos polipéptidos que contienen un único grupo hemo (citocromo b). Ambas proteínas son necesarias para la unión con la ubiquinona. El flujo de electrones desde el succinato hasta la ubiquinona tiene lugar por la vía del FADH₂ que es producido por la oxidación del succinato a fumarato. Recordemos que el FADH₂ se forma en el ciclo del ácido cítrico por la oxidación del succinato a fumarato, por medio de la SDH, componente del complejo II. El FADH₂ no abandona el complejo. En vez de ello, sus electrones se transfieren a centros Fe-S y de allí al CoQ para incorporarse a la cadena transportadora de electrones. El potencial estándar de reducción de la transferencia de electrones desde el FADH₂ hasta la CoQ es mucho menor que la variación de potencial de la reacción de la NADH CoQ reductasa. La pequeña variación de energía no permite a la succinato CoQ reductasa bombear protones a través de la membrana mitocondrial. Por tanto, este complejo proteico no contribuye a la creación del gradiente de protones. Sin embargo, sí transfiere electrones a la CoQ, y la subsiguiente oxidación de ésta se encuentra acoplada a la síntesis de ATP a través de los gradientes de protones creados por la QH₂ citocromo c reductasa y la citocromo c oxidasa. Así, por cada par de electrones que pasan desde el succinato a la cadena transportadora de electrones, se sintetizan 2 moléculas de ATP, hecho que contrasta con las 3 moléculas de ATP producidas en la oxidación del NADH por la cadena respiratoria.

El déficit del complejo II se caracteriza entonces por una disminución de la oxidación de los sustratos FADH_2 dependientes, como el succinato, y por una oxidación normal de los que dependen del NADH.

- COMPLEJO III. Ubiquinol (QH_2) citocromo c reductasa.

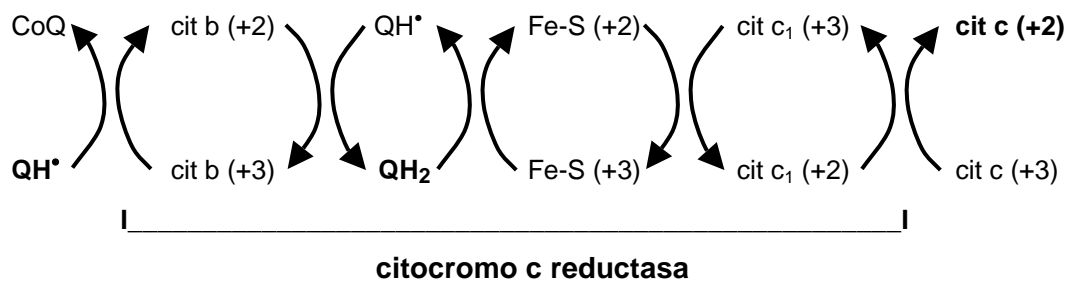
De las tres bombas de protones de la cadena respiratoria, la segunda es la citocromo oxidasa, la cual transfiere electrones desde el QH_2 al citocromo c. Los citocromos son un grupo de proteínas que contienen un grupo hemo y que actúan como portadores de un electrón en las cadenas transportadoras de electrones respiratoria y fotosintética. Durante el transporte de electrones, los átomos de hierro de los citocromos alternan entre el estado ferroso reducido (+2) y el estado férrico oxidado (+3). Se encuentran en todos los organismos aerobios. Según la naturaleza de las cadenas laterales de su grupo hemo, hay 3 clases principales de citocromos: a, b y c.

El citocromo c actúa como un transportador intermediario de transferencia electrónica entre el complejo III y IV. La función de la citocromo reductasa es catalizar la transferencia de electrones desde el QH_2 al citocromo c, y al mismo tiempo bombear protones a través de la membrana interna mitocondrial. El flujo de un par de electrones a través de este complejo provoca el transporte neto de 2H^+ hacia el lado citosólico, un rendimiento que es la mitad del que se obtiene con la NADH CoQ reductasa, dado que el impulso termodinámico es menor.

La citocromo reductasa está formada por 11 subunidades, de las cuales una, el citocromo b, está codificada por el genoma mitocondrial. El resto de los polipéptidos están codificados por el ADN nuclear (ADNn). Las 5 subunidades mayores son muy parecidas en las diferentes especies y contienen 4 centros de óxido-reducción: el citocromo c (subunidad IV), la proteína Fe-S de Rieske (subunidad V) y los 2 grupos hemo del citocromo b, el b_{562} y el b_{566} (subunidad III). La función de las otras subunidades se desconoce.

El ubiquinol (QH_2) transfiere uno de sus dos electrones al complejo Fe-S de la reductasa. Este electrón es entonces conducido de manera secuencial hacia el citocromo c_1 y el citocromo c, el cual lo transfiere fuera de este complejo. La transferencia de este electrón convierte al ubiquinol (QH_2) en el anión semiquinona (QH^\bullet). El otro electrón que permanece en la semiquinona, se transfiere rápidamente

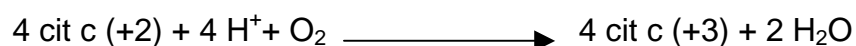
al citocromo b para formar CoQ, la cual difunde libremente en la membrana. En este momento, el grupo hemo b se reduce, a la vez que un coenzima Q, próximo al lado citosólico, se reduce también para formar QH[•]. En este punto la función del complejo enzimático se ha cumplido solo a medias, ya que únicamente uno de los dos electrones procedentes del QH₂ ha sido transferido al citocromo c. El otro electrón está esperando su turno en forma de CoQ[•] unido. Una segunda molécula de QH₂ reacciona entonces con el complejo, del mismo modo que la primera. Uno de sus electrones se transfiere a un centro Fe-S y posteriormente a los citocromos c₁ y c. El otro electrón viaja desde el CoQ[•] recién formado hacia el citocromo b. Sin embargo, esta vez el grupo hemo b reduce a un CoQ[•] unido en vez de a CoQ, con lo que se completa el llamado ciclo Q. De esta forma, a lo largo de un ciclo completo, dos QH₂ se oxidan para formar dos CoQ, y un CoQ se reduce a QH₂. Toda esta complejidad tiene su explicación en la transferencia eficaz de electrones desde un transportador de dos electrones (QH₂) a un transportador de un electrón (el citocromo c). En esencia, el componente citocromo b de la reductasa es un mecanismo de reciclaje que permite que los dos electrones de QH₂ sean utilizados de manera efectiva.



Un bloqueo a nivel del complejo III altera la utilización de sustratos NADH y FADH₂ dependientes.

- COMPLEJO IV. Citocromo c oxidasa.

Es el último de los complejos que bombean protones de la cadena respiratoria. Cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c, en su forma reducida, hasta el oxígeno molecular, que es el aceptor final.

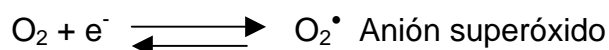


Cuatro electrones son cedidos al O_2 para reducirlo completamente al H_2O a la vez que se bombean protones desde la matriz al lado citosólico de la membrana interna mitocondrial.

Esta reacción se realiza mediante un complejo de 10 subunidades, de las cuales tres (llamadas subunidades I, II y III) están codificadas por el propio genoma mitocondrial. La citocromo oxidasa contiene dos grupos hemo A y dos iones cobre. Los dos grupos hemo A, aunque químicamente idénticos, tienen propiedades diferentes debido a que están ubicados en puntos distintos de la citocromo oxidasa. Uno de ellos se llama hemo a y el otro hemo a_3 . Asimismo, los dos iones cobre denominados Cu_A y Cu_B son distintos porque están enlazados de diferente forma a la proteína. El hemo a está próximo al Cu_A en la subunidad II y el hemo a_3 está próximo al Cu_B en la subunidad I. Los pares redox de la citocromo oxidasa, conocidos como citocromo a y a_3 , se encuentran en las subunidades II y I, respectivamente.

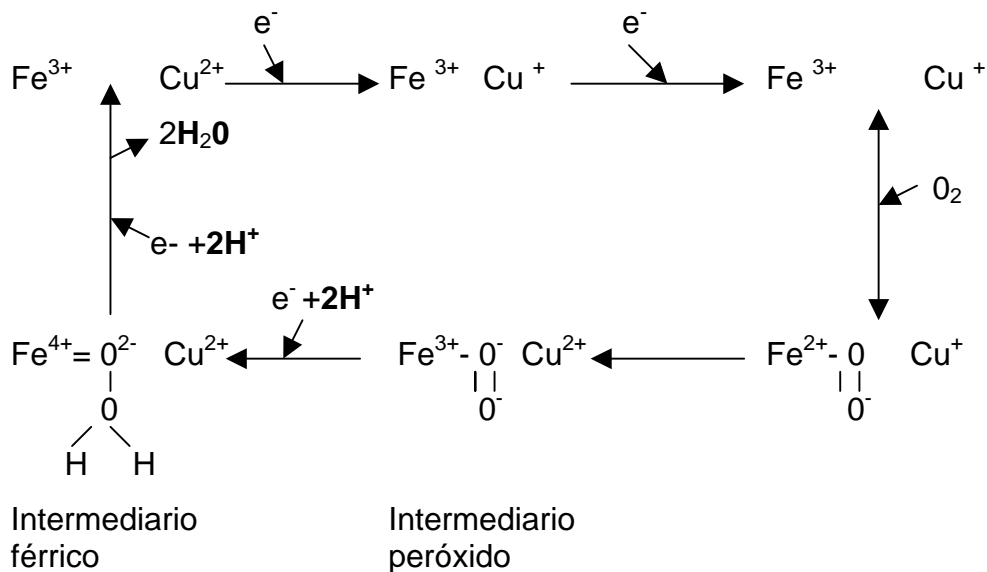
El ferrocitocromo c cede su electrón al complejo hemo a- Cu_A . Un electrón se transfiere entonces al complejo hemo a_3 - Cu_B , donde el O_2 se reduce en una serie de pasos hasta dos moléculas de H_2O .

El oxígeno molecular es un aceptor final de electrones ideal. Su alta afinidad por los electrones proporciona un gran impulso termodinámico a la fosforilación oxidativa. Es más, el O_2 , en contraste con otros fuertes aceptores de electrones, reacciona muy lentamente a menos que sea activado en un proceso catalítico. Sin embargo, la reducción del O_2 no está exenta de riesgos. La transferencia de cuatro electrones conduce a la obtención de productos inocuos (dos moléculas de H_2O), pero la reducción parcial puede generar compuestos altamente peligrosos. En particular el anión superóxido, un compuesto altamente destructivo, que se forma mediante la transferencia de un único electrón al O_2 .



La estrategia para la reducción segura del O_2 se basa en que la catálisis nunca debe producir intermediarios parcialmente reducidos. La citocromo c oxidasa cumple este criterio enlazando al O_2 entre los iones Fe^{2+} y Cu^+ de su centro a_3 - Cu_B (Figura 8).

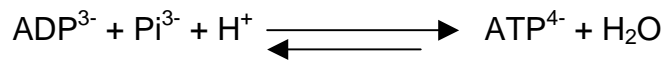
Figura 8. Ciclo de reacciones para la reducción del O_2 por 4 electrones procedentes de la citocromo oxidasa (183)



El ciclo comienza con el centro totalmente oxidado: el hierro en estado +3 y el cobre en estado +2. El primer electrón entregado por el ferrocitocromo c reduce al Cu^{2+} y el segundo reduce al Fe^{3+} . El ion hierro del centro completamente reducido se une entonces al oxígeno molecular, que extrae un electrón de cada ion para formar un intermediario peróxido. El aporte de un electrón y la captura de dos H^+ provocan la ruptura del peróxido unido. Un átomo de oxígeno se une en estado -2 al hierro en estado ferrilo +4, y el otro se une en forma de agua al Cu^{2+} . El aporte de un cuarto electrón y la captura de otros dos H^+ provocan la liberación inocua de dos moléculas de H_2O y la regeneración del centro bimetálico oxidado. El bombeo de protones se produce durante las dos últimas transiciones, desde el intermediario peróxido hasta el agua. El flujo de un par de electrones a través de la oxidasa provoca la translación de cuatro protones hacia el lado citosólico de la membrana.

- COMPLEJO V. F0-F1 ATP sintasa.

Cataliza la producción de ATP a partir de ADP y P_i y mediante esta reacción convierte el gradiente protónico transmembrana generado en la cadena respiratoria en energía química.



La integran 12-14 polipéptidos y dos de ellos, el 6 y el 8, están codificados por el ADNmt. La ATP sintasa está formada por dos fracciones, F0 y F1. La unidad F0 es un segmento hidrofóbico que atraviesa la membrana interna mitocondrial. Está formada por cuatro tipos de cadenas polipeptídicas y la cadena 8 Kd, de la cual hay 6 copias por cada unidad F1, forma probablemente el poro transmembranar para los protones. La unidad F0 es el conducto de protones del complejo, mientras que la unidad F1 es la porción catalítica de la enzima. Es una proteína soluble formada por cinco subunidades diferentes en una combinación estequiométrica α_3 , β_3 y δ_3 . La región F1 penetra en la matriz y se encuentra conectada a la porción F0 por una estructura similar a un pequeño tallo. Dicho tallo está formado por varias proteínas diferentes y una de ellas confiere al complejo su sensibilidad a la oligomicina, un antibiótico que bloquea la síntesis de ATP al impedir el uso del gradiente de protones.

Una vez finalizada la exposición de los pasos fisiológicos de la degradación de los ácidos grasos en el ser humano, es posible analizar por qué mecanismos puede alterarse dicho proceso con el subsiguiente acúmulo de ácidos grasos libres intrahepáticos y su depósito en forma de triglicéridos constituyendo el denominado hígado graso (Tabla 4; pág. 18).

3.1- Alteración de los mecanismos de transporte de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) a la matriz mitocondrial

3.1.1-Deficiencia de carnitina

La carnitina (ácido β -hidroxi-trimetil-aminobutírico) es un compuesto nitrogenado derivado de la transmetilación de los aminoácidos esenciales lisina y metionina. Su importancia se ha ido reconociendo durante las últimas tres décadas y actualmente se sabe que mediante el control que ejerce en el transporte de los AGCL a la matriz mitocondrial, juega un papel clave en la producción de energía celular (187-189).

Aproximadamente el 75% de las necesidades de carnitina se aportan con la dieta (carne roja y derivados), el resto procede de la síntesis endógena (hígado y riñón). Tanto la carnitina procedente de la dieta, como la sintetizada de novo en hígado o riñón, deben ser transportadas a través de la sangre hasta los órganos que metabolizan los ácidos grasos. Existe un complejo equilibrio metabólico entre las distintas fracciones de carnitina en los diferentes compartimentos corporales, entre el pool de carnitina en tejidos y sangre y también con la fracción excretada por la orina. El 95% de la carnitina corporal total se almacena en el músculo (cardíaco y esquelético); el resto se encuentra en el hígado y riñón, y menos del 1% permanece en los fluidos biológicos. Como es una molécula hidrosoluble, la carnitina es filtrada y reabsorbida por el glomérulo renal para prevenir su pérdida en exceso por la orina (190,191).

La carnitina se encuentra en los tejidos y fluidos orgánicos en forma libre (CL) o esterificada con ácidos grasos en forma de acilcarnitina (CE). En el hombre los ésteres de carnitina constituyen aproximadamente el 25% de la carnitina total presente en el suero y el 15% de la carnitina del hígado y músculo esquelético. La esterificación de carnitina es un mecanismo de almacén, transporte o excreción de grupos acilo. Los grupos acilo en las acilcarnitinas pueden ser de cadena corta (acetilcarnitina) o larga (palmitoilcarnitina). Las acilcarnitinas pueden abandonar la célula siguiendo la vía de transporte de la carnitina, entrar a la circulación y ser excretadas en la orina (190,192).

Como ya se mencionó durante la exposición de las distintas etapas de la oxidación de las grasas, existe una estrecha relación entre la carnitina y la oxidación de los ácidos grasos, puesto que la carnitina es la molécula transportadora del acilCoA (p.e., palmitoil CoA) presente en el espacio intermembrana de la mitocondria hasta la matriz de ésta, y lo hace como carnitina esterificada (p.e., palmitoilcarnitina). Por ello, una alteración en el metabolismo de la carnitina es capaz de bloquear la oxidación de los ácidos grasos, llevando a una pérdida en la producción de energía y consecuentemente a una disfunción celular (2,187,193).

Entre las diferentes causas que pueden dar lugar a una disminución de la carnitina en los diferentes tejidos se encuentran: 1-Disminución en la capacidad de síntesis por el hígado o el riñón, 2-Aumento de su excreción renal; 3-Dieta deficitaria en carnitina; 4-Alteración en su absorción intestinal; 5-Defectos en el transporte por la sangre; y 6-Deficiencia de carnitina libre por un exceso de ésteres de carnitina.

Se han descrito varios síndromes de deficiencia de carnitina en el hombre y la mayoría cursan con afectación del hígado y músculo, puesto que son los lugares de mayor actividad oxidativa (187,194,195). Globalmente podemos hablar de deficiencias de carnitina primarias y secundarias (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación de los déficits de carnitina (193)

-Deficiencia primaria:

- Muscular
- Sistémica
- Cardiomiopatía familiar

-Deficiencia secundaria (insuficiencia de carnitina):

Genética:

- Acidurias orgánicas
- Defectos de la β -oxidación
- Defectos de la cadena respiratoria

Adquirida:

- Insuficiencia renal en hemodiálisis
- Fármacos (valproato, pivampicilina, zidovudina)
- Nutrición parenteral total
- Embarazo
- Cirrosis
- Bypass yeyunoileal
- Hipotiroidismo e hipopituitarismo
- Insuficiencia adrenal

El **déficit primario de carnitina** se define según dos criterios: niveles tisulares de carnitina muy disminuidos y ausencia de alteraciones genéticas o adquiridas que provoquen la deplección tisular de carnitina (libre y esterificada con ácidos grasos) (196). Actualmente se reconoce como una verdadera entidad nosológica y se caracteriza por: 1. Cardiomiopatía progresiva; 2. Niveles disminuidos de carnitina libre y esterificada con ácidos grasos en plasma y tejidos (músculo, hígado, corazón); 3. Acúmulo de lípidos en distintos tejidos; y 4. Defecto en el

transporte de carnitina a los tejidos (músculo esquelético, miocardio, hígado), hecho demostrado en cultivos de fibroblastos. Se ha comprobado que al aumentar la concentración de carnitina presente en un medio de cultivo de fibroblastos, se normaliza el transporte a través de la membrana celular por mecanismos no aclarados, de ahí que se haya observado una mejoría en la clínica de muchos de estos enfermos al administrarles carnitina oral (2-6 mg/d) (197-199).

La **deficiencia secundaria de carnitina** engloba numerosas condiciones que pueden inducir una insuficiencia de carnitina libre debido a un aumento en su eliminación o bien a un exceso en su esterificación. El defecto primario, común a todas ellas, consiste en un bloqueo en el metabolismo de los ácidos grasos, produciéndose como consecuencia de ello un gran aumento en la concentración de moléculas de acilCoA y formación en exceso de acilcarnitinas. Para compensar el mayor consumo de carnitina, se produce un incremento en el transporte de ésta desde el plasma hasta las células de los tejidos, mecanismo que no llega a compensar la deficiencia de carnitina ya que no se equilibra simultáneamente con un incremento en la biosíntesis endógena ni con un mayor aporte en la dieta. Como consecuencia de este desequilibrio, aparece una deficiencia / insuficiencia de carnitina (192,199). Además, también se ha propuesto como mecanismo que puede contribuir a la deplección de carnitina la posibilidad de que los niveles aumentados de acilcarnitina alteren el transporte de carnitina en las células tubulares renales (200).

En resumen, en las deficiencias secundarias de carnitina encontraremos una deficiencia / insuficiencia de carnitina libre, con un aumento en la concentración de carnitina esterificada y, por tanto, un cociente de carnitina esterificada / carnitina total (CE / CT) aumentado. El exceso de acilcarnitina formado en las mitocondrias es extraído al citoplasma por la carnitin-acil-transferasa (CAT) y de ahí pasan a la circulación sanguínea y a la orina. Según el tipo de bloqueo en el catabolismo de los ácidos grasos, encontraremos un espectro específico de acilcarnitinas en la orina, siendo este dato útil para el diagnóstico.

Se han descrito deficiencias secundarias de carnitina en las *acidurias orgánicas* (donde existe una alteración en el metabolismo mitocondrial de ácidos grasos orgánicos) (201), en los *defectos de la β -oxidación* de los ácidos grasos (fundamentalmente en la deficiencias de acilCoA deshidrogenasas de cadena larga, media y corta) (187,202), *defectos en las flavoproteínas transportadoras de*

electrones (193), *defectos en la cadena respiratoria mitocondrial* (complejos I, II+III, IV y V) (199), *síndrome de Reye* (195), y en un grupo heterogéneo de condiciones en las que la disminución de la concentración de carnitina se produce por diferentes mecanismos: síndrome de Fanconi y hemodiálisis (disminución de la síntesis de carnitina y aumento en las pérdidas) (203) tratamientos con ácido valproico y pivampicilina (incremento en el consumo de carnitina por la aparición de valproilcarnitina y pivalocilcarnitina) (204,205); tratamiento con zidovudina (deplección del ADNmt) (206); y otras como el alcohol (207,208), bypass yeyunoileal (209), hipotiroidismo, hipopituitarismo, insuficiencia adrenal (194), kwashiorkor (210), embarazo, y nutrición parenteral total (88,89,151,211-213). En estas condiciones, la administración de suplementos de carnitina generalmente no mejora el cuadro (87,214).

En resumen, gracias a la posibilidad de cuantificar la carnitina en plasma y tejidos, en la actualidad es posible diferenciar entre la deficiencia primaria y secundaria de la carnitina. La concentración de carnitina plasmática es más baja en la primaria (menor del 10% de los niveles normales, frente al 20-70% en la secundaria) y también la concentración tisular de carnitina suele ser menor. Además, la relación CE / CT está aumentada en la secundaria, mientras que en la primaria dicho cociente tiende a ser normal. Otra diferencia importante es la ausencia de aciduria dicarboxílica en los déficits primarios, que normalmente se asocia a defectos en la β -oxidación y deficiencia secundaria de carnitina. Finalmente, mientras que en la deficiencia primaria los suplementos de carnitina suelen normalizar la concentración de carnitina, ésta mejoría no se observa en los déficit secundarios.

Aunque el papel fisiológico más estudiado de la carnitina es el de intervenir en la oxidación mitocondrial de los AGCL, también se le reconocen otras funciones (Tabla 9).

Tabla 9. Funciones fisiológicas de la carnitina (189)

-
- 1.Oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga
 - 2.Regulación del par mitocondrial acilCoA / CoA
 - 3.Oxidación peroxisomal de ácidos grasos
 - 4.Detoxificación de los grupos acilo
 - 5.Estabilización de membranas
 - 6.Metabolismo de aminoácidos ramificados
-

La carnitina intramitocondrial es capaz de extraer acilos de cadena corta desde el espacio intra al extramitocondrial en forma de acetilCoA. Actúa como buffer o modulador del cociente acilCoA / CoA al reaccionar con los acilCoA de cadena corta y media, por la acción de la CAT. Las acilcarnitinas formadas de esta manera, pueden ser lanzadas fuera de la mitocondria.

La carnitina interviene también en el metabolismo de aminoácidos ramificados al estimular su oxidación mediante la formación de acilcarnitinas ramificadas.

Actúa como detoxificadora de grupos acilo no fisiológicos cuando existe un bloqueo en el metabolismo de un acilCoA o cuando se forma un acilCoA que no puede ser metabolizado.

Interviene también en la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en los peroxisomas, cuyo producto final son ácidos grasos de cadena corta y acetilCoA.

Participa en la estabilización de membranas celulares: estudios en mitocondrias de hepatocitos de animales de experimentación han demostrado un potencial de membrana más elevado y mejor control respiratorio cuando son tratadas con carnitina.

Se han descrito otras funciones de la carnitina no dependientes de carnitina-acil-transferasas (CAT, CPT), como su interacción con los canales del calcio, la inhibición de la proteólisis, así como el estímulo de la agregación de eritrocitos.

La mayoría de las consecuencias de la deficiencia de carnitina pueden resumirse en los siguientes puntos (192-195):

1. Fallo en la oxidación de los lípidos, lo que explicaría el acúmulo de éstos en los diferentes tejidos.

2. Hipoglucemia, por fallo en la gluconeogénesis. Los niveles de ATP pueden estar disminuidos, y la acilCoA puede inhibir la acción de la piruvato carboxilasa, enzima inicial de la gluconeogénesis en la mitocondria. Además, si la génesis de energía aeróbica está alterada, se estimula la glicolisis anaerobia, depleccionándose los depósitos de glucógeno.
3. Acidemia láctico-pirúvica. Como resultado de la alteración en la oxidación del piruvato y del aumento en su producción. Los niveles elevados de metabolitos acilCoA inhiben al complejo piruvato deshidrogenasa y la conversión de piruvato en acetil-CoA. La deficiencia de carnitina estimula la producción de piruvato desde sus dos fuentes principales. El aumento en la glicolisis en el hígado incrementa la formación de piruvato.
4. Hiperamoniemia. Muchos factores son los que contribuyen.
5. Hígado graso. Por fallo en el catabolismo de los ácidos grasos. La pobre conversión de ácidos grasos en acilcarnitinas y la alteración del transporte en la mitocondria se correlaciona con el acúmulo de lípidos en los tejidos y el aumento de ácidos grasos libres en suero y tejidos.
6. Algunos metabolitos acilCoA inhiben a la 3-oxoacil-CoA tiolasa, un enzima de la β -oxidación, y pueden bloquear la acilcarnitina transferasa de cadena larga.
7. Hiperuricemia. Ocurre en algunas enfermedades mitocondriales, incluyendo al síndrome de Reye. Podría explicarse por un exceso en sangre de lactato, el cual compite en el lugar de transporte del ácido úrico en el riñón.

El hígado juega un papel clave en la homeostasis de la carnitina. Además de ser el lugar fundamental de síntesis, es capaz de captar la carnitina absorbida en el intestino delgado y que recibe a través de la vena porta, previamente a que ésta sea distribuida a los distintos órganos o eliminada por el riñón (192).

Se ha especulado que la deficiencia de carnitina podría intervenir en la patogenia de la EHNA. Por el momento, los estudios que existen sobre el metabolismo de la carnitina en pacientes y en animales de experimentación con enfermedad crónica hepática no han llegado a resultados concluyentes. La mayoría de los datos se han obtenido en la hepatopatía alcohólica, obesidad, y en situaciones de nutrición parenteral total y en la mayoría las conclusiones se obtienen a partir de mediciones de carnitina en plasma (87,88,207,214-217). Como la sangre actúa como transportador de la carnitina, sus niveles séricos pueden no reflejar necesariamente

el estado del metabolismo de la carnitina tisular. Pocos estudios documentan los niveles de carnitina en tejidos.

El metabolismo de la carnitina puede alterarse en la enfermedad hepática crónica por diferentes mecanismos (66,188,218,219): 1.Disminución en el aporte de sus precursores en la dieta, sobre todo en alcohólicos; 2.Bloqueo en la síntesis normal de carnitina, puesto que el último paso es catalizado en el hígado; 3.Incremento en la biosíntesis de carnitina como consecuencia del aumento del metabolismo proteico del músculo esquelético en pacientes con cirrosis.

Rudman et al. (219) hallaron una disminución en la concentración plasmática y tisular de carnitina en pacientes con cirrosis alcohólica, probablemente por malnutrición o enfermedad hepática terminal. En contraste, Fuller y Hoppel (217) han afirmado que la cirrosis alcohólica es una condición hipercarnitinémica, al encontrar concentraciones elevadas de acilcarnitina y de carnitina total en el plasma de pacientes alcohólicos, con o sin cirrosis, e independientemente de su estado nutricional. De Sousa et al. (207) detectaron una concentración normal de carnitina en hígado y plasma, pero aumentada en el músculo esquelético de sujetos alcohólicos con hígado graso; tampoco hallaron una correlación entre la concentración de carnitina en el hígado y el grado de infiltración grasa. Por otro lado, Harper et al. (220) encontraron un aumento en la concentración de carnitina en el hígado de alcohólicos no cirróticos, tras un periodo de abstinencia. Otros autores no han hallado variaciones en la concentración de carnitina plasmática en la hepatopatía alcohólica (208).

Existe menos información acerca de la carnitina en enfermedades del hígado de etiología no alcohólica. Palombo et al. (151) observaron un aumento en la concentración plasmática de carnitina en pacientes con enfermedad hepática terminal de diferentes causas. Más recientemente, Amodio et al. (218) encontraron concentraciones elevadas de carnitina en sujetos con cirrosis hepática de distintas etiologías. En aquellos estudios en los que se han determinado las distintas fracciones de la carnitina, se ha encontrado que el aumento en la carnitina total plasmática se corresponde con concentraciones normales de carnitina libre (CL) y elevadas de acilcarnitina (CE). El mecanismo responsable de este aumento en CE en pacientes con cirrosis es desconocido y podría explicarse como una respuesta a un incremento en el flujo de lípidos frente a glucosa como fuente de energía. En este

sentido, se ha sugerido que la cirrosis hepática es un estado metabólico de ayuno (217)

Los estudios sobre el metabolismo de la carnitina en animales de experimentación se concentran en tres áreas principales: 1.Los efectos de la administración aguda o crónica de alcohol en el contenido de carnitina; 2.El efecto producido al administrar suplementos de carnitina sobre el acúmulo de triglicéridos; 3.La influencia de la carnitina sobre algunos efectos neurotóxicos del alcohol. En resumen, no se han encontrado cambios sustanciales en la concentración de carnitina plasmática o hepática en animales con cirrosis experimental, excepto en el caso de la cirrosis biliar primaria (221). No obstante, en estudios de ratas con esteatosis inducida por alcohol se ha comprobado una mejoría de la infiltración grasa tras administrar suplementos de carnitina o de sus precursores (208).

Se han intentado justificar estas discrepancias teniendo en cuenta las diferencias en el estado nutricional de los pacientes, el estadio de la enfermedad y el empleo de métodos distintos para medir la carnitina. En conclusión, parece que los enfermos con enfermedad hepática crónica, incluyendo la cirrosis, tienen una concentración plasmática y tisular de carnitina dentro de la normalidad, aunque deben tenerse en cuenta la causa y el estadio de la enfermedad (215).

Algunos autores han especulado con la existencia de una deficiencia secundaria / insuficiencia de carnitina en la obesidad. Harper et al. (220) determinaron la concentración de carnitina en plasma, hígado, y músculo esquelético de 14 mujeres obesas con hígado graso. Encontraron un aumento en la concentración hepática de carnitina a expensas de la CL, sin variaciones en la CE con respecto a los controles. Además, hallaron una correlación negativa entre el grado de infiltración grasa y el contenido hepático de carnitina. La obesidad se caracteriza por un aumento en el metabolismo de las grasas e insulinoresistencia, generalmente asociada a hiperinsulinemia e hígado graso. El mecanismo por el que la carnitina se encuentra aumentada en los obesos no es conocido, aunque se ha sugerido que un incremento en su síntesis hepática o renal, cambios en los sistemas de transporte de carnitina en la célula hepática, o bien una alteración en el cociente insulina/glucagón, se encuentran entre las causas (85,220,222).

Se ha comprobado que determinadas condiciones caracterizadas por un exceso relativo de la concentración de glucagón sobre la de insulina, como la inanición o la diabetes, se acompañan de un aumento en el contenido hepático de carnitina

(208,223-225). Mc Garry et al. (226) demostraron en animales de experimentación que el cociente insulina/glucagón interviene en la regulación de la carnitina hepática: el glucagón aumenta la captación de carnitina, mientras que la insulina disminuye el transporte de carnitina al interior del hepatocito. Harper et al. (220) encontraron en su estudio en pacientes obesos una correlación positiva entre el contenido hepático de carnitina y la concentración de glucagón en sangre portal, y negativa con la de insulina.

Se ha sugerido que el déficit de carnitina puede ser la causa de la esteatosis y EHNA en pacientes tratados con nutrición parenteral total. Esta hipótesis se basa en estudios experimentales y se ha atribuido a un aporte exógeno insuficiente de carnitina, a una disponibilidad menor de sus aminoácidos precursores, a una alteración en la síntesis de carnitina por alteración de la función hepática, o bien a un déficit en su absorción intestinal (87). Tampoco en este caso los resultados de los diferentes estudios publicados al respecto son concluyentes. En animales de experimentación alimentados con nutrición parenteral se ha conseguido disminuir la incidencia de esteatosis hepática cuando se suplementa la dieta con carnitina (208,227). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el metabolismo de la carnitina en seres humanos tratados con nutrición parenteral a largo plazo y en la mayoría se encuentra una disminución de la carnitina plasmática y hepática, con resultados no uniformes en cuanto a la mejoría de la esteatosis y pruebas de función hepatocelular tras administrar suplementos de carnitina e incluso normalizar sus niveles plasmáticos (88,151,214)

Se ha propuesto que la deficiencia de carnitina puede ser un factor principal en el fallo agudo mitocondrial que sucede en el síndrome de Reye y cuya consecuencia es una esteatosis severa. El síndrome de Reye se caracteriza por un aumento de los ácidos orgánicos séricos (acilCoA) por estímulo del metabolismo proteico y de los ácidos grasos. La carnitina los convertiría en el hígado en derivados no tóxicos (acilcarnitinas), desarrollándose una deficiencia secundaria de carnitina en tejidos, con un aumento del cociente CE / CL. El exceso de acilCoA se acumula y produce efectos adversos sobre la función mitocondrial. Sin embargo, solo ciertos individuos se afectan, por lo que se ha propuesto la existencia de defectos enzimáticos del metabolismo de los ácidos grasos que, asociados a determinados factores desencadenantes que acentúen el estado catabólico, como el ayuno, infecciones,

toxinas, ácido acetilsalicílico, provocarían la aparición de este síndrome en determinados sujetos (195,228).

También se han implicado cambios en el pool de carnitina entre las causas de la toxicidad hepática inducida por ciertos fármacos, como el valproato. Krähenbühl et al. han documentado concentraciones disminuidas de carnitina total y CL junto con un aumento de ésteres de carnitina (valproilcarnitina) en el plasma e hígado de un paciente con esteatosis microvesicular inducida por valproato (204).

En los estados de sepsis existe un aumento en la oxidación de ácidos grasos como respuesta del huésped. Estudios en animales de experimentación en estado séptico, han documentado niveles bajos de carnitina en el hígado (229).

3.1.2- Déficit de carnitin-palmitoil-transferasa (CPT)

El sistema enzimático de CPT supone el primer paso en la oxidación de los ácidos grasos, al catalizar el transporte de los ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria. Está compuesto por dos enzimas diferentes inmunológicamente y que están asociadas a las membranas mitocondriales (187,193):

1.CPT I, presente en la membrana externa de la mitocondria, que se inhibe con malonil-CoA de forma específica, y que tiene dos isoformas conocidas, hepática y muscular, presentes en los distintos tejidos en distinta proporción.

2.CPT II, presente en la membrana interna de la mitocondria, insensible a malonil-CoA, y que mantiene la misma forma en diferentes tejidos.

El déficit de CPT es excepcional. La mayoría de los casos publicados se diagnostican en la infancia-adolescencia (230). Se han descrito más de 80 casos de déficit de CPT con afectación muscular aislada y con clínica miopática, en forma de episodios desencadenados por factores precipitantes, como el ejercicio físico prolongado, ayuno, dieta rica en grasas, fiebre, infecciones víricas, estrés emocional, anestesia general, embarazo, o toma de ciertos fármacos, como el diazepam o el ibuprofeno (231-233). El hecho de precisar la aparición de un desencadenante, indica probablemente que en condiciones basales la actividad de la CPT era suficiente para mantener la producción de energía. Las formas hepáticas de déficit de CPT se caracterizan por una alteración en la cetogénesis hepática en ayuno,

esteatosis hepática y disminución en la actividad de la CPT en los hepatocitos (187,231,234).

Es posible determinar la actividad enzimática disminuida de la CPT en músculo, plaquetas, fibroblastos, leucocitos e hígado. En sujetos sintomáticos podemos encontrar desde ausencia de actividad de la CPT hasta un 30% de actividad con respecto a los controles. La heterogeneidad clínica del déficit de CPT puede ser secundaria a diferentes mutaciones en el mismo alelo, a alteraciones de la CPT específicas para cada tejido, o bien a mutaciones que afecten a diferentes genes: al gen que codifica a la CPT I o a la CPT II (187,231,235).

3.1.3- Déficit de carnitina acilcarnitina translocasa (CAT)

Se ha publicado una descripción excepcional de déficit de este enzima, con un aumento de los niveles de acilcarnitinas (CE), y disminución en los de CL (236). La actividad del enzima en cultivo de fibroblastos fue menor del 5% con respecto a la normalidad. Posteriormente se han descrito otros casos en recién nacidos con un curso clínico generalmente fatal (237).

3.2- Defectos en los enzimas de la β -oxidación

Corresponden en la mayoría de los casos a déficits congénitos o bien secundarios a drogas que las inactiven. Se caracterizan por una descompensación metabólica desencadenada fundamentalmente por el ayuno, cuyas consecuencias son: acumulación de grasa en forma de esteatosis macro o microvesicular en los tejidos, hipoglucemia, deficiencia secundaria de carnitina tisular, aciduria dicarboxílica, producto de la ω -oxidación microsomal, un aumento de ácidos grasos libres y un incremento de CE (187,202). Se han publicado pocos casos de déficits enzimáticos de la β -oxidación, y generalmente se diagnostican en la infancia. Entre ellos: deficiencias de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, media y larga (238), déficit de 3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa (implicada en el hígado graso del embarazo) (239) y de ETF (flavoproteína que transfiere electrones).

La toxicidad producida por los ácidos grasos dicarboxílicos ha sido implicada en la aparición del síndrome de Reye. Los ácidos dicarboxílicos (adípico C₆, subérico

C₈ y sebácico C₁₀), son productos de la ω -oxidación en los microsomas. La ω -oxidación es de poca importancia en el catabolismo normal de los ácidos grasos, activándose cuando existe una alteración en la β -oxidación (228,240).

3.3-Disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM)

Cualquier déficit enzimático de la CRM afecta marcadamente al metabolismo celular. Una consecuencia inmediata es la limitación en la cantidad de ATP intracelular, aunque también se producen otros defectos metabólicos. Entre ellos una importante alteración en la oxidación de los ácidos grasos, ya que existen reacciones de ésta que requieren NAD⁺ o FAD, cuya disponibilidad se encuentra limitada si existe una alteración en la CRM. Concretamente, como hemos visto, hay dos pasos de la β -oxidación catalizados por deshidrogenasas (Tabla 6; pág. 23). En el primero, interviene la acil-CoA deshidrogenasa, y afecta a la transferencia de electrones sobre la proteína transportadora de electrones (ETF) y la ETF-ubiquinona reductasa. En el segundo interviene la 3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa, la cual es inhibida por el aumento en la concentración de NADH y la disminución en la regeneración de NAD⁺ (\downarrow NAD⁺/NADH) que se produce como resultado del defecto en el funcionamiento de la CRM. La consecuencia final de la disfunción de la CRM es la formación de gran cantidad de radicales libres del oxígeno, capaces de dañar las células (186).

El funcionamiento de la CRM en el hombre ha sido estudiado en la mayoría de los casos en el músculo esquelético por ser un tejido fácilmente asequible. La alteración en el funcionamiento de la CRM puede ser primaria o secundaria. Las deficiencias primarias se deben a un defecto genético del ADNn o del ADNmt (delección o mutaciones), y se produce, por ello, un déficit en los complejos enzimáticos cuyas subunidades codifican. De esta forma, en el caso de una delección o mutación en el ADNmt, de herencia materna, se producirán deficiencias combinadas que afectarán a los complejos I, III y IV, mientras que el II permanecerá dentro del rango normal (241). La alteración en los genes nucleares (ADNn) que codifican proteínas mitocondriales se transmiten por herencia mendeliana y generalmente son déficits de un único complejo (242). Además, la CRM también puede alterarse de forma secundaria a un grupo de procesos:

- Endocrinopatías: hipo e hipertiroidismo (243).
- Isquemia-reperfusión. Independientemente de la causa, se produce una falta de oxígeno en los tejidos, acúmulo de calcio intracelular y disfunción mitocondrial, con lesión de la cadena de transporte electrónico y acúmulo de radicales libres de oxígeno y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (244).
- Deficiencia de algún metabolito intermediario o cofactor, como en el caso de un déficit de cobre o de hierro. Ocasionará una disminución en la activación de los enzimas que lo contengan como el citocromo a en el caso del cobre, de la aconitasa del ciclo de Krebs, o de los complejos I, II y III de la CRM (245).
- Sepsis. La endotoxemia que se produce en el curso de una sepsis podría constituir un factor determinante en el daño tisular a través de la lesión de la CRM (246). En presencia de endotoxinas bacterianas, las mitocondrias sufren una pérdida del control respiratorio, una disminución en el contenido de citocromos y una inhibición en la oxidación de sustratos, con la consiguiente producción insuficiente de ATP. La intensidad de tales alteraciones estará en relación directa con la dosis de entotoxina y la duración de su presencia en contacto con las células. Morfológicamente las mitocondrias presentan invaginaciones tubulares, vacuolas, tumefacción y anomalías en la configuración de las crestas. En el desarrollo de todas estas alteraciones también se han implicado algunas citocinas, como el $TNF\alpha$, probablemente a través de la producción de óxido nítrico, el cual se une a las moléculas de hierro que contienen determinadas enzimas de la CRM y promueve el estrés oxidativo, bloqueando de esta manera el metabolismo aeróbico (21,247).
- Fármacos. Algunos medicamentos ejercen sus acciones deletéreas en el organismo a través de su interacción con la mitocondria. Entre ellos se encuentran algunos antibióticos (cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol), antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides, paracetamol, interferón, antagonistas del calcio, amiodarona, quimioterápicos, bloqueantes β -adrenérgicos, anestésicos, neurolépticos (haloperidol, clorpromacina), ciclosporina y algunos antirretrovirales que inhiben a la ADN-polimerasa necesaria para la replicación del ADNmt, como la zidovudina (AZT) (248-251).
- Alcohol. Existen evidencias de que el alcohol es capaz de producir una lesión directa sobre la mitocondria, tanto desde un punto de vista estructural como funcional (252-254). Desde un punto de vista bioquímico, se ha detectado en

mitocondrias hepáticas una disminución en la actividad de la CRM como consecuencia de su exposición al alcohol. Según estudios recientes la lesión inducida por el alcohol en el hígado parece deberse a una disminución de la actividad de los complejos de la CRM, probablemente a través de la generación de ROS y daño oxidativo del ADNmt, cuya consecuencia es la inhibición de la fosforilación oxidativa y alteración en el metabolismo energético. En estos efectos intervienen la acumulación de acetaldehído y acetato, derivados del metabolismo hepático del alcohol, potenciado por la activación del citocromo P450.

Además de en la enfermedad hepática por alcohol, y fundamentalmente asociados a microesteatosis, también se han encontrado defectos en el funcionamiento de la CRM (complejos III y IV) en hígados cirróticos independientemente de su etiología, y sin evidencias de deleciones del ADNmt (255,256). Caldwell et al. (133) no han detectado defectos en el funcionamiento de la CRM en mitocondrias derivadas de plaquetas, ni tampoco deleciones en el ADNmt en tejido hepático de pacientes con EHNA.

- Otras. Muchas enfermedades, algunas de ellas muy prevalentes, cursan con defectos en el metabolismo de la CRM (251): arterioesclerosis; diabetes mellitus tipo 2; enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Esclerosis lateral amiotrófica); linfoma no Hodgkin, migraña, miocardiopatía dilatada, distrofia muscular, etc.

4. Alteración en la síntesis y/o secreción hepática de lipoproteínas VLDL

Los componentes lipídicos del plasma son el colesterol (30% en forma libre y 70% esterificada con AG), los TG o grasas neutras, fosfolípidos (PL) y AGL. Con excepción de estos últimos, que circulan unidos a la albúmina, el transporte por la sangre de los otros tres componentes se lleva a cabo por las lipoproteínas (257).

Las lipoproteínas son agregados macromoleculares formados por un componente lipídico (colesterol esterificado y libre, TG y PL) y otro proteico, las denominadas apoproteínas. Se identifican según su diferente densidad utilizando la ultracentrífuga y se denominan quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja

densidad), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y HDL (lipoproteínas de alta densidad) (Tabla 10).

Tabla 10. Características de las diversas lipoproteínas en sujetos normales (258)

	QM	VLDL	LDL	HDL
Origen	Intestino	Hígado	VLDL	Hígado/Intestino
Densidad	<0.94	0.94-1006	1006-1063	1063-1210
Composición				
Proteínas (%)	0,5-2,0	6-12	20-25	50
Lípidos (%)	98-99	88-94	75-80	50
Lípido principal	TG	TG	Colesterol	Colesterol, PL
Función: transporte de	TG exógenos	TG endógenos	Colesterol a tejidos periféricos	Colesterol de tej.periféricos al hígado

QM: quilomicrones; **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **TG:** triglicéridos

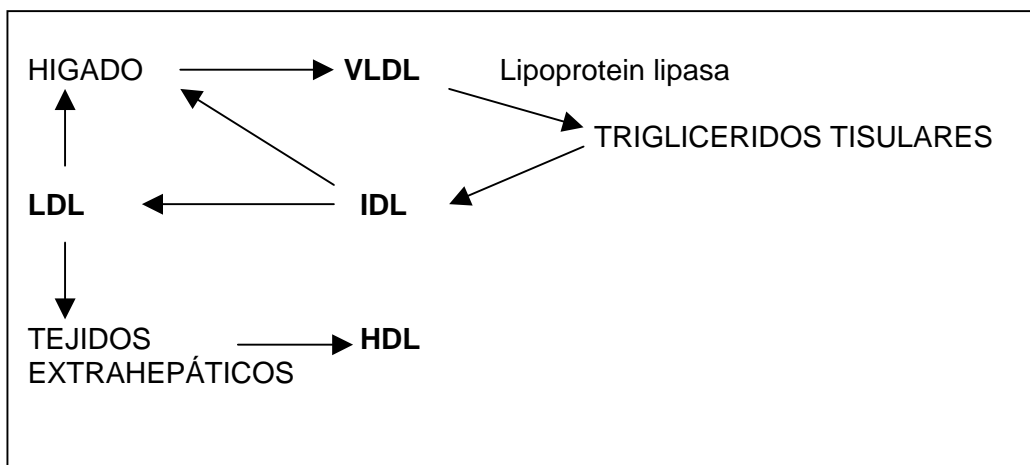
Las apoproteínas son moléculas sintetizadas por el hígado, imprescindibles para que el metabolismo lipídico transcurra con normalidad. Su función es la de transportar los lípidos, dirigir su metabolismo funcionando como activadoras o inhibidoras enzimáticas, y permitir su reconocimiento y unión a receptores específicos de las membranas celulares. Hasta el momento se han identificado 13 apoproteínas diferentes, que se han clasificado según las letras del alfabeto de la A a la H, existiendo varios subtipos (Tabla 11).

Tabla 11. Principales apoproteínas plasmáticas (258)

CLASE	LIPOPROTEÍNA	FUNCIÓN
A-I	HDL	Cofactor LCAT, formación HDL
A-II	HDL	Inhibe LCAT, formación HDL
B-100	QM, VLDL, LDL	Reconoce receptor LDL (apo-B 100:E); formación de QM y VLDL hepáticas
B-48	QM	Formación QM
C-I	QM, VLDL, HDL	Activación LCAT
C-II	QM, VLDL, HDL	Activación lipoprotein lipasa
C-III	QM, VLDL, HDL	Inhibe lipoprotein lipasa
E	QM, VLDL, HDL	Reconoce receptor
F	HDL	
G	HDL	

QM: quilomicrones; **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **TG:** triglicéridos; **LCAT:** lecitín-colesterol-aciltransferasa

Los quilomicrones transportan a los TG procedentes de la dieta hasta los distintos tejidos, mientras que las partículas HDL y LDL transportan el colesterol hasta el hígado. Este proceso constituye la vía exógena del metabolismo lipídico, ya que afecta a los lípidos procedentes de la dieta (Figura 1; pág. 16). La vía endógena es aquella que afecta a la utilización de los TG y colesterol formados en el metabolismo intracelular (Figura 9).

Figura 9. Vía endógena del metabolismo lipídico (257)

Las partículas VLDL tienen su origen en el hígado. Están constituidas por un núcleo donde se disponen fundamentalmente los TG y una pequeña fracción del colesterol plasmático, y las apoproteínas, que se sitúan en la cubierta externa y que se denominan apo-B 100, apo-C y apo-E. La función principal de las VLDL es el transporte de los TG endógenos desde los hepatocitos, hasta los capilares del tejido adiposo y músculo, donde son hidrolizados por acción de la lipoproteinlipasa. Una alteración en la síntesis y/o secreción hepática de lipoproteínas VLDL podría explicar la esteatosis hepática que aparece asociada a la *malnutrición, defectos congénitos en la síntesis de apoproteínas, deficiencia de colina y defectos en la esterificación del colesterol* (2).

Se han asociado déficits genéticos de las apoproteínas con la esteatosis hepática. Existen casos publicados de esteatosis y de EHNA en la *abetalipoproteinemia familiar* (259) e *hipobetalipoproteinemia homocigota y heterocigota* (145,146,260-264), así como una elevada prevalencia de hipobetalipoproteinemia en pacientes con *cirrosis hepática criptogenética* (262).

El hígado graso que aparece en estos enfermos se explica por el defecto en la síntesis hepática de apo-B y consiguiente incapacidad para exportar partículas VLDL a la sangre (259,260). Se trata de enfermedades raras, que cursan con niveles plasmáticos bajos de TG y de colesterol y en las que, además del hígado graso, puede aparecer esteatorrea (por malabsorción intestinal), alteraciones oculares (retinitis pigmentaria), manifestaciones neurológicas (ataxia, polineuropatía, retraso mental) y hematológicas (acantocitosis) (263). La esteatosis hepática puede ser la única manifestación en la forma heterocigota, de aparición en la edad adulta, mientras que la abeta e hipobetalipoproteinemia homocigota suelen debutar en la edad infantil, con malabsorción intestinal de grasas. Sreekumar et al. (264) han comunicado en un estudio preliminar una atenuación en la síntesis de apoB-100 en un grupo de pacientes con EHNA. En estos casos, los TG no pueden ser transportados desde el hígado y quedan atrapados en el citoplasma de los hepatocitos, originando la infiltración grasa del hígado.

Se ha relacionado la esteatosis hepática con un *déficit plasmático de colina* en pacientes y en animales de experimentación alimentados con NPT (265). La colina es un precursor de la síntesis de PL y su déficit puede resultar en una alteración del transporte de TG desde el hígado como parte de las lipoproteínas. Se

ha comprobado una disminución significativa de la infiltración grasa del hígado e incluso su desaparición en animales alimentados con suplementos de lecitina en la dieta (154,155).

5. Papel patogénico de la insulina

Existen autores defensores del papel de la insulina, y especialmente del cociente insulina / glucagón, en la aparición de las lesiones de esteatosis y de EHNA (66,85,86,266-268).

La insulina y el glucagón son hormonas peptídicas secretadas por las células de los islotes de Langerhans del páncreas que ejercen importantes efectos reguladores del metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas (269). La *insulina* tiene un peso molecular de alrededor de 6.000 dalton y está formada por dos cadenas polipeptídicas A y B, unidas en dos sitios por puentes disulfuro. La *proinsulina* es el precursor biosintético de la insulina y consta de una cadena polipeptídica de 81 a 86 restos de aminoácidos, según la especie de origen. Contiene ambas cadenas A y B de la insulina y, entre ambas, un péptido de conexión de 30 residuos de aminoácidos denominado *péptido C*. La proinsulina se forma en los ribosomas y por sí misma exhibe una actividad insulínica muy pequeña. Es trasladada al aparato de Golgi, donde se escinde en insulina y péptido C por acción enzimática (Figura 10).

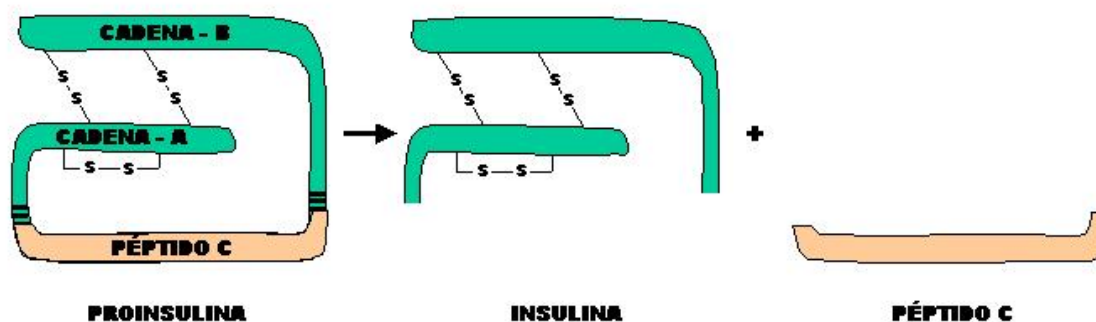


Figura 10. Representación esquemática de la conversión de proinsulina en insulina y péptido C en la célula β pancreática (270)

De esta manera, la insulina y el péptido C son secretados de forma equimolar a la circulación portal, alcanzando el lecho hepático (269,270).

Está bien establecido que un 50-70% de la insulina es extraída por el hígado en un primer paso, mientras que el metabolismo del péptido C se efectúa principalmente en el riñón, de forma que nada o una mínima parte no valorable es metabolizado por el hígado. El hecho de que ambas sustancias sean secretadas en cantidades equimolares y que el péptido C no sufra metabolismo hepático, ha inducido a utilizar métodos de cálculo indirecto de la “tasa de secreción pancreática de insulina” y de la “tasa de extracción hepática de insulina”, a partir de las concentraciones periféricas de insulina y de péptido C (270,271).

El *glucagón* es un péptido de cadena simple, con un peso molecular de alrededor de 3.500 dalton. Es sintetizado y secretado principalmente por las células A de los islotes del páncreas. Contiene 29 restos de aminoácidos y se sintetiza en forma de precursor inactivo, el proglucagón (224).

La secreción de insulina depende fundamentalmente de la concentración de glucosa en sangre periférica, aunque también intervienen ciertos aminoácidos (arginina y lisina), así como ciertos factores específicos secretados por el estómago e intestino (gastrina, secretina, colecistoquinina y péptido inhibidor gástrico). La secreción de insulina se asocia a abundancia de energía, ejerciendo un papel muy importante en el almacenamiento del exceso de sustancias energéticas. Hace que los hidratos de carbono se almacenen en forma de glucógeno, principalmente en hígado y músculo, provoca la síntesis y almacenamiento de la grasa en el hígado y tejido adiposo, y en el caso de las proteínas, favorece la captación de aminoácidos por las células y su conversión en proteínas, además de inhibir la degradación proteica (176).

La insulina induce efectos importantes sobre el metabolismo de las grasas, que pueden favorecer la aparición de esteatosis hepática:

1. Bloquea la oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Esta acción la ejerce al disminuir la actividad de la carnitin-palmitoil-transferasa, y lo hace al aumentar la sensibilidad de este enzima a la acción inhibidora del malonil-CoA, producto de la acetil-CoA carboxilasa y primer intermediario en la síntesis de ácidos grasos (272). Además, parece que también disminuye la disponibilidad de carnitina por las células (224,225)

2. Favorece la esterificación de ácidos grasos para producir triglicéridos. Esta acción la desarrolla al estimular la síntesis de glicerol a partir de la glucosa (57).
3. Promueve la síntesis de ácidos grasos en presencia de un exceso de hidratos de carbono. Cuando el glucógeno alcanza altas concentraciones, la glucosa adicional que penetra en los hepatocitos se utiliza para formar grasa (la glucosa se desdobla por la vía glucolítica primero a piruvato → acetil-CoA → síntesis de ácidos grasos). Además, cuando se utilizan grandes cantidades de glucosa para obtener energía, se forma un exceso de citrato e iones isocitrato en el ciclo del ácido cítrico. Estos iones actúan activando a la acetil-CoA carboxilasa, enzima que carboxila el acetil-CoA a malonil-CoA, primera etapa de la síntesis de los ácidos grasos (57,176).
4. Activa a la lipasa de la lipoproteína, enzima que desdobla los triglicéridos de nuevo en ácidos grasos en las paredes de los capilares del tejido adiposo, paso previo necesario para ser absorbidos por el adipocito, donde se convierten de nuevo en triglicéridos (273).
5. Inhibe la acción de la lipasa sensible a hormonas, enzima que hidroliza a los triglicéridos almacenados en los adipocitos, inhibiendo así la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo hacia la circulación periférica (274).
6. Inhibe la síntesis y secreción de apoproteína B y de triglicéridos desde los hepatocitos, hecho estudiado en hepatocitos aislados de animales de experimentación (275).

Para iniciar sus efectos sobre las células diana, la insulina se liga a una proteína receptora de la membrana que es quien causa los efectos ulteriores. El receptor de la insulina es una combinación de 4 subunidades, 2α y 2β . Al unirse la insulina a la 2 subunidades α , las porciones β se autofosforilan y ésto las convierte en una enzima activa, una proteincinasa local, que a su vez causa la fosforilación de otras muchas enzimas intracelulares (276).

El glucagón tiene varias funciones, diametralmente opuestas a las de la insulina. Es secretado cuando disminuye la concentración de glucosa sanguínea y su acción más importante es la de aumentar la glucemia, lo que consigue mediante el estímulo de la glucogenolisis (degradación del glucógeno hepático) y la neoglucogénesis

(síntesis de glucosa). Sobre el metabolismo graso, actúa inhibiendo la lipasa del adipocito y también inhibe el almacenamiento de triglicéridos en el hígado (224,277).

Diferentes estudios han atribuido gran importancia a la relación entre los valores plasmáticos de insulina y glucagón. En situaciones de deficiencia de insulina como son el ayuno, el seguimiento de dieta para perder peso, o una diabetes mal controlada, el cociente insulina / glucagón se encuentra disminuido. Como consecuencia de ello, se produce un aumento en el flujo de ácidos grasos desde el tejido adiposo hasta el hígado, se reduce la síntesis intrahepática de ácidos grasos, los niveles de malonil-CoA disminuyen, y la carnitin-palmitoil-transferasa se activa, favoreciéndose la oxidación de las grasas.

Hay evidencias en la literatura de la importancia de la insulina en la aparición de esteatosis hepática. La hipótesis de que la insulina tenga un papel importante en la patogénesis de la esteatosis y de la EHNA se basa en los siguientes hechos: 1. Muchas de las situaciones de riesgo para la esteatosis / EHNA tienen en común la hiperinsulinemia; 2. La asociación demostrada entre la diabetes y la hepatopatía; 3. La aparición de fármacos que mejoran la esteatosis al disminuir el hiperinsulinismo; y 4. El hallazgo de lesiones hepáticas subcapsulares de esteatosis y esteatonecrosis en diabéticos tipo 1 con enfermedad renal terminal, tratada con diálisis peritoneal ambulatoria con insulina intraperitoneal. La esteatosis ocurre cuando existe suficiente insulina para bloquear la oxidación de los ácidos grasos pero no para bloquear la movilización de éstos desde el tejido adiposo.

La hiperinsulinemia es una característica que comparten la obesidad y otros estados de insulinoresistencia (nutrición parenteral total, diabetes tipo 2, síndrome X) (62,175,278).

La obesidad y la diabetes tipo 2 son dos entidades en estrecha relación. Los individuos obesos y diabéticos suelen tener niveles plasmáticos de insulina aumentados, suficientes para inhibir el catabolismo de los ácidos grasos y favorecer el acúmulo de éstos y de triglicéridos en los hepatocitos. Además, los obesos diabéticos tienen mayor resistencia a la acción periférica de la insulina y también niveles mayores de ácidos grasos plasmáticos si se comparan con los obesos no diabéticos (226,279,280). En estas condiciones existe hiperinsulinemia e

insulinorresistencia, de forma que la insulina es capaz de bloquear la oxidación de los ácidos grasos pero es insuficiente para bloquear la movilización de éstos desde el tejido adiposo, probablemente por una pérdida en la sensibilidad del adipocito a la acción antilipolítica de la insulina (281).

En situaciones de bypass yeyunoileal debería producirse una mejoría de la morfología hepática, al igual que en los pacientes obesos tras seguir una dieta adelgazante y, sin embargo, esto no sucede. En ambas situaciones hay una pérdida de peso, pero la diferencia radica en la secreción de insulina: en los obesos que han seguido una dieta para perder peso existe una caída en la secreción de insulina, lo cual permite que el exceso de ácidos grasos libres que fluyen al hígado desde el tejido adiposo sean oxidados; sin embargo, el enfermo que tiene un bypass intestinal continúa comiendo, por lo que persiste el estímulo para la secreción de insulina, la cual bloquea la oxidación de ácidos grasos, de forma que éstos se acumulan en el hígado (91,266).

Nussbaum et al. (86) encontraron que las soluciones de nutrición parenteral ricas en dextrosa y sin lípidos intervienen de forma fundamental en el desarrollo de esteatosis hepática y que la razón probablemente radique en el cociente insulina/glucagón. Ambas hormonas parecen jugar un papel crítico en la aparición de esteatosis hepática asociada a nutrición parenteral total. Estudios de experimentación en animales alimentados con soluciones enriquecidas con glucagón han logrado revertir e incluso prevenir el desarrollo de esteatosis hepática (85,268). Por otro lado, se ha especulado que el glucagón posiblemente favorezca un mejor uso de la insulina endógena, probablemente por actuar a nivel del receptor de la insulina.

No se conoce el mecanismo último por el que estos pacientes tienen insulinorresistencia ni está establecido si esta alteración es un defecto primario o secundario a la propia hipersecreción de insulina. Como posibles factores etiológicos de dicha resistencia se han implicado a los ácidos grasos libres (aumentados en la obesidad y en la cirrosis) (282-284), la sobreproducción de $TNF\alpha$ (285-290), la ferritina (291-294) y la propia hiperinsulinemia (por un mecanismo de “down-regulation”) (295). El tejido graso es una fuente importante de producción endógena de $TNF\alpha$, y en cultivos celulares y en animales de experimentación se ha observado que es capaz de bloquear la acción de la insulina. Diferentes estudios han hallado

una correlación positiva tanto del $\text{TNF}\alpha$, como de la ferritina sérica, con el índice de masa corporal y con el nivel de insulinemia (283,285). Aquellos individuos predispuestos a desarrollar diabetes tipo 2 perderían su capacidad de incrementar la secreción pancreática de insulina lo suficiente como para compensar la resistencia a la acción de esta hormona, apareciendo una diabetes manifiesta.

La hiperinsulinemia parece resultar de la hipersecreción de insulina y en los pacientes obesos con esteatosis hepática, probablemente también contribuya una disminución en el metabolismo hepático de esta hormona. El hígado funciona como un sistema importante de control de la glucemia y juega un papel clave en el metabolismo y efectos de la insulina (63). Este hecho justifica que en los pacientes con enfermedad hepática se vuelva casi imposible mantener la homeostasis de la glucosa y que no se altere la acción de la insulina (57). Casi todos los enfermos cirróticos son insulinoresistentes, el 60-80% son intolerantes a la glucosa, y aproximadamente un 20% desarrollan diabetes tipo 2 manifiesta. Además, la cirrosis es 2-3 veces más frecuente en diabéticos y, en 2/3 de los casos en que coexisten ambas enfermedades, la cirrosis es diagnosticada antes que la diabetes. A su vez, la diabetes es 4 veces más frecuente entre los cirróticos comparando con aquellos sujetos con un hígado normal. Estas observaciones sugieren que la cirrosis es diabetógena (296,297). También se ha considerado la posibilidad de que la EHNA pueda favorecer la aparición de diabetes, puesto que se han descrito casos de EHNA de causa desconocida, y cuyo diagnóstico se efectuó varios años antes de la aparición de intolerancia a la glucosa (60).

La disfunción hepática es una alteración que puede jugar un papel muy importante en la génesis de la hiperinsulinemia e insulinoresistencia encontradas en pacientes con enfermedades crónicas del hígado, aunque no se ha encontrado una relación con la causa específica de la enfermedad hepática (57,298,299). A pesar de que tampoco se conoce el mecanismo de producción de estas alteraciones en la enfermedad hepática, se ha implicado la existencia de un aumento en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas, una disminución en la extracción hepática de insulina y, también, la existencia de hipertensión portal (297). Se ha especulado que en la cirrosis hepática la hiperinsulinemia crónica sería la causa de la resistencia a la insulina, habiéndose implicado también al aumento de ácidos grasos libres y de glucagón hallados en estos pacientes (296,297).

Existen datos que sugieren la presencia de insulinoresistencia e hiperinsulinemia en sujetos con esteatosis hepática. Basándose en la determinación de los niveles plasmáticos de insulina y péptido C basales, Inokuchi et al. (300) investigaron la relación del metabolismo de la insulina con el hígado graso en sujetos obesos con y sin esteatosis hepática frente a controles sanos. Al igual que en la cirrosis, demostraron una hiperinsulinemia, con aumento de los niveles de insulina y de péptido C, y, lo más importante, una disminución en la extracción hepática de insulina en aquellos obesos con esteatosis hepática, al comparar con los obesos sin infiltración grasa del hígado. Estos autores atribuyeron la hiperinsulinemia a una disminución en el metabolismo hepático de la insulina.

Estudios recientes han evaluado el efecto sobre la EHNA de nuevos antidiabéticos orales. Es el caso de la *troglitazona* y la *rosiglitazona*, derivados de la tiazolidinediona, que corrigen la hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, al disminuir la resistencia periférica a la insulina. Estos fármacos actúan favoreciendo los efectos periféricos de la insulina, pero sin aumentar su secreción. De esta forma, mejoran dos de los mecanismos implicados en la patogenia de la EHNA como son la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia (301-303). Además, no causan hipoglucemia, incluso en pacientes euglucémicos. Estudios piloto recientes, efectuados en un escaso número de pacientes, demuestran un efecto beneficioso parcial de la troglitazona, ya que se normalizan las transaminasas sin mejorar las lesiones hepáticas (304). Sin embargo, la aparición de hepatotoxicidad producida por este nuevo antidiabético ha hecho que sea retirado del mercado y que no se hayan efectuado más estudios (305). Con respecto a la rosiglitazona, se precisan más estudios (306).

Por último, la aparición de lesiones hepáticas subcapsulares difusas de EHNA en pacientes tratados con insulina intraperitoneal, idénticas a las encontradas en el hígado de obesos y de alcohólicos, se ha atribuido directamente a la insulina. Wanless et al. (266) propusieron que estos cambios se producen por el estímulo directo de la insulina sobre la síntesis de triglicéridos en un lugar de alto gradiente de concentración. A su favor se encuentra el hecho de que la esteatosis hepática subcapsular no se haya detectado en pacientes con diálisis peritoneal sin insulina intraperitoneal (267).

Una vez establecidos los posibles mecanismos que llevan al depósito en exceso de grasa en el hígado, el siguiente paso consiste en establecer qué conexiones existen entre la grasa simple y la aparición de lesiones de EHNA.

B- ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA

Actualmente se admite que la esteatosis hepática es el sustrato sobre el que se desarrollan la inflamación y la fibrosis. Se ha documentado la secuencia esteatosis-esteatohepatitis-cirrosis en la obesidad, administración prolongada de nutrición parenteral total, y cirrosis criptogénica (3,161). Además, se ha hallado correlación entre el grado de inflamación, la fibrosis y la severidad de la esteatosis en el hígado de pacientes y de animales de experimentación (21,165,166). Aunque no se ha establecido cuál es la conexión entre ambas entidades, la hipótesis propuesta actualmente por la mayoría de autores incluye dos posibles mecanismos, que no tienen por qué excluirse entre sí (159,160): 1. Estrés oxidativo y peroxidación lipídica, y 2. Daño mediado por $TNF\alpha$ / endotoxinas bacterianas.

1. Estrés oxidativo y peroxidación lipídica

Recientemente el grupo de Pessayre ha demostrado que la esteatosis hepática, independientemente de su causa, se asocia con peroxidación lipídica, y sugieren que la lipoperoxidación constituye el mecanismo por el que se desarrolla esteatohepatitis (166).

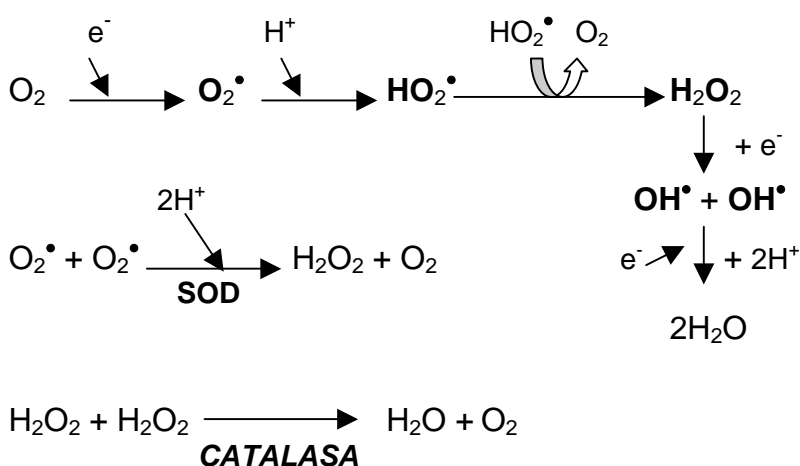
Como ya se ha mencionado, la mayoría de situaciones de riesgo para la EHNA se asocian a un aumento de ácidos grasos libres intrahepáticos, motivado por diferentes causas (171,172). Si bien la mayor parte se emplean para la síntesis de triglicéridos, existe un exceso de ácidos grasos no esterificados que pueden ser oxidados en otros sistemas diferentes a los de la oxidación β mitocondrial y generar, como consecuencia de ello, especies o radicales reactivos del oxígeno (ROS) (307-310)

La producción de ROS es un atributo de los organismos aerobios. Se trata de moléculas prooxidantes, muy reactivas y poco estables, ya que contienen uno o más electrones no apareados en su órbita externa. Los ROS son generados de forma

fisiológica en la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias así como en los microsomas, y su formación debe estar equilibrada con la producción de agentes antioxidantes que los hagan desaparecer (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, α -tocoferol, ascorbato). Generalmente existe un equilibrio entre los factores que promueven la formación de ROS y los mecanismos de defensa antioxidantes. El estrés oxidativo se caracteriza precisamente por un desequilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes, a favor de los primeros (311,312).

La reducción del oxígeno molecular (O_2) durante la fosforilación oxidativa incluye la formación de radical superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\bullet). El radical hidroxilo es un agente oxidante particularmente reactivo, y se piensa que es el principal mediador de la toxicidad del oxígeno (Figura 11).

Figura 11. Ecuación que representa la formación de ROS (311)



O_2^\bullet : *anión superóxido*

HO_2^\bullet : *radical hidroperóxido*

H_2O_2 : *peróxido de hidrógeno*

OH^\bullet : *radical hidroxilo*

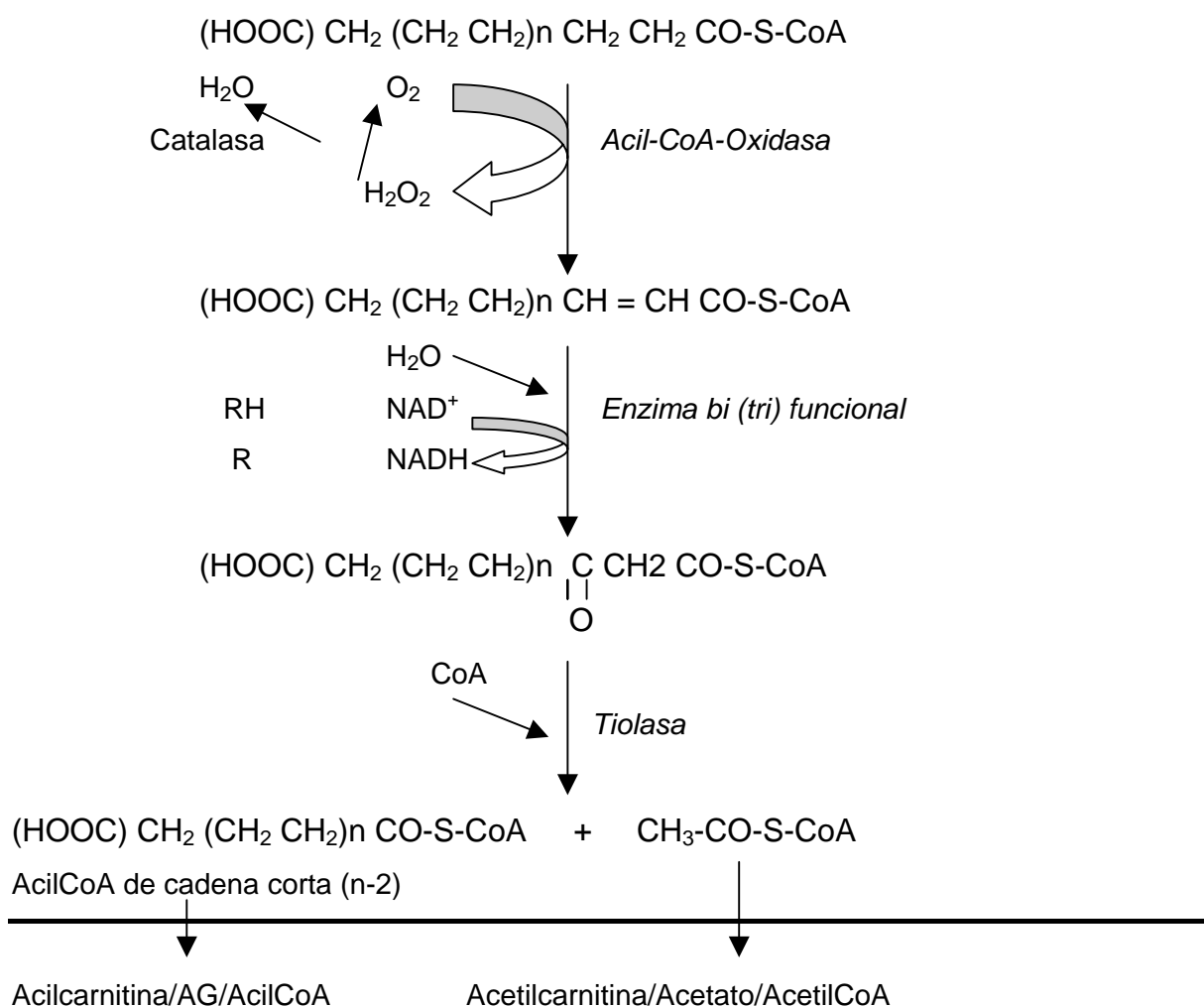
SOD: superóxido dismutasa

Los ROS pueden dañar distintas moléculas biológicas esenciales, incluyendo el ADN, proteínas celulares esenciales y lípidos de membrana. Además, pueden iniciar reacciones en cadena, como la *peroxidación lipídica*, que pueden alterar la integridad de las membranas celulares y finalmente causar la muerte celular (311).

En los últimos años la producción de ROS ha sido implicada en la patogenia de múltiples enfermedades como la artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas, hepatitis alcohólica, etc. También se han identificado varias fuentes de ROS en la EHNA (159,160): 1. Factores exógenos: productos de la industria petroquímica, aceite de colza, etc.; 2. La β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos; y 3. El sistema microsomal oxidativo.

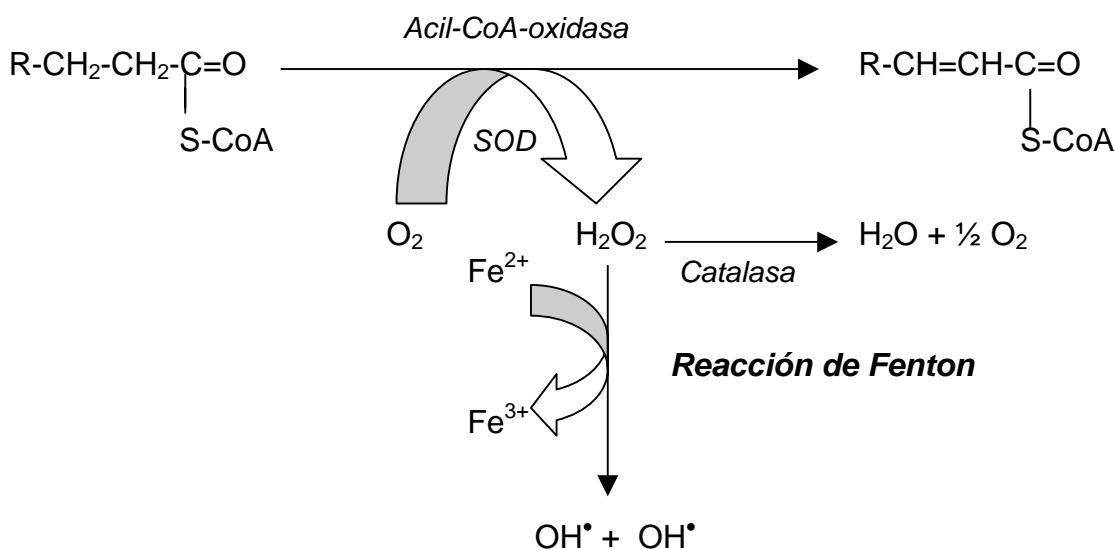
Los peroxisomas son cuerpos subcelulares que tienen particular importancia en el hepatocito y que en condiciones normales contribuyen a la oxidación del 10% de la grasa (308,313). Su función es la de acortar los ácidos grasos de cadena larga, los cuales son luego transportados a la mitocondria para continuar su oxidación (Figura 12).

Figura 12. Características esenciales de la β -oxidación peroxisomal (308)



La reacción inicial en el sistema peroxisomal consiste en la oxidación del acil-CoA activado, con la transferencia de electrones y la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual habitualmente es inactivado al transformarse en H_2O , por acción de las catalasas. Sin embargo, cuando su producción es excesiva, o en presencia de hierro, se genera el potente radical hidroxilo (OH^\bullet) (Figura 13).

Figura 13. Generación de ROS durante la β -oxidación peroxisomal (308)



SOD: Superóxido dismutasa

OH^\bullet : radical hidroxilo

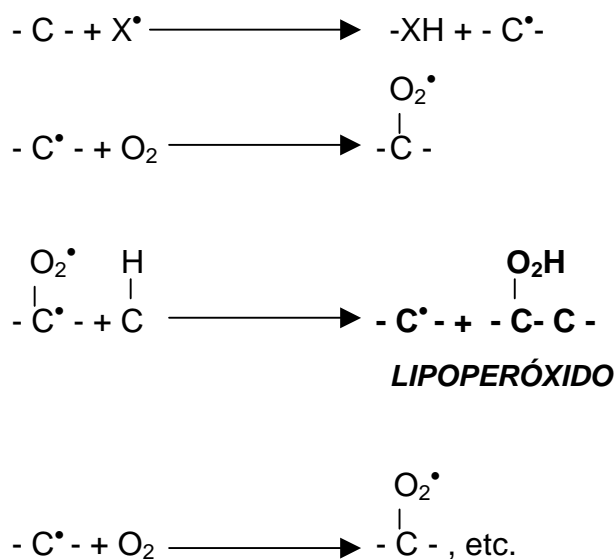
El hecho de que exista una inducción de la β -oxidación peroxisomal en ratas alimentadas con dietas de alto contenido en grasas, sobre todo si los ácidos grasos son de cadena larga, y que sustancias como el ácido valproico y los glucocorticoides estimulan la proliferación peroxisomal en el hígado de ratas apoyan la hipótesis de que los peroxisomas estén involucrados en la patogenia de la EHNA (308).

A favor de la participación de los ROS y el estrés oxidativo en la aparición de lesiones de EHNA se encuentra el hecho de que determinados fármacos asociados a la EHNA como la amiodarona, perhexilina y dietilaminoetoxihexestrol, son capaces de producir directamente lesiones de EHNA (314). Estos fármacos alteran, por un lado, la β -oxidación, induciendo así esteatosis hepática, como sucede con la mayoría de fármacos que producen esteatosis, y, por otro, son capaces de generar ROS por

alteración directa de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial. De esta forma, aumentan ambos sustratos para la peroxidación lipídica, la presencia de grasa y la de ROS (99,315).

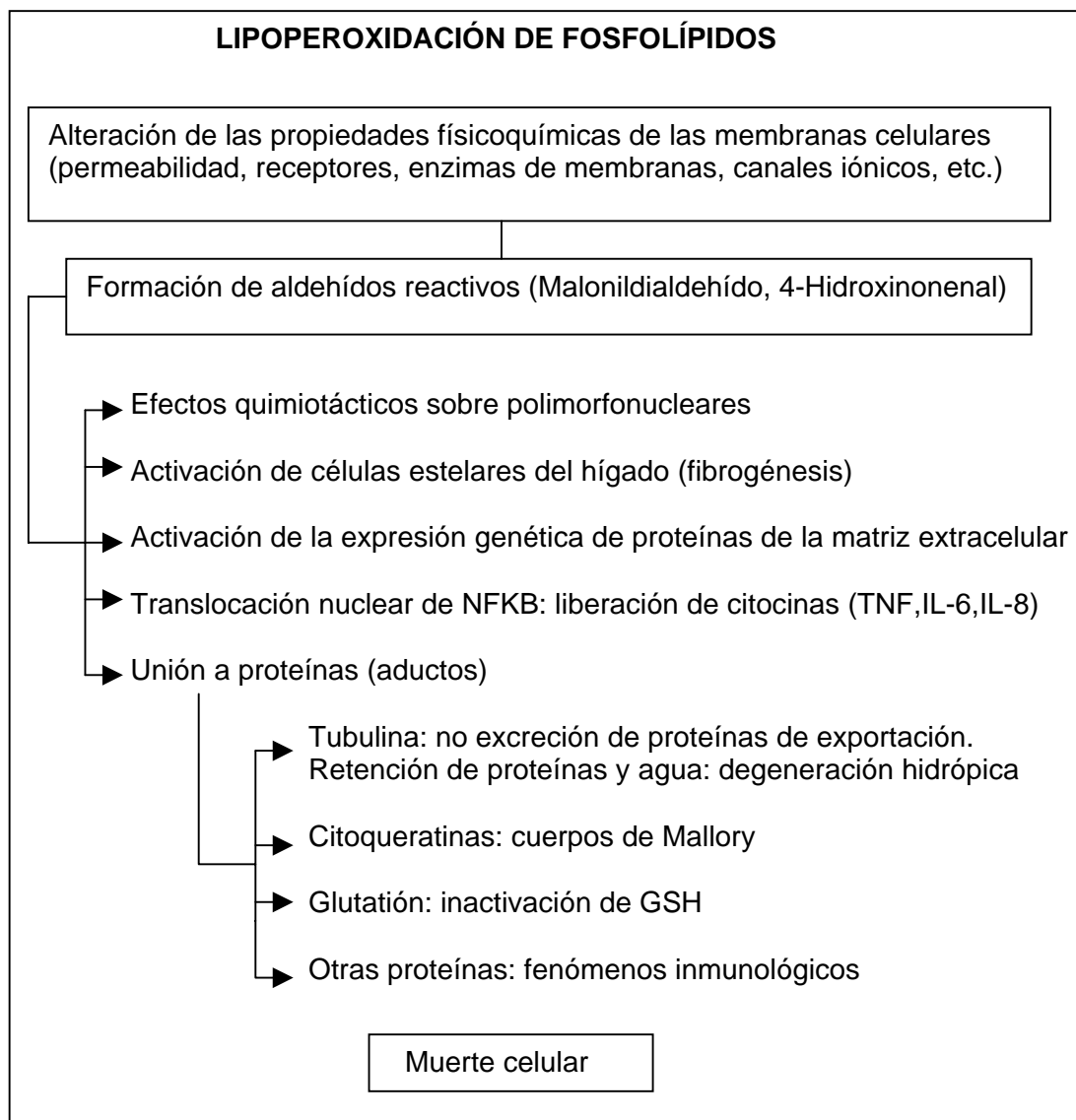
El segundo lugar de origen de los ROS en el EHNA podría ser el sistema microsomal oxidativo el cual, a través del citocromo P450, juega un papel importante en la oxidación del etanol y de otras muchas sustancias químicas (316,317). A través de esta vía, un sustrato, como el etanol o un ácido graso, se une al citocromo P450E1 (CYP2E1) oxidado (Fe^{3+}) y unido al O_2 . El complejo resultante, $(\text{RH}) \text{Fe}^{3+} (\text{O}_2)$, sigue una serie de transformaciones que concluyen en la hidroxilación del sustrato ($\text{ROH} + \text{Fe}^{3+}$). Sin embargo, el complejo $(\text{RH}) \text{Fe}^{3+} (\text{O}_2)$ puede desintegrarse y dar lugar a la liberación del anión superóxido (O_2^\bullet).

Cualquiera que sea la vía por la que se producen estos ROS, una de sus consecuencias es la de inducir la peroxidación de los lípidos celulares (163,311): el radical reactivo se une a un átomo de hidrógeno de la cadena de un AG poliinsaturado, dando lugar a un electrón impar en el carbono (e^-). Posteriormente el radical carbono reacciona con el oxígeno molecular, resultando en un radical peroxilo que ataca la cadena de otro AG adyacente y genera un radical carbono nuevo y un lipoperóxido. A continuación, la reacción en cadena continúa. Globalmente, el ataque de un ROS puede oxidar múltiples AG a peróxidos lipídicos dañando de esta forma las membranas celulares y causando su ruptura (Figura 14).

Figura 14. Peroxidación lipídica

Se ha detectado un aumento de productos de lipoperoxidación en tejidos de animales de experimentación con esteatosis hepática, así como una estrecha correlación entre el grado de peroxidación lipídica y la severidad de la esteatosis en animales y pacientes con hígado graso (163,318). La lipoperoxidación por los ROS afecta preferentemente a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, lo que puede tener consecuencias importantes para la función y viabilidad de las células (319). Consecuencia de la oxidación en cadena de los lípidos es la formación de aldehídos que, entre otros efectos biológicos, pueden explicar perfectamente los cambios morfológicos que se encuentran en la EHNA (320,321) (Figura 15).

Figura 15. Consecuencias de las lipoperoxidaciones y efectos biológicos de los aldehídos derivados de la lipoperoxidación



Adaptada de Solís Herruzo JA. Esteatohepatitis no alcohólica. *Revis Gastroenterol* 1999; 1:551-578

Entre los aldehídos productos de la lipoperoxidación se encuentran el 4-hidroxinonal y el malonildialdehído. El primero posee un potente efecto quimiotáctico sobre los polimorfonucleares, lo que pudiera explicar este tipo de infiltrado en la EHNA (322). El segundo es un inductor de la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$ o la interleuquina 8, y puede formar enlaces con proteínas, de forma que hipotéticamente podría constituir complejos con las citoqueratinas del hepatocito y dar lugar a la aparición de los cuerpos de Mallory.

Además, el malonildialdehído es capaz de unirse a las moléculas implicadas en la exportación celular de proteínas, como la tubulina, lo que se traduce en el hallazgo morfológico de la degeneración hidrópica por retención de proteínas y, secundariamente, de agua. Ambos aldehídos son capaces de estimular la producción de colágeno por las células estrelladas del hígado (células de Ito) y justificar así la fibrosis en los casos de EHNA más avanzados (323,324,329). El aumento de la permeabilidad de la membrana celular, consecuencia de la fragmentación de sus ácidos grasos, permite el paso de agua y calcio al interior celular, provocando una serie de alteraciones que comprometen la vida celular (325).

Además de los efectos que aparecen como consecuencia de la lipoperoxidación, algunos otros se producen por acción directa de los ROS. Este es el caso de la oxidación del glutatión y de los grupos tiólicos de las proteínas, el aumento del calcio citosólico, la delección del ADN, la deplección energética o la muerte celular por apoptosis (326,327).

2.Endotoxemia portal y citocinas pro-inflamatorias

Sin excluir el papel que pueda tener el estrés oxidativo, durante los últimos años se viene considerando la posibilidad de que la endotoxemia y las citocinas inducidas por ella, incluyendo al $TNF\alpha$ y a las IL-6 e IL-8, puedan participar en la patogenia de la EHNA (160). A favor de esta hipótesis se encuentran los siguientes hallazgos:

1.- La elevada incidencia de EHNA y de cirrosis en pacientes sometidos a bypass yeyunoileal. La EHNA y la cirrosis son más frecuentes en obesos con esteatosis a los que se somete a un bypass yeyunoileal, proceso que aumenta la endotoxemia portal con el subsiguiente estímulo de producción de $TNF\alpha$ (70,71). Además, otras situaciones en las que puede haber sobrecrecimiento bacteriano intestinal, como la diverticulosis del intestino delgado, también figuran entre las situaciones en las que se ha descrito la aparición de lesiones de EHNA (141).

2.- El metronidazol y la reconstrucción del bypass yeyunoileal son capaces de curar o de prevenir el desarrollo de EHNA en pacientes sometidos a este tipo de derivación intestinal (91).

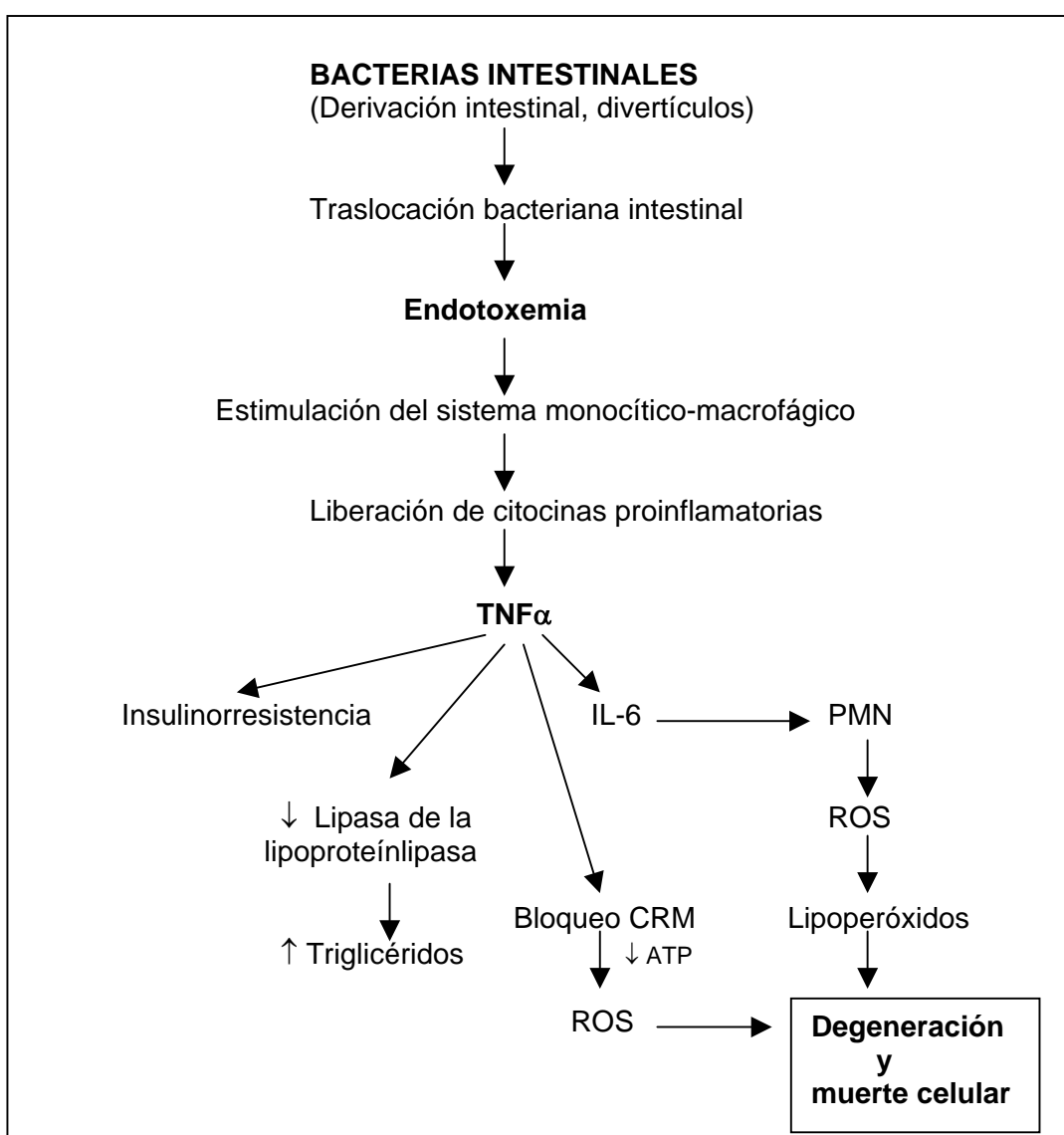
3.- Existen evidencias experimentales que sugieren que productos derivados del intestino, como las endotoxinas, participan en la patogénesis de la esteatohepatitis (158,328,329). Se ha encontrado que existe una disfunción de los macrófagos en ciertas ratas obesas en las que además se ha detectado un aumento en la producción de IL-6, peróxido de hidrógeno y superóxido, moléculas que son capaces de producir cambios en la homeostasis de la energía mitocondrial. Dicha alteración en la función fagocítica de las células de Kupffer probablemente permite que mantengan un bajo grado de endotoxemia sistémica crónica. Este hecho podría ser responsable del aumento en la expresión del ARNm del $TNF\alpha$ en tejido adiposo que se ha observado en la obesidad (329-331). Por otro lado, La administración de endotoxinas a ratones obesos resulta en niveles circulantes anormalmente altos de $TNF\alpha$ y en un aumento en la resistencia a la insulina (289). Estudios recientes han demostrado que ratones genéticamente obesos son muy sensibles a dosis bajas de lipopolisacáridos, desarrollando una esteatohepatitis severa que no se observa en animales delgados. Dicha lesión es atribuida al daño hepático producido por la endotoxina a través de la liberación de $TNF\alpha$ (158). En este modelo se observa, además, una sobreexpresión del ARNm del interferón γ , el cual sensibiliza a los hepatocitos a la toxicidad producida por el $TNF\alpha$, mientras que los niveles de ARNm de IL-10, que inhibe la acción del $TNF\alpha$, se encuentran disminuidos. Los niveles plasmáticos elevados de $TNF\alpha$ en la obesidad podrían contribuir a la patogénesis de la EHNA en estos pacientes.

4.- Por último, en un estudio reciente realizado por nosotros, encontramos sobrecrecimiento bacteriano intestinal en un 27% de pacientes con EHNA a los que se efectuó un test del hidrógeno espirado, excluyendo a aquellos pacientes diabéticos o con antecedentes de cirugía intestinal (332).

La liberación de $TNF\alpha$ por los macrófagos, inducida por la endotoxemia, aumentará la expresión genética de la IL-6 e IL-8. Esta última es un potente estimulante de la quimiotaxis de los polimorfonucleares, por lo que pudiera justificar el componente inflamatorio de la esteatohepatitis, la formación de ROS, la peroxidación de los lípidos de la membranas, y el daño y muerte de los hepatocitos. Entre los múltiples efectos del $TNF\alpha$ cabe destacar sus acciones sobre la función mitocondrial, interfiriendo el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria

mitocondrial: reduce la producción de ATP, favorece el paso de electrones al oxígeno molecular y la formación de ROS; el resultado final es el daño y muerte celular por apoptosis (333). Además, es bien conocido que el $\text{TNF}\alpha$ inhibe a la lipoproteínlipasa, reduce la lipólisis y favorece la acumulación de triglicéridos (331,334). Actualmente se sabe que el $\text{TNF}\alpha$ es un mediador potencial de la resistencia a la insulina en los obesos al modificar el grado de activación del receptor de insulina (Figura 16).

Figura 16. Papel de las endotoxinas en la patogenia de las lesiones de EHNA



PMN: polimorfonucleares; **CRM:** cadena respiratoria mitocondrial. Adaptada de Solís Herruzo JA. Esteatohepatitis no alcohólica. *Revis Gastroenterol* 1999;1: 551-578

En apoyo de la teoría de que las citocinas pro-inflamatorias estén aumentadas en la EHNA se encuentra el hallazgo reciente de una disminución en la tasa de aclaramiento de antipirina en pacientes con EHNA, ya que se sabe que estas citocinas comprometen la actividad de varias enzimas del citocromo P450 , incluyendo aquellas que metabolizan a la antipirina (335). Además, se ha hallado un aumento en la concentración intraluminal de IL-6 como resultado de un incremento en su producción por el epitelio intestinal en pacientes con sobrecrecimiento bacteriano intestinal (336). Sin embargo, de momento no existe información disponible que correlacione el grado de inducción de estas citocinas con el estadio de la enfermedad hepática en pacientes con EHNA.

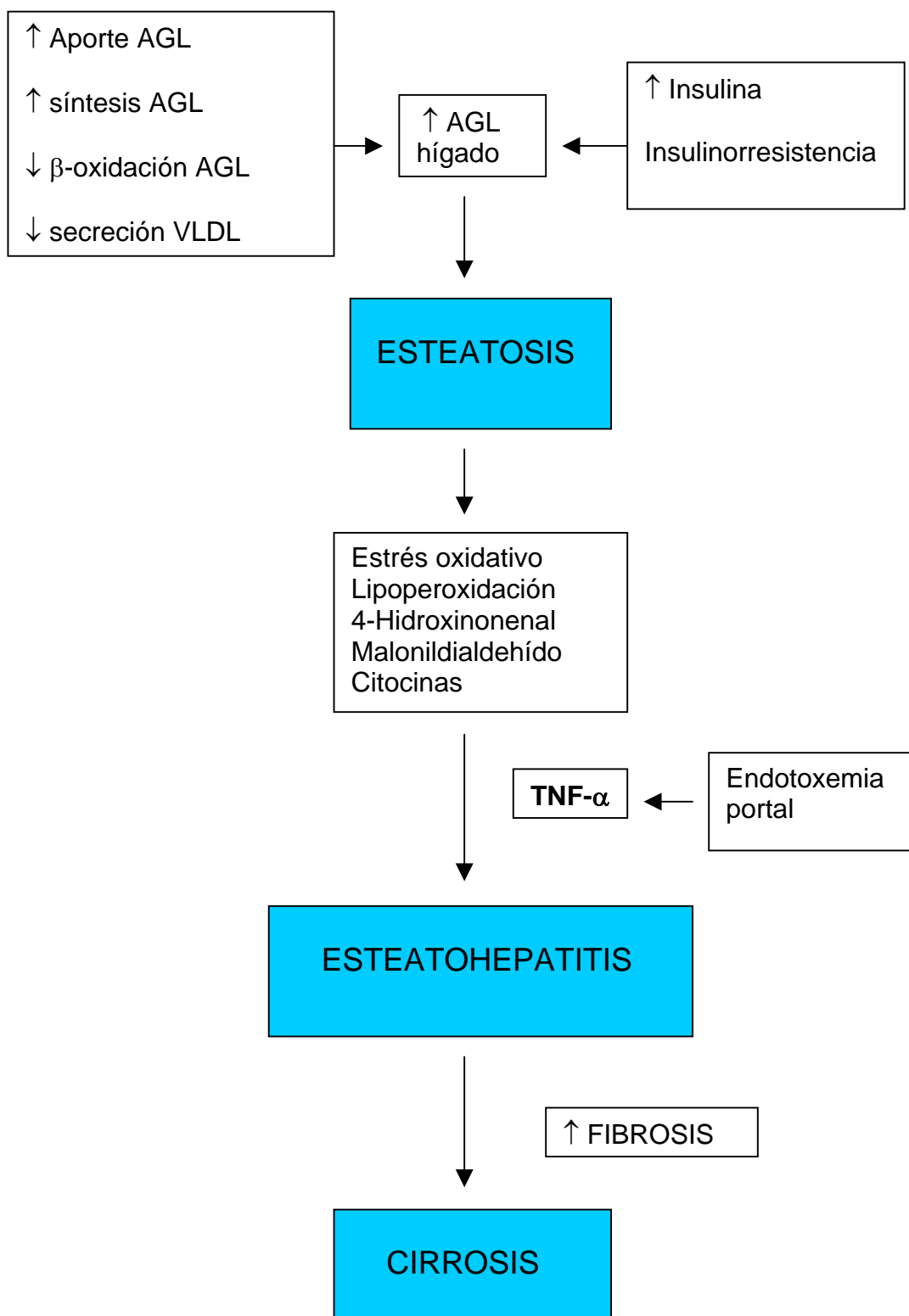
Se ha demostrado también que el *hierro* puede participar en la génesis de ROS (recuérdese la reacción de Fenton) y, por ello, en la aparición de lesiones de EHNA (337,338). Existen evidencias experimentales de que este metal actúa de forma sinérgica con la esteatosis hepática, favoreciendo la peroxidación lipídica de las membranas celulares y la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial (339,340). En este sentido, resulta interesante reseñar que los pacientes con EHNA presentan con frecuencia un estado de sobrecarga de hierro y un aumento en la prevalencia de la mutación C282Y en el gen HFE de la hemocromatosis (37,341). Mendler et al. (292) han mostrado muy recientemente la asociación del denominado síndrome de insulinoresistencia con la esteatosis hepática / EHNA y un estado de sobrecarga de hierro.

Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de pacientes con esteatosis desarrolla esteatohepatitis, lo que induce a pensar que, de forma similar a lo que ocurre en la hepatopatía alcohólica, algunos *factores genéticos* podrían jugar un papel en la susceptibilidad para desarrollar EHNA. Existen algunos datos que apoyan esta predisposición genética al desarrollo de EHNA, como son: 1. La estrecha relación de la EHNA con dos enfermedades de riesgo familiar en las que participa la herencia genética, como la diabetes tipo 2 y la obesidad (342,343); 2. La existencia de formas familiares de EHNA asociadas a lipodistrofia (143); 3. La aparición de formas familiares de cirrosis criptogénica (344); y 4. El mayor riesgo de desarrollar EHNA entre niños obesos de origen hispano y afroamericano documentado en un estudio muy reciente (345,346).

Recientemente Struben et al. (344) han encontrado mayor prevalencia de EHNA, con o sin cirrosis, y de cirrosis criptogénica en varios miembros de una misma familia. Este hallazgo apunta la posibilidad de que exista un riesgo heredado de susceptibilidad para desarrollar EHNA, aunque no descarta que factores ambientales, como la dieta, intervengan. No existen datos que apoyen un patrón de herencia mitocondrial estricto y entre los posibles factores que podrían explicar esta variación genética y susceptibilidad para el daño celular en el hígado graso se han propuesto los siguientes: variaciones genéticas en la actividad del CYP2E1, responsable de la mayor producción de ROS (347-351); variaciones genéticas en la proteína desacoplante de la fosforilación oxidativa (UCP) (352,353); y la existencia de polimorfismos genéticos del promotor del $TNF\alpha$, reconocidos en la enfermedad hepática alcohólica (354,355).

En conclusión, aunque no se han determinado los mecanismos por los que aparece la EHNA, sí existen hipótesis avaladas por diferentes estudios que pueden resumirse según se ha hecho en la siguiente figura (Figura 17).

Figura 17. Mecanismos patogénicos de la EHNA



AGL: ácidos grasos libres; **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad; **TNF:** factor de necrosis tumoral

IV. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las características clínicas de la EHNA se resumen en la siguiente tabla

Tabla 12. Características clínicas de la EHNA (26)

Edad

Generalmente entre 41 y 60 años

En ocasiones entre 11 y 20 años

Sexo

Predominantemente femenino

Condiciones asociadas

Obesidad (69 a 100%)

Diabetes (36 a 75%)

Hiperlipemia (20 a 81%)

Ausencia de exposición al alcohol

Síntomas

Ninguno (48 a 100%)

Molestia abdominal inespecíficas

Dolor en hipocondrio derecho

Fatiga o astenia

Signos

Hepatomegalia

Raramente estigmas de hepatopatía crónica o hipertensión portal

Laboratorio

Elevación 2-3 veces de AST y ALT.

Fosfatasa alcalina y GGT normales o ligeramente elevadas

Niveles normales de albúmina, protrombina y bilirrubina

Posible aumento de ferritina

Estudio etiológico de hepatopatía (vímica, metabólica, autoinmune) negativo

Ecografía abdominal

Hiperecogenicidad del parénquima hepático

- **SÍNTOMAS Y SIGNOS**

De forma similar a otros tipos de enfermedad hepática crónica del hígado, la mayoría de pacientes con EHNA están asintomáticos (48-100%) y un pequeño porcentaje aquejan síntomas inespecíficos, tales como astenia o dolor/malestar en el hipocondrio derecho (16,38,356). Bacon et al. (16) encontraron algún síntoma previo al diagnóstico de la enfermedad en aproximadamente un 25% de sus pacientes.

A la exploración física el hallazgo más frecuente es la hepatomegalia, que aparece en el 75% de enfermos, según la mayoría de estudios (1,4,16,30-32,357). Los estigmas de hipertensión portal son infrecuentes, aunque es posible encontrar esplenomegalia en el 25% de casos (16). Rara vez se detectan signos o síntomas sospechosos de enfermedad hepática avanzada, tales como ictericia, encefalopatía, ascitis o arañas vasculares.

- **LABORATORIO**

No existe ningún dato de laboratorio específico de la EHNA. El dato más constante es una hipertransaminasemia leve-moderada (2-3 veces el valor normal), que a menudo se detecta de forma casual en una analítica efectuada por otro motivo (4,16,30,32,34,38). Generalmente se encuentra un aumento en los valores séricos de la alanino-amino-transferasa (ALT) y de la aspartato-amino-transferasa (AST), aunque el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad de la enfermedad, puesto que no diferencia entre esteatosis sola, esteatohepatitis, o esteatohepatitis que ha evolucionado a cirrosis (12,32,358). El aumento del valor sérico de la ALT suele ser el dato analítico de mayor sensibilidad diagnóstica, siendo el cociente AST/ALT menor de 1 en la mayoría de los casos (16,31). Con menor frecuencia existe una elevación de la fosfatasa alcalina y de la gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT). Los parámetros bioquímicos de función hepatocelular (albúmina, actividad de protrombina y bilirrubina) no suelen estar alterados (Tabla 13).

Tabla 13. Datos analíticos hepáticos en la EHNA (16)

DATO	RANGO NORMAL	VALORES EN PACIENTES	% PACIENTES ANORMAL
ALT	3-55	64-224	29/33 (88%)
AST	12-50	52-122	29/33 (88%)
FA	33-133	139-205	10/33 (30%)
BR	0.2-1.2	1.5-2.3	4/33 (12%)

ALT (U/L): aspartato-amino-transferasa; AST (U/L): alanino- amino-transferasa; FA (U/L): fosfatasa alcalina; BR (mg/dl): bilirrubina.

En el 25-75% de pacientes con EHNA se detectan niveles anormales del perfil lipídico (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia) y/o aumento en la concentración de glucosa en suero (1,4,31,36,48,60,357). Algún estudio ha encontrado correlación entre los valores plasmáticos de la colinesterasa y la esteatosis, pero se necesitan aún más datos (359). Bacon et al. (16) identificaron por primera vez una alteración en el perfil del hierro en el 58% de pacientes con EHNA, que generalmente consistía en un aumento en los niveles séricos de la ferritina con o sin elevación en la saturación de transferrina. Series más recientes han confirmado que este hallazgo es un hecho común entre los pacientes con EHNA. Además, el estudio de las mutaciones asociadas al gen de la hemocromatosis primaria (HFE) ha permitido detectar una mayor prevalencia de las mutaciones C282Y y H63D entre pacientes con EHNA (31-19% y 31-50%, respectivamente) (37,341).

-TÉCNICAS DE IMAGEN

Aunque tradicionalmente la ultrasonografía ha sido la técnica de imagen más utilizada para el diagnóstico de la esteatosis hepática, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) son también capaces de indentificar la infiltración grasa y se han propuesto como técnicas de diagnóstico no invasivas para la EHNA (360,361). Desafortunadamente, ninguna de ellas tiene la sensibilidad suficiente para detectar la inflamación hepática; además, sólo son capaces de detectar la presencia de fibrosis

una vez que existe una cirrosis establecida, con manifestaciones evidentes de hipertensión portal.

La *ecografía abdominal* es una exploración segura y fiable, que en la actualidad es aceptada como la técnica de imagen de primera línea de investigación en pacientes con sospecha de enfermedad hepática. Tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 84% para identificar la esteatosis hepática. Sin embargo, estos porcentajes empeoran para la fibrosis: sensibilidad del 57% y especificidad del 88% (362). El criterio diagnóstico fundamental de la esteatosis es la hiperecogenicidad del parénquima hepático, que además presenta un patrón de ecos finos. El grado de esteatosis habitualmente se valora por el descenso de la amplitud de los ecos en profundidad (tasa de atenuación posterior de la transmisión de los ecos), por el incremento en la diferencia en la amplitud de ecos entre el parénquima hepático y el renal, y también por la pérdida de ecos de las paredes de las ramas venosas portales. En los casos con fibrosis las paredes venosas conservan sus ecos o éstos se exageran, y no se ve la atenuación posterior. Sin embargo, resulta muy difícil identificar la coexistencia de fibrosis con esteatosis y la única característica que permite sospecharlo es la presencia de ecos gruesos dentro del patrón de ecos finos que caracteriza a la esteatosis (361,362).

La *RM* es una técnica que permite detectar cantidades pequeñas de grasa en los hepatocitos, pero que es menos asequible que la ecografía o la TC para el clínico. Ambas técnicas suelen reservarse para los casos de esteatosis irregular, que planteen dudas con otros procesos (161). Estudios experimentales han evidenciado una correlación entre el contenido de triglicéridos en el hígado y los hallazgos con la TC (363), por lo que actualmente se buscan métodos de imagen que permitan cuantificar la esteatosis y, puesto que se sabe que ésta puede progresar, establecer un pronóstico de la enfermedad y poder evaluar la eficacia terapéutica de determinados tratamientos (364,365).

V. DIAGNÓSTICO

La EHNA siempre debe ser incluida entre las posibilidades diagnósticas de pacientes con hipertransaminasemia crónica sin otra causa identificable de enfermedad hepática crónica, especialmente en presencia de alguna de las condiciones reconocidas como de riesgo (obesidad, diabetes, hiperlipemia). Hacen más probable su diagnóstico la ausencia de síntomas o que éstos sean inespecíficos, la elevación predominante de ALT y la presencia de un hígado brillante en la ecografía abdominal. Sin embargo, aunque todos estos datos permiten establecer un diagnóstico de sospecha, se requiere una biopsia hepática para establecer el diagnóstico de certeza y poder evaluar la severidad y el pronóstico de la enfermedad (22).

El diagnóstico de EHNA se basa en tres características, y todas ellas deben estar presentes (20):

1. Lesiones hepáticas “alcohol-like”.
2. Ausencia de la exposición al alcohol.
3. Exclusión de otras causas de enfermedad hepática crónica.

1. Lesiones hepáticas similares a la hepatopatía alcohólica

Desde el punto de vista morfológico la esteatohepatitis, alcohólica y no alcohólica, se define por una combinación de esteatosis (hígado graso), daño hepatocitario (degeneración y necrosis celular), infiltrado inflamatorio (con predominio de polimorfonucleares) y grados variables de fibrosis (3,46,50,161,323,366,367). La severidad, extensión, y proporción relativa de estas cuatro características básicas son variables, de forma que actualmente se considera que el término EHNA engloba tres estadios histológicos:

1ª) EHNA en fase de esteatosis simple: depósito aislado de grasa en el citoplasma de los hepatocitos, de predominio macrovesicular y centrolobulillar.

2ª) EHNA en fase de esteatohepatitis: esteatosis, degeneración hidrópica de los hepatocitos, cuerpos de Mallory, infiltrado de polimorfonucleares, y grados variables de fibrosis.

3ª) EHNA en fase de cirrosis esteatohepatítica: nódulos de regeneración rodeados de bandas de fibrosis, observándose en los nódulos signos esteatohepatíticos tales como esteatosis, cuerpos de Mallory, infiltrado de polimorfonucleares, etc.

En fases precoces las lesiones se concentran principalmente en la región perivenular (zona 3 o centrolobulillar), pero según progresa la enfermedad los cambios se extienden a través del acino, destruyendo finalmente la arquitectura normal del hígado, y llegando a la cirrosis como último estadio de la enfermedad.

Múltiples revisiones de la enfermedad hepática alcohólica han analizado en qué consisten las características morfológicas de la esteatohepatitis (13,368-373) (Figuras 18-27; pág. 89-93):

ESTEATOSIS (CAMBIO GRASO)

Traduce la presencia de grasa en los hepatocitos y suele ser el hallazgo más frecuente y precoz. Al igual que en la alcohólica, la esteatosis de la EHNA suele ser predominantemente macrovesicular (el hepatocito contiene una única y gran vacuola de grasa que desplaza al núcleo), aunque en ocasiones se encuentra un componente variable de esteatosis microvesicular (vacuolas pequeñas y múltiples que no desplazan el núcleo), que a veces puede ser incluso la variante principal. El grado de esteatosis en la EHNA puede variar desde leve, generalmente localizada en la región perivenular, hasta intensa, afectando a todo el lobulillo.

DAÑO HEPATOCITARIO

La forma fundamental en la que se manifiesta el daño celular en la esteatohepatitis se denomina *degeneración hidrópica o balonizante*. Consiste en la aparición de células con citoplasma claro, esférico, hinchado, con el núcleo en situación central. Su localización es fundamentalmente centrolobulillar o bien comprometiendo a los hepatocitos próximos a los septos de fibrosis en los casos de cirrosis. Este mayor tamaño de los hepatocitos se ha atribuido a un incremento en los lípidos citoplasmáticos y a un acúmulo de proteínas secundario a un trastorno en la secreción de las mismas. Aunque puede ser reversible, la degeneración o cambio hidrópico es un signo de gravedad y puede evolucionar a necrosis hepatocitaria. Con menor frecuencia la pérdida de hepatocitos se manifiesta de otras formas, como son los *cuerpos acidófilos o apoptóticos* y la *necrosis hepatocitaria focal*, similar a la que se observa en otras formas de hepatitis.

Otra de las características distintivas de la esteatohepatitis son las inclusiones intracitoplasmáticas conocidas como *cuerpos de Mallory*. Se encuentran en el 40-80% de esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica, siendo más patentes en aquellos casos con mayor grado de daño hepatocitario e infiltrado inflamatorio. Se trata de acúmulos de material homogéneo de contornos irregulares, intensamente eosinofílicos, de distribución preferentemente perivenular, y que adoptan la forma de “gota de cera”. Ultraestructuralmente están compuestos por agregados de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los hepatocitos. El mecanismo por el que aparecen no está aclarado, aunque se ha sugerido que pueden ser secundarios a una alteración en el ensamblaje, organización o distribución de los filamentos intermedios en el interior de los hepatocitos. Aunque son característicos de la esteatohepatitis, no son un requisito ni un hallazgo específico de ésta. Pueden aparecer en otras enfermedades hepáticas como la cirrosis biliar primaria, enfermedad de Wilson, síndromes colestásicos crónicos, hiperplasia nodular focal, hepatocarcinoma, porfiria cutánea tarda, y fibrosis hepática congénita. Sin embargo, cuando se observan en el área centrolobulillar y asociados a infiltración grasa sugieren el diagnóstico morfológico de esteatohepatitis.

INFILTRADO INFLAMATORIO

Las células inflamatorias características de la esteatohepatitis son los neutrófilos, los cuales generalmente se acumulan alrededor de los hepatocitos dañados y adyacentes a los sinusoides. Aunque la presencia de neutrófilos es una característica clásica de la esteatohepatitis, también se encuentran presentes células mononucleares, incluyendo linfocitos y macrófagos. El grado y extensión acinar de la inflamación puede variar y se correlaciona generalmente con la severidad del daño hepatocitario. La inflamación portal generalmente es menor en la esteatohepatitis y consiste en un infiltrado inflamatorio mononuclear leve. En ocasiones pueden verse neutrófilos portales y proliferación de ductos biliares de distintos grados.

FIBROSIS

Constituye una característica frecuente de la esteatohepatitis y suele estar presente en diferentes grados en casi todos los casos, aunque no se considera un requisito diagnóstico. Al igual que el resto de lesiones, generalmente afecta más a la zona 3 del lobulillo. La forma más distintiva es la *fibrosis pericelular*, la cual se caracteriza por depósito de colágeno en los sinusoides, quedando los hepatocitos aislados o agrupados, rodeados de fibrosis. Este depósito de colágeno ocurre inicialmente en el espacio de Disse y se denomina *esclerosis o colagenización sinusoidal* o también capilarización de los sinusoides. La fuente principal de este tejido parecen ser las células hepáticas estrelladas o células de Ito, también denominadas lipocitos perisinusoidales. La fibrosis pericelular compromete el intercambio metabólico entre los hepatocitos y la sangre y puede incrementar la resistencia sinusoidal y contribuir por este mecanismo a la aparición de hipertensión portal. Existe una tercera forma de fibrosis característica de la esteatohepatitis que se denomina *fibrosis perivenular o fibroesclerosis*. Es aquella que se extiende alrededor de 2/3 partes del perímetro de la vena centrolobulillar, obliterando su luz, y contribuyendo con ello al desarrollo de hipertensión portal. En casos avanzados, la combinación de fibrosis perivenular y pericelular lleva a la aparición de grandes áreas de fibrosis que acaban

sustituyendo a la zona 3 del lobulillo hepático. Dicha lesión generalmente está rodeada de daño hepatocitario e inflamación lobular, dando la apariencia de lo que en el pasado se denominó “necrosis hialina esclerosante” (372). Además, las venas hepáticas terminales pueden mostrar un infiltrado linfocitario con mononucleares en su pared venosa (flebitis linfocítica) e incluso lesiones veno-oclusivas que consisten en proliferación intimal con fibrosis de la pared venosa y estenosis de la luz vascular, contribuyendo también a la aparición de hipertensión portal (373).

La fibrosis que puede aparecer en las regiones portales y periportales, en contraste con la perivenular, es una lesión poco común, al menos durante estadios iniciales. En fases avanzadas de esteatohepatitis la fibrosis centrolobulillar se extiende pericelularmente hasta las regiones portales y se forman puentes de fibrosis. Estos septos o puentes de fibrosis finalmente alteran la arquitectura normal del hígado y generalmente contienen áreas de células inflamatorias mononucleares y proliferación de ductos biliares y daño hepatocitario en sus márgenes. Su progresión lleva a la formación de nódulos que indican el desarrollo de una cirrosis. La cirrosis derivada de una esteatohepatitis clásicamente es micronodular, aunque puede ser mista (macro-micronodular) (372).

OTRAS CARACTERÍSTICAS

- Megamitocondrias

Se trata de inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas, globulosas, que pueden adoptar una forma esférica o elíptica. Las primeras suelen localizarse en la región centrolobulillar y son más frecuentes en la hepatopatía alcohólica; las elípticas suelen situarse en los hepatocitos periportales y son más inespecíficas. Las megamitocondrias o mitocondrias gigantes representan cambios degenerativos adaptativos hepáticos y se consideran una manifestación del estrés oxidativo del hepatocito, aunque su significado clínico no está bien definido.

- Núcleos glucogenados

Se trata de una característica inespecífica de la esteatohepatitis. Ocasionalmente pueden ser un hallazgo normal en niños. En la EHNA son más frecuentes cuando existe hiperinsulinemia o diabetes.

- Lipogranulomas

Son glóbulos de grasa rodeados por macrófagos y otras células mononucleadas. Suelen localizarse en la región centrolobulillar y son consecuencia de la rotura de hepatocitos distendidos por la grasa y la respuesta inflamatoria secundaria.

- Siderosis

En algunos casos aislados se puede detectar un depósito leve de hierro en los hepatocitos y células de Küpffer.

- Fosfolipidosis

Un hallazgo adicional en los casos de EHNA inducida por amiodarona o maleato de perhexilina es la presencia de hepatocitos ricos en fosfolípidos con un citoplasma de apariencia espumosa o granular (117).

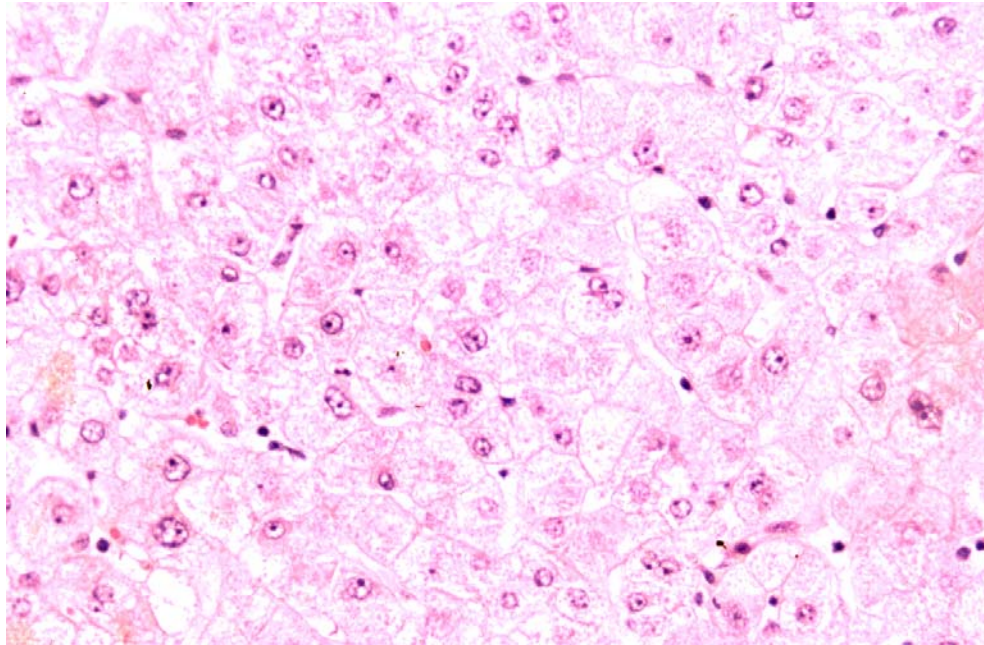


Figura 18. Citoplasma característico de hepatocitos normales para su comparación con los cambios que se objetivan en la EHNA. (HE x200)

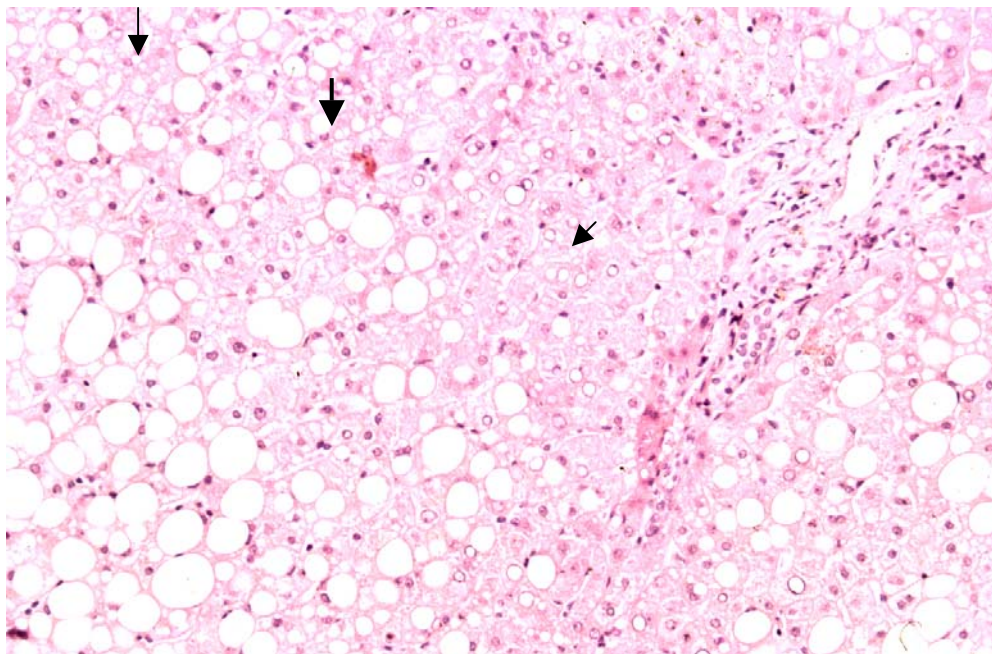


Figura 19. Cambio claro citoplasmático leve, esteatosis macro y microvacuolar (flechas), núcleos hiperglicogenados periportales y afectación inflamatoria leve en un espacio porta. (HE x100)

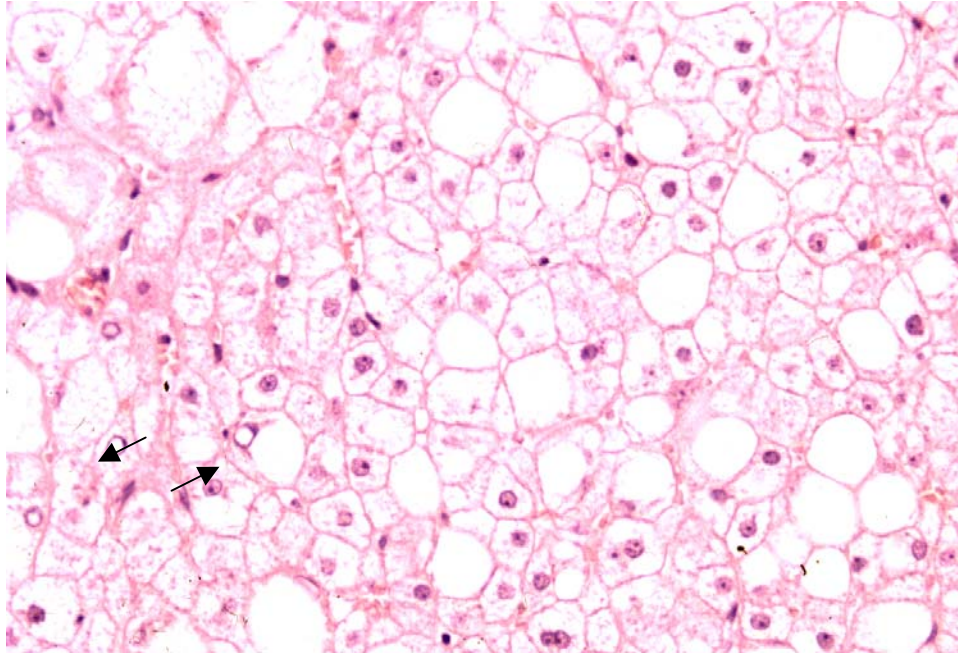


Figura 20. Aspecto claro de los citoplasmas hepatocitarios debido a su hiperglicogenización. Este aspecto hidrópico resalta las membranas y confiere a estas células un aspecto “vegetaloide” o en “mosaico”. Se observan también núcleos hiperglicogenados (flechas) (HE x200).

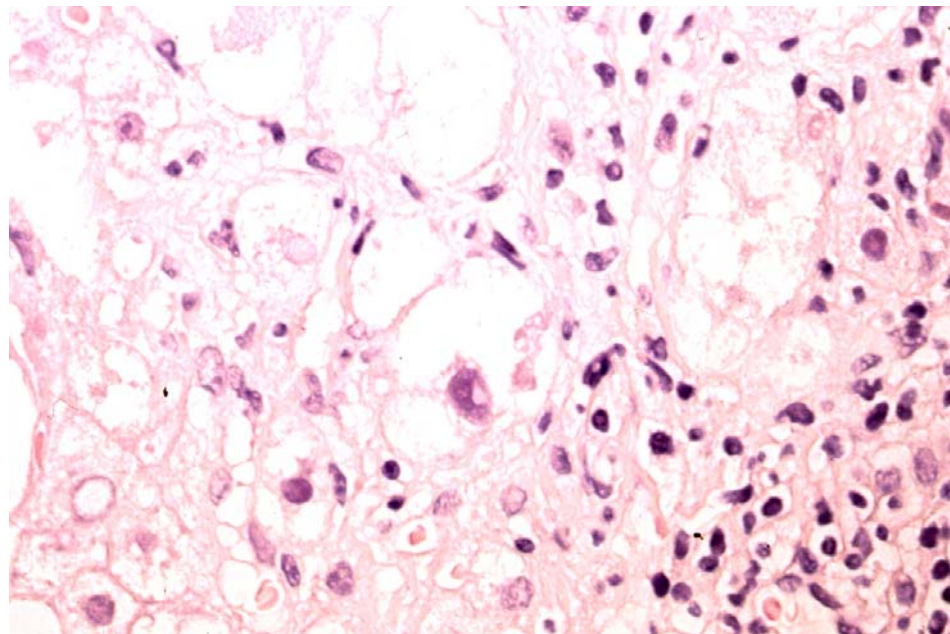


Figura 21. Cambio claro hepatocitario asociado con infiltrado inflamatorio (angulo inferior derecho) y con presencia de hialina alcohólica de Mallory (flechas) (HE x300).

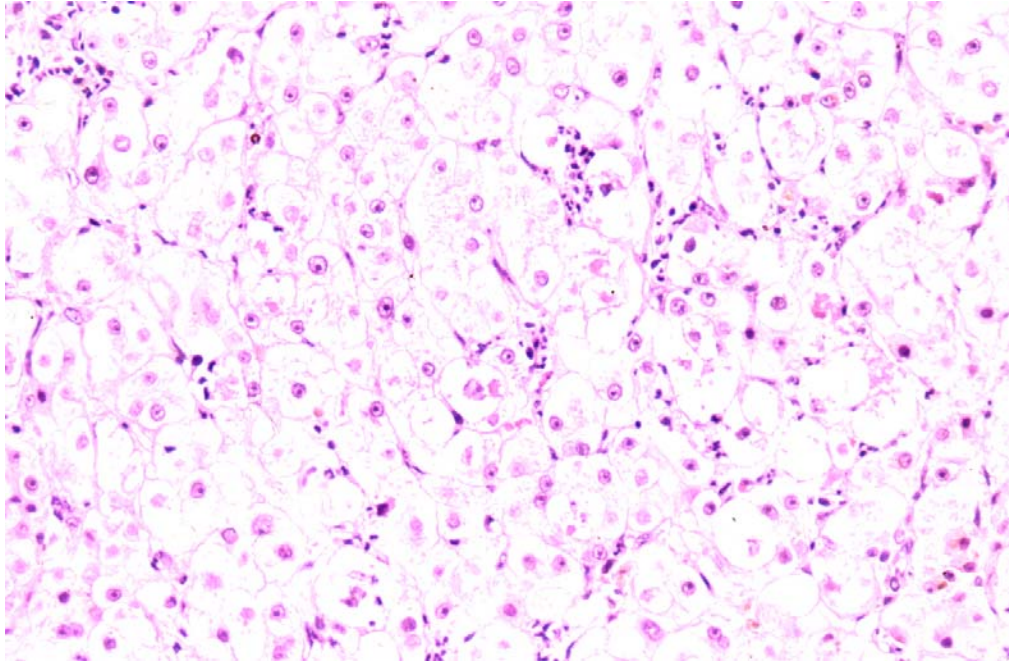


Figura 12. Componente neutrofílico de la inflamación lobulillar en un transfondo característico de ENA. (HE x100)

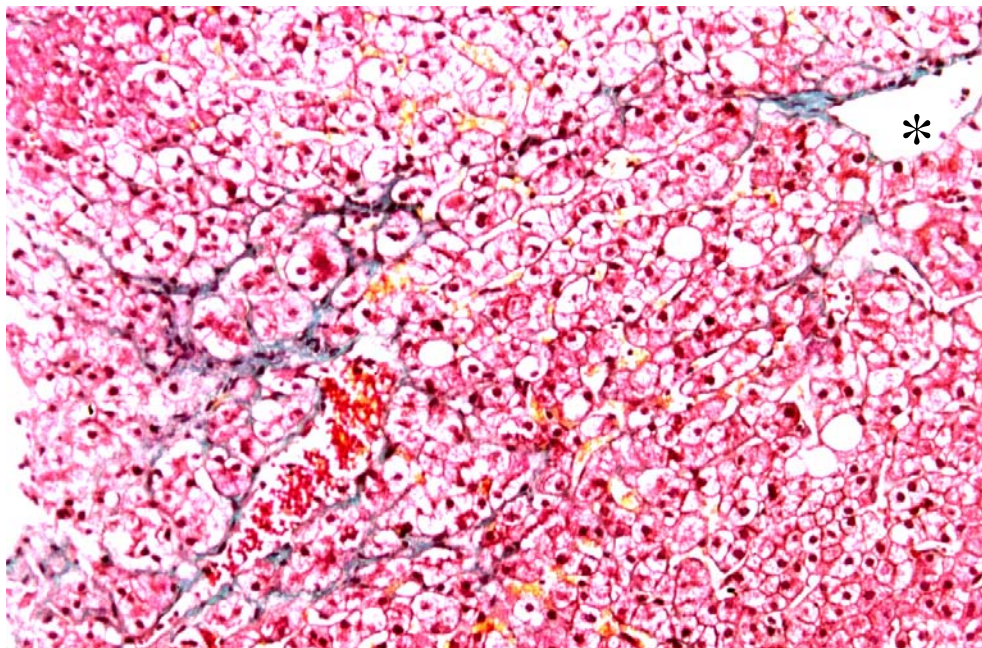


Figura 23. Fibrosis interhepatocitaria (colagenización sinusoidal) en la zona 3 (Rappaport). Se objetiva una vena central (eferente (*)). (Tricrómico de Masson x100).

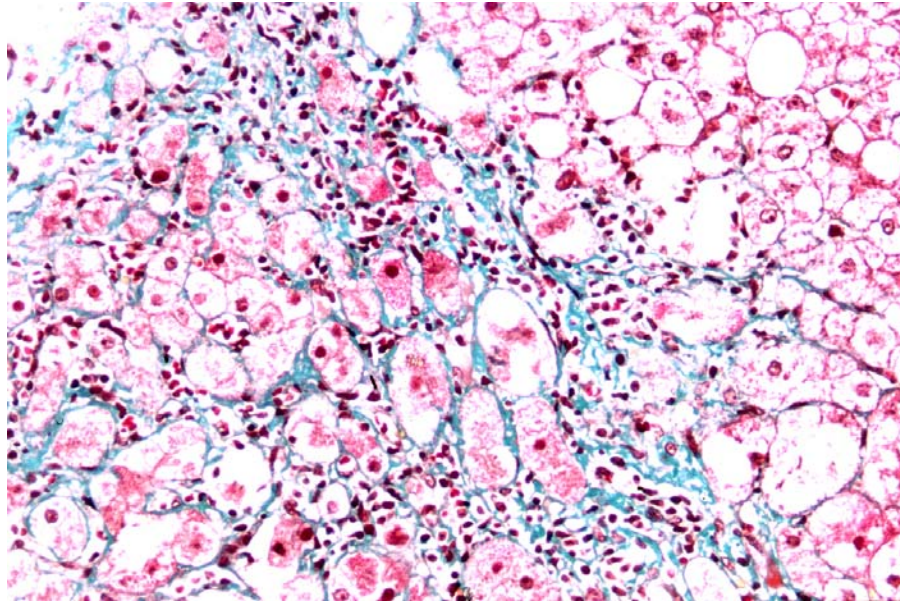


Figura 24. Fibrosis interhepatocitaria es muy marcada y se asocia con cambios hidrópicos de los hepatocitos englobados en ella. En estas células se reconoce también la presencia de cuerpos de Mallory. El infiltrado incluye neutrofilos. (Tricrómico de Masson x200).

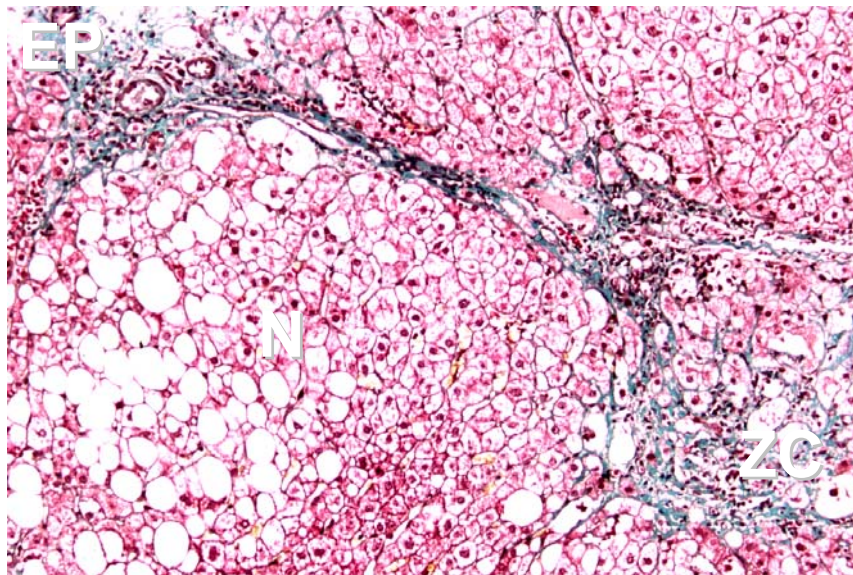


Figura 25. Septo fibroso centro-portal completo (zona central: ZC; espacio porta: EP). Se inicia regeneración en forma de nódulos (N) cuyos hepatocitos muestran características típicas de ENA. (Tricrómico de Masson x100).

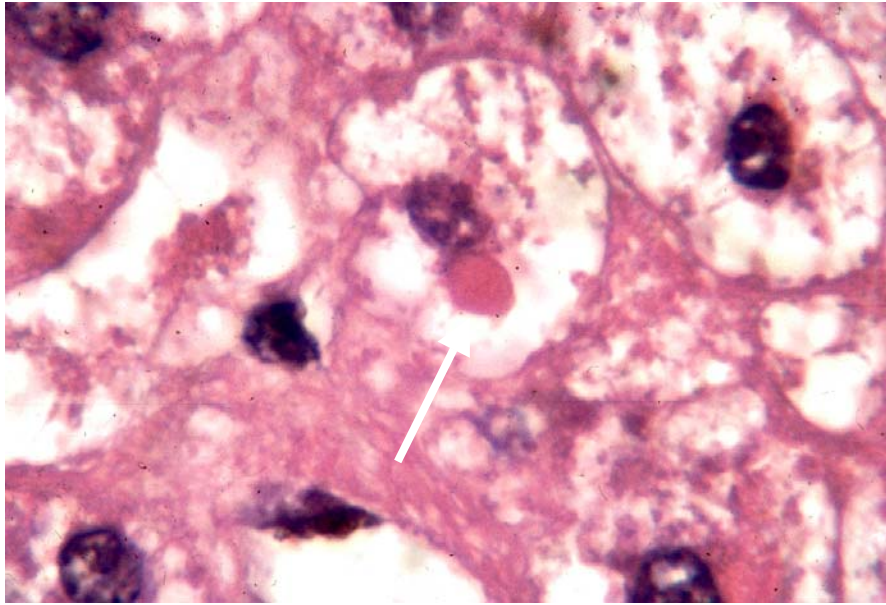


Figura 26. Cambio claro del citoplasma de un hepatocito que alberga una Mitocondria gigante (flecha) (HE x400).

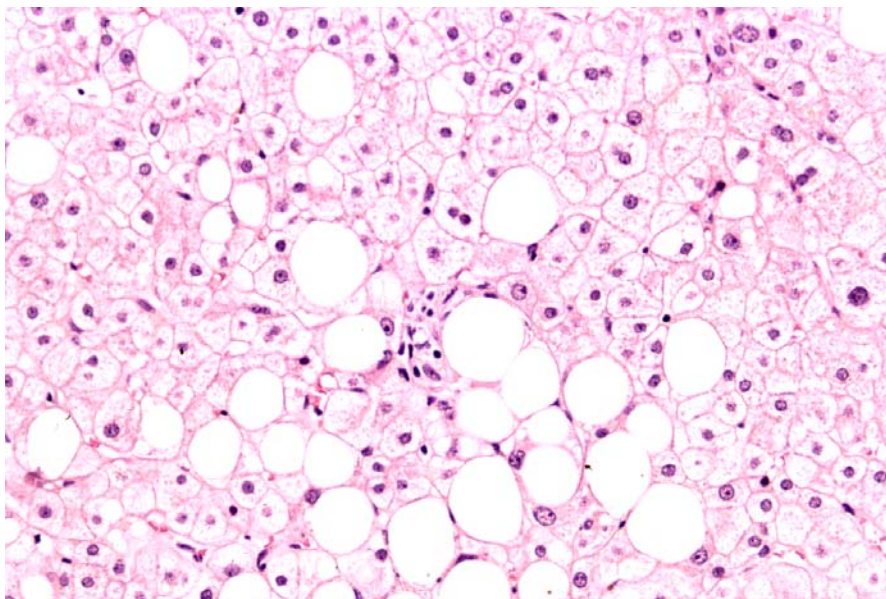


Figura 27. Aspecto en "mosaico" y macroesteatosis en un campo centrado por un lipogranuloma (flechas). (HE x200)

La mayoría de estudios han evaluado la severidad histológica de la EHNA según un sistema de puntuación numérica, que analiza semicuantitativamente y de forma individual la intensidad de cada cambio morfológico (3,16,30) (Tabla 14).

Tabla 14. Severidad de la EHNA según la intensidad de las lesiones morfológicas

ESTADIO	PATRÓN/CARACTERÍSTICA	GRADO
Esteatosis simple	Macrovesicular	1 (<33%)*
	Microvesicular	2 (33-66%)
	Mixta	3 (>66%)
Esteatohepatitis	Inflamación	0-3
	Hepatocitos balonizados	0-3
	Cuerpos de Mallory	0-3
	Necrosis celular	0-3
Fibrosis	Pericelular	0-3
	Perivenular	0-3
	Cirrosis	

* porcentaje de hepatocitos con grasa

Con el fin de estandarizar el análisis de la severidad de la EHNA desde el punto de vista morfológico, recientemente se ha propuesto un sistema similar al empleado para la mayoría de las enfermedades crónicas como las hepatitis crónicas virales o la hepatitis autoinmune (374-377). Dicho método permite evaluar de forma global la intensidad de la lesión según el *grado* de actividad necroinflamatoria, definido por la magnitud del daño hepatocitario y del infiltrado inflamatorio, y el *estadio*, según la extensión y distribución de la fibrosis y las alteraciones arquitecturales (368,378,379). Estos dos parámetros aportan una valoración global de la severidad del proceso y además permiten comparar diferentes estudios y evaluar los efectos de distintos tratamientos (Tabla 15).

Tabla 15. Sistema de puntuación global de la esteatohepatitis (368)

GRADO	ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA
0	Ninguna
1	Mínima: daño hepatocitario limitado e inflamación escasa
2	Leve: daño focal e inflamación lobular leve
3	Moderada: daño celular patente e inflamación moderada
4	Severa: daño celular prominente e inflamación intensa
ESTADIO	FIBROSIS
0	Ninguna: tejido conectivo normal
1	Mínima: fibrosis pericelular en zona 3
2	Leve: fibrosis perivenular o pericelular en zonas 2-3 (septos incompletos)
3	Moderada: fibrosis en septos completos
4	Cirrosis: septos completos rodeando nódulos de regeneración

Un problema importante a la hora de diagnosticar la esteatohepatitis deriva de la dificultad en establecer de manera universal los criterios mínimos de diagnóstico morfológico. Si bien en algunos estudios la enfermedad se diagnostica por la presencia de esteatosis e inflamación lobulillar (3,32), parece conveniente exigir que se demuestre la presencia de cambio hidrópico hepatocitario (degeneración balonizante) o de al menos mínima fibrosis interhepatocitaria pericentral si se pretende realizar el diagnóstico concluyente de esteatohepatitis, especialmente si nos basamos solo en la morfología (26,161). Sin embargo, el paciente sometido a una biopsia del hígado por presentar una alteración crónica de la bioquímica hepática con estudio etiológico negativo puede mostrar histológicamente una esteatosis con o sin inflamación lobular, y con o sin algún foco de necrosis hepatocitaria; los neutrófilos pueden ser escasos o estar ausentes, y no observarse cuerpos de Mallory ni hepatocitos balonizados o fibrosis pericelular. Estos casos, según la mayoría de hepatólogos, deberían incluirse en el diagnóstico clínico-patológico de esteatohepatitis en estadio previo a la fibrosis y

sin actividad inflamatoria histológica, y clasificarse según el método de evaluación propuesto en el grado 0 y estadio 0 (367,368).

2. Ausencia de alcoholismo

El diagnóstico de EHNA solo puede establecerse en pacientes que no consuman cantidades significativas de alcohol. Aunque resulta difícil establecer la cantidad de alcohol capaz de producir daño hepático, la mayoría de los autores consideran consumo de riesgo la ingesta de 60 g/día en los varones y de 40 g/día en las mujeres, aunque otros han sido más estrictos y establecen el límite en 40 g/día en los varones y 20 g/día en las mujeres (161). A pesar de ello, no se puede descartar con seguridad que alguna cantidad de alcohol pueda contribuir al desarrollo de enfermedad hepática en algunos individuos con EHNA que sean exageradamente sensibles a la hepatotoxicidad inducida por el etanol (380).

Habitualmente el primer paso consiste en el *interrogatorio* repetido al enfermo, haciéndole saber la importancia que para su salud tiene el conocimiento de este factor etiológico (4). En cualquier caso, la negación de la ingesta de alcohol debe ser corroborada por los familiares que convivan con el paciente. Se han diseñado cuestionarios específicos con el propósito de detectar el alcoholismo, que consisten en una serie de preguntas destinadas a obtener información sobre la cantidad y frecuencia con que el paciente bebe alcohol y que según las respuestas emitidas, reciben una puntuación (381). Entre ellos, los más utilizados son el MAST (Michigan Alcoholism Screening Test), el CAGE y el AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test). Dichos test, además de ser rápidos y baratos, han demostrado una alta sensibilidad (85-98%) y especificidad (76-89%) al compararlos con los parámetros bioquímicos de alcoholismo (382). Sin embargo, en muchas ocasiones se debe ser escéptico ante el volumen de alcohol que cuantifica el propio enfermo y tener en cuenta que la mayoría de veces éste tiende a minimizar la cantidad que bebe, que muchos son bebedores sociales, y también la elevada frecuencia de ingesta oculta de alcohol entre las mujeres (383).

Conscientes de las limitaciones del interrogatorio al propio paciente, se han buscado test más objetivos capaces de identificar el consumo de alcohol, particularmente en el contexto de la enfermedad hepática (384). Se trata de una serie de *marcadores serológicos y hematológicos* entre los que se incluyen la gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT), el volumen corpuscular medio de los hematíes (VCM), la aspartato-amino-transferasa (AST), la alanino-amino-transferasa (ALT) y el cociente AST / ALT (385). Sin embargo, todos ellos carecen de la suficiente sensibilidad y especificidad, por lo que recientemente se han propuesto otros dos test serológicos, la transferrina desialilada o deficiente en carbohidratos (CDT) y la isoenzima mitocondrial de la AST (ASTm) (385-388) (Tabla 16).

TABLA 16. Utilidad de los marcadores bioquímicos en la diferenciación de la EHNA y la esteatohepatitis alcohólica

Marcador	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
GGT	69	55
VCM	73	79
AST	69	66
ALT	58	50
CDT	81	98
ASTm/ASTt	92	50

GGT: gamma-glutamyl-transpeptidasa; VCM: volumen corpuscular medio de los hematíes; AST: aspartato-amino-transferasa; ALT: alanino-amino-transferasa; CDT: transferrina deficiente en carbohidratos; ASTm: aspartato-amino-transferasa mitocondrial; ASTt: aspartato-amino-transferasa total

La *alcoholemia* es una medida útil solo cuando la sangre se extrae dentro de las primeras 24 horas desde el consumo de alcohol (385).

La elevación de la *GGT* sérica es quizá la anomalía bioquímica que se observa con mayor frecuencia en los individuos bebedores ya que su síntesis es inducida por el alcohol. Está elevada en el 80-90% de bebedores crónicos, en los que generalmente se detectan cifras de 2-5 veces el valor normal (388). Sin embargo, no es un marcador

específico del alcohol ya también está elevada en sujetos que toman fármacos inductores enzimáticos, en las colestasis y en otras enfermedades que cursan con lesión hepatocelular (27,385,388).

La *macrocitosis* (VCM > 95-100 fl) es un hallazgo frecuente entre los alcohólicos y refleja probablemente los efectos tóxicos del alcohol sobre la médula ósea. Sin embargo, solo se detecta un valor de VCM por encima de la normalidad en el 30% de bebedores, y además también puede estar elevado en otras condiciones como enfermedades tiroideas, deficiencia de folato y enfermedades hepáticas de otras etiologías (385).

El cociente *AST/ALT* se detecta elevado en el 80-90% de pacientes con hepatopatía alcohólica (388). Clain y Lefkowitz, entre otros, mostraron que el cociente *AST/ALT* >1 es sugestivo de hepatopatía alcohólica y que si supera el valor de 2 es diagnóstico de esta etiología (389).

La utilidad de todos estos marcadores convencionales de alcoholismo ha sido analizada por diversos autores y su finalidad ha sido discutida (25,27,30,31,34,388). Moreno et al. (27) encontraron que un valor del VCM < 95 fl, de GGT < de 2.5 veces la normalidad y una cociente *AST/ALT* < 1.2, fueron los parámetros con mayor seguridad diagnóstica para descartar una esteatohepatitis alcohólica. Con respecto al cociente *AST/ALT*, detectaron una sensibilidad alta (90%), pero una especificidad baja (55%), tomando 1.2 como valor discriminativo entre ambos grupos (Tabla 17).

Tabla 17. Datos de laboratorio significativos al comparar pacientes con EHNA y hepatopatía alcohólica (27)

Marcador	EHNA (%)	EHA (%)
VCM>95 fl	27	82
GGT>2.5	15	65
AST/ALT>1.2	10	55

EHNA (%): porcentaje de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica; EHA (%): porcentaje de pacientes con enfermedad hepática alcohólica; GGT: gamma-glutamyl-transpeptidasa; VCM: volumen corpuscular medio de los hematíes

Spech et al. (25) hallaron también valores superiores de GGT en los alcohólicos, pero con superposiciones en los valores más bajos, aunque solo encontraron utilidad diagnóstica con tasas de GGT por encima de 500 UI/L. También detectaron valores de VCM > 100 fl en el 60% de alcohólicos vs. 0% de no bebedores y un cociente AST/ALT < 2 en el 100% de pacientes con EHNA vs. AST/ALT > 2 en el 90% de alcohólicos.

Fletcher et al. (388) estudiaron también la eficiencia de estos marcadores en el diagnóstico diferencial de la esteatohepatitis alcohólica/no alcohólica, pero además incluyeron en su estudio a un grupo de pacientes con enfermedad hepática no alcohólica. Encontraron que el test bioquímico de menor sensibilidad y especificidad fue la ALT, seguido de la GGT. El cociente AST/ALT fue > 1 en el 70% de alcohólicos vs. 0% de pacientes con EHNA. Sin embargo, también fue > 1 en el 47% de individuos con enfermedad hepática no alcohólica y > 2 en el 15% de individuos con hepatopatía alcohólica (Tabla 18).

Tabla 18. Utilidad de los marcadores convencionales bioquímicos de alcoholismo en pacientes con EHNA, hepatopatía por alcohol y enfermedad hepática no alcohólica (388)

Marcador	EHNA (%) (n=19)	EHA (%) (n=26)	EH (%) (n=21)
VCM > 95 fl	16	73	38
GGT > 50 UI/L	50	69	71
AST/ALT > 1	0	70	47
AST > 40 UI/L	37	69	37
ALT > 35 UI/L	63	58	63

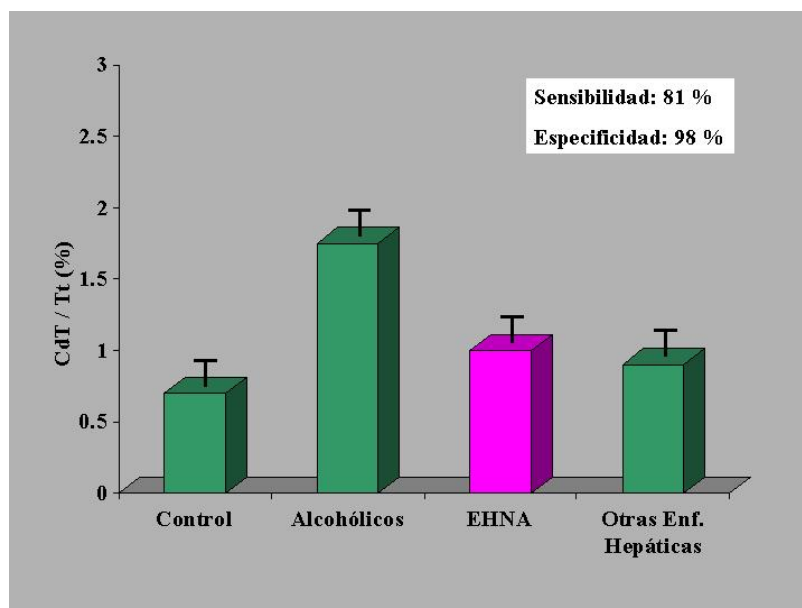
EHNA (%): porcentaje de n=19 pacientes con esteatohepatitis no alcohólica; EHA (%): porcentaje de n=21 pacientes con hepatopatía alcohólica; EH (%): porcentaje de n=26 pacientes con enfermedad hepática no alcohólica; VCM: volumen corpuscular medio de los hematíes; GGT: gamma-glutamyl-transpeptidasa; AST: aspartato-amino-transferasa; ALT: alanino-amino-transferasa.

Recientemente se han descrito dos nuevos marcadores bioquímicos de alcoholismo, la AST mitocondrial (390,391) y la CDT (385-387).

La determinación en suero de la *isoenzima mitocondrial de la AST (ASTm)* y del cociente ASTm/AST (proporción de ASTm con respecto a la AST total en suero), han demostrado ser útiles en el diagnóstico del alcoholismo. La ASTm constituye aproximadamente el 80% de la actividad normal total de la AST en el hígado y, como la mayoría de las proteínas mitocondriales, su síntesis depende del ADN nuclear. Se sintetiza en los ribosomas del citosol en forma de un precursor (pre-ASTm), el cual es transportado a la matriz a través de las membranas interna y externa mitocondriales. La administración de desacopladores de la fosforilación oxidativa a cultivos celulares es capaz de bloquear el transporte del pre-ASTm a la mitocondria (392). En cuanto a los mecanismos por los que el abuso del alcohol es capaz de aumentar los niveles de ASTm existen diferentes teorías: inducción de la síntesis de ASTm por el alcohol; trastorno en el transporte transmembrana; aumento en la liberación de ASTm desde la mitocondria, etc.

Nalpas et al. (390,391) han comparado la actividad de la ASTm y el valor de la relación ASTm/ASTt en individuos alcohólicos con o sin enfermedad hepática y han obtenido un valor medio considerablemente mayor de ASTm en alcohólicos con o sin enfermedad hepática, mientras que los valores no eran diferentes entre individuos con enfermedad hepática no alcohólica con respecto a los controles sanos. Además, la relación ASTm/ASTt resultó ser 4 veces mayor en los sujetos alcohólicos, con una sensibilidad y especificidad mayores a la de la GGT. También se detectó una disminución en los niveles de ASTm tras un periodo de abstinencia. Otros autores han encontrado también una elevada sensibilidad (90%) para este marcador pero una especificidad baja (50%), indicando muchos falsos positivos. Fletcher et al. (388) hallaron cocientes ASTm/ASTt similares al comparar el grupo de pacientes con EHNA frente al de alcohólicos. Este hecho apunta la posibilidad de que ambas enfermedades compartan la misma patogénesis puesto que una alteración mitocondrial justificaría el aumento de dicho cociente en ambas enfermedades, de forma que la determinación de la ASTm probablemente no sirva para diferenciar ambas entidades.

En la actualidad el marcador serológico más sensible y específico de etilismo es la *transferrina deficiente en carbohidratos (CDT)*. La transferrina sérica es una glicoproteína sintetizada por el hígado cuya vida media es de 16 ± 5 días. Presenta dos lugares de unión al hierro y en cada uno de ellos 11 unidades de carbohidratos que se añaden a la cadena polipeptídica por la acción de la glicosil-transferasa (385). El alcohol altera la adición de los hidratos de carbono a la transferrina, apareciendo isoformas de transferrina deficientes en carbohidratos que, además, transportan el hierro de forma poco eficiente (387). Se ha comprobado que la ingesta de > 50 g/día de etanol durante al menos una semana induce un aumento en los niveles de CDT séricos en sujetos sin enfermedad hepática y que su valor se normaliza en 2-3 semanas durante la abstinencia. Sin embargo, aunque los valores de CDT son proporcionales a la cantidad de alcohol ingerido, sus niveles tienden a ser menores en individuos alcohólicos con enfermedad hepática cuando se comparan con aquellos sin enfermedad, especialmente cuando ésta es más severa (386). Algunos autores expresan el valor de la CDT como porcentaje con respecto a la transferrina total en el suero (Tt) y emplean dicho cociente (CDT/Tt) en el diagnóstico de la EHNA (385,388). Fletcher et al. (388) encontraron que el valor medio de dicho cociente era significativamente mayor entre los alcohólicos al comparar con los controles, pacientes con EHNA o con otras enfermedades hepáticas de etiología no alcohólica. Ninguno de los sujetos control de este estudio presentaba un cociente $>1.3\%$, por lo que éste fue el valor que establecieron como límite superior normal (Figura 28).

Figura 28. Utilidad de la CDT en el diagnóstico de la EHNA (388)

La *IgA* se encuentra elevada en aproximadamente un 30% de sujetos con hepatopatía alcohólica y en el 60% de alcohólicos con cirrosis. Spech et al. (25) han señalado la utilidad que podría tener el cociente *IgG/IgA*, puesto que el 92% de pacientes con EHNA incluidos en su estudio presentaba un cociente >3.35 , mientras que en el 80% de los alcohólicos era <3.35 .

En conclusión, la mayoría de los marcadores convencionales de alcoholismo son sensibles para detectar el consumo de alcohol pero carecen de especificidad, mientras que el cociente *ASTm/ASTt* no ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de la EHNA. La determinación de la CDT (o del cociente CDT/Tt) se presenta en el momento actual como el marcador bioquímico de mayor utilidad en la detección del consumo de alcohol, con una sensibilidad del 81% y especificidad del 98%. Sin embargo, a pesar de estos datos, resulta prematuro concluir que este test deba ser requerido para establecer el diagnóstico de EHNA (161).

3. Exclusión de otras causas de hepatopatía crónica

Las etiologías más comunes que pueden justificar una hipertransaminasemia crónica son el alcohol y la hepatitis viral. Otras causas incluyen las enfermedades hepáticas autoinmunes, hereditarias o metabólicas. Por ello, uno de los requisitos para

establecer el diagnóstico de EHNA consiste en excluir, además del alcohol, otras enfermedades hepáticas que puedan justificar una elevación crónica de las transaminasas como son la hepatitis viral, hepatitis autoinmune, enfermedad de Wilson, déficit de α_1 -antitripsina, hemocromatosis, porfirias hepáticas, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad tiroidea, etc (393).

Aunque los marcadores serológicos autoinmunes son negativos en la mayoría de estudios, algunos autores han detectado autoanticuerpos positivos (título $>1/40$ - $1/80$) en un elevado porcentaje de pacientes con EHNA (25-54%) (16,36,394). Sin embargo, dicho hallazgo no se ha encontrado asociado a ninguna otra característica clínica, inmunológica o histológica de enfermedad autoinmune, por lo que no se conoce la interpretación de este hallazgo. Con respecto a la exclusión del virus de la hepatitis C, si bien en la mayoría de las series retrospectivas de EHNA no fue posible efectuar su determinación al no disponer de los test necesarios, actualmente la presencia de marcadores negativos para el virus C se considera un requisito imprescindible en el diagnóstico de EHNA, aunque aún no se conoce si este virus podría jugar algún papel en la patogenia de esta enfermedad (127,136,137).

VI. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Aunque el principal diagnóstico diferencial debe establecerse con la esteatohepatitis alcohólica, existen otras condiciones que también comparten algunas de las características de la esteatohepatitis (Tabla 19).

Tabla 19. Diagnóstico diferencial de la EHNA (368)

Esteatohepatitis alcohólica
Cirrosis biliar primaria
Colangitis esclerosante primaria
Hepatitis crónica (especialmente por el virus C)
Enfermedad de Wilson
Toxicidad por Metrotexate

La presencia de daño hepatocitario, cuerpos de Mallory, y fibrosis puede darse en condiciones que cursen con colestasis crónicas (cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante) y en la enfermedad de Wilson. En estas enfermedades los cuerpos de Mallory tienden a distribuirse en áreas periportales más que perivenulares y se puede identificar el depósito de cobre. Además, el daño del ducto biliar y su pérdida, son características clave en el diagnóstico de la cirrosis biliar y la colangitis esclerosante. Aunque la hepatitis crónica, particularmente la hepatitis C, a veces simula una esteatohepatitis, las alteraciones generalmente son portales y periportales más que perivenulares, el infiltrado neutrofílico generalmente es una característica menor, y no suelen verse claros cuerpos de Mallory (127,137). Ambas condiciones, sin embargo, pueden coexistir sin saberse por el momento qué es lo primero o si se trata de un híbrido (368).

La diferenciación entre la EHNA y la esteatohepatitis alcohólica es esencial en el diagnóstico. Por ello, diferentes series han buscado alguna característica clínica, histológica o de laboratorio, que permita distinguir ambas entidades (25,27,30,31,34,395):

Esteatohepatitis alcohólica vs. EHNA

En lo que se refiere a la prevalencia, la esteatohepatitis alcohólica es mucho más frecuente que la EHNA, con una relación clásicamente aceptada de 1:12. La diferencia de edad no es significativa (3,27) y según series retrospectivas, favorece la sospecha de EHNA el sexo femenino. Aunque no se ha demostrado ninguna característica clínica que permita diferenciar ambas entidades, la presencia de determinadas condiciones como la obesidad, la diabetes tipo 2, o la hiperlipemia, entre otras, son más frecuentes en la EHNA y se aceptan como criterios orientativos de ésta, aunque de ningún modo permiten establecer su diagnóstico definitivo. El mismo sentido orientador, a favor de la hepatopatía alcohólica ofrece la aparición de signos o síntomas de descompensación hidrópica o de estigmas cutáneomucosos de hepatopatía crónica. Clínicamente los pacientes con EHNA suelen tener mejor estado general y presentan con poca

frecuencia estigmas y síntomas o signos de descompensación de su enfermedad (Tabla 20).

Tabla 20. Características clínicas diferenciales entre la EHNA y la enfermedad hepática alcohólica (27)

	EHNA	EHA
EDAD (años)	51±13	50 ±11
SEXO FEMENINO	68%	17%
OBESIDAD	85%	27%
DIABETES	32%	5%
HIPERLIPEMIA	40%	37%
FÁRMACOS	65%	35%
SAT	23%	2%
ESTADO GENERAL BUENO	100%	65%
SIGNOS DE DESCOMPENSACIÓN	10%	37%

EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; EHA: enfermedad hepática alcohólica; SAT: síndrome del aceite tóxico

No se han encontrado diferencias histológicas marcadas entre ambas enfermedades, aunque, en general, la intensidad de las lesiones es menor en la EHNA. Tampoco se reconoce actualmente un marcador bioquímico cuya sensibilidad y especificidad permita diferenciarlas.

Tres estudios (30,34,395) han comparado las características histológicas de la EHNA y la enfermedad hepática alcohólica y han encontrado una prevalencia mayor de núcleos glucogenados (reflejando la presencia de diabetes) y mayor severidad de la esteatosis en los casos de EHNA; la fibrosis periportal y pericelular y la proliferación de ductos biliares resultaron ser más frecuentes en la hepatopatía alcohólica. Itoh et al. (30) no encontraron diferencias en la extensión de la necrosis centrolobular, de la fibrosis centrolobular, ni en la presencia de cuerpos de Mallory entre ambos grupos.

Recientemente Pinto et al. (34) han comparado los hallazgos histológicos entre un grupo de pacientes con EHNA y otro con hepatopatía alcohólica, pero diferenciando dentro del segundo grupo a aquellos enfermos diagnosticados y tratados de forma ambulatoria de los alcohólicos con enfermedad hepática que requirieron ser hospitalizados. Aunque la mayoría de los hallazgos resultaron similares, encontraron que ciertas características como la severidad del daño hepatocelular, la frecuencia de aparición de cuerpos de Mallory, la intensidad del infiltrado inflamatorio y la fibrosis eran menores en la EHNA y que la severidad y frecuencia de estas características histológicas se incrementaban de manera muy significativa en el grupo de pacientes con hepatopatía alcohólica hospitalizados. Otros cambios histológicos como la esteatosis y los núcleos glucogenados fueron prevalentes en obesos y diabéticos no alcohólicos. La fibrosis más intensa y la cirrosis también aumentaba de forma progresiva en los tres grupos de pacientes (8% en EHNA; 38% en hepatopatía alcohólica ambulatoria; 89% en hepatopatía alcohólica hospitalizada), siendo la distribución y localización de dicha fibrosis similares.

Vargas et al. (395) hallaron que la presencia de núcleos glucogenados era más frecuente en el grupo de EHNA, siendo un dato poco sensible (47%), pero muy específico (77%) para el diagnóstico de esta enfermedad. Otras características morfológicas como la colagenización sinusoidal, los infiltrados polimorfonucleares portales y periportales, y la siderosis hepatocitaria y kúpfferiana, se encontraron con mayor frecuencia en la hepatopatía alcohólica. La ausencia de siderosis fue el signo más sensible para el diagnóstico de EHNA (80%) y la de polimorfonucleares y colagenización sinusoidal, los más específicos (100%). La combinación de núcleos glucogenados, ausencia de siderosis, de colagenización sinusoidal y de infiltrado leucocitario resultaron diagnósticos de EHNA en este estudio (valor predictivo positivo del 100%). Sin embargo, la probabilidad de encontrar dicha combinación resultó ser muy baja.

VII. EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

Existe controversia sobre el pronóstico de la EHNA, fundamentalmente porque contamos con pocos estudios que aporten información sobre la historia natural de esta enfermedad. Además, la mayoría de ellos incluyen un número pequeño de pacientes, el tiempo medio de seguimiento es corto y la severidad de la lesión hepática existente en el momento del diagnóstico es muy heterogénea (4,16,32,396). Sin embargo, actualmente parece un hecho probado que, al menos algunos pacientes con EHNA pueden presentar una enfermedad hepática progresiva. Existen algunos datos que apoyan la progresión de la EHNA como son: 1.El hallazgo de fibrosis en el 15-50% y de cirrosis establecida en el 7-16% de pacientes con EHNA en el momento del diagnóstico (1,4,16,31,32); 2.La presencia de lesiones histológicas de EHNA menos severas en los enfermos más jóvenes (396,167); 3.La existencia de estudios que documentan casos de cirrosis criptogenética como etapa final de la EHNA, basándose fundamentalmente en la prevalencia mayor de los principales factores de riesgo para la EHNA, como la obesidad y la diabetes tipo 2, entre los pacientes con cirrosis de causa desconocida, al compararlos con los casos de cirrosis de otras etiologías y también con la población general (342,343); 4.El hallazgo de que la cirrosis esteatohepatítica constituye el 1.6-2.2% de las causas de trasplante hepático y, además, se ha demostrado la recurrencia de la lesión y su progresión desde esteatosis a EHNA y fibrosis en el tejido hepático trasplantado (3,80,397,398).

Aunque algunos estudios revelan que la esteatosis hepática pura, sin inflamación, es una enfermedad benigna que raramente evoluciona a cirrosis (36), en el momento actual se cree que no es una entidad tan benigna como se venía considerando (162).

Hasta la actualidad se han publicado cuatro series en las que se ha efectuado un seguimiento histológico de los pacientes con EHNA mediante biopsias hepáticas sucesivas (4,16,32,396) (Tabla 21).

Tabla 21. Estudios publicados sobre la evolución de la lesión hepática en la EHNA

Autor/año	Nº casos	Seguimiento Años (media)	Progresión fibrosis Nº casos	Cirrosis Nº casos
Lee (1989)	12	3.5 (0.9-4)	5 (42%)	2 (17%)
Powell (1990)	13*	5.0 (1.0-9.0)	5 (42%)	1 (8%)
Moreno (1990)	10	4.9 (2.0-7.3)	6 (60%)	4 (40%)
Bacon (1994)	2	5.5 (4-7)	1 (50%)	1 (50%)

*Un paciente fue excluido por presentar una cirrosis en la biopsia inicial y además, desarrolló un hepatocarcinoma tras 6 años de seguimiento

Combinando estos resultados se observa que de un total de 36 pacientes, hubo progresión histológica en 25 (69%) durante un periodo de seguimiento de 1 a 7 años, mientras que 10 pacientes (28%) permanecieron sin cambios, y en 1 caso (3%) se observó mejoría. Globalmente, es posible decir que el 8-60% de pacientes con EHNA tienen progresión histológica a fibrosis o cirrosis durante un tiempo medio de seguimiento de 1-9 años.

Se ha propuesto que la mera presencia de grasa es el primer daño de una secuencia morbosa progresiva, aunque se requiere probablemente la superposición de otros insultos para que ésta evolucione a lesiones de esteatohepatitis y a cirrosis (70,158,161,166).

La progresión de la EHNA es muy variable y no se sabe qué factores pueden intervenir en que pueda evolucionar hasta una fase de cirrosis (161). Tampoco se ha establecido la frecuencia con la que suele producirse esta progresión, ni el tiempo requerido para ello. Es más, recientemente se han descrito cinco casos de EHNA silente con progresión subclínica a cirrosis y debut de la enfermedad como fallo hepático subagudo con deterioro rápido de la función hepatocelular y evolución fatal en un grupo de pacientes obesas de edad mediana (399). Diferentes autores han buscado algún parámetro clínico, de laboratorio o histológico que pueda ser identificado como factor de mal pronóstico por asociarse a mayor riesgo de que la EHNA evolucione desde esteatosis hasta fibrosis o cirrosis (39,46,70,164,165,357).

Se ha propuesto que la obesidad y la diabetes tipo 2, además de ser factores de riesgo para la EHNA, podrían serlo para el desarrollo de fibrosis y cirrosis (21,46,164,165). Series de autopsia han demostrado que la obesidad es la única causa identificable de enfermedad hepática en el 12% de pacientes con cirrosis y que la cirrosis es 6 veces más prevalente entre los obesos con respecto a la población general (39,70,357). Silverman et al. (46) hallaron que la asociación de obesidad y diabetes tipo 2 era más frecuente en aquellos paciente de EHNA con progresión a cirrosis. Angulo et al. (165) encontraron mayor riesgo de progresión a cirrosis en aquellos individuos con EHNA de mayor edad, obesos y diabéticos, y propusieron que la presencia de obesidad y diabetes tipo 2 podría ayudar a identificar a aquellos sujetos con EHNA que probablemente tuvieran fibrosis hepática severa. Estos mismos autores han especulado que a mayor índice de masa corporal (IMC) habría mayor grado de esteatosis hepática y de peroxidación lipídica, con el consiguiente estímulo de las células estrelladas hepáticas y mayor síntesis de colágeno, explicando así la evolución a fibrosis y cirrosis. Ratziu et al. (165) propusieron un índice clínico-biológico que combinaba la edad, el IMC y los triglicéridos séricos para seleccionar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse de una biopsia hepática ya que hallaron que cada uno de estos factores se asociaba de manera independiente a la presencia de fibrosis septal.

No se ha podido establecer el papel del virus de la hepatitis C (VHC) como factor de riesgo en la progresión de la EHNA, ya que pocas series han podido descartar dicha infección, al no disponer en el momento de estudiar a los enfermos de las técnicas que permiten excluirla (16,34,38,136,137). Series recientes han encontrado una tasa de progresión de la EHNA bastante menor que en aquellas en las que no se pudo excluir el VHC (8% vs. 30-38%, respectivamente) (22). De todas formas, la EHNA y el VHC no tienen por qué excluirse mutuamente y su presencia combinada puede contribuir a un curso más agresivo, de forma similar a lo que sucede con la enfermedad hepática alcohólica y el VHC (162).

Recientemente George et al. (37) han sugerido que la siderosis hepática y una copia del gen de la hemocromatosis primaria se asocian a mayor severidad de fibrosis, aunque por el momento el significado exacto de este hallazgo en relación con la progresión de la enfermedad no se conoce.

Con respecto a los parámetros de laboratorio, la mayoría de autores no encuentran correlación entre las cifras de las aminotransferasas y la actividad histológica, aunque aquellos sin fibrosis suelen tener valores mayores (400,401). Angulo et al. (164) detectaron que valores del cociente AST/ALT >1 se asociaban con mayor riesgo de progresión. Piñol et al. (167) hallaron valores de ALT y de GGT mayores en aquellos pacientes con mayor lesión histológica.

Aunque parece que la infiltración grasa del hígado es un requisito para la aparición de necroinflamación y de fibrosis (118,159), no se ha identificado ningún hallazgo morfológico que oriente al pronóstico de la EHNA. El riesgo de progresión parece proporcional a la severidad de la histología en la biopsia hepática diagnóstica y, presumiblemente, a menor fibrosis y lesiones de esteatohepatitis menor riesgo (162,379,402). Matteoni et al. (162) observaron un curso más agresivo en aquellos casos de EHNA con esteatonecrosis e hialina de Mallory. Otros autores (21,165) han encontrado que la actividad necroinflamatoria se asocia a mayor fibrosis septal y es posible que como en el caso del alcohol, la presencia de fibrosis perivenular constituya un patrón de lesión histológica predictor de la evolución a cirrosis (402,403). Sin embargo, a pesar de todo ello, el pronóstico de la EHNA es mejor que el de la esteatohepatitis alcohólica. La tasa de supervivencia a los 5-10 años es del 67% y 59% en el caso de la EHNA, similar a la de la población general, y mejor que la de la esteatohepatitis alcohólica (38% y 15%) (404,405).

En resumen, aunque los pacientes con EHNA tienen un curso indolente, casi la mitad desarrollan fibrosis progresiva y 1/6 cirrosis (26). No se ha identificado ninguna característica clínica, de laboratorio o histológica que permita distinguir a aquellos pacientes con enfermedad progresiva. Resolver este problema requiere estudios epidemiológicos amplios que sigan a pacientes con EHNA durante varias décadas (longitudinales y prospectivos), y además comprender mejor los mecanismos implicados en la patogenia de la EHNA.

VIII. TRATAMIENTO

No existe ninguna medida terapéutica que en la actualidad haya probado de manera científica su eficacia en la mejoría de las lesiones de EHNA, ni tampoco en evitar la progresión de la enfermedad. El tratamiento debería establecerse según la fase en que se encuentre la enfermedad. Sin embargo, el desconocimiento de la patogenia e historia natural de la EHNA limitan el desarrollo de terapias específicas (161).

La mayoría de medidas recomendadas consisten en modificar los factores de riesgo que han sido asociados a la EHNA. Así, la reducción del peso, el control de la hiperglucemia e hiperlipemia, y evitar o discontinuar el uso de drogas potencialmente tóxicas son las claves del tratamiento en este momento (161,406). Desafortunadamente, parece que estas medidas no son útiles en todos los pacientes. Además, queda por establecer qué actitud terapéutica debemos adoptar en los casos cada vez más frecuentes de EHNA en los que no se identifica ninguna de las condiciones de riesgo tradicionalmente aceptadas en la literatura (98).

En la esteatosis hepática simple la mayoría de autores no recomiendan otra medida que la *reducción gradual de peso* si existe **obesidad**. Aunque pocos estudios han evaluado los cambios morfológicos hepáticos antes y tras seguir una dieta hipocalórica, parece que el control del peso se traduce en una mejoría de la bioquímica hepática y de la esteatosis, aunque no se ha demostrado un efecto beneficioso en la inflamación ni en la fibrosis (92,407-411). Andersen et al. (92) observaron en su estudio prospectivo de 40 pacientes obesos con EHNA que la pérdida de peso se asoció a una mejoría bioquímica significativa y también de la infiltración grasa del hígado; sin embargo, un 24% de pacientes desarrollaron inflamación portal leve y el 12% fibrosis, correspondiendo a aquellos enfermos con pérdida de peso más pronunciada y más rápida. No está determinada la cuantificación exacta del grado de pérdida de peso que se requiere para normalizar el perfil hepático, aunque deben evitarse las reducciones rápidas ya que se movilizan grandes cantidades de ácidos grasos, lo que empeoraría más la esteatosis hepática, favoreciendo su progresión a inflamación y fibrosis. Se considera un ritmo adecuado el perder 3-4 Kg al mes (92,411). La composición de la

dieta ideal no se conoce, aunque no se recomiendan aquellas que alteren de forma importante la proporción de nutrientes. Lo ideal parece ser aquella dieta que contenga al menos mínimas cantidades de proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales y sea pobre en grasas saturadas (412,413).

Es importante considerar que los efectos de la pérdida de peso sobre la lesión hepática son difíciles de evaluar, ya que son pocos los obesos que consiguen mantener la reducción del peso a largo plazo. En este sentido, se ha comprobado que el asociar la práctica de ejercicio físico regular a una dieta hipocalórica consigue efectos beneficiosos adicionales, al controlar la obesidad y mejorar la glucemia y la hiperlipemia de manera simultánea. El ejercicio no sólo aumenta el gasto calórico sino que también promueve el cumplimiento de la dieta; suele aumentar además el deseo de comidas ricas en carbohidratos y reduce el de aquellas ricas en grasas (407,412-414).

Los cambios conductuales constituyen un importante ingrediente del tratamiento de la obesidad. Ello incluye registrar diariamente la ingestión de alimentos, los consejos sobre la frecuencia de las comidas, el ritmo con el que se come, la eliminación del aperitivo, y la separación de la comida respecto de otras actividades, además de la modificación de los hábitos de ejercicio (415).

Numerosos estímulos neuronales (simpático y parasimpático) y hormonales (insulina, colecistocinina, glucocorticoides, leptina) intervienen en la regulación del peso corporal al modular la liberación de péptidos que afectan al apetito. Existen drogas de acción simpaticomimética (fentermina) o agonistas serotoninérgicos (fenfluramina; fluoxetina) que son capaces de inducir la pérdida de peso al disminuir el apetito o bien aumentar el gasto energético. Puede considerarse la posibilidad de prescribir tratamiento farmacológico ante IMC superiores a 30 Kg/m² en el caso de que fallen la dieta, el ejercicio y los cambios conductuales, así como ante IMC superiores a 25 Kg/m² si persiste la comorbilidad pese a otros tratamientos de la obesidad (46). Sin embargo, no deberían administrarse nunca solos, como única medida terapéutica y requieren supervisión médica por sus efectos secundarios y por la recuperación rápida del peso perdido que suele producirse al abandonar el tratamiento (412,416).

En los últimos años se ha implicado a la leptina en la patogénesis de la obesidad. Se trata de una proteína sintetizada por el tejido adiposo, que regula el peso corporal y

cuya deficiencia se asocia a la obesidad (412,417). Su administración sistémica o intracerebroventricular a animales de experimentación suprime el apetito y aumenta el gasto energético, resultando en una disminución de la grasa corporal y mejoría en la regulación de la glucosa por la insulina. Se ha especulado que probablemente ejerza su acción al disminuir el ARNm del neuropéptido Y o bien bloqueando directamente la acción de éste como estimulante del apetito (418). Estudios experimentales han demostrado que la administración de leptina produce una inhibición del apetito y consigue disminuir de manera significativa el peso corporal así como la infiltración grasa del hígado en ratones obesos con deficiencia de leptina (419). Sin embargo, aunque la leptina tiene efectos anti-obesidad en animales, su papel en la patogenia y tratamiento de la obesidad en humanos permanece sin aclarar. La concentración plasmática de leptina se encuentra elevada en seres humanos obesos en proporción directa a la masa grasa corporal y, sin embargo, presentan resistencia a la acción de la insulina. Se ha propuesto que probablemente en la obesidad humana exista una mutación que afecte a la habilidad del receptor de la leptina para ejercer su acción, lo que induciría a una mayor producción de leptina y a encontrar una concentración plasmática de leptina en los obesos mayor a la esperada según su masa corporal; sin embargo, esto no es así (420,421).

La cirugía para perder peso sólo se recomienda en la obesidad severa ($IMC > 40 \text{Kg/m}^2$) o menos severa ($IMC = 35-40 \text{Kg/m}^2$) cuando coexisten otras condiciones. En la actualidad la reducción gástrica (gastroplastia) es el proceder utilizado con mayor frecuencia, aunque teniendo en cuenta que se han descrito casos de empeoramiento de la lesión grasa del hígado tras la intervención (422,423).

La **diabetes mellitus tipo 2** es la segunda condición asociada a la EHNA en orden de frecuencia. Muchos pacientes diabéticos son obesos y múltiples estudios han demostrado la mejoría en la tolerancia a la glucosa tras la pérdida de peso, aunque los mecanismos no están bien establecidos (424). Considerando que la hiperinsulinemia e insulinoresistencia pueden intervenir en la patogenia de la EHNA, se han buscado nuevos fármacos que mejoren el control de la glucemia pero sin estimular la secreción de insulina. La *troglitazona* es un nuevo antidiabético oral, que ha demostrado corregir

la hiperglucemia, el hiperinsulinismo y la hipertrigliceridemia en animales con obesidad. Se trata de un derivado de la tiazolidinediona cuyo principal mecanismo de acción es el de aumentar la sensibilidad periférica a la acción de la insulina y disminuir así la insulinoresistencia, aunque sin estimular la secreción pancreática de insulina y sin causar hipoglucemia, incluso en pacientes euglucémicos (301,425). Se han desarrollado diferentes ensayos clínicos en Estados Unidos, Europa y Japón cuyos resultados demuestran que la troglitazona disminuye significativamente la concentración de glucosa plasmática al aumentar la captación periférica de ésta mediada por insulina. Además, interviene en el metabolismo lipídico, ya que su principal lugar de acción es el tejido adiposo, de forma que es capaz de disminuir la concentración plasmática de triglicéridos y de ácidos grasos libres (418). Resultados preliminares en un pequeño número de pacientes han demostrado que esta droga puede ser beneficiosa en el tratamiento de la EHNA (304). Desafortunadamente, se ha descrito disfunción hepática, generalmente reversible, en el 1.9% de los pacientes tratados, lo que ha provocado su retirada del mercado farmacéutico (305,426). La *rosiglitazona* es otra tiazolidinediona que, según estudios piloto recientes, parece disminuir el contenido hepático de grasa, aunque se precisan más estudios que confirmen su efectividad y ausencia de efectos secundarios (303, 306).

También el control del peso parece ser el pilar básico en el control de la **hiperlipemia** asociada a la EHNA. El uso de hipolipemiantes, como el *clofibrato*, no ha demostrado mejoría bioquímica ni histológica en estos pacientes (33). Sin embargo, algunos estudios parecen mostrar mejoría analítica y de la esteatosis hepática con el uso de *gemfibrocilo* y *bezafibrato*, aunque con independencia de la cifra de triglicéridos (427-429). El gemfibrozil es un hipolipemiante derivado del ácido fíbrico que, además de disminuir la cifra de triglicéridos en suero, es capaz de aumentar los niveles de HDL-colesterol. Aunque no se conocen bien los mecanismos por los que actúa, parece que afecta tanto a la producción como al aclaramiento de las moléculas de VLDL-triglicéridos, de forma que disminuye su síntesis e incrementa su aclaramiento plasmático al estimular la actividad de la lipoproteína lipasa (430). Además, parece que el gemfibrocilo inhibe la movilización de los ácidos grasos libres desde el tejido adiposo

(427,431). Basaranoglu et al. (428) trataron con gemfibrozilo a 46 pacientes con EHNA a dosis de 600 mg/día v.o., de forma prospectiva, y durante 4 semanas. Observaron una disminución en los niveles séricos de ALT en el 74% de pacientes con EHNA vs. 30% en el grupo control y también una mejoría significativa en las cifras de AST y GGT en el grupo tratado. No hallaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de triglicéridos, lo que sugiere que este fármaco podría ser beneficioso en casos de EHNA sin hipertrigliceridemia como condición de riesgo asociada, aunque se requieren más estudios que confirmen estos datos.

La esteatosis / EHNA asociada a la **nutrición parenteral total** parece justificarse por la administración de soluciones ricas en hidratos de carbono con el estímulo subsiguiente de la secreción de insulina y de síntesis de ácidos grasos e inhibición de su oxidación. Existen múltiples estudios experimentales que investigan si la deficiencia de diversas sustancias en la solución de la nutrición parenteral pudiese justificar la aparición de las lesiones de la EHNA. La administración de soluciones de nutrición enriquecidas con lecitina, precursor de la colina, de L-glutamina, y de lípidos, ha demostrado mejorar la esteatosis hepática e incluso prevenirla, probablemente al alterar el cociente insulina/glucagón (86,155,268,432,433). Sin embargo, los suplementos de carnitina administrados a animales de experimentación y a humanos no han demostrado cambios en la esteatosis ni en las lesiones de EHNA de modo concluyente (434). Actualmente la recomendación es utilizar *soluciones ricas en lípidos*, ya que se ha comprobado que previenen la esteatosis (85).

En cuanto a los **fármacos** implicados en la aparición de la EHNA, parece lógico evitar su administración y retirarlos si se sospecha hepatotoxicidad. No se ha establecido el tiempo ni la dosis capaz de producir esteatosis / EHNA. Se recomienda monitorizar la bioquímica hepática y efectuar ecografía o TAC abdominal durante el tratamiento. Algunos autores han empleado un activador de la proliferación peroxisomal, el bezafibrato, en la prevención de la hepatotoxicidad inducida por el tamoxifeno, empleado en pacientes con cáncer de mama (121,123,429,435-437). Su mecanismo de acción en la EHNA se basa en activar la proliferación peroxisomal y

compensar así la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos inducida por determinados fármacos. Saibara et al. (429) han propuesto recientemente que la administración de bezafibrato, a dosis de 400 mg/día, a pacientes con EHNA inducida por tamoxifeno, podría mejorar la esteatosis hepática y prevenir su progresión a fibrosis y cirrosis.

En las situaciones de EHNA tras exposición ambiental a determinadas **sustancias o tóxicos industriales**, se ha observado la vuelta a la normalidad tras retirar a los sujetos de dicho ambiente (96).

En los casos de EHNA asociada a sobrecrecimiento bacteriano (**cirugía de la obesidad, divertículos de intestino delgado, resección intestinal masiva**), el *tratamiento antibiótico* es capaz de prevenir o revertir la esteatosis, aunque sin demostrar mejoría en la inflamación y fibrosis (91). Drenik et al. (91) emplearon el *metronidazol*, fármaco que suprime a los organismos intestinales anaerobios, a dosis de 750-2000 mg/d durante periodos de 3 meses alternando con otros sin tratamiento y observaron normalización en la morfología hepática en 8 de los 12 obesos intervenidos con bypass yeyunoileal, mientras que 12 de los 17 obesos intervenidos y no tratados empeoraron. Además, en los casos de cirugía de la obesidad (gastroplastia, derivación biliopancreática), se recomiendan dietas pobres en hidratos de carbono y grasas para disminuir así el estímulo postprandial de liberación de insulina (84). En algunos pacientes con cirugía intestinal derivativa (bypass yeyunoileal o yeyunocólico) la EHNA es severa y progresiva, siendo necesario efectuar la reconstrucción del tránsito intestinal, eliminando el asa desfuncionalizada. Styblo et al. (79) observaron una mejoría en los parámetros histológicos hepáticos, sobre todo en la esteatosis e inflamación, en el 76% de pacientes sometidos a reconstrucción intestinal. Sin embargo, en algunos casos la lesión permanece e incluso progresa a pesar de la cirugía.

Al igual que sucede en la hepatitis alcohólica con la supresión del alcohol, en la EHNA, a pesar de controlar adecuadamente su causa, no se consigue evitar la

progresión en todos los casos. Por ello se han buscado fármacos que puedan detener la progresión de la EHNA, independientemente de cuál sea su causa. Se han evaluado algunos de estos **tratamientos específicos** que podrían actuar sobre mecanismos patogénicos de la EHNA, pero los resultados son muy preliminares.

El *ácido ursodeoxicólico* (UDCA) a dosis de 13-15 mg/Kg/día durante 12 meses, provoca mejoría analítica y de la esteatosis hepática, pero no del resto de lesiones morfológicas de la EHNA (33,438). Se trata de un fármaco utilizado con seguridad en otras enfermedades de etiología desconocida. Este medicamento posee múltiples mecanismos potenciales de acción como son el desplazamiento de sales biliares hidrófobas tóxicas desde el pool de sales biliares, acción inmunomoduladora y efectos citoprotectores que previenen la lesión de la membrana hepatocelular (439). Sin embargo, queda por establecer cuánto tiempo debe emplearse el UDCA ya que se han descrito casos de recidiva de las alteraciones hepáticas al retirarlo (438,440).

Teniendo en cuenta las teorías patogénicas actuales que implican a las endotoxinas bacterianas, determinadas citoquinas (TNF- α), y la formación de radicales libres de oxígeno, es posible que en un futuro próximo puedan desarrollarse terapias específicas para evitar la aparición de inflamación y fibrosis, características de la EHNA. Sustancias antioxidantes como el *α -tocoferol*, del que existe un estudio piloto con resultados favorables (441), y el *S-adenosil-L-metionina* (442,443); los *anticuerpos anti-TNF* (288,331,444), y el uso de *antibióticos* (332,445,446), son medidas que en un futuro pueden demostrar su utilidad.

El manejo terapéutico de las descompensaciones de la cirrosis hepática esteatohepatítica es similar al de la cirrosis de otra etiología, incluyendo el trasplante hepático. Este tiene las mismas indicaciones que para el resto de causas de cirrosis, y en algún caso se ha descrito la recurrencia de la enfermedad al persistir el factor etiológico (397,447).

Por último, no se debe olvidar que estos pacientes parecen ser especialmente sensibles a pequeñas cantidades de etanol, probablemente como consecuencia de un polimorfismo genético en el citocromo CYP2E1 o en el TNF- α , por lo que se debe prestar especial atención a la abstinencia alcohólica (347,354,355).

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los conocimientos actuales sobre el metabolismo hepático de los ácidos grasos libres y sobre la patogenia de la EHNA que hemos expuesto en la actualización de este tema, nuestra hipótesis de trabajo fue que para el desarrollo de la EHNA sería necesario la participación de uno o varios de los siguientes mecanismos:

- 1) Alteración del transporte de los ácidos grasos libres al interior de la mitocondria por la carnitina y la carnitin-palmitoil-transferasa, para iniciar la β -oxidación hepática de los mismos;
- 2) Disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial;
- 3) Sobrecrecimiento bacteriano intestinal y aumento en la producción de $\text{TNF}\alpha$;
- 4) Alteración del metabolismo del hierro;
- 5) Hiperinsulinemia;
- 6) Predisposición genética.

OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo estuvieron dirigidos a estudiar cada uno de los mecanismos de lesión hepática mencionados en la hipótesis. Así, los objetivos concretos fueron los siguientes:

MAYORES

- 1º) Definir las características epidemiológicas, clínicas, analíticas e histológicas de una serie prospectiva y amplia de pacientes con EHNA
- 2º) Conocer los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de la EHNA

MENORES

1. Conocer si el transporte de los ácidos grasos al interior de las mitocondrias está alterado en el hígado de los pacientes con EHNA
2. Determinar si en la EHNA existe una deficiencia en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial de las células hepáticas
3. Estudiar el metabolismo de la glucosa y de la insulina en los enfermos con EHNA no asociada a diabetes mellitus
4. Determinar la frecuencia del sobrecrecimiento bacteriano intestinal en pacientes con EHNA y si su presencia se relaciona con los factores de riesgo conocidos para esta enfermedad

5. Conocer si el $\text{TNF}\alpha$ plasmático está aumentado en los pacientes con EHNA y establecer si sus tasas se correlacionan con la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, hiperinsulinemia, insulinoresistencia, o con la presencia de sobrecrecimiento bacteriano intestinal

6. Conocer la frecuencia de las alteraciones del metabolismo del hierro y de las mutaciones del gen de la hemocromatosis hereditaria en los pacientes con EHNA

7. Investigar si existe alguna asociación entre la EHNA y alguno de los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad HLA

El presente estudio de investigación se ha realizado en pacientes diagnosticados de EHNA pertenecientes al Área 11 de Salud del Hospital 12 de Octubre (780.000 habitantes). Los enfermos fueron atendidos en la consulta externa del Servicio de Aparato Digestivo donde un clínico estableció el diagnóstico de sospecha de EHNA antes de efectuar una biopsia hepática diagnóstica, basándose en una serie de estudios que posteriormente se expondrán. Dicha presunción permitió dividir en dos fracciones el cilindro hepático obtenido con la biopsia. Una fracción fue procesada de la forma habitual para obtener el diagnóstico morfológico y la otra fue preservada a la espera de conocer el diagnóstico definitivo. Este proceder permitió disponer de tejido hepático de pacientes con EHNA y poder realizar en él las determinaciones específicas que más adelante serán analizadas.

El estudio se ha llevado a cabo en una serie de sujetos diagnosticados de EHNA de forma prospectiva, en los que se han analizado una serie de variables con el fin de conocer, por un lado, el perfil característico de la enfermedad, y, por otro, datos acerca de la patogenia de la EHNA. Para este segundo apartado se diseñó un estudio del tipo de casos y controles, como más adelante se detallará.

◆ **SUJETOS DE ESTUDIO Y PROTOCOLOS**

Se han estudiado dos tipos de sujetos: un grupo de pacientes con EHNA y dos grupos de sujetos sanos que constituyen los grupos control.

I. PACIENTES

1. SELECCIÓN

Este estudio ha sido realizado en 85 pacientes diagnosticados de forma prospectiva y consecutiva de EHNA en el Servicio de Medicina del Aparato Digestivo del Hospital 12 de Octubre desde noviembre de 1996 hasta diciembre de 1999. Todos ellos pertenecían a un grupo amplio de enfermos con hipertransaminasemia crónica (> 6 meses) y remitidos a nuestra consulta externa para estudio. En todos ellos se practicó una anamnesis (edad; ingesta de etanol en gramos/semana; peso y

talla; antecedentes de enfermedades médicas y/o quirúrgicas; transfusiones; tratamiento farmacológico), exploración física, y determinaciones analíticas. Entre las determinaciones de laboratorio, se valoraron los parámetros habituales de función hepática y los estudios etiológicos de hipertransaminasemia crónica: virus B, virus C, metabolismo del hierro, ceruloplasmina, α 1-antitripsina, autoanticuerpos, cupruria, porfirinas urinarias.

Se sospechó el diagnóstico de EHNA, previamente a la realización de la biopsia hepática, en aquellos individuos no bebedores de alcohol en quienes el estudio etiológico de enfermedad hepática crónica resultó negativo, y especialmente en los casos con alguno de los factores de riesgo reconocidos para la EHNA (obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipemia) y/o diagnóstico ecográfico de infiltración grasa del hígado.

Se practicó una biopsia hepática percutánea diagnóstica en todos los casos y se fraccionó el cilindro obtenido en aquellos pacientes con sospecha de EHNA en los que el tamaño de la muestra lo permitía. Antes de efectuar la biopsia se obtuvo el consentimiento informado firmado.

2. DIAGNOSTICO

En 85 pacientes se estableció el diagnóstico definitivo de EHNA. Para ello, se exigió el cumplimiento de tres criterios:

A- Clínico: ausencia de exposición al alcohol. Este dato se confirmó mediante un nuevo interrogatorio al paciente y familiares más cercanos y la determinación de los marcadores bioquímicos de alcoholismo.

El interrogatorio consistió en un cuestionario corto (“five-short questionnaire”) que combina preguntas de los tests más comunmente utilizados para la detección del abuso del alcohol, como son el AUDIT y el CAGE (381):

1 ¿Con qué frecuencia bebe alcohol?	Nunca (0) 2-3 veces/semana (1,5)	Cada mes o menos (0,5) 4 o mas/semana (2)	2-4 veces/mes (1)
2 ¿Cuántas copas bebe un día normal, cuando bebe?	1-2 (0)	3-4 (0,5)	5-6 (1) 7-9 (1,5) 10 o más (2)
3 ¿Le ha molestado alguna vez que la gente critique su forma de beber?	Sí (1)	No (0)	
4 ¿Se ha sentido alguna vez mal, o culpable, por su hábito de beber?	Sí (1)	No (0)	
5 ¿Alguna vez lo primero que ha hecho por la mañana ha sido beber para calmar los nervios?	Sí (1)	No (0)	

Los gramos de alcohol se calcularon según la siguiente tabla de equivalencias:

TIPO BEBIDA	VOLUMEN (ml)	GRADOS (°)	GRAMOS (g)	UNIDADES (U)
Caña de cerveza	200	6	10	1
Copa de vino / cava	100	12	10	1
Coñac	50	40	16	2
Whisky / Vodka	50	45	18	2

Los marcadores bioquímicos de alcoholismo que se determinaron fueron los siguientes:

- VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO > 100 FL
- γ -GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA > 52 U/L
- AST / ALT > 1
- TRANSFERRINA DEFICIENTE EN
CARBOHIDRATOS (CDT): \geq 20 U/L varones
 \geq 25 U/L mujeres

B- Morfológico: lesiones típicas de esteatohepatitis con esteatosis hepatocitaria, infiltrado polimorfonuclear, degeneración hidrópica, fibrosis, etc.

C- Etiológico: ausencia de cualquier otra posible causa de enfermedad hepática, con negatividad de los estudios etiológicos de enfermedad hepática crónica antes mencionados.

Ninguno de los 85 enfermos incluidos en el estudio ingería una cantidad superior a 20 gramos de alcohol / semana, tenía una puntuación de 3 ó más en el cuestionario de las cinco preguntas, ni presentaba marcadores bioquímicos de alcoholismo.

3. PROTOCOLOS DE ESTUDIO

En los 85 casos diagnosticados de EHNA se llevaron a cabo 3 protocolos de estudio: clínico, histológico y de investigación. En el protocolo clínico se recogieron los datos clínicos y analíticos más próximos a la biopsia hepática. El protocolo histológico se elaboró con la re-evaluación de los mismos cortes anatómopatológicos que habían servido para efectuar el diagnóstico histológico de la enfermedad. El protocolo de investigación incluyó una serie de estudios específicos encaminados a probar la hipótesis y objetivos mayores del trabajo.

3a– Protocolo clínico (pág. 131)

Incluía una serie de datos que fueron recogidos por el mismo clínico en todos los casos:

- Anamnesis: datos personales (nombre, fecha de nacimiento, dirección, teléfono, número de historia clínica), edad, sexo, antecedentes de enfermedad médica (obesidad, diabetes mellitus, hiperlipemia, síndrome del aceite tóxico, hipertensión arterial, hiperuricemia, fármacos, nutrición parenteral total, pérdida o ganancia ponderal reciente, otras) y/o quirúrgica (cirugía de la obesidad), transfusiones previas, exposición al alcohol (gramos/semana).
- Sintomatología: ausencia o presencia de síntomas (astenia, dolor-molestia en hipocondrio derecho, prurito, otros).
- Exploración física: general, incluyendo el peso (Kg) y la talla (cm); así como del enfermo hepático (estigmas de hepatopatía, ictericia, estado de nutrición, signos de encefalopatía hepática, hepato o esplenomegalia en cm, circulación colateral abdominal, ascitis, edemas de miembros inferiores). Con los datos de peso y talla se

calculó la existencia o no de obesidad, siguiendo las normas establecidas por el Consenso Español para la Evaluación de la Obesidad (448). Se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC o índice de Quételet) dividiendo el peso (en Kg) por la talla al cuadrado (m^2) y el resultado se clasificó siguiendo la siguiente tabla:

NORMALIDAD: $IMC < 27 \text{ Kg/m}^2$
OBESIDAD: $IMC \geq 27 \text{ Kg/m}^2$
GRADOS DE OBESIDAD:
GRADO I (sobrepeso): $27-29,9 \text{ Kg/m}^2$
GRADO II: $30-34,9 \text{ Kg/m}^2$
GRADO III: $35-39,9 \text{ kg/m}^2$
GRADO IV: $\geq 40 \text{ kg/m}^2$

• Determinaciones analíticas:

- Generales: hemoglobina (Hb); hematocrito (Hcto); leucocitos y fórmula; plaquetas; actividad de protrombina (AT); fibrinógeno; glucemia basal; ácido úrico; perfil hepático, incluyendo a la aspartato-aminotransferasa (AST/GOT), alanino-aminotransferasa (ALT/GPT), cociente AST/ALT, γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total, proteínas totales y albúmina; γ -globulinas; colinesterasa; α -fetoproteína; perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos, fracciones HDL, LDL y VLDL), apoproteína-A (apo-A), apoproteína-B (apo-B).

- Determinaciones diagnósticas de causas específicas de enfermedad hepática crónica: serologías para el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) (hepatitis víricas), ceruloplasmina y cobre en plasma y orina de 24 horas (enfermedad de Wilson), anticuerpos anti-nucleares, anti-músculo liso, anti-mitocondriales y anti-LKM (enfermedades hepáticas autoinmunes), α_1 -antitripsina (déficit de α_1 -antitripsina), perfil metabólico del hierro con cuantificación del hierro, ferritina, transferrina, TIBC y saturación de la transferrina (hemocromatosis primaria o secundaria) y porfirinas en orina de 24 hora (porfirias hepáticas).

- Ecografía abdominal: se recogieron la existencia de datos sugestivos de infiltración grasa del hígado (hepatomegalia, hígado brillante, atenuación posterior de la ecogenicidad del parénquima hepático) y la aparición de signos de hepatopatía avanzada (dilatación del sistema portal y/o esplenomegalia).

3b – Protocolo histopatológico (pág. 132)

En este protocolo se incluyeron los datos morfológicos de la biopsia hepática de los 85 casos de EHNA. Se evaluaron el tamaño de la muestra, el número de espacios porta que incluía, y una serie de hallazgos histológicos propios de la EHNA, exigiéndose como requisitos mínimos para el diagnóstico de EHNA la coexistencia de esteatosis, inflamación lobulillar con componente neutrofílico y degeneración balonizante hepatocelular (26). El examen de la biopsia fue realizado de forma simultánea e independiente por dos patólogos de nuestro hospital.

En cada muestra se valoraron los siguientes parámetros histológicos:

1. Esteatosis: grado, tipo y localización
2. Inflamación: tipo de infiltrado inflamatorio y grado.
3. Fibrosis: ausente, mínima (fibrosis interhepatocitaria pericentral) o formando septos.
4. Lesiones hepatocelulares características de la EHNA: presencia o ausencia.
5. Siderosis: ausencia o presencia, y en este caso, valoración semicuantitativa en grados.

- La **esteatosis** se analizó en función del:

- *Grado*. Según el porcentaje de hepatocitos con presencia de vacuolas con grasa se establecieron 4 grados de esteatosis: 1. Leve (<10%); 2. Moderada (10-25%); 3. Intensa (26-50%); 4. Masiva (> 50%).
- *Tipo*: macrovacuolar (vacuola única y grande); microvacuolar (múltiples vacuolas pequeñas); mixta (porcentaje de macro/microvacuolar).
- *Localización*: centrolobulillar; periportal; difusa.

- La **actividad inflamatoria y la fibrosis** se evaluaron de forma semicuantitativa según unos índices numéricos, adaptados a los utilizados para las hepatitis crónicas (372,377,378):

- La actividad histológica se valoró según la presencia de aquellos datos morfológicos relacionados más estrechamente con la necroinflamación en el lobulillo (actividad lobulillar) y en el área portal y periportal (actividad portal-periportal). Estas actividades necroinflamatorias se calibraron en ausente, leve, moderada o intensa, produciéndose un “índice de actividad lobulillar” (L0 a L4) y otro “índice de actividad portal-periportal” (P0 a P4), que se denominaron *grados* (ver protocolo). La “inflamación global”, calculada como la suma de ambos grados dividido por el número total de enfermos, se utilizó en algunos casos para correlacionar la actividad inflamatoria de la lesión con diferentes datos del estudio.

- El momento evolutivo de la hepatopatía, independientemente de la actividad inflamatoria, se estableció en *estadios* utilizando un “índice de fibrosis” (F0 a F4). Se utilizaron estos estadios con el fin de establecer también correlaciones entre diferentes variables del estudio y la severidad histológica de la enfermedad.

- Se valoró también la presencia de **otras lesiones hepatocelulares** que con frecuencia se asocian a la EHNA y que ayudan al reconocimiento microscópico de la enfermedad. Entre ellas, los *lipogranulomas*, los *núcleos glucogenados*, las *mitocondrias gigantes*, la *hialina de Mallory*, y los *cuerpos acidófilos*. En el caso de encontrar núcleos glucogenados, se especificó su localización (periportal, central o difusa).

- Por último, se determinó y graduó la presencia de **siderosis** de forma semicuantitativa (Scheuer): 0: ausencia de depósitos; 1: pequeño depósito de hemosiderina, disperso sobre todo en la zona 1 del lobulillo; 2-3: depósito más abundante, localizado en zonas 1 y 2; 4: depósito masivo, afectando a todo el acino. Además, en los casos con siderosis se especificó su situación (hepatocitaria o kupfferiana).

3c – Protocolo de investigación

Este protocolo consistió en una serie de estudios encaminados a investigar las diferentes vías patogénicas que, según nuestra hipótesis de trabajo, podrían estar implicadas en la EHNA. Los estudios se efectuaron en aquellos pacientes en los que fue posible, tras obtener su consentimiento informado. Estos estudios fueron los siguientes:

- *Cuantificación de la carnitina, de los ésteres de carnitina de cadena corta y larga y de la actividad de la carnitin-palmitoil-transferasa en tejido hepático.*

- *Medición de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en tejido hepático.*

- *Estudio del metabolismo de la glucosa:*
 - Test de tolerancia oral a la glucosa.
 - Medición de los niveles de insulina, péptido C y glucagón en sangre periférica.

- *Investigación del sobrecrecimiento bacteriano intestinal mediante el test del H₂ espirado.*

- *Cuantificación de la tasa de TNF α en suero.*

- *Estudio del metabolismo del hierro: determinación en suero del hierro, ferritina y saturación de la transferrina. Estudio de las mutaciones más frecuentes para el gen de la hemocromatosis (HFE).*

- *Determinación de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA).*

PROTOCOLO CLÍNICO-ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA**DATOS PERSONALES**

Nombre:

Nº Historia:

Dirección:

Teléfono:

Edad:

Sexo:

ANTECEDENTES PERSONALES

Diabetes Hiperlipemia HTA Urico SAT NPT

Obesidad Otros:

Fármacos:

Cirugía:

Transfusiones: NO SI (año:)

Alcohol: NO SI (gramos / semana:)

Pérdida de peso: NO SI (Kg: / Tiempo:)

SÍNTOMAS NO SI: astenia dolor HD prurito
otros:**EXPLORACIÓN FÍSICA** Peso (kg): Talla (cm): IMC (kg/m²):

Estado general: Bueno Regular Malo

Estigmas hepatopatía: Si No Hepatomegalia: Si(cm:) No

Esplenomegalia: Si No Ascitis/edemas: Si No

Circulación colateral: Si No

LABORATORIO

Hb:

Plaquetas:

Glucosa:

Bilirrubina:

GGT:

VHB:

ANA (1/)

Cobre plasma:

α1-antitripsina:

Hierro:

α-fetoproteína:

Hcto :

A.Protrombina:

Acido úrico:

AST/GOT:

F.Alcalina

VHC:

AML (1/) AMC (1/)

Cobre orina:

Porfirinas orina:

Ferritina:

Proteinograma:

Leucocitos:

Fibrinógeno:

Albúmina:

ALT/GPT:

AST/ALT:

Resto virus hepatotropos:

) A-LKM (1/)

Ceruloplasmina:

Colinesterasa:

Saturación transferrina:

Inmunoglobulinas:

ECOGRAFIA ABDOMINAL

Normal

Brillo hepático

Hepatomegalia

Otros:

PROTOCOLO HISTOLÓGICO-ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA**NOMBRE****CASO Nº****Nº HISTORIA****NºBIOPSIA****TAMAÑO** (mm)**Nº ESPACIOS PORTA****ESTEATOSIS**

<i>TIPO:</i>	MACRO	MICRO	MACROMICRO
<i>LOCALIZACIÓN:</i>	DIFUSA	CENTROLOBULILLAR	PERIPORTAL
<i>GRADO:</i>	0-10%	10-25%	25-50% >50%

ARQUITECTURA-ESTADIO FIBROSIS (F) Plata-tricrómico	ACTIVIDAD-GRADO (L) LOBULILLAR HE, PAS-d	ACTIVIDAD-GRADO (P) PORTAL-PERIPORTAL HE, PAS-d
F0 <input type="checkbox"/> sin fibrosis	L0 <input type="checkbox"/> mínima o nula	P0 <input type="checkbox"/> no infl. portal o mínima
F1 <input type="checkbox"/> f.sinusoidal zona 3	L1 <input type="checkbox"/> leve: neutrófilos sinus. +escaso cambio hidróp.	P1 <input type="checkbox"/> inflamación portal
F2 <input type="checkbox"/> septos incompletos	L2 <input type="checkbox"/> moderada: focos infl.+ cambio hidrópico	P2 <input type="checkbox"/> infl. portal y periportal
F3 <input type="checkbox"/> septos completos	L3 <input type="checkbox"/> intensa: infl.severa + cambio hidrópico	P3 <input type="checkbox"/> infl. periportal moderada
F4 <input type="checkbox"/> fibrosis perinodular	L4 <input type="checkbox"/> intensa con hialina bien definida	P4 <input type="checkbox"/> infl. periportal intensa

LIPOGRANULOMAS	SI	NO
-----------------------	----	----

HIALINA	SI	NO
----------------	----	----

MITOCONDRIAS GIGANTES	SI	NO
------------------------------	----	----

CUERPOS ACIDÓFILOS	SI	NO
---------------------------	----	----

SIDEROSIS	SI	NO
------------------	----	----

<i>GRADO:</i>	1	2	3	4
---------------	---	---	---	---

<i>HEPATOCITARIA</i>	SI	NO
----------------------	----	----

<i>KUPFFERIANA</i>	SI	NO
--------------------	----	----

NÚCLEOS GLUCOGENADOS	SI	NO
-----------------------------	----	----

<i>LOCALIZACIÓN</i>	DIFUSA	CENTRAL	PERIPORTAL
---------------------	--------	---------	------------

II. CONTROLES

En este estudio participaron dos series diferentes de individuos sanos controles:

GRUPO 1

Constituido por 16 pacientes, cuyo tejido hepático sirvió de control para las diferentes determinaciones efectuadas en el hígado de los enfermos con EHNA. Los 16 sujetos pertenecían a un grupo de 25 individuos ingresados en nuestro hospital entre mayo de 1997 y abril de 1998 para ser sometidos a cirugía abdominal por diferentes causas. Todos ellos fueron informados y firmaron el consentimiento para realizar una biopsia hepática intraoperatoria durante la laparotomía quirúrgica. Para proponerles su participación en este estudio el tipo de cirugía debía permitir el acceso fácil al hígado sin aumentar el riesgo quirúrgico, y no debían presentar ningún trastorno de la coagulación ni otra contraindicación para obtener la muestra. Además, debían cumplir los criterios de inclusión y no presentar criterios de exclusión, que se detallan a continuación:

. Criterios de inclusión

Pacientes de ambos sexos con buen estado general y edad mayor de 18 años, que vayan a ser sometidos a una laparotomía abdominal electiva y que firmen el consentimiento informado.

. Criterios de exclusión

- . Enfermedad hepática conocida.
- . Bioquímica hepática alterada (ALT, ASAT, bilirrubina, albúmina).
- . Historia de abuso de alcohol
- . Hepatomegalia o aumento de la ecogenicidad hepática.
- . Obesidad.
- . Diabetes mellitus.
- . Pérdida rápida e importante de peso (>5%) los 6 meses previos.

- . Cirugía derivativa intestinal previa (gastroplastia, bypass).
- . Diverticulosis de intestino delgado.
- . Malnutrición.
- . Hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia.
- . Nutrición parenteral total (6 meses previos).
- . Procesos infecciosos severos.
- . Síndrome del aceite tóxico.
- . Serología positiva para el virus de la hepatitis C.
- . Toma crónica de determinados fármacos: corticoides, estrógenos, tetraciclinas, sulfasalazina, espironolactona, amiodarona, naproxeno, oxaciclina, tamoxifen, metrotexate, estrógenos.
- . Procesos tumorales digestivos o hepáticos

Tras obtener el cirujano una cuña hepática de 30-45 mg mediante una incisión con bisturí, la muestra se fraccionaba en dos porciones en el mismo quirófano. Una parte era introducida en formol al 10% y entregada en mano al patólogo, y la otra porción se congelaba de forma inmediata en nitrógeno líquido y era transportada de esta manera hasta una nevera para ser conservada a -70°C hasta su estudio. El patólogo encontró cambios morfológicos en el hígado de 9 pacientes y normalidad en los 16 restantes. Las muestras congeladas de estos 16 casos fueron las que se emplearon como controles. Todos los sujetos eran mayores de 18 años de edad (media: 50 ± 16 años), pertenecían a ambos sexos (8 mujeres y 8 varones), y ninguno tenía antecedentes conocidos de enfermedad hepática ni factores de riesgo para la EHNA. No sucedió ninguna complicación relacionada con la biopsia en ninguno de los casos y se informó del resultado del estudio histológico a todos ellos.

GRUPO 2

Formado por 22 individuos cuyo suero sirvió de control para las determinaciones de glucosa, insulina, péptido C y glucagón efectuadas en algunos de los pacientes con EHNA. Todos ellos eran mayores de 18 años de edad (media: 55 ± 20 años), de ambos sexos (12 mujeres y 10 varones), y ninguno tenía antecedentes conocidos de patología severa ni condiciones de riesgo para la EHNA. Todos eran trabajadores del hospital o familiares de éstos, que iban a realizarse un

control analítico de rutina, y que tras ser informados accedieron a donar sangre para este estudio. La fracción de suero obtenida para las determinaciones del estudio fue procesada de manera inmediata siguiendo la misma metodología que con el suero de los enfermos, y que posteriormente se detallará.

♦ METODOLOGIA

En este apartado se exponen los métodos que se emplearon para realizar las diferentes determinaciones en suero, el análisis microscópico de la biopsia hepática, y los estudios específicos de investigación en sangre, aire espirado y tejido hepático.

I. DETERMINACIONES DE LABORATORIO

1. GENERALES

- 1.1- Hemograma (recuento de hematíes, leucocitos y plaquetas; cuantificación de hemoglobina, hematocrito y fórmula leucocitaria). Se utilizó el autoanalizador Coulter-counter, modelo S-plus.
- 1.2- Estudio de coagulación. Se empleó un coagulómetro Organón Teknika TH Compact 1268.
- 1.3- Bioquímica elemental y hepática. Se efectuó mediante un analizador automático Hitachi Boehringer Mannheim 747-200.

2. ESPECÍFICAS DE ESTUDIO ETIOLÓGICO DE HIPERTRANSAMINASEMIA CRÓNICA

- 2.1- Virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC). La serología del VHB se determinó por método enzimático (EIA) de las marcas Diasorin Saluggia, Italia (para el Ag-HBs, anti-HBs y anti-HBc IgG) y Abbott Laboratorios, Chicago ILL (para el Ag-Hbe, anti-Hbe y anti-HBc IgM). Para la detección en suero de anticuerpos anti-VHC se utilizó un inmunoensayo de tercera generación frente a los antígenos c22-3, c200 y NS5 (ELISA 3. Ortho-Clinical Diagnostic

System, Inc., Raritan, NJ, USA). El test se consideró positivo si la densidad óptica de la muestra era la del control negativo + 0.400.

2.2- Hierro. Para su determinación se empleó un test colorimétrico, basado en el método Ferro Zine sin desproteinización (Roche) (449) y que tiene las siguientes fases: Liberación de los iones Fe^{3+} del complejo de transferrina por medio de ácidos o detergentes; reducción de los iones Fe^{3+} a iones Fe^{2+} ; reacción de los iones Fe^{2+} con Ferro Zine para formar un complejo coloreado cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración férrica y que se calcula automáticamente en un analizador Roche/Hitachi 911/Modular. Valores de referencia: 50-150 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Control de calidad: coeficiente de variación (CV) intraensayo: 0.8-1.2%; CV interensayo: 0.6-1.8%.

2.3- Ferritina. Se utilizó un test inmunoturbidimétrico para la determinación cuantitativa de ferritina en suero, el cual se basa en el principio del test inmunológico de aglutinación con intensificación de la reacción por látex (450). La concentración de la ferritina en la muestra se calculó automáticamente con un analizador Roche/Hitachi 911/Modular. Intervalo de referencia: 30-300 ng/ml en varones; 30-200 ng/ml en mujeres. Control de calidad: CV intraensayo: 1.2-6%; CV interensayo: 1.3-5.6%.

2.4- Cobre en suero y orina. Fueron cuantificados mediante absorción atómica (Perkin. Elmer 2280). Valores de referencia: 70-150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (sangre); < 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (orina).

2.5- Transferrina, ceruloplasmina y α 1-antitripsina. Se determinaron en suero empleando el nefelómetro Behring modelo BNA II. Se basa en la formación de inmunocomplejos entre la transferrina, la ceruloplasmina y la α 1-antitripsina al unirse a sus anticuerpos específicos, los cuales pueden dispersar un rayo de luz incidente. La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la concentración de la correspondiente proteína de la muestra (451). La valoración se hace automáticamente mediante una función logit-log,

comparando con un estándar de concentración conocida. Valores de referencia: Transferrina 200-360 mg/dl; Ceruloplasmina 21-53 mg/dl; α 1-antitripsina 113-318 mg/dl. Control de calidad: CV intraensayo: 2.7%; 1.4%; 2%, respectivamente. CV interensayo: 2.3%; 2.1%; 3.2%, respectivamente.

2.6- *Anticuerpos no organoespecíficos*. Los anticuerpos antinucleares (ANA), antimúsculo liso (AML), antimitocondriales (AMC) y antimicrosomales de hígado y riñón (a-LKM) fueron analizados mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando portas comerciales específicos para cada anticuerpo y PBS (phosphate buffered saline 150 mM. Pasteur Diagnostic) como dilutor de los sueros a estudio. Las muestras se leyeron en un microscopio de fluorescencia tras haber sido incubadas en la oscuridad. Para titular aquellas que resultaron positivas, se repitió la técnica con diluciones sucesivas del suero a la mitad. El título en cuestión fue aquella dilución en la que el resultado resultó positivo por última vez (452).

3. PEFIL LIPÍDICO

Las principales lipoproteínas se aislaron utilizando un método rápido de ultracentrifugación y posteriormente se determinó cada fracción empleando un analizador automático Hitachi (453). El procedimiento fue el siguiente: tras centrifugar x 1500 r.p.m. el suero obtenido tras 12 horas de ayunas, se añadió una solución 195 mmol/L NaCl, $d=10006$, y se ultracentrifugó en un rotor 50.3 Ti (Beckman Instruments) a 40.000 r.p.m. (g_{max} 142.000), durante 18 horas. El sobrenadante contenía las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-colesterol y VLDL-triglicéridos), que se recuperaron por aspiración (1ml); el precipitado fue homogeneizado para cuantificar en él las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol). Los triglicéridos, colesterol y HDL-colesterol fueron determinados en un autoanalizador utilizando test enzimáticos (TG GPO-PAP; CHOD-PAP; HDL-C PLUS. Boehringer Mannheim Systems). La fracción LDL-colesterol se calculó a partir del colesterol total y el unido a las HDL ($LDL-C = Ct - HDL-C$).

Se utilizaron como valores de referencia los recomendados por el Adult Treatment Panel II para la población americana (454).

.COLESTEROL

Colesterol ideal: < 200 mg/dl

Hipercolesterolemia: colesterol total \geq 240 mg/dl

Colesterol borderline: 200-239 mg/dl

HDL: bajo riesgo \geq 60 mg/dl; alto riesgo < 35 mg/dlLDL ideal: < 130 mg/dl; alto riesgo: \geq 220 mg/dl**.TRIGLICÉRIDOS**

Hipertrigliceridemia: > 150 mg/dl

.Apo-A < 94 mg/dl**.Apo-B** < 63 mg/dl**4. TRANSFERRINA DEFICIENTE EN CARBOHIDRATOS (CDT)**

Además del interrogatorio y los marcadores biológicos tradicionalmente empleados para el diagnóstico de alcoholismo, se empleó la determinación de la CDT en sangre. Para su medición se utilizó el denominado CDTECT[®] (Pharmacia & Upjohn Diagnostics, Uppsala, Sweden) (386). Se trata de un método que separa las formas de transferrina sérica deficitarias en carbohidratos mediante cromatografía y las detecta por inmunoensayo. Para que aparezcan concentraciones por encima de lo normal es necesario un consumo de 50-80 gramos de etanol/día ó más, durante al menos una semana. Si se inicia la abstinencia alcohólica, los valores de CDT persisten elevados todavía de 12 a 17 días. Por este motivo, en los pacientes de este estudio se determinó la CDT en la sangre extraída horas antes de la biopsia hepática, aprovechando la misma venopunción efectuada para el estudio de coagulación. Se consideraron positivos aquellos valores \geq 20 U/L en los varones y \geq 25 U/L en las mujeres. Sensibilidad del test: 69-75%; especificidad: 92-100%. Control de calidad: CV intraensayo: 6,5%; CV interensayo: 9,3%.

II. BIOPSIA HEPATICA Y ESTUDIO MICROSCOPICO

En todos los pacientes con sospecha de EHNA se realizó una biopsia hepática percutánea (BHP). Todos ellos cumplían tres requisitos imprescindibles:

- a) Estudio de coagulación reciente (24-48 horas previas) con unos valores hemostáticos: actividad de protrombina > 50%, tiempo de cefalina \leq 34 segundos, plaquetas > 70.000/mm³, tiempo de hemorragia < 9 minutos.

- b) Ecografía abdominal previa, en la que no se observaban lesiones que contraindicasen el procedimiento: angiomas, circulación colateral, quistes, atrofia hepática, etc.
- c) Consentimiento informado del enfermo.

El procedimiento de la BHP fue el habitual en todos los casos (455): con el paciente en ayunas y en decúbito supino, se determinaba el espacio intercostal a atravesar, mediante percusión hepática y con la ayuda de un ecógrafo. Después de elegir el lugar de punción, se limpiaba la piel con un antiséptico del tipo de la povidona yodada mediante una gasa estéril y se anestesiaba el trayecto de la punción. Con el enfermo en apnea, se introducía la aguja por el trayecto infiltrado hasta alcanzar el hígado. La aguja empleada era de tipo Menghini, la cual funciona según un mecanismo de succión en vacío, es decir, obtiene la muestra mediante aspiración del tejido que queda en el interior de la aguja tras penetrar en el parénquima hepático. El calibre de esta aguja (0.5-1.9 mm), su longitud (70-120 mm) y la anchura muy fina, permitieron obtener muestras apropiadas para el estudio histológico, mayores de 1 cm, con un peso aproximado de 20-30 mg, y generalmente no fragmentadas. Una vez retirada la aguja con la muestra en su interior, se limpiaba de nuevo la zona de punción y se aplicaba un apósito adhesivo de protección. A continuación, el paciente se colocaba en decúbito lateral derecho durante 3 horas, y permanecía en cama y en observación durante 24 horas.

El cilindro hepático extraído era fraccionado en dos porciones, siempre que el tamaño de la muestra lo permitía. Una fracción era procesada de forma habitual: tras su inspección en fresco con el microscopio de luz polarizada, que hace que el tejido se observe rojo fluorescente en caso de existir depósito de porfirinas, se fijaba en formaldehído al 10% y se remitía para su estudio morfológico. Para ello el tejido era incluido en parafina y los cortes de 4-6 μ de espesor, se teñían con hematoxilina-eosina (HE), plata para reticulina de Wilder, tricrómico de Masson, ácido periódico de Schiff (PAS) previa digestión con diastasa y tinción de Perls para hierro. Se consideraron adecuadas las muestras en las que se identificaron 3 ó más espacios porta, y se midió la longitud de las mismas una vez procesadas. La otra fracción de la muestra de tejido se congelaba inmediatamente a -70°C en nitrógeno líquido para ser conservada hasta su estudio, una vez confirmado el diagnóstico de EHNA.

III. DETERMINACIONES EN TEJIDO HEPÁTICO: CARNITINA, CARNITIN-PALMITOIL-TRANSFERASA Y CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

1. CARNITINA

El contenido hepático de carnitina libre (CL) y de carnitina esterificada con ácidos grasos de cadena corta (CCC) y de cadena larga (CCL) se midió utilizando el método radioquímico descrito por Di Donato (200). Se constituyó un homogenado a partir de 5 mg de tejido hepático y ácido perclórico (PCA) 0,6N y, tras centrifugar 1,5 minutos a 8000 r.p.m., se separaron el sobrenadante y el precipitado. A partir del sobrenadante se obtuvieron la CL y la CCC (fracción ácido-soluble), mientras que en el precipitado se determinó la concentración de CCL (fracción ácido-insoluble), según se detalla a continuación:

a)- Cuantificación de carnitina libre (CL) y obtención de carnitina esterificada con ácidos grasos de cadena corta (CCC)

Se pipetearon 1200 μ l de sobrenadante, al que se añadió rojo fenol y 100 μ l de Hepes KOH 0,5M pH8.5. Después de mantener la solución en hielo durante 20 minutos, se neutralizó con CO_3HK a pH=6,6-6,9 y se tamponó con Hepes pH7. El resultado se dividió en dos fracciones:

.Fracción A: constituida por 500 μ l de sobrenadante; 20 μ l de tampón Hepes KOH 0,5M pH=7; y 140 μ l de KCL 0,6N. Con ella se obtuvo CL.

.Fracción B: constituida por 500 μ l de sobrenadante; y 100 μ l de KOH 1N. Con ella se obtuvo CL y ácidos grasos de cadena corta.

b)- Obtención de carnitina esterificada con ácidos grasos de cadena larga (CCL)

Al precipitado obtenido al principio del procedimiento se le añadieron 100 μ l de H_2O , 1 gota de rojo fenol y se sonicó. A continuación, se añadieron 100 μ l de KOH

1N para hidrolizar los ácidos grasos de cadena larga de su unión con la carnitina, y se incubó a 56°C durante 90 minutos. Finalmente, se tamponó con Hepes KOH pH7. Así se obtuvo CL y ácidos grasos de cadena larga.

c)- Cuantificación de CCC y CCL

Para conocer la concentración de la carnitina esterificada con ácidos grasos de cadena corta y larga, se procedió a realizar una mezcla de incubación de la CL obtenida de la hidrólisis de la carnitina esterificada, con Acetil-CoA 14C*, CAT (carnitina-acetil-transferasa), Hepes buffer y N.E.M.(N-etilmaleimida), un inhibidor de la oxidación de la CoASH libre.



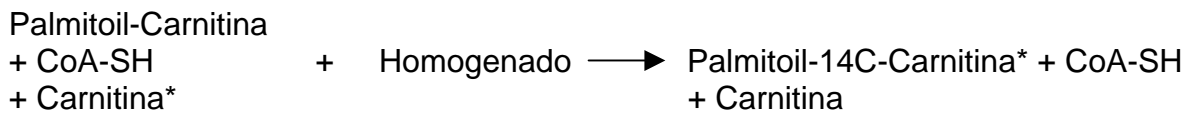
Posteriormente, se separó la Acetil-Carnitina 14C* formada en la mezcla de la reacción, utilizando una resina de intercambio iónico DOWEX 2x8 400. Finalmente, se tomaron 300 µl del sobrenadante, añadiéndose a viales de centelleo. La concentración de ésteres de cadena corta y larga, medidos en un contador de centelleo, era proporcional a la de CL que estaba esterificada con ellos. Paralelamente, se preparó la curva estándar a partir de 1000 µl de L-carnitina 25 µM, utilizándose concentraciones de carnitina de 250 pm a 2500 pm.

Los valores de carnitina se expresaron en nanogramos x mg de proteínas no colágenas (ng x mg⁻¹ NCP). Para extraer las proteínas no colágenas del homogenado de tejido, éste se trató con una solución de NaOH 0,25N, según el método de Lowry (456). Todas las medidas se efectuaron por duplicado.

2. CARNITIN-PALMITOIL-TRANSFERASA (CPT)

La actividad de la CPT se determinó por el método de intercambio isotópico (230), el cual consiste en un análisis enzimático radiométrico que se realiza en homogenado de hígado. La CPT cataliza la transferencia de los ácidos grasos de

cadena larga desde la coenzima A (CoA-SH) hasta la carnitina. In vitro, la actividad de la CPT se determinó según la siguiente reacción de intercambio isotópico:



La palmitoil-carnitina radiactiva, una vez formada, se extrajo con butanol y la radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido.

La actividad de la CPT se expresó en nanomoles de palmitoil-carnitina formada durante 1 minuto y por gramo de tejido. Los valores obtenidos se corrigieron según las proteínas no colágenas (NCP) del homogenado, determinadas según el método de Lowry (456):

$$\text{CPT (nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{NCP)} = \text{CPT nml min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ tejido} / 10 \times \text{NCP mg/ml.}$$

3. CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM)

La actividad de las enzimas de la CRM en tejido hepático fue estudiada por espectrofotometría. Esta técnica se basa en los diferentes espectros de absorbancia para las formas oxidadas y reducidas de cada transportador de la CRM a una determinada longitud de onda (λ). La actividad específica se calculó al dividir el Δ (Abs/min $\times 10^3$) de cada complejo por ϵ (coeficiente de extinción molar, $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y por el volumen del homogenado (ml). Se expresó en nanomoles de sustrato \times minuto \times mg de proteína no colágena (actividad específica = $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{NCP}$). Para corregir por el volumen mitocondrial, todas las actividades específicas se normalizaron según la actividad de la enzima mitocondrial citrato sintasa (CS) (457).

El *complejo I* (NADH CoQ oxidorreductasa) sensible a rotenona, se determinó durante la reacción de oxidación del NADH a 340 nm en 100mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM sucrosa, 2 mM EDTA, 5mM KCN, 100 μM NADH y 50 μM de coenzima Q₁. La reacción fue inhibida al 90% tras añadir 2 μM de rotenona.

Para estudiar la actividad del *complejo II* (Succinato deshidrogenasa) se monitorizó la oxidación del succinato (16mM) a 600 nm en el homogenado, en presencia de un aceptor artificial de electrones, el 2,6-diclorofenol-indofenol (0.1 mM DCPI), y 50 μ M CoQ1.

El *complejo III* (Ubiquinol-citocromo c-oxidorreductasa) sensible a antimicina, fue analizado según la aparición de citocromo c reducido a 550 nm, en presencia de 50 μ M citocromo c 1mM y 50 μ M DBH₂ (decilubiquinol). La reacción fue inhibida por antimicina A.

La actividad del *complejo IV* (citocromo c oxidasa) se determinó por la disminución en la absorbancia a 550 nm del citocromo c reducido en presencia del enzima del homogenado.

La actividad del *complejo V* (ATPasa) se monitorizó durante la extinción de ATP a 340 nm en Hepes-Mg pH8, 150 μ l NADH, 2.5 mM PEP, 5 μ l piruvatokinasa, 10 μ l LHD, 10 μ l antimicina A, 100 μ l ATP 25 nM pH7 y 10 μ l oligomicina.

La *citrato sintasa* (CS) se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm producida por la reacción del 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzónico) con la coenzima A libre formada por la condensación del acetil-CoA con oxalacetato en presencia del enzima (10 μ l de homogenado).

La temperatura de incubación fue de 38°C para el complejo IV y de 30°C para la CS y el resto de los complejos. Todos los análisis enzimáticos se efectuaron por triplicado, utilizando un espectrofotómetro DU-68 (Beckman Instrument, Brea, CA).

IV. ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA: TEST DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA, DETERMINACIONES DE INSULINA, PEPTIDO C Y GLUCAGÓN

En los 85 pacientes con EHNA se determinó la glucemia basal. Además, después de excluir a los enfermos con diabetes mellitus, en 41 de estos 85 casos se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa y una cuantificación de insulina y péptido C. En 15 de estos 41 casos se midió también la concentración de glucagón en ayunas.

Las muestras de sangre basales de los 41 pacientes fueron extraídas tras 10 horas de ayunas y a continuación fueron procesadas para determinación de la glucosa, insulina y péptido C basales. En 15 de estas 41 muestras se separaron 5 ml de suero y, tras añadir Trasylol[®], se congelaron a -70°C hasta la determinación de glucagón. Paralelamente se obtuvo la sangre de los 22 sujetos controles y con las muestras se siguió el mismo procesamiento para determinación de glucosa, insulina, péptido C y glucagón basales.

En los 41 pacientes en los que se llevó a cabo el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG), una vez realizada la extracción de sangre para determinar la glucosa basal, se administraron 75 gramos de glucosa disuelta en agua por vía oral (458,459). Dos horas después de la toma de la glucosa, se efectuó una segunda venopunción para nueva determinación de la glucemia (glucosa 120´). Según los resultados del TTOG, los 41 pacientes fueron clasificados como normales, diabéticos tipo 2, intolerantes a la glucosa en ayunas, e intolerantes a la sobrecarga con glucosa, según los criterios actuales del Comité de Expertos de la ADA (American Diabetes Association) y la WHO (World Health Organization) (460,461):

TTOG NORMAL

Glucosa basal < 110 mg/dl
 Glucosa a los 120' < 140 mg/dl

DIABETES

Glucosa basal \geq 126 mg/dl en dos ocasiones
 Glucosa a los 120' \geq 200 mg/dl

INTOLERANCIA A LA GLUCOSA EN AYUNAS

Glucosa basal \geq 110 mg/dl y < 126 mg/dl

**INTOLERANCIA A LA SOBRECARGA ORAL
CON GLUCOSA**

Glucosa a los 120' \geq 140 mg/dl y < 200 mg/dl

Una vez conocidos los valores basales de la glucosa, insulina y péptido C, se calcularon la insulinoresistencia, función de la célula beta pancreática y extracción hepática de insulina en los 41 pacientes con EHNA y los 22 controles, utilizando los índices aceptados en la literatura como indicadores de estos parámetros (271,300):

INSULINORRESISTENCIA

Glucosa / Insulina

FUNCIÓN CÉLULA β PANCREÁTICA

Glucosa / Péptido C

EXTRACCIÓN HEPÁTICA DE INSULINA

Péptido C / Insulina

También se determinó el número de pacientes con EHNA que cumplían los criterios del síndrome metabólico, de insulinoresistencia ó "síndrome X" (61,459). Dicho síndrome se caracteriza por la coexistencia de alguna forma de intolerancia en el metabolismo de la glucosa/insulina (diabetes o intolerancia a la sobrecarga oral o hiperinsulinemia) y 2 ó más de los siguientes: obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$); hipertensión arterial; triglicéridos > 150 mg/dl y/o HDL < 35 mg/dl.

Las técnicas empleadas para la determinación de los diferentes parámetros de la homeostasis de la glucosa estudiados fueron las siguientes:

- GLUCOSA. Se utilizó el analizador automático Hitachi Boehringer Mannheim 747-200.

- INSULINA. Se determinó mediante enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA) usando para ello un autoanalizador AxSYM[®] (ABBOTT) (462). Esta técnica se basa en que las micropartículas están recubiertas de anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina, de forma que la insulina presente en la muestra se unía al anticuerpo de las micropartículas. El complejo formado se inmovilizaba en una matriz de fibras de vidrio, la cual era lavada para eliminar todo lo que no era complejo antígeno-anticuerpo. A continuación se añadía un conjugado compuesto por anticuerpos anti-insulina monoclonales de ratón unidos a fosfatasa alcalina, de tal forma que se formaba un “sandwich” en el que la insulina de la muestra quedaba inmovilizada entre dos anticuerpos específicos. Por último, se añadía un sustrato fluorescente, el 4-metil-umbeliferil fosfato, que al hidrolizarse mediante la fosfatasa alcalina, producía una señal fluorescente directamente proporcional a la cantidad de insulina presente en la muestra. Valores de referencia: 5-15 μ U/ml. Control de calidad: C.V. intraensayo: 2,6-4,1%; C.V. interensayo: 2,7-2,1% .

- PÉPTIDO C. Se cuantificó mediante inmunoensayo competitivo quimioluminiscente en fase usando un equipo Immulite[®] (271). La fase sólida consistía en esferas de polietileno recubiertas de anticuerpo policlonal de campo anti-péptido C. La muestra del paciente se incubaba con esta fase sólida y con el conjugado formado por péptido C-fosfatasa alcalina, el cual competía con el péptido C de la muestra por los sitios de unión al anticuerpo. Tras retirar el conjugado que no se había unido, se añadía un sustrato quimioluminiscente (éster fosfato de adamantil-dioxetano) que gracias a la fosfatasa alcalina se hidrolizaba, produciendo una señal quimioluminiscente inversamente proporcional a la cantidad de péptido C presente en la muestra. Valor de referencia: 0.5-4 ng/ml. Control de calidad: C.V. intraensayo: 5-8,2%; C.V. interensayo: 5,3-13%.

- **GLUCAGÓN.** Se cuantificó utilizando un método de radioinmunoensayo secuencial de doble anticuerpo (463). El glucagón presente en la muestra competía con el glucagón marcado con I^{125} por los sitios de unión al anticuerpo anti-glucagón de conejo. La separación de las formas ligada y libre se realizó mediante una solución precipitante que contenía polietilenglicol y antisuero anti-gamma-globulina de conejo. Tras centrifugación, el complejo de doble anticuerpo formado precipitaba la forma ligada. Una vez eliminado el sobrenadante, se contaba el precipitado en un contador γ , siendo las cuentas por minuto (cpm) inversamente proporcionales a la cantidad de glucagón presente en la fórmula. Los cálculos se realizaron mediante una representación logit-log de las cpm de la curva estándar presente a la concentración. Valor de referencia. 40-130 pg/ml. Control de calidad: C.V. intraensayo: 4-15%; C.V. interensayo: 5,7-15,7%.

V. TEST DEL HIDROGENO (H₂) ESPIRADO

Denominado también “prueba del aliento del H₂” (Hydrogen breath test). Se trata de una técnica que permite demostrar la existencia de sobrecrecimiento bacteriano al detectar un exceso de H₂ en el aire espirado. Dicho gas es producido en el intestino a partir de la acción bacteriana sobre un azúcar previamente ingerido (464). La prueba se basa en varias premisas:

1. En condiciones normales la única fuente de H₂ en el hombre es la producida en el colon, donde se forma a partir del catabolismo bacteriano de los carbohidratos. El volumen de H₂ producido dependerá de la cantidad de hidratos de carbono fermentables que lleguen hasta la flora bacteriana
2. En los casos de sobrecrecimiento bacteriano la producción de H₂ estará aumentada, ya que existe un sobrecrecimiento de bacterias donde habitualmente no existen es decir, en el intestino delgado. El H₂ se producirá tanto en el colon como en el intestino delgado.
3. El 86% del H₂ producido es eliminado por vía rectal. El 14% restante es absorbido por la mucosa del colon, transportado por el torrente circulatorio hasta los pulmones

y posteriormente eliminado por el aire espirado. La cantidad de H₂ en el aire espirado es igual a la absorbida por el intestino, siendo ésta directamente proporcional a la producción intestinal de este gas.

En este estudio se realizó el test del H₂ espirado en 56 de los 85 pacientes con EHNA. Eran 44 varones y 12 mujeres, con una edad media de 40 ± 11 años. Se excluyeron los enfermos con diabetes mellitus conocida, antecedentes de cirugía gástrica o intestinal, diarrea, anomalías estructurales o de la motilidad intestinal, inmunodepresión, hipoclorhidria gástrica, y consumo de medicamentos que pudiesen alterar la flora intestinal (antibióticos, inhibidores de la secreción ácida gástrica). Para poder descartar todas estas causas de sobrecrecimiento bacteriano, se efectuó previamente a la prueba un interrogatorio clínico dirigido, así como determinación en suero de vitamina B12, anticuerpos anti-parietales y factor intrínseco; cuantificación de inmunoglobulinas en sangre periférica; tránsito gastrointestinal radiológico; y cuantificación de grasas en heces.

La recolección de las muestras del aire espirado se realizó mediante una jeringa de plástico de 60 ml con un orificio lateral, de manera que era posible su llenado espirando en su interior a través de una boquilla. Estando el paciente en ayunas, sin fumar, y tras un enjuague oral con un antiséptico, se le instruía para que realizase una espiración profunda en el interior de la jeringa, tapándose inmediatamente el orificio lateral de ésta. La muestra así obtenida contenía el H₂ basal. Posteriormente, se administraban 50 g de glucosa en una solución al 20% y se recolectaban muestras del aliento a intervalos de 30 minutos durante 2 horas. El aparato utilizado para la medición del H₂ fue el denominado "Lactoscreen breath tester", el cual cuantifica el H₂ en el aliento mediante un detector altamente sensible a la presencia de H₂, y emite una señal eléctrica a un microprocesador cuando la muestra contiene dicho gas (465). Los resultados así obtenidos fueron expresados en partes por millón (ppm).

En el sobrecrecimiento bacteriano, la presencia anómala de flora bacteriana en el intestino delgado produce la fermentación del azúcar y la consiguiente producción de H₂. Por ello, la aparición precoz de un pico de H₂, normalmente en la primera hora, con tendencia a disminuir e incluso a normalizarse hacia la segunda

hora, es característica de la colonización bacteriana del intestino delgado (Figura 29). Además, de acuerdo con la mayoría de autores, se consideró como anormal un aumento en la eliminación de H₂ superior a 20 ppm sobre el valor basal (466).

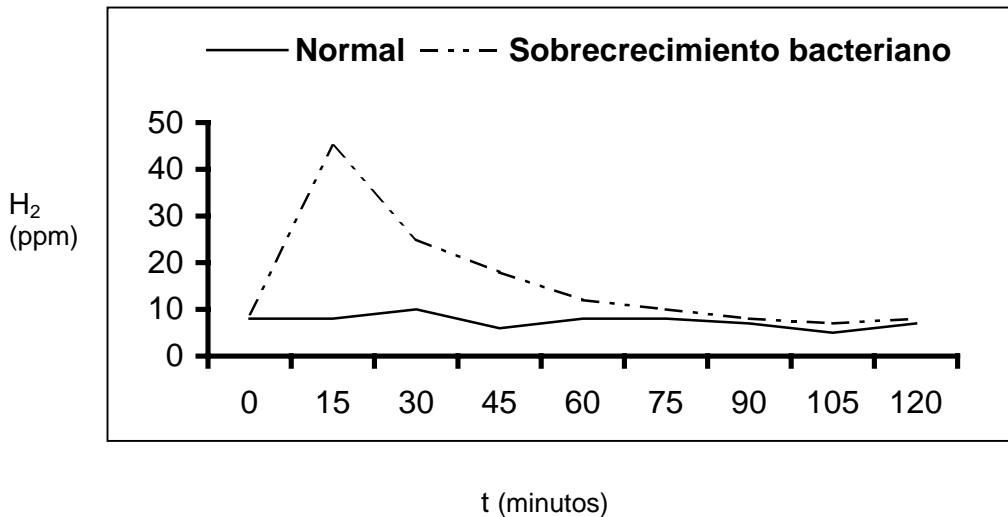


Figura 29. Representación de las curvas del test del H₂ espirado normal y de sobrecrecimiento bacteriano

VI. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α)

El TNF α se determinó en suero mediante ensayo inmunoradiométrico (Medgenix-TNF α -IRMA). Con este método se utilizaron varios anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra diferentes epítomos del TNF α , los cuales quedaban adheridos a la superficie interna de la parte inferior de un tubo de plástico. La señal emitida por el anticuerpo marcado con I¹²⁵ desencadenaba la reacción inmunológica (467). Tras lavar, la radioactividad ligada al tubo reflejaba la concentración del antígeno y ésta se medía mediante un contador gamma (I¹²⁵). La concentración de TNF α de la muestra se determinaba a partir de una curva de representación semi-log de las cpm de la curva estándar frente a la concentración. Valores de referencia: 0 - 35 pg/ml. Control de calidad: C.V. intraensayo: 2,2-6,0%; C.V. interensayo: 2,8-7,0%.

VII. DETERMINACION DE LAS MUTACIONES DEL GEN DE LA HEMOCROMATOSIS

En 60 de los 85 pacientes con EHNA se buscó la presencia de alguna de las 2 mutaciones del gen HFE más frecuentes: Cys 282 Tyr y His 63 Asp. Eran 44 varones y 16 mujeres con una edad media de 45 ± 11 años. La técnica utilizada fue la reacción en cadena de la polimerasa y posterior digestión enzimática con enzimas de restricción (PCR / RFLP) (468). El ADN se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica mediante un proceso de extracción automático y usando un extractor de ADN 340 A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La PCR se efectuó en 3 etapas consecutivas: desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores específicos del gen a sus secuencias complementarias del ADN y, por último, elongación en dirección 5' a 3' mediante la incorporación de deoxinucleótidos monofosfato al complejo cebador-ADN sustrato. Como enzima ADN polimerasa, catalizadora de la reacción, se empleó la denominada Taq-polimerasa. Para amplificar el exón 2 se utilizaron los cebadores HEME x 2-5' (5'-CTT TGG GCT ACG TGG ATG ACC) y HEME x 2-3' (5'-CTG GCT TGA AAT TCT ACT GGA AAC C); para el exón 4 se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos HEME x 4-5' (5'-GGT GTC GGG CCT TGA ACT ACT ACC) y HEME x 4-3' (5'-GGG CTC CCA GAT CAC AAT GAG G). En una segunda fase, los productos de la PCR fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Bcl* (exón 2) y *Rsa* (exón 4), según protocolo (Promega, Madison, WI). La presencia de la mutación H63D destruía el lugar de acción de la *Bcl* en el producto de 101 pb (pares de bases), de forma que, mientras que el ADN normal era cortado en 2 fragmentos de 38 y 63 pb, el DNA mutado no era cortado. En el caso de existir la mutación C282Y, se creaba un lugar adicional para la *Rsa* de forma que el producto de ADN de 228 pb era cortado por este enzima en 2 fragmentos de 145 y 83 pb en el alelo normal, mientras que en el ADN mutado se formaban, tras la digestión, 3 fragmentos de 145, 29 y 54 pb. Finalmente, estos productos obtenidos se sometían a electroforesis en gel de acrilamida y eran visualizados mediante la tinción con bromuro de etidio.

VIII. DETERMINACION DE LOS ALELOS HLA

En 57 de los 85 pacientes con EHNA se analizó el genotipo HLA. Eran 42 varones y 15 mujeres con una edad media de 42 ± 9 años. Las técnicas utilizadas fueron las siguientes:

Antígenos de CLASE I (A y B). Fueron detectados serológicamente mediante la técnica denominada “ensayo de microlinfocitotoxicidad” (469). Dicho método se basa en la especificidad de determinados antisueros que reconocen y se fijan a los antígenos HLA sobre los linfocitos que los presentan, provocando su lisis al añadir complemento (reacción positiva). Esta reacción no tiene lugar cuando los linfocitos en estudio no presentan los antígenos HLA que reconocen los antisueros utilizados (reacción negativa). Se utilizaron linfocitos T aislados a partir de sangre periférica defibrinada, los cuales fueron mezclados en placas de múltiples pocillos con los antisueros policlonales correspondientes (instituto Behring, Alemania; Biotest, Alemania).

Alelos de CLASE II (DR). Se determinaron mediante amplificación y tipaje alélico utilizando el sistema comercial INNO LIPA (Line Probe Assay; Innogenetics, Bélgica). Este sistema de tipaje se basa en el principio de hibridación reversa (dot-blot reverso), según el cual el ADN amplificado mediante técnica automática de PCR (termociclador PCR-9600. Perkin Elmer Cetus) se desnaturaliza y se hibrida con oligosondas inmovilizadas sobre una membrana en forma de tira. El oligotipaje reverso se efectuó utilizando un sistema automatizado que es capaz de analizar 30 muestras simultáneamente (Autolipa) y de determinar la mayoría de los alelos descritos para el HLA DR. (470).

El grado de asociación de los marcadores estudiados a la EHNA se calculó por comparación de la frecuencia alélica de cada marcador en la población con EHNA y en la población normal, para lo que se utilizó como control una población ya estudiada en nuestro hospital y constituida de 176 sujetos sanos de Madrid (471).

Cálculo de frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas se definieron por conteo directo $p=A/2n$, siendo A el número de individuos que presentaban el alelo objeto de estudio y n el número total de individuos.

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SAS versión 12.

Las variables categóricas se han expresado en frecuencias absolutas y porcentajes. Las variables continuas se han expresado en parámetros de tendencia central y de dispersión, diferentes según tuviesen o no una distribución gaussiana normal en el **test de Kolmogorov-Smirnov**: media \pm desviación estándar, cuando los valores tenían una distribución agrupada; mediana y rango intercuartílico, cuando los valores estaban agrupados.

La comparación de los porcentajes de las variables categóricas se realizó mediante el **test de la χ^2** . Cuando las variables se presentaban en tablas de dos por dos y N era menor de 20 o algún valor de los datos observados era inferior a 5, se empleó el **test exacto de Fisher**.

La comparación de las medias de las variables continuas se realizó mediante la **prueba t de Student**. Cuando estas variables no tenían una distribución normal se utilizó una prueba no paramétrica: el **test de Mann-Whitney** para muestras no pareadas. Cuando existían más de dos grupos independientes, la comparación de sus medias se realizó mediante el análisis de la varianza **ANOVA**, si la distribución de las variables era normal y las varianzas eran homogéneas, y el **test de Kruskal-Wallis** si no se cumplían estas condiciones.

El análisis de correlación entre variables continuas se realizó con el **coeficiente de correlación de Pearson**.

Se consideró estadísticamente significativo un nivel de confianza mayor del 95%, es decir, todo valor de **$p < 0.05$** .

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA HEPATICA DURANTE LAPAROTOMIA QUIRURGICA.

He sido informado sobre el estudio que se está realizando en el hospital “Doce de Octubre” en pacientes con Esteatohepatitis no alcohólica y doy mi consentimiento para participar como sujeto control, aceptando que se tome una muestra hepática durante la cirugía que me van a practicar.

He recibido suficiente información sobre el estudio y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Lugar

Fecha

Firma del paciente

Firma del investigador

I. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CONDICIONES DE RIESGO PARA LA EHNA

Nuestra serie está constituida por 85 enfermos con hipertransaminasemia crónica y diagnóstico clínico-morfológico de EHNA. Todos ellos fueron incluidos en el presente estudio de forma consecutiva, una vez excluida la exposición al alcohol (anamnesis, marcadores biológicos del alcoholismo ausentes, valor de la transferrina deficiente en carbohidratos en rango normal), descartadas otras causas de hipertransaminasemia crónica (virales, metabólicas, autoinmunes), y confirmada la presencia de las lesiones histológicas características de la EHNA (esteatosis, degeneración hidrópica y algún grado de inflamación, con o sin fibrosis).

El 74% de los pacientes eran varones y el 26% mujeres, siendo la edad media en el momento del diagnóstico de la enfermedad de 41 ± 12 años (rango: 20-70 años; mediana: 35 años). El 92% de los sujetos incluidos en nuestro estudio (78/85) presentaba uno o más de los factores de riesgo conocidos para la EHNA (Figuras 30 y 31; pág.158 y 159).

La **obesidad** ($IMC \geq 27 \text{ Kg/m}^2$) fue la condición encontrada con mayor frecuencia, ya que estaba presente en 65 individuos (77%). La media del IMC fue de $29.5 \pm 3.6 \text{ Kg/m}^2$, con un rango de 27.2-39.4 Kg/m^2 . Con respecto a los grados de severidad, la mayoría de los obesos estaban incluidos en el grupo de obesidad leve: 34 individuos presentaban un grado 1 (52%), 24 un grado 2 (37%) y 7 un grado 3 (11%). Ningún paciente tenía una obesidad mórbida o grado 4 ($IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la edad ni el sexo entre el grupo de obesos y el de no obesos; tampoco al analizar estas variables en los distintos grados de severidad de la obesidad (Tabla 22).

Tabla 22. Características epidemiológicas y obesidad en 85 pacientes con EHNA

N = 85	OBESOS		NO-OBESOS		p
	n=65	(77%)	n=20	(23%)	
SEXO					
Varones	47	(72)	16	(80)	>0.5
Mujeres	18	(28)	4	(20)	
EDAD (años)	41 ± 12		43 ± 13		>0.5

La **hiperlipemia** fue la segunda condición asociada a la EHNA en orden de frecuencia (Figura 32; pág.159). Presentaban hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia 45 pacientes (53%): 21 (47%) tenían hipertrigliceridemia (triglicéridos > 150 mg/dl), 8 (18%) hipercolesterolemia (colesterol total \geq 240 mg/dl), y 16 (35%) ambas alteraciones asociadas. Los pacientes con hiperlipemia tenían una edad mayor (44 ± 12 años vs. 39 ± 12 años; $p=0.05$) y la mayoría eran varones (67% vs. 33%; $p=0.96$). Estas diferencias en la distribución de la edad y sexo fueron más marcadas en el grupo de pacientes con cifras de triglicéridos elevadas, aunque sin alcanzar, en ningún caso, significación estadística.

El 20% de los pacientes (17/85) cumplía los criterios diagnósticos actuales de **diabetes**; 14 eran diabéticos tipo 2 ya conocidos y en 3 casos el diagnóstico se efectuó durante nuestro estudio, al encontrar una glucemia por encima de 200 mg/dl a los 120 minutos en el test de tolerancia oral a la glucosa. La mayoría de los diabéticos pertenecía al sexo femenino (59% vs. 41%; $p=0.001$) y tenía una edad significativamente mayor (53 ± 9 años vs. 38 ± 11 años; $p=0.0001$) (Tabla 23).

Tabla 23. Características epidemiológicas y diabetes en 85 pacientes con EHNA

N = 85	DIABETICOS		NO-DIABETICOS		p
	n=17	(20%)	n=68	(80%)	
SEXO					
Varones	7	(41)	56	(82)	0.001
Mujeres	10	(59)	12	(18)	
EDAD (años)	53 ± 9		38 ± 11		0.0001

Diecinueve individuos (22%) tomaban alguno de los **fármacos** implicados en la aparición de las lesiones de EHNA. Esta asociación se encontró con mayor frecuencia entre las mujeres (53% vs. 47%; $p=0.002$) y en aquellos pacientes de mayor edad (46 ± 11 años vs. 40 ± 12 años; $p=0.05$).

FARMACO DE RIESGO	Nº pacientes
Corticoides	5
Ibuprofeno	3
Diltiazem	3
Nifedipino	2
Anticonceptivos	2
Tetraciclinas	1
Acido valpróico	1
Sulfasalazina	1
Acido acetilsalicílico	1

Además, 34 pacientes de nuestra serie (40%) tomaban fármacos que no han sido relacionados hasta la actualidad con la EHNA. Entre ellos, y por orden de frecuencia, se encontraron:

- 1- Antihipertensivos: Captopril, Lisinopril, Enalapril, Atenolol, Verapamilo.
- 2- Antiinflamatorios no esteroideos: Diclofenaco, Nabumetona, Indometacina, Meloxicam.
- 3- Hipolipemiantes: Bezafibrato, Colestipol, Lovastatina, Pravastatina, Ebastina.
- 4- Antidepresivos: Paroxetina, Fluoxetina, Depamide.
- 5- Otros: Antidiabéticos orales, Benzodiacepinas, Haloperidol, Paracetamol, Teofilina, Insulina, Omeprazol, Alopurinol.

Dos sujetos de nuestro grupo estaban diagnosticados de **SAT** (2%), aunque en ambos casos existían también otros factores de riesgo de EHNA asociados.

El 54% del total de individuos (46/85) presentaba **varios factores de riesgo asociados**. La obesidad e hiperlipemia fue la asociación más frecuente (32%), seguida de la obesidad y diabetes (12%) e hiperlipemia y diabetes (10%). Ninguna de estas asociaciones fue significativamente estadística ($p=1$; $p=0.833$; $p=0.587$, respectivamente). Los fármacos y el SAT estaban asociados a otro factor en todos los casos, especialmente a la obesidad ($p=0.129$). La asociación de toma de fármacos de riesgo y presencia de diabetes o hiperlipemia resultó ser estadísticamente significativa ($p=0.037$ y $p=0.010$, respectivamente).

No se encontró **ningún factor de riesgo** reconocido para la EHNA en 7 pacientes (8%). El 87% de ellos eran varones ($p=0.003$), incrementándose la frecuencia del sexo femenino paralelamente al número de factores de riesgo asociados. No se hallaron diferencias significativas con relación a la edad, si bien se observó que ésta era mayor según aumentaba el número de condiciones de riesgo presentes en un mismo individuo (1 condición de riesgo: 35 ± 0.5 años; 4 condiciones: 55 ± 5 años).

Con respecto a otros factores, cuyo papel patogénico es incierto pero que cada vez se describen con mayor frecuencia en los enfermos con EHNA, el 29% de sujetos presentaban entre sus antecedentes **hipertensión arterial** (25 individuos) y

el 26% **hiperuricemia** (22 casos). La mayoría de pacientes con EHNA e hipertensión arterial eran mujeres (48% vs. 52%; $p=0.001$), mientras que un 92% de los hiperuricémicos pertenecían al sexo masculino (92.31% vs. 7.69%; $p=0.016$).

Siete pacientes (8%) cumplían los criterios diagnósticos del “**síndrome X**” (diabetes y dos o más de los siguientes: $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$; HTA; Triglicéridos $> 150 \text{ mg/dl}$ y/o HDL-colesterol $< 35 \text{ mg/dl}$). Además, entre los 41/85 pacientes sin diabetes conocida en quienes se efectuó el test de tolerancia oral a la glucosa, 10 (24%) fueron diagnosticados también de síndrome X (2 diabéticos, 4 intolerantes a la sobrecarga con glucosa, 4 con hiperinsulinemia normoglucémica). La presencia del síndrome X se asoció de forma significativa al sexo femenino (86% vs. 14%; $p=0.001$) y a una edad más avanzada (57 ± 5 años vs. 40 ± 12 años; $p=0.0001$). No se encontró la asociación descrita entre hiperuricemia y dicho síndrome ($p=0.334$).

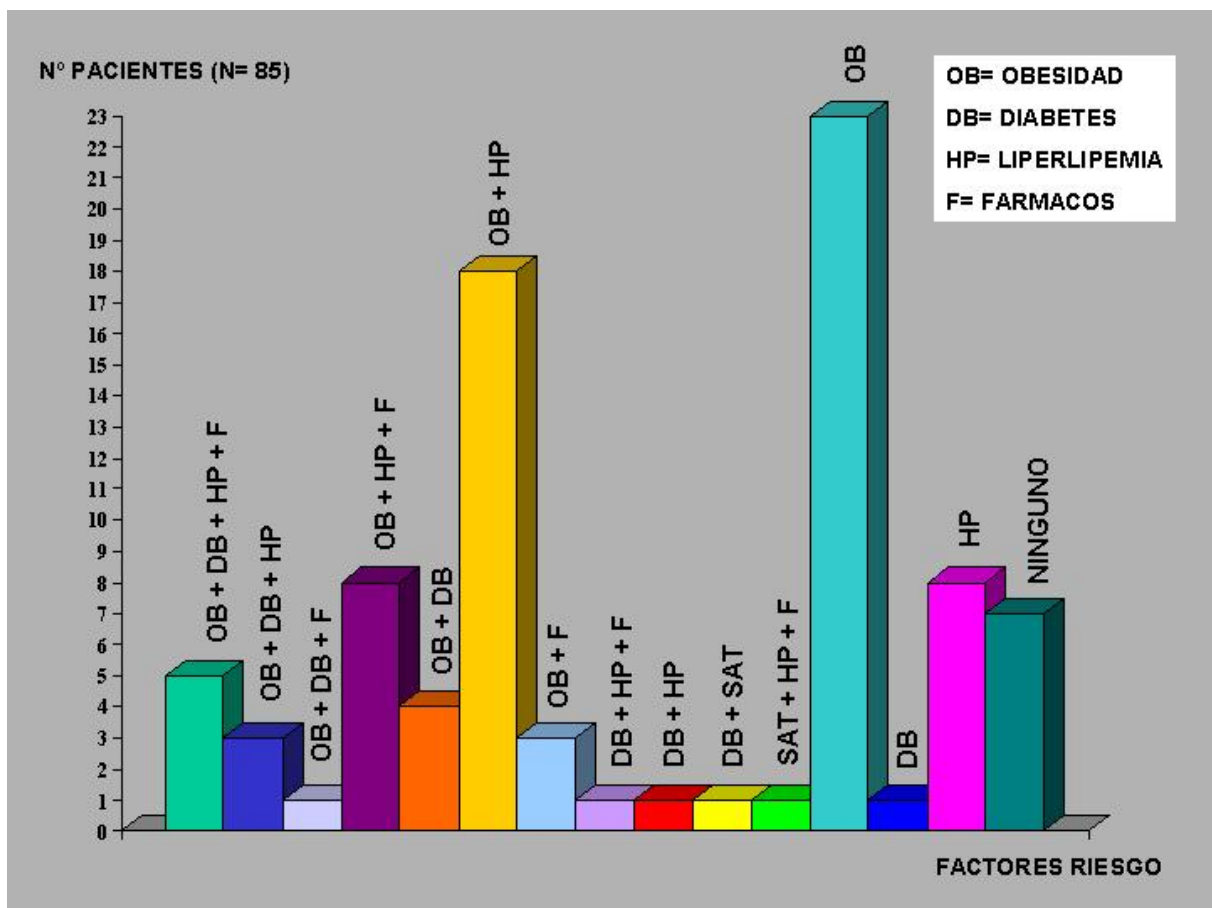


Figura 30. Factores de riesgo para EHNA hallados en los 85 pacientes

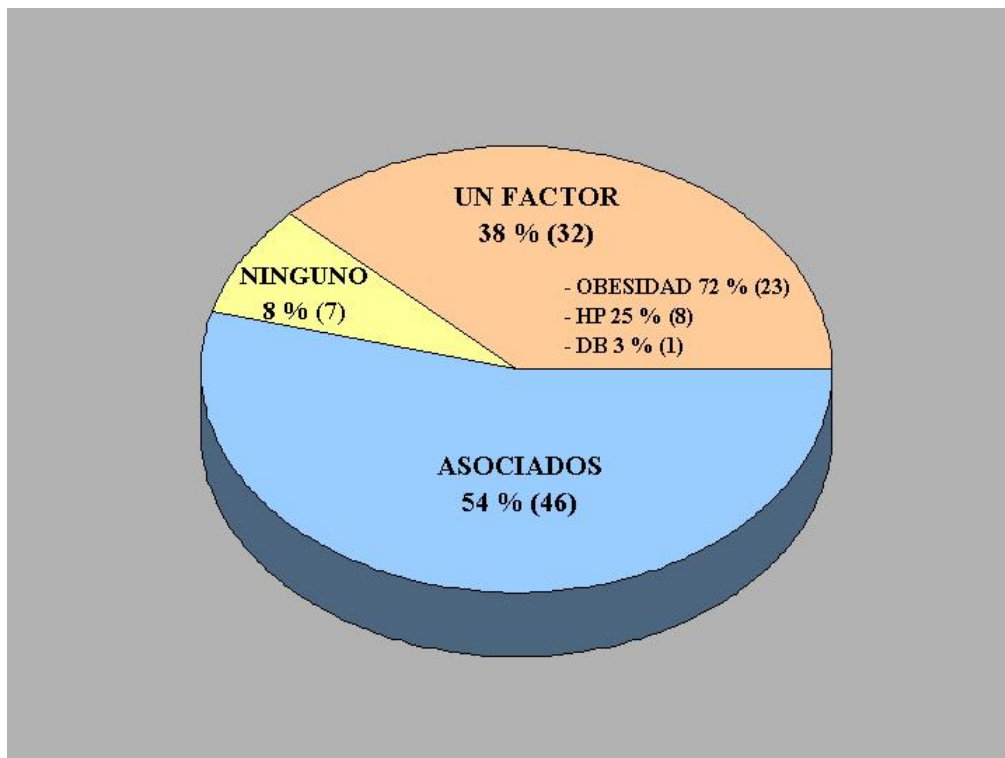


Figura 31. Distribución de los factores de riesgo para EHNA en los 85 pacientes

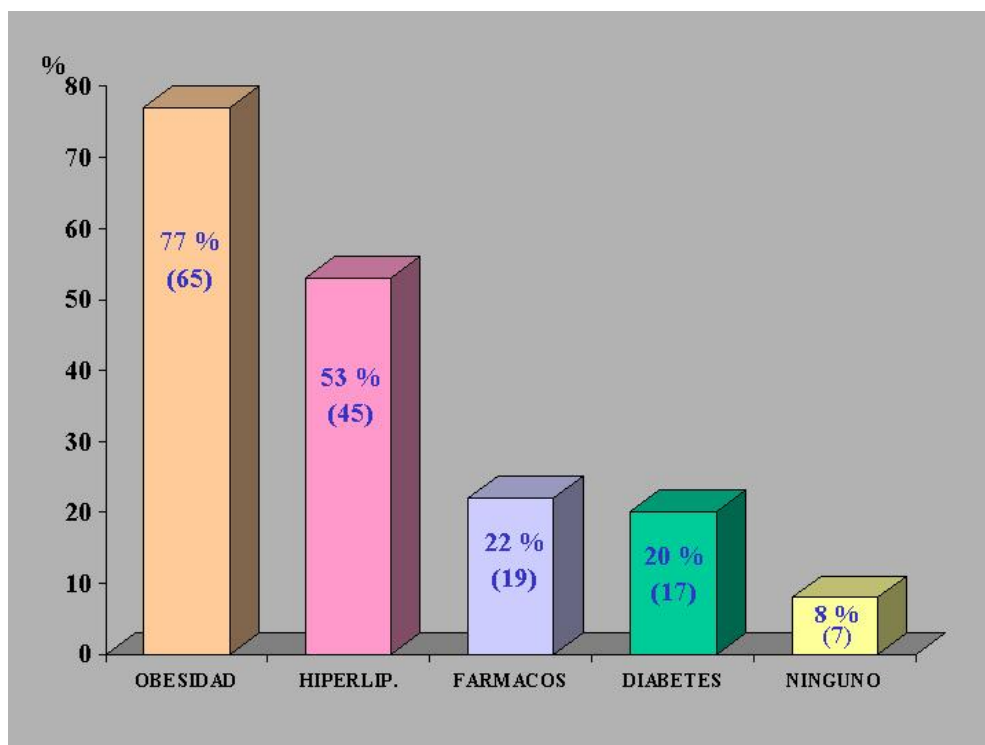


Figura 32. Frecuencia de los distintos factores de riesgo para EHNA obtenida en los 85 pacientes

II. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y EXPLORACIÓN FÍSICA

El 85% de los 85 pacientes con EHNA estaba asintomático. Entre los enfermos con algún síntoma, la molestia en hipocondrio derecho fue la más frecuente (54%), seguido de la astenia (38%) y del prurito (8%).

En sólo 13 sujetos (15%) se encontraron algún signo patológico en la exploración física. Entre ellos, la hepatomegalia fue el hallazgo más frecuente: 10 pacientes. En 2 enfermos se observaron estigmas cutáneos de hepatopatía crónica. Un último paciente presentaba esplenomegalia como signo de hipertensión portal.

III. DATOS DE LABORATORIO

En la **bioquímica hepática** se encontraron valores de ALT por encima de la normalidad (>45 U/L) en 77 casos (91%), de AST (>45 U/L) en 24 (28%), de GGT (>52 U/L) en 43 (51%) y de fosfatasa alcalina (>295 U/L) en 4 (5%). El cociente AST/ALT resultó menor de 2 en los 85 enfermos y menor de uno en 82 (96%). Presentaban hiperbilirrubinemia (>1 mg/dl) 8 sujetos (10%). Otros parámetros de **función hepatocelular**, como la tasa de protrombina (>70%) y el valor de la albúmina sérica (>3,5 mg/dl), resultaron estrictamente normales en todos los casos. La colinesterasa estaba disminuida (<3.000U/L) en 4 casos (10%). Ningún paciente presentaba anemia (Hb<12 g/dl) ni leucopenia (leucocitos<3,500/L). Se halló trombopenia (plaquetas<150,000/mm³) en 6 casos (7%) y macrocitosis (VCM>100fl) en 2 (2.5%). Cinco sujetos (7%) tenían hipergammaglobulinemia (>24g/dl).

Con respecto al **estudio etiológico de hipertransaminasemia crónica**, los valores plasmáticos de α 1-antitripsina, cobre y ceruloplasmina, así como la determinación de cobre y porfirinas en orina, resultaron normales en todos los casos (un sujeto presentaba hipoceruloplasminemia leve, con cupremia y cupruria dentro de la normalidad). Todos los pacientes presentaban anticuerpos para el VHC negativos; 6 enfermos (7%) tenían serología de inmunización para el VHB (anti-HBs positivo), pero el AgHBs era negativo en los 85 casos. En el estudio de

autoinmunidad, 2 pacientes tenían ANA positivos, a título 1/80 y 1/160 respectivamente, y 8 individuos presentaban AML, con un título de 1/20 en 6 casos y de 1/40 y 1/160 en los 2 restantes; los AMC y a-LKM fueron negativos en todos los sujetos.

En cuanto a los resultados del estudio de las **lipoproteínas y apoproteínas**, se obtuvo un valor por debajo de la normalidad para la apo-B en un caso (1.4%), mientras que la apo-A tenía un valor dentro del rango normal en todos los pacientes. Al analizar las fracciones HDL y LDL del colesterol, 15 sujetos (22%) tenían valores de HDL-colesterol y 20 (29%) de LDL-colesterol de reconocido riesgo cardiovascular (HDL<35 mg/dl; LDL>160 mg/dl). La mayoría de enfermos con cifras de lipoproteínas de riesgo eran varones (14:1 en el caso de la HDL y 13:7 en el de la LDL), siendo la edad menor para aquellos con valores de HDL de riesgo (36.46 ± 8.33 vs. 41.12 ± 12.03) y mayor para aquellos con valores de LDL elevados (45 ± 11.61 vs. 38.90 ± 12.06). No se encontraron diferencias importantes en el IMC entre aquellos pacientes con o sin hiperlipemia ni entre los que presentaban cifras de HDL o LDL-colesterol de riesgo cardiovascular.

En la Tabla 24 se reflejan los valores medios de los distintos parámetros analíticos estudiados en el grupo de los 85 pacientes con EHNA.

Tabla 24. Determinaciones analíticas generales, de función hepática, y de estudio de hepatopatía en nuestra serie de 85 pacientes con EHNA

DATOS ANALITICOS	X ± DS	RANGO	MEDIANA
Hemoglobina (g/dl)	15.4 ± 1.0	13.2-18.7	14.6
Leucocitos (x 10 ⁹ /l)	7,134 ± 1,625	4,400-11,200	6,200
Plaquetas (x 10 ³ /μl)	224 ± 55	100-358	224
Actividad de protrombina (%)	96.4 ± 9.3	69-120	100
Albúmina (g/dl)	4.9 ± 0.4	3.9-5.7	5
Bilirrubina (mg/dl)	0.7 ± 0.3	0.2-2.1	0.5
AST (U/L)	45.4 ± 28.6	19-166	37
ALT (U/L)	90.3 ± 58.4	32-422	74
AST / ALT	0.5 ± 0.2	0.25-1.4	0.5
GGT (U/L)	76.9 ± 67.5	1 8-344	39
F.Alcalina (U/L)	171.3 ± 74.6	60-489	155
Glucosa (mg/dl)	109 ± 36	72-327	99
Acido úrico (mg/dl)	6.13 ± 3	3.2-9.9	6.2
Colesterol total (mg/dl)	211 ± 49	95-370	203
Triglicéridos (mg/dl)	158.6 ± 82	52-411	131
HDL-Colesterol (mg/dl)	43.4 ± 11.6	27-93	35
LDL-Colesterol (mg/dl)	139.2 ± 45.1	23-298	103
VLDL-Colesterol (mg/dl)	27.4 ± 18.2	5-82	19
VLDL-Trigliceridos (mg/dl)	83.9 ± 66.2	21-325	29
Apoproteína A (mg/dl)	158.2 ± 34.7	112-299	150
Apoproteína B (mg/dl)	130.1 ± 39.3	152-249	112
Gammaglobulinas (g/dl)	18.0 ± 3.6	12-29	17
Colinesterasa (U/L)	11645 ± 2924	10144-17670	11460
α1-Antitripsina (mg/100)	143.2 ± 45.6	70-348	126
Cobre (μg/dl)	96.5 ± 18.3	64-165	106
Ceruloplasmina (mg/dl)	33.4 ± 13.6	16-126	31
Hierro (μg/dl)	103.4 ± 34.4	42-212	101
Ferritina (ng/dl)	273.7 ± 208.2	15-993	213
Saturación de transferrina (%)	30.5 ± 10.7	10-69	30
VCM (fI)	89.3 ± 5	80-109	87
CDT (U/L)	14.6 ± 4	6.1-21	16

Al comparar el valor de los enzimas hepáticos según los factores de riesgo para la EHNA (Tabla 25), se encontró que los valores de ALT eran significativamente mayores en aquellos pacientes con EHNA e hiperlipemia (p=0.01). No se hallaron diferencias significativas en las cifras de enzimas hepáticos en relación con el sexo, la existencia de diabetes, obesidad, o toma de fármacos de riesgo. Los dos casos con SAT presentaban cifras de GGT significativamente menores (p=0.0001).

Tabla 25. Enzimas hepáticas y factores de riesgo en 85 pacientes con EHNA

FACTOR RIESGO	AST	ALT	GGT	FA
n	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)
Varones (63)	43 ± 24	89 ± 42	78 ± 67	162 ± 72
Mujeres (22)	52 ± 37	94 ± 90	75 ± 68	192 ± 75
	p=0.3	p=0.7	p=0.8	p=0.07
Obesidad (65)	44 ± 25	89 ± 48	82 ± 70	176 ± 80
No-obesidad (20)	50 ± 39	96 ± 85	59 ± 55	152 ± 48
	p=0.5	p=0.7	p=0.1	p=0.1
Hiperlipemia (45)	52 ± 34	98 ± 71	83 ± 70	179 ± 84
No-hiperlip. (40)	38 ± 18	82 ± 38	70 ± 65	162 ± 63
	p=0.01	p=0.1	p=0.3	p=0.3
Diabetes (17)	50 ± 30	85 ± 58	76 ± 73	192 ± 87
No-diabetes (68)	44 ± 28	92 ± 59	77 ± 66	166 ± 71
	p=0.5	p=0.6	p=0.9	p=0.2
Fármacos (19)	58 ± 40	114 ± 99	94 ± 77	205 ± 107
No-fármacos (66)	42 ± 23	83 ± 38	72 ± 64	161 ± 59
	p=0.1	p=0.2	p=0.2	p=0.1
SAT (2)	100 ± 93	232 ± 268	37 ± 2	158 ± 60
No-SAT (83)	44 ± 25	86 ± 46	78 ± 68	172 ± 75
	p=0.5	p=0.5	p=0.0001	p=0.8

IV. ULTRASONOGRAFÍA ABDOMINAL

En 58 de los 85 pacientes (68%) se observó alguna alteración en la ecografía abdominal. El dato hallado con mayor frecuencia fue la hiperecogenicidad hepática o “patrón brillante”, observado en 55 pacientes (65%). En otros 3 casos existían datos de HTP como dilatación del eje esplenoportal y esplenomegalia.

V. HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Los hallazgos morfológicos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 26. Características histopatológicas del hígado en los 85 pacientes con EHNA

CILINDRO HEPATICO		
Tamaño (mm)		14 ± 5.4
Espacios porta (nº)		8 ± 3.7
		<u>n</u> (<u>%</u>)
ESTEATOSIS		
<u>Tipo:</u>	Macrovesicular	26 (31)
	Microvesicular	0 (0)
	Mixta	59 (69)
<u>Localización:</u>	Centrolobulillar	64 (75)
	Difusa	21 (25)
<u>Grado:</u>	1 (0-10%)	13 (15)
	2 (10-25%)	21 (25)
	3 (25-50%)	23 (27)
	4 (>50%)	28 (33)
INFLAMACION (GRADO)		
<u>Lobulillar</u>	L0	1 (1)
	L1	46 (54)
	L2	29 (34)
	L3	4 (5)
	L4	5 (6)
<u>Portal-periportal</u>	P0	35 (41)
	P1	33 (39)
	P2	10 (12)
	P3	7 (8)
	P4	0 (0)
FIBROSIS (ESTADIO)		
	F0	30 (35)
	F1	42 (50)
	F2	7 (8)
	F3	6 (7)
	F4	0 (0)
NUCLEOS CLAROS		61 (72)
LIPOGRANULOMAS		58 (68)
CUERPOS ACIDOFILOS		35 (41)
HIALINA DE MALLORY		17 (20)
MEGAMITOCONDRIAS		17 (20)
SIDEROSIS	0	69 (81)
	1	13 (16)
	2	2 (2)
	3	1 (1)
	4	0 (0)

Todos los pacientes presentaban esteatosis, cambio hidrópico e inflamación en distintos grados:

La **esteatosis** era del tipo mixto, macro-microvesicular, en la mayoría de los casos (69%) y macrovesicular en el resto (31%); no encontramos ningún caso de esteatosis microvacuolar aislada. La distribución de la infiltración grasa era fundamentalmente centrolobulillar (75%) o difusa (25%). Al analizar la severidad de la esteatosis, según los 4 grados previamente establecidos, se obtuvo una puntuación media de 2.7 ± 1 , siendo la mediana de 3 (25-50% de hepatocitos con grasa). No se halló asociación estadística entre el tipo de esteatosis y su localización ($p=0.186$). La esteatosis macrovacuolar analizada de manera independiente era intensa, afectando como media al 33% de hepatocitos (rango = 5-80%; mediana: 25%). La microesteatosis era leve en todos los casos (media: 6%; rango = 0-30%; mediana: 5%).

La **actividad inflamatoria** global, considerada como la suma de la lobulillar (L) y portal-periportal (P), resultó ser de intensidad leve en la mayoría de los casos, con una media de 1.2 ± 0.7 puntos y una mediana de 1. El 54% de enfermos presentaba una *actividad inflamatoria lobulillar* poco intensa (L1), con neutrófilos sinusoidales y escaso cambio hidrópico (puntuación media de 1.6 ± 0.8 ; mediana de 1). También la mayoría de los pacientes presentaban escaso *infiltrado inflamatorio portal* (41% con P0 y 39% con P1), con una media de 0.87 ± 0.9 y mediana de 1. Se encontró *infiltrado periportal*, P2 ó P3, en el 12 y 8% de enfermos, respectivamente. Ningún caso presentaba un infiltrado periportal intenso (P4).

El **estadio** de fibrosis (F) tenía una puntuación media de 0.87 ± 0.8 , con una mediana de 1. El 50% de los hígados estudiados presentaban fibrosis sinusoidal en la zona 3 (F1). La fibrosis estaba ausente en el 35% de casos (F0). Ningún enfermo se encontraba en un estadio de cirrosis (F4).

Con respecto a **otros hallazgos morfológicos** asociados frecuentemente a la EHNA, se observaron *núcleos glucogenados* en 61 casos (72%), *lipogranulomas* en 58 (68%), *cuerpos acidófilos* en 35 (41%), *mitocondrias gigantes* en 17 (20%) e

hialina de Mallory en 17 (20%). La distribución de los núcleos glucogenados fue periportal o difusa con una frecuencia similar (51 y 49%, respectivamente). Hallamos *siderosis* hepática en 16 pacientes (19%), aunque en la mayoría de los casos en cantidad leve (13 pacientes con grado 1; 2 con grado 2; 1 con grado 3; 0 pacientes con grado 4). En la mayoría de los casos el hierro tenía una distribución hepatocitaria o mixta, hepatocitaria-Kupfferiana, (7 y 6 casos respectivamente). El único caso con *siderosis* severa tenía una distribución mixta y todos aquellos con depósito en las células de Kupffer eran leves.

Al comparar el valor de las lesiones histológicas hepáticas según los factores de riesgo para EHNA, se obtuvo una asociación muy significativa entre el sexo femenino y el estadio de fibrosis (varones: 1.71 ± 0.72 ; mujeres: 2.31 ± 0.9 ; $p=0.008$). También se encontró dicha asociación entre la diabetes y la severidad de la lesión histológica, tanto en el estadio de fibrosis ($p=0.001$) como en la inflamación, lobulillar ($p=0.02$) y portal-periportal ($p=0.01$). Sin embargo, no se halló relación entre la presencia de diabetes y la severidad o el tipo de esteatosis. No se encontró ninguna asociación significativa para el resto de condiciones de riesgo (obesidad, hiperlipemia, toma de fármacos) (Tabla 27).

Tabla 27. Lesiones histológicas y factores de riesgo en 85 pacientes con EHNA

	Esteatosis (1-4) X ± DS	Macrov (%) X ±DS	Microv (%) X ±DS	L (0-4) X ±DS	P (0-4) X ±DS	F (0-4) X ±DS
Diabetes (17)	2.9±1	34±22	6.4±5	2.1±1.1	1.5±1.1	1.7±1.1
No-diabet. (68)	2.7±1	32±22	6.2±7	1.4±0.7	0.7±0.8	0.6±0.5
	p=0.5	p=0.7	p=0.8	p=0.02	p=0.001	p=0.002
Obesidad (65)	2.7±1	31±21	5.9±7	1.5±0.8	0.8±0.9	0.87±0.8
No-obesos (20)	2.9±1	38±25	7.3±7	1.7±0.9	0.9±0.8	0.85±0.8
	p=0.4	p=0.2	p=0.4	p=0.5	p=0.6	p=0.8
Hiperlipem. (45)	2.6±1	30±19	5.9±7	1.6±0.8	0.8±0.9	0.9±0.8
No-hiperlipe(40)	2.9±1	36±24	6.6±6	1.5±0.8	0.9±0.9	0.7±0.8
	p=0.3	p=0.2	p=0.6	p=0.7	p=0.4	p=0.3
Fármacos (19)	2.6±1	30±22	4.5±6	1.7±1	0.9±1.1	1.0±1
No-fármaco (66)	2.8±1	33±22	6.7±7	1.5±0.7	0.8±0.8	0.8±0.7
	p=0.5	p=0.5	p=0.1	p=0.3	p=0.7	p=0.3

Esteatosis: grados 1-4; **Macrov:** macrovesicular; **Microv:** microvesicular; **L:** actividad inflamatoria lobulillar (severidad de 0 a 4); **P:** actividad inflamatoria portal-periportal (severidad de 0 a 4); **F:** estadio (severidad de 0 a 4).

VI. DETERMINACIONES EN TEJIDO HEPÁTICO DE CARNITINA, CARNITIN-PALMITOIL-TRANSFERASA Y DE LA ACTIVIDAD DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

- CARNITINA Y CARNITIN-PALMITOIL-TRANSFERASA (CPT)

No se encontraron variaciones estadísticamente significativas en el contenido hepático de carnitina total ni de carnitina libre entre los pacientes con EHNA y los controles. Al determinar la carnitina esterificada con ácidos grasos, se obtuvo un

aumento significativo de los ésteres de carnitina de cadena larga en los enfermos al comparar con los controles y una disminución de los ésteres de cadena corta en los enfermos con EHNA comparado con los controles.

Por otro lado, la actividad hepática de la CPT en los pacientes con EHNA no fue diferente de la de los controles (Tabla 28; Figura 33, pág.170).

Tabla 28. Contenido hepático de carnitina y CPT

	PACIENTES EHNA n = 26	CONTROLES n = 14	p
CT	8.73 ± 2.15	10.5 ± 3.0	0.364
CL	5.49 ± 1.96	6.16 ± 2.9	0.315
CCL	0.60 ± 0.33	0.38 ± 0.22	0.043
CCC	2.48 ± 1.24	3.81 ± 1.25	0.012
CPT	5.54 ± 1.38	5.93 ± 1.27	0.371

CT: carnitina total; **CL:** carnitina libre; **CCL:** ésteres de carnitina de cadena larga; **CCC:** ésteres de carnitina de cadena corta; **CPT:** carnitin-palmitoil-transferasa. **Unidades:** carnitina y ésteres (nmol/mg); CPT (nmol/min/mg).

- CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM)

En el grupo de pacientes con EHNA la actividad de todos los complejos enzimáticos de la CRM estaba reducida de forma significativa con respecto a los controles (Tabla 29).

Tabla 29. Actividad hepática de los complejos de la CRM en la EHNA y controles

COMPLEJO		EHNA	CONTROLES	
CRM (n ₁ /n ₂)		n ₁ =18	n ₂ =11	p
I	(7/11)	23.5 ±10	36.3 ±6.2	0.004
II	(8/10)	24.3 ±6.2	36.8 ±8.8	0.002
III	(15/10)	34.0 ±12.3	49.0 ±11.1	0.005
IV	(16/10)	20.7 ± 4.8	34.8 ±11.0	0.002
V	(3/4)	60.0 ± 16.0	132.4 ±34.2	0.02

Unidades: nmol min⁻¹ mg⁻¹ NCP/nmol min⁻¹ mg⁻¹ CS

La actividad del *complejo I* (NADH CoQ₁ oxidoreductasa) estaba disminuida al 64% con respecto a la normalidad; la del *complejo II* (Succinato CoQ₀ oxidorreductasa) al 65%; la del *complejo III* (QH₂-Ubiquinol citocromo C reductasa) al 69%; la del *complejo IV* (Citocromo C oxidasa) al 59% y la del *complejo V* (ATPasa) al 45% (Figura 34; pág.170). Además, la mayoría de los pacientes con EHNA tenía un valor para cada uno de los complejos inferior a la media menos una desviación estándar (el 80% de los enfermos en el caso del complejo I; el 75% en el caso del II; el 45% para el III; el 85% en el IV y todos los pacientes en el caso del complejo V).

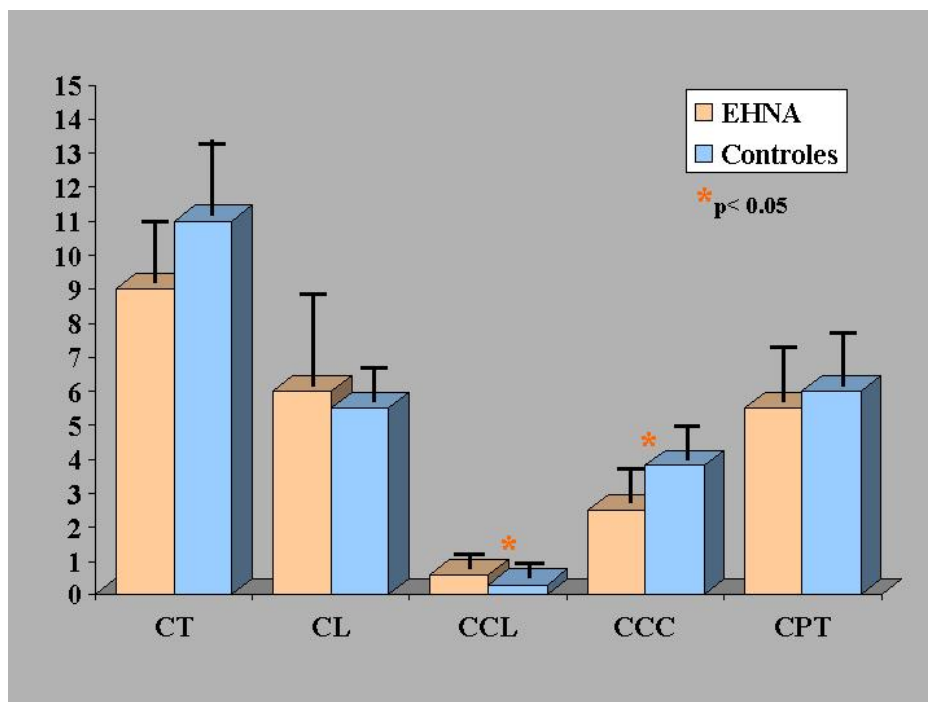


Figura 33. Concentración hepática de carnitina total (CT), carnitina libre (CL), ésteres de carnitina de cadena larga (CCL), ésteres de carnitina de cadena corta (CCC), y carnitin-palmitoil-transferasa (CPT). Unidades: nmol/mg para CT, CL, CCL y CCC; nmol/min/mg para CPT. * $p < 0.05$

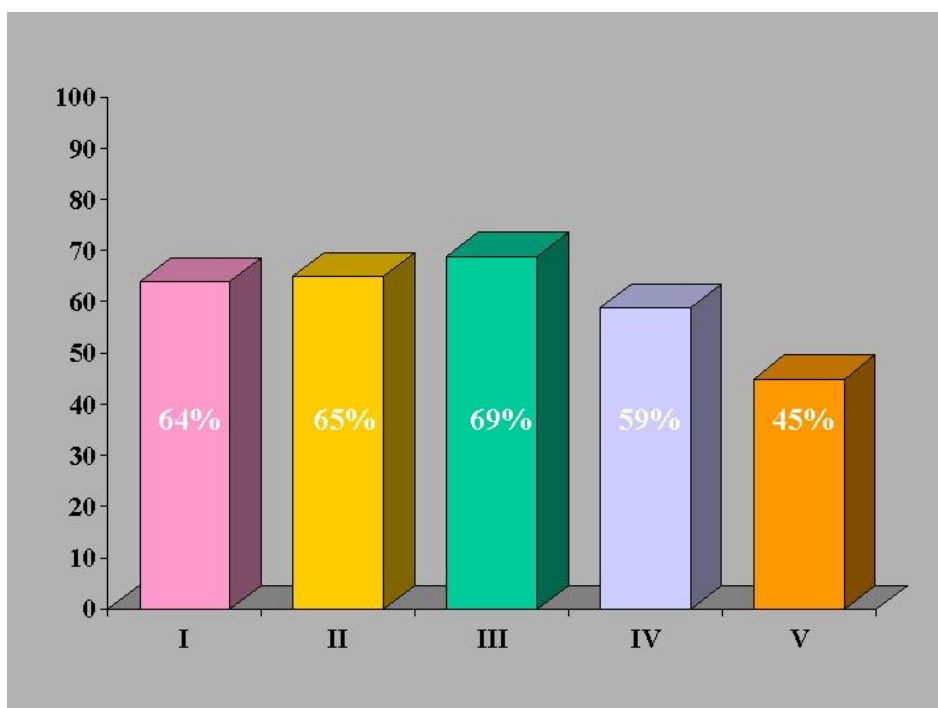


Figura 34. Actividad porcentual de los complejos de la CRM en los pacientes con EHNA comparado con los individuos controles

VII. ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN LA EHNA: TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA, INSULINEMIA, PÉPTIDO C, GLUCAGÓN. ÍNDICES DE INSULINA

- TEST DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA

En 41 de los 85 casos con EHNA se efectuó el test de tolerancia oral a la glucosa y el resultado fue normal en 31 pacientes (75%), mientras que apareció algún tipo de intolerancia en los 10 sujetos restantes (25%). Dicha intolerancia consistió en *intolerancia a la sobrecarga con glucosa* en 5 (12%), *intolerancia a la glucosa en ayunas* en 2 (5%) y *diabetes* en 3 casos (8%). El 70% de los sujetos pertenecían al sexo masculino en ambos grupos y la edad era mayor entre los intolerantes, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. (45 ± 14 años vs. 40 ± 12 años; $p=0.352$). La obesidad estaba presente en un alto porcentaje de sujetos en ambos grupos (en el 60% de intolerantes y en el 90% de normotolerantes).

- DETERMINACIÓN PLASMÁTICA EN AYUNAS DE GLUCEMIA, INSULINA, PÉPTIDO C Y GLUCAGÓN EN PACIENTES Y CONTROLES

El grupo de 41 pacientes con EHNA presentaba una **glucemia** basal significativamente mayor que el grupo de 22 sujetos sanos: 95 ± 15 mg/dl, rango: 66-147 mg/dl vs. 82 ± 10 mg/dl, rango: 66-104 mg/dl; $p=0.0008$.

Existía **hiperinsulinemia** ($IRI > 15 \mu\text{U/ml}$) en el 56% de los pacientes con EHNA (23/41 enfermos), mientras que los 22 individuos utilizados como controles presentaban cifras normales ($IRI < 15 \mu\text{U/ml}$). Además, al comparar los valores medios de insulina entre ambos grupos, se hallaron valores significativamente mayores entre los pacientes (EHNA: $16.16 \pm 7.6 \mu\text{U/ml}$, rango: 5-37 $\mu\text{U/ml}$; controles: $7 \pm 3.3 \mu\text{U/ml}$, rango: 1.6-13.6 $\mu\text{U/ml}$; $p=0.0001$) (Tabla 30; pág.173). No se encontraron diferencias en la distribución según la edad ni el sexo entre los pacientes con EHNA hiperinsulinémicos y normoinsulinémicos.

El **péptido C** tenía un valor por encima de la normalidad (>4 ng/ml) en 11 de los 41 pacientes con EHNA (27%), mientras que era normal en todos los controles. El valor medio del péptido C en los pacientes fue de 3.6 ± 1.3 ng/ml (rango: 1.7-7.5 ng/ml), y en los controles de 1.9 ± 0.9 ng/ml (rango: 0.5-4 ng/ml), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$) (Tabla 30; pág.173).

Los valores del **glucagón** fueron similares en los 15 enfermos con EHNA en los que se cuantificó y en los 22 sujetos sanos (EHNA: 24.73 ± 7.18 pmol/l; control: 26.75 ± 6.94 pmol/l; $p=0.4$). Al determinar el **cociente insulina/glucagón** en ambos grupos, se comprobó que los pacientes con EHNA tenían un cociente significativamente más alto (EHNA: 4.9 ± 3.2 ; controles: 2.6 ± 1.2 ; $p=0.004$) (Tabla 30; pág.173).

- ÍNDICES DE INSULINORRESITENCIA, FUNCIÓN DE LA CÉLULA β -PANCREÁTICA Y EXTRACCIÓN HEPÁTICA DE LA INSULINA

- Pacientes con EHNA vs. controles

Con el fin de investigar si la hiperinsulinemia encontrada en los enfermos con EHNA podía justificarse por un aumento de la resistencia a la acción periférica de la insulina (\downarrow ratio glucosa / insulina), un incremento en la secreción de insulina por la célula β -pancreática (\downarrow ratio glucosa / péptido C) y/o por una disminución en la extracción hepática de la insulina (\downarrow ratio péptido C / insulina), en una primera fase se calcularon estos índices en el grupo de pacientes con EHNA y el grupo control y se analizaron los resultados. Esta comparación reveló que el grupo con EHNA tenía un aumento estadísticamente significativo en el índice de insulinoresistencia, un incremento en la síntesis pancreática de insulina y por último, una disminución en el metabolismo hepático de la insulina (Tabla 30).

Tabla 30. Valores de glucosa, insulina, péptido C e índices de insulina en pacientes con EHNA y controles

	EHNA n= 41	CONTROLES n = 22	p
G	95 ± 15	82 ± 10	0.0008
IRI	16.2 ± 7.6	7.0 ± 3.3	0.0001
PC	3.6 ± 1.3	1.9 ± 0.9	0.0001
G/IRI	55 ± 25	112.5 ± 58.4	0.0002
G/PC	4.9 ± 1.5	8.2 ± 3.8	0.0006
PC/IRI	11.4 ± 3.8	14 ± 4.8	0.034

G: glucemia basal (mg/dl); **IRI:** insulina (μ U/ml); **PC:** péptido C (ng/ml); **ratio G/IRI:** insulinoresistencia; **ratio G/PC:** síntesis pancreática de insulina; **ratio PC/IRI:** extracción hepática de insulina

- Pacientes con EHNA: Normotolerantes vs. intolerantes

En una segunda fase se evaluó si dentro del grupo de pacientes con EHNA existían diferencias en estos parámetros según que fuesen normotolerantes (n=31) o intolerantes (n=10) a la sobrecarga oral con glucosa. No se encontraron variaciones estadísticamente significativas en los valores de insulina, péptido C, ni en ninguno de los índices de insulina al comparar ambos grupos (Tabla 31). Existía hiperinsulinemia (IRI>15 μ U/ml) tanto en el subgrupo de enfermos intolerantes como en el del normotolerantes: 9/10 (90%) vs. 14/31 (45%). El péptido C estaba aumentado (>4 ng/ml) en 3 casos del grupo de intolerantes (30%) y en 8 del grupo de normotolerantes (26%).

Tabla 31. Valores de glucosa, insulina, péptido C e índices de insulina en pacientes con EHNA normotolerantes e intolerantes a la sobrecarga oral de glucosa

	NORMOTOLERANTES	INTOLERANTES	
	n = 31	n = 10	p
IRI	16.2 ± 7.9	15.7 ± 8.3	0.890
PC	3.5 ± 1.4	3.7 ± 1.4	0.713
G/IRI	54 ± 25	62 ± 27	0.420
G/PC	4.7 ± 1.5	5.2 ± 1.7	0.464
PC/IRI	11.5 ± 4.3	11.8 ± 2.8	0.789

IRI: insulina ($\mu\text{U/ml}$); **PC:** péptido C (ng/ml); **G:** glucemia basal (mg/dl); **ratio G/IRI:** insulinoresistencia; **ratio G/PC:** síntesis pancreática de insulina; **ratio PC/IRI:** extracción hepática de insulina

De manera global, el 59% de pacientes (24/41) mostraron alguna forma de alteración en el metabolismo de la glucosa/insulina: 7 (17%) intolerantes a la sobrecarga oral con glucosa, 3 diabéticos tipo 2 (8%) y 14 (34%) normotolerantes con hiperinsulinemia (Figura 35)

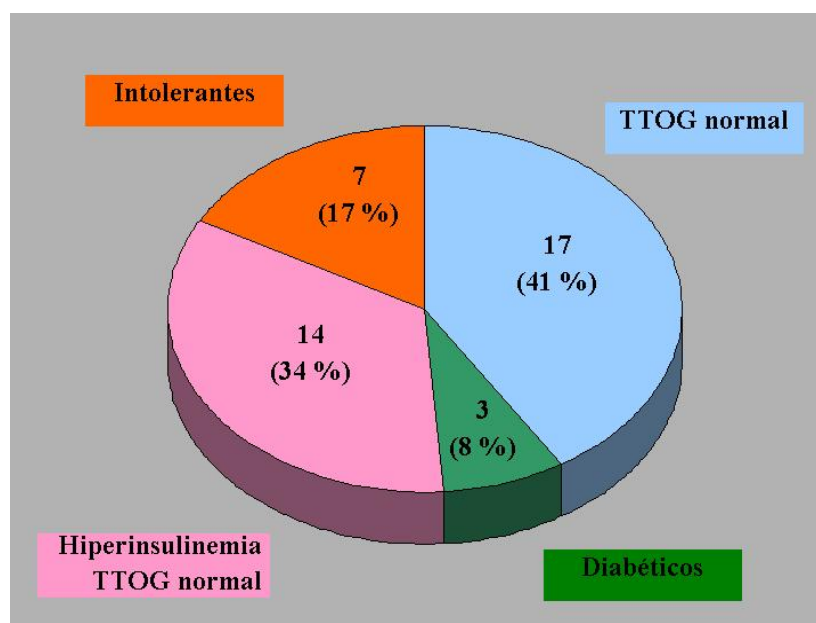


Figura 35. Distribución de la tolerancia a la glucosa en 41 pacientes con EHNA

- Pacientes con EHNA normo e intolerantes vs. controles

También se compararon de manera independiente los dos grupos de pacientes, normo e intolerantes, frente a los controles sanos. La insulinemia, los niveles de péptido C y los índices de insulinoresistencia y de síntesis pancreática de insulina estaban significativamente aumentados en ambos grupos de enfermos.

La comparación de *normotolerantes vs. controles* arrojó los siguientes valores: IRI= 16.2 ± 7.9 μ U/ml vs. 7 ± 3.3 μ U/ml, $p=0.0001$; PC= 3.5 ± 1.4 ng/ml vs. 1.9 ± 0.9 ng/ml, $p=0.0002$; G/IRI= 54.1 ± 25.5 vs. 112.5 ± 58.4 , $p=0.0002$; G/PC= 4.7 ± 1.5 vs. 8.2 ± 3.8 , $p=0.0005$.

Por otro lado, la comparación de *intolerantes vs. controles* resultó ser la siguiente: IRI= 15.7 ± 8.3 vs. 7 ± 3.3 μ U/ml, $p=0.0001$; PC= 3.7 ± 1.4 ng/ml vs. 1.9 ± 0.9 ng/ml, $p=0.003$; G/IRI= 62.0 ± 26.6 vs. 112.5 ± 58.4 , $p=0.002$; G/PC= 5.2 ± 1.7 vs. 8.2 ± 3.8 , $p=0.004$.

El índice que expresa el metabolismo hepático de la insulina (PC/IRI) era similar en el grupo de enfermos intolerantes y el de los controles (11.8 ± 2.8 vs. 14 ± 4.8 ; $p=0.1$), mientras que el grupo de los tolerantes lo mantenía significativamente alterado (11.5 ± 4.3 vs. 14 ± 4.8 ; $p=0.046$).

- Pacientes con EHNA e hiperinsulinemia vs. normoinsulinemia

También se comparó el subgrupo de pacientes con EHNA e hiperinsulinemia (IRI >15 μ U/ml) con el subgrupo de pacientes con EHNA e insulinemia en rango normal (IRI <15 μ U/ml) (Tabla 32).

El grupo de pacientes hiperinsulinémicos tenía valores más elevados de péptido C y mayor insulinoresistencia y síntesis de insulina, así como una disminución en el metabolismo hepático de la insulina.

Tabla 32. Péptido C y cocientes de insulina en pacientes con EHNA hiperinsulinémicos y normoinsulinémicos

	HIPERINSULINEMICOS (IRI > 15 μU/ml) n = 23	NORMOINSULINEMICOS (IRI < 15 μU/ml) n = 18	p
PC	4.36 \pm 1.39	2.84 \pm 0.77	0.0001
G/IRI	39.2 \pm 12.6	71.6 \pm 23.5	0.0001
G/PC	4.2 \pm 1.5	5.48 \pm 1.3	0.008
PC/IRI	9.4 \pm 2	13.3 \pm 4.3	0.0005

IRI: insulina (μ U/ml); **PC:** péptido C (ng/ml); **G:** glucemia basal (mg/dl); **ratio G/IRI:** insulinoresistencia; **ratio G/PC:** síntesis pancreática de insulina; **ratio PC/IRI:** extracción hepática de insulina

- Pacientes con EHNA normoinsulinémicos vs. controles

También se investigó si los pacientes con EHNA y normoinsulinémicos (IRI < 15 μ U/ml) tenían alguna alteración en la homeostasis de la glucosa, a pesar de tener cifras normales de insulina. Para ello, se establecieron comparaciones entre este grupo y el de los controles sanos (Tabla 33).

Tabla 33. Péptido C y cocientes de insulina en pacientes con EHNA normoinsulinémicos y controles sanos

	PACIENTES CON EHNA NORMOINSULINEMICOS	CONTROLES	
	n = 18	n= 22	p
PC	2.84 ± 0.77	1.98 ± 0.86	0.001
G/IRI	71.6 ± 23.5	112.4 ± 58.4	0.005
G/PC	5.48 ± 1.3	8.2 ± 3.86	0.004
PC/IRI	13.3 ± 4.3	14 ± 4.8	0.6

PC: péptido C (ng/ml); **G:** glucemia basal (mg/dl); **IRI:** insulina (μ U/ml); **ratio G/IRI:** insulinoresistencia; **ratio G/PC:** síntesis pancreática de insulina; **ratio PC/IRI:** extracción hepática de insulina

Los resultados revelaron cifras de péptido C mayores en los pacientes con EHNA y normoinsulinemia que en los controles, aunque significativamente menores que las de los hiperinsulinémicos, así como un aumento en los índices de insulinoresistencia y de síntesis de insulina, aunque también menores que los de los hiperinsulinémicos. La extracción hepática de insulina, sin embargo, fue análoga en ambos grupos.

. Pacientes con EHNA y valores plasmáticos de péptido C elevados vs. normales

En los 11 pacientes con EHNA que tenían valores elevados de péptido C (>4 ng/ml), se encontró también hiperinsulinemia acompañada de insulinoresistencia y aumento de la síntesis de insulina, pero no se detectó en este grupo de pacientes una alteración en la extracción de la insulina por el hígado al comparar con el grupo de EHNA con péptido C normal (Tabla 34).

Tabla 34. Insulina y cocientes de insulina en pacientes con EHNA y niveles altos o normales de péptido C

	PC > 4 ng/ml n = 11	PC < 4 ng/ml n = 30	p
IRI	25.2 ± 7.7	12.9 ± 4.8	0.0003
G/IRI	33.5 ± 10.8	63.3 ± 24	0.0001
G/PC	3.2 ± 0.5	5.5 ± 1.3	0.0001
PC/IRI	10.4 ± 2.0	11.8 ± 4.3	0.1579

PC: péptido C (ng/ml); **IRI:** insulina (μ U/ml); **G:** glucemia basal (mg/dl); **ratio G/IRI:** insulinoresistencia; **ratio G/PC:** síntesis pancreática de insulina; **ratio PC/IRI:** extracción hepática de insulina

VIII. TEST DEL HIDRÓGENO ESPIRADO

El test del H₂ espirado resultó anormal (positivo) en 16 (29%) de los 56 pacientes con EHNA en quienes se efectuó la prueba, mientras que fue normal (negativo) en los 40 (71%) enfermos restantes.

Al comparar ambos subgrupos, no se encontraron variaciones estadísticamente significativas en cuanto a la edad, sexo, ni niveles de enzimas hepáticos entre aquellos pacientes con el resultado del test positivo o negativo (Tabla 35).

Tabla 35. Test del hidrógeno espirado y características epidemiológicas y de laboratorio en 56 pacientes con EHNA

	TEST H₂ (+) n=16	TEST H₂ (-) n=40	p
Edad (años)	41 ± 11	39 ± 11	NS
Sexo (v / m)	11 / 5	33 / 7	NS
AST (U/L)	50 ± 40	38 ± 17	NS
ALT (U/L)	97 ± 98	84 ± 35	NS
GGT (U/L)	67 ± 52	72 ± 60	NS
FA (U/L)	175 ± 90	172 ± 69	NS

Tampoco se halló asociación significativa entre la lesión histológica y el resultado de la prueba (Tabla 36).

Tabla 36. Test del hidrógeno espirado y lesiones histológicas hepáticas en 56 pacientes con EHNA

LESION HISTOLOGICA	TEST H₂ (+) n=16	TEST H₂ (-) n=40	p
Esteatosis (grado)	2.8 ± 1	2.7 ± 1	NS
E.Macrovesicular (%)	33 ± 20	31 ± 22	NS
E.Microvesicular (%)	6 ± 7	6 ± 6	NS
Inflamación (grado)			
Lobulillar	1.6 ± 1	1.4 ± 0.7	NS
Portal-peri.	0.9 ± 1	0.6 ± 0.7	NS
Fibrosis (estadio)	0,7 ± 0.8	0.7 ± 0.5	NS

Grado de esteatosis (0-4); %: porcentaje de hepatocitos con esteatosis macrovesicular /microvesicular; **grado de inflamación** (0- 4); **estadio de fibrosis** (0-4)

La mayoría de los enfermos con EHNA a quienes se les efectuó el test presentaban uno o varios factores de riesgo para la enfermedad: la obesidad estaba presente en el 79% de los pacientes, la hiperlipemia en el 51%, y el 20% tomaba algún fármaco de riesgo. No se encontró ningún factor etiológico conocido en 5 casos (9%). Al correlacionar la presencia de dichos factores con el resultado de la prueba, se obtuvo una asociación significativa entre la existencia de factores de riesgo y la positividad del test ya que los 5 pacientes sin ningún factor de riesgo, tenían un test de sobrecrecimiento bacteriano negativo. En el análisis multivariado, no se encontró ninguna asociación entre el resultado del test y la obesidad (OR: 1.7; IC: 0.3-9.4; $p=0.493$), pero sí entre un resultado positivo y la existencia de hiperlipemia (OR: 6.7; IC: 1.5-29.9; $p=0.01$) o toma de fármacos de riesgo (OR: 4.9; IC: 1.0-22.3; $p=0.037$) (Figura 36).

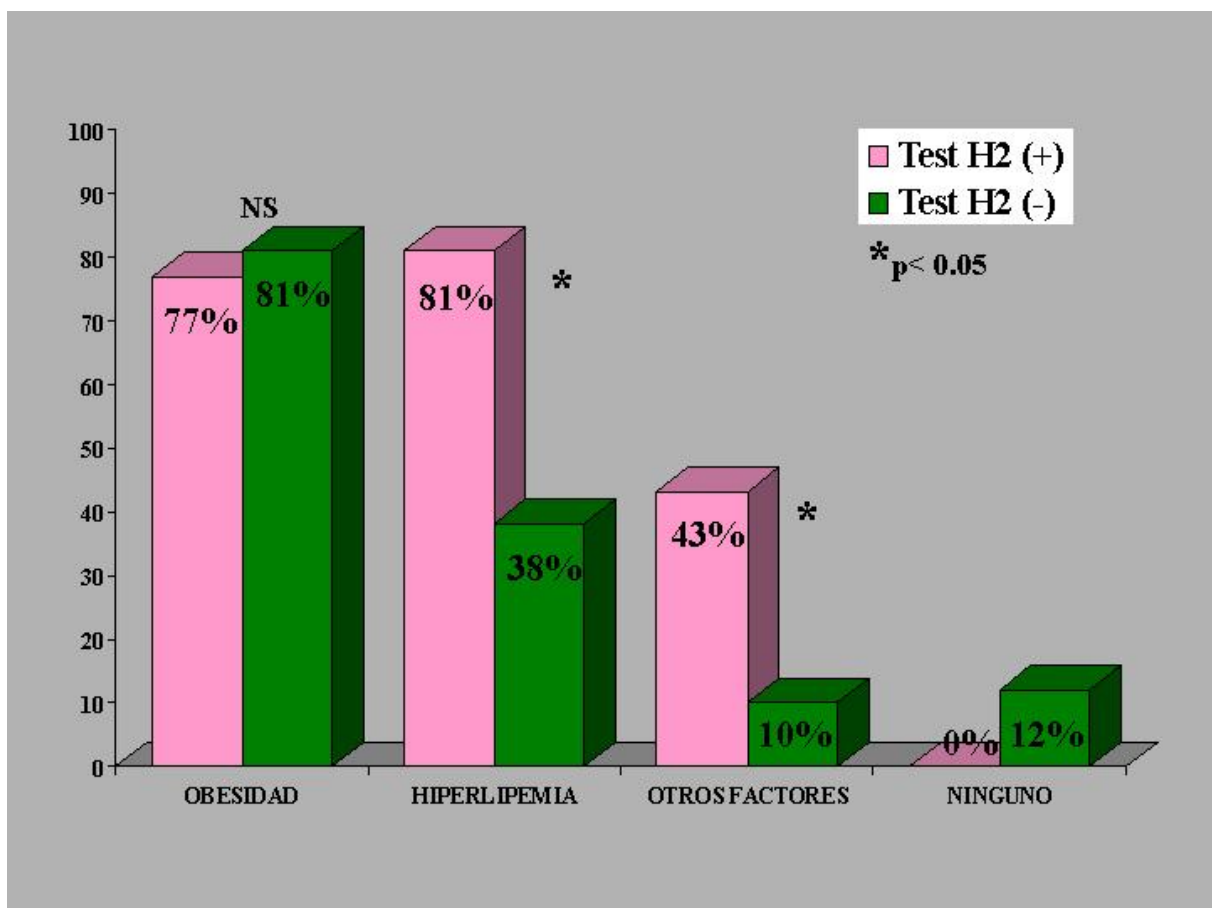


Figura 36. Test del H₂ espirado y factores de riesgo para la EHNA

IX. NIVELES DE TNF α EN SUERO

La concentración sérica de TNF α fue medida en 63 pacientes con EHNA y los valores obtenidos fueron: media: 24.4 \pm 15 pg/ml; rango: 5.4-88 pg/ml; mediana: 20 pg/ml. Solo 13 (21%) pacientes presentaban niveles séricos de TNF α por encima de la normalidad (>35 pg/ml). Como se expresa en la tabla siguiente, la tasa media de TNF α en suero y el número de pacientes con niveles por encima de la normalidad fueron similares en los pacientes con EHNA y test del H₂ positivo y negativo (Tabla 37).

Tabla 37. TNF α y test del hidrógeno espirado en 56 pacientes con EHNA

	TEST H ₂ (+) n=16	TEST H ₂ (-) n=40	p
TNF α (pg/ml)	22 \pm 10	25 \pm 17	NS
TNF α > 35 pg/ml	3 (21%)	8 (21%)	NS

No se halló asociación significativa entre los niveles séricos de TNF α y la existencia o no de diabetes u obesidad (tabla 38).

Tabla 38. TNF α y presencia de diabetes u obesidad en 63 pacientes con EHNA

	TNF α (pg/ml)	n	p
DIABETES	26 \pm 15	(12)	0.7
NO DIABETES	24 \pm 16	(51)	
OBESIDAD	23 \pm 14	(51)	0.07
NO-OBESIDAD	33 \pm 17	(12)	

X. PERFIL METABÓLICO DEL HIERRO. MUTACIONES DEL GEN DE LA HEMOCROMATOSIS (HFE)

- METABOLISMO DEL HIERRO

Entre los 85 pacientes con EHNA el valor sérico del hierro se encontraba por encima de la normalidad ($\geq 150 \mu\text{g/dl}$) en 8 individuos (9%). La ferritina estaba aumentada ($>200 \text{ ng/ml}$ en mujeres y $>300 \text{ ng/ml}$ en varones) en 28 de 76 pacientes con EHNA (37%), mientras que la saturación de la transferrina tenía un valor mayor del 45% en 3 de los 51 enfermos en los que se determinó (6%).

Los 51 pacientes con EHNA que tenían una determinación simultánea de la ferritina y de la saturación de la transferrina, fueron clasificados en tres grupos diferentes:

.Grupo 1; con ferritina y saturación de transferrina normales: 33 casos (65%).

.Grupo 2; con ferritina alta y saturación de transferrina normal: 15 casos (29%)

.Grupo 3; con ferritina y saturación de transferrina altas: 3 casos (6%)

No se encontró asociación significativa entre la alteración de los parámetros del hierro y la edad ni el sexo de los pacientes con EHNA. Tampoco se halló asociación significativa entre la presencia de obesidad o diabetes y los valores de ferritina sérica (tabla 39).

Tabla 39. Ferritina y presencia de diabetes u obesidad en 76 pacientes con EHNA

	FERRITINA (ng/ml)	n	p
DIABETES	260 \pm 244	(13)	0.8
NO DIABETES	276 \pm 202	(63)	
OBESIDAD	282 \pm 210	(60)	0.5
NO-OBESIDAD	242 \pm 203	(16)	

Sí se encontró una fuerte asociación entre los valores de ferritina y la presencia de siderosis hepática ($p=0.001$) y el estadio de la enfermedad ($p=0.04$). No se obtuvo asociación significativa con la severidad de la esteatosis ($p=0.5$) ni con la inflamación (lobulillar, $p=0.3$; portal-periportal, $p=0.8$) (tabla 40).

Tabla 40. Ferritina y lesión histológica (estadio de fibrosis y siderosis) en 76 pacientes con EHNA

	n	FERRITINA (ng/ml)	p
ESTADIO (F)	0 (28)	221 ± 135	0.04
	1 (38)	290 ± 219	
	2 (6)	248 ± 275	
	3 (4)	520 ± 298	
	4 (0)	-	
SIDEROSIS	0 (61)	215 ± 134	0.001
	1 (15)	512 ± 281	

Siderosis: 0-ausente; 1-presente

- MUTACIONES DEL GEN HFE

Las dos mutaciones del gen HFE (H63D y C282Y) descritas en la hemocromatosis genética fueron estudiadas en 60 pacientes con EHNA. Se encontró alguna mutación en 21 pacientes (35%). La mutación H63D estaba presente en los 21 casos: 18 en estado heterocigoto y 3 en estado homocigoto (Tabla 41). La mutación C282Y se detectó en un solo caso (2%), en estado heterocigoto, y asociada a la mutación H63D también en forma heterocigota. No se halló asociación entre el sexo y la presencia de alguna de las mutaciones.

Tabla 41. Mutaciones del gen HFE halladas en 60 pacientes con EHNA

H63D	N	(%)	C282Y	N	(%)
- / -	39	(65)	- / -	59	(98)
+ / -	18	(30)	+ / -	1	(2)
+ / +	3	(5)	+ / +	0	(0)

- / - (mutación ausente); + / - (portador heterocigoto); + / + (homocigoto)

Para estudiar la posibilidad de que existiera una asociación entre la presencia de alguna de las mutaciones del gen HFE y la alteración del perfil metabólico del hierro, se estudiaron a los 47 enfermos con EHNA que compartían la determinación de la ferritina y del gen HFE, reduciendo los 3 grupos de EHNA previamente establecidos a 2, según que el valor de ferritina fuera normal o alto (Tabla 42).

Tabla 42. Mutaciones del gen HFE y ferritina sérica en 47 pacientes con EHNA

MUTACION	FERRITINA NORMAL		FERRITINA ALTA	
H63D	n = 30	(%)	n = 17	(%)
- / -	20	(67)	11	(64)
+ / -	10	(33)	3	(18)
+ / +	0	(0)	3	(18)
MUTACION				
C282Y				
- / -	29	(97)	17	(100)
+ / -	1	(3)	0	(0)
+ / +	0	(0)	0	(0)

- / - (mutación ausente); + / - (portador heterocigoto); + / + (homocigoto)

El hallazgo más frecuente en ambos grupos fue la ausencia de mutaciones (el 67% en el grupo con ferritina normal y el 64% en el grupo con ferritina alta no presentaban la mutación H63D; el 97% y el 100% no tenían la mutación C282Y,

respectivamente). Presentaban alguna mutación para el gen HFE un porcentaje similar de pacientes de ambos grupos: el 33% de sujetos incluidos en el grupo con ferritina normal, y el 36% de los incluidos en el grupo con ferritina alta. En el grupo con ferritina normal no se encontró ningún caso homocigoto para ninguna de las dos mutaciones. Entre los 6 pacientes del grupo con ferritina alta que presentaban alguna mutación, la mitad eran homocigotos y la otra mitad heterocigotos para la mutación H63D; ninguno de ellos tenía la mutación C282Y. El único caso portador de la mutación C282Y pertenecía al grupo con ferritina normal.

XI. ALELOS HLA

En la Tabla 43 se han expresado el porcentaje y el número absoluto de los 57 pacientes con EHNA que presentaban cada uno de los alelos de clase I (HLA-A y HLA-B) y II (HLA-DR) analizados y la comparación de estos resultados con la población utilizada como control. No se encontró asociación de la EHNA con la presencia de ninguno de los múltiples alelos determinados.

Tabla 43. Alelos HLA-A, HLA-B, y HLA-DR en 57 pacientes con EHNA

HLA-A	PACIENTES EHNA n = 57		CONTROLES SANOS n = 176		p
	F.alélica (%)	n	F.alélica (%)	n	
A1	7.9	9	11.4	40	0.3
A2	20.2	23	22.4	79	0.6
A3	7.0	8	7.1	25	0.8
A11	10.5	12	7.9	28	0.5
A23	4.4	5	1.4	5	0.1
A24	9.6	11	7.1	25	0.5
A25	1.8	2	2.3	8	0.9
A26	6.2	7	5.9	21	0.8
A28	2.6	3	3.4	12	0.9
A29	6.2	7	8.8	31	0.5
A30	7.0	8	5.9	21	0.8
A31	2.6	3	1.7	6	0.8
A32	0.9	1	4.3	15	0.1
A33	2.6	3	3.1	11	0.9
A34	0	0	0.9	3	-
Ablanco	10.5	12	6.4	22	0.2

HLA-B	PACIENTES EHNA n = 57		CONTROLES SANOS n = 176		p
	F.alélica (%)	n	F.alélica (%)	n	
B7	11.4	13	7.1	25	0.2
B8	7.0	8	5.1	18	0.6
B13	2.6	3	3.4	12	0.9
B14	6.1	7	9.7	34	0.3
B18	6.1	7	8.2	29	0.6
B27	1.8	2	2.6	9	0.9
B35	8.8	10	6.5	23	0.5
B37	2.6	1	2.0	7	0.7
B38	4.4	5	1.4	5	0.1
B39	2.6	3	2.0	7	0.9
B44	13.2	15	14.5	51	0.8
B45	1.8	2	1.4	5	0.8
B49	5.3	6	3.7	13	0.6
B50	3.5	4	2.8	10	0.9
B51	7.9	9	7.1	25	0.9
B57	2.6	3	2.8	10	0.8
B58	0.9	1	1.1	4	0.7
B60	2.6	3	1.1	4	0.5
B61	0.9	1	1.1	4	0.7
B62	5.3	6	4.0	14	0.7
B52	0	0	2.0	7	-
B53	0	0	0.9	3	-
Bblanco	2.6	3	5.8	20	0.2
B63	0	0	0.3	1	-
B55	0	0	1.4	5	-
B41	0	0	1.1	4	-
B47	0	0	0.3	1	-
B70	0	0	0.6	2	-

HLA-DR	PACIENTES EHNA n = 57		CONTROLES SANOS n = 176		p
	F.alélica (%)	n	F.alélica (%)	n	
DR1	7.9	9	10.2	36	0.5
DR15	7.9	9	10.2	36	0.6
DR16	0.9	1	1.7	6	0.8
DR3	14.0	16	13.6	48	0.9
DR4	12.2	14	11.4	40	0.9
DR11	7.0	8	8.5	30	0.7
DR12	1.8	2	0	0	0.1
DR13	12.3	14	7.9	28	0.2
DR14	4.4	5	2.3	8	0.4
DR7	14.9	17	19.1	67	0.3
DR8	1.8	2	3.1	11	0.6
DR9	0.9	1	1.7	6	0.8
DR10	3.5	4	3.4	12	0.8
DRblanco	10.5	12	6.9	24	0.2

XII. CORRELACIONES

Al correlacionar los enzimas hepáticos con las diferentes lesiones elementales del hígado presentes en los 85 enfermos con EHNA, se observó que existía una asociación significativa entre el grado de actividad inflamatoria, fundamentalmente lobulillar, y los valores de AST y ALT ($p=0.02$ y $p=0.03$, respectivamente). También se encontró correlación entre el estadio de fibrosis y las cifras de AST ($p=0.03$). No se halló asociación estadística entre ningún enzima hepático y la severidad o el tipo de esteatosis (macro o microvesicular). Tampoco se encontró correlación con la siderosis hepática (Tabla 44).

Tabla 44. Coeficientes de correlación entre enzimas hepáticos y lesiones histológicas del hígado en 85 pacientes con EHNA

	AST	ALT	GGT	FA
ESTEATOSIS				
Severidad (grado)	0.113 ($p=0.300$)	0.147 ($p=0.178$)	-0.051 ($p=0.642$)	-0.217 ($p=0.060$)
Macrovacuolar	0.071 ($p=0.517$)	0.114 ($p=0.294$)	-0.131 ($p=0.231$)	-0.256 ($p=0.190$)
Microvacuolar	0.061 ($p=0.573$)	0.125 ($p=0.253$)	0.082 ($p=0.452$)	-0.189 ($p=0.088$)
INFLAMACION (GRADO)				
Lobulillar	0.250 ($p=0.020$)	0.234 ($p=0.030$)	-0.047 ($p=0.664$)	-0.048 ($p=0.667$)
Portal-periportal	0.185 ($p=0.088$)	0.075 ($p=0.493$)	-0.118 ($p=0.278$)	-0.058 ($p=0.600$)
FIBROSIS (ESTADIO)				
	0.235 ($p=0.030$)	0.094 ($p=0.391$)	-0.066 ($p=0.542$)	0.211 ($p=0.060$)

No se encontró ninguna correlación entre los enzimas hepáticos y la carnitina libre o esterificada (Tabla 45). Con respecto a los 5 complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, se obtuvo una correlación inversa ($p=0.03$) entre los valores de AST y la actividad del complejo V (ATPasa), calculada en los 3 enfermos en los que fue posible cuantificar la actividad de dicho complejo. También se halló una correlación inversa entre la actividad del complejo II (SDH) y los valores de la fosfatasa alcalina ($p=0.0001$). No se obtuvo correlación de la insulinemia, insulinoresistencia y extracción hepática de insulina con los niveles de los enzimas hepáticos (Tabla 45).

Tabla 45. Coeficientes de correlación de los enzimas hepáticos con la carnitina, complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), insulinemia (IRI), índice de insulinoresistencia (G/IRI), y extracción hepática de insulina (PC/IRI) en pacientes con EHNA

	AST	ALT	GGT	FA
CARNITINA				
Libre (n=23)	-0.147 (p=0.471)	-0.235 (p=0.246)	0.152 (p= 0.457)	-0.007 (p=0.969)
Cadena corta (n=23)	-0.156 (p= 0.475)	-0.123 (p=0.575)	0.168 (p=0.441)	0.022 (p= 0.918)
Cadena larga (n=23)	0.080 (p= 0.713)	0.152 (p=0.486)	0.169 (p=0.439)	0.048 (p=0.827)
CRM				
I (NADH2COQ1) (n=7)	0.391 (p=0.384)	0.552 (p= 0.198)	-0.733 (p=0.060)	-0.493 (p= 0.398)
II (SDH) (n=8)	0.108 (p=0.799)	0.343 (p= 0.405)	-0.097 (p= 0.818)	-0.990 (p= 0.0001)
III (DBH2CITC) (n=15)	-0.439 (p= 0.101)	-0.200 (p=0.474)	-0.093 (p=0.740)	-0.043 (p= 0.088)
IV (COX) (n=16)	0.159 (p=0.555)	0.298 (p= 0.261)	-0.166 (p= 0.538)	-0.069 (p=0.812)
V (ATPASA) (n=3)	-0.998 (p= 0.038)	-0.912 (p=0.268)	0.612 (p= 0.580)	1.000 (p= 0.490)
IRI (n=41)	0.027 (p=0.858)	-0.008 (p= 0.958)	-0.112 (p=0.461)	0.092 (p=0.551)
G / IRI (n=41)	-0.059 (p=0.700)	-0.087 (p=0.573)	0.008 (p=0.958)	-0.088 (p=0.577)
PC / IRI (n=41)	-0.069 (p=0.656)	-0.126 (p= 0.417)	-0.121 (p=0.436)	-0.026 (p=0.866)

n= número de pacientes en los que se determinó

Con respecto a los hallazgos histológicos, se encontró una correlación positiva entre la edad de los 85 enfermos con EHNA y el estadio de fibrosis ($p=0.04$; $r=0.22$), aunque ninguna con la severidad de la esteatosis ($p=0.9$; $r=0.01$) ni con el grado de inflamación ($p=0.5$; $r=0.07$).

El análisis de las lesiones morfológicas mostró una correlación positiva entre la severidad de la esteatosis con la actividad inflamatoria, portal y lobulillar, así como con el estadio de fibrosis. También se obtuvo asociación al correlacionar la inflamación con la fibrosis (Tabla 46).

Tabla 46. Coeficientes de correlación entre las lesiones hepáticas morfológicas en 85 pacientes con EHNA

	INFLAMACION		FIBROSIS
	Lobulillar	Portal-periportal	
ESTEATOSIS			
Severidad (grado)	0.464 ($p=0.0001$)	0.327 ($p= 0.002$)	0.250 ($p=0.020$)
INFLAMACION			
Lobulillar			0.373 ($p=0.0004$)
Portal-periportal			0.344 ($p=0.01$)

Al establecer correlaciones entre los cambios morfológicos y la concentración hepática de carnitina y sus ésteres se encontró una asociación positiva entre la carnitina de cadena larga y el estadio de fibrosis, pero ninguna con el resto de lesiones. Tampoco se obtuvo ninguna correlación entre las lesiones histológicas y la actividad de los cinco complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los pacientes con EHNA estudiados (Tabla 47).

Tabla 47. Coeficientes de correlación de las lesiones histológicas de EHNA con la carnitina, carnitin-palmitoil-transferasa (CPT) y complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM)

	ESTEATOSIS		INFLAMACIÓN	FIBROSIS
	MACRO	MICRO		
CARNITINA				
Libre (n=23)	0.046 (p=0.820)	0.157 (p=0.443)	0.098 (p= 0.633)	-0.090 (p=0.660)
Cadena corta (n=23)	-0.210 (p= 0.334)	0.286 (p=0.184)	-0.190 (p=0.384)	-0.095 (p= 0.651)
Cadena larga (n=23)	0.236 (p= 0.278)	0.117 (p=0.592)	0.122 (p=0.577)	0.475 (p=0.021)
CPT				
(n=26)	0.358 (p=0.072)	0.151 (p=0.461)	0.150 (p=0.463)	0.223 (p=0.263)
CRM				
I (NADH2COQ1) (n=7)	0.512 (p=0.239)	0.512 (p= 0.240)	0.017 (p=0.970)	-0.003 (p= 0.993)
II (SDH) (n=8)	0.556 (p=0.152)	0.365 (p= 0.372)	-0.614 (p= 0.105)	0.539 (p=0.167)
III (DBH2CITC) (n=15)	0.043 (p= 0.877)	0.190 (p=0.496)	-0.038 (p=0.891)	-0.412 (p= 0.126)
IV (COX) (n=16)	-0.049 (p=0.856)	-0.295 (p= 0.266)	-0.351 (p= 0.181)	-0.418 (p=0.107)
V (ATPASA) (n=3)	-0.192 (p=0.877)	0.497 (p= 0.668)	0.867 (p= 0.331)	— —

n= número de pacientes en los que se determinó

Al analizar los hallazgos morfológicos encontrados en el presente grupo de pacientes y correlacionarlos con los niveles de $TNF\alpha$ en plasma (n=63), se halló una correlación significativa entre el $TNF\alpha$ y la severidad de la esteatosis, según los 4 grados evaluados (1-4), así como con la actividad inflamatoria global, suma de la

lobulillar y portal-periportal, ($p=0.001$ y $p=0.04$, respectivamente). No se encontró correlación con la fibrosis (estadio) (Tabla 48).

La insulinemia, insulinorresistencia e índice de producción pancreática de insulina se correlacionaron con la actividad inflamatoria en el hígado, pero no con la esteatosis ni con el estadio de la enfermedad. No se encontró correlación entre la extracción hepática de insulina y los hallazgos histológicos (Tabla 48).

Tabla 48. Coeficientes de correlación del $TNF\alpha$ en suero, insulinemia e índices de insulina con las lesiones histológicas en pacientes con EHNA

	IRI (n=41)	G/IRI (n=41)	G/PC (n=41)	PC/IRI (n=41)	$TNF\alpha$ (n=63)
Esteatosis	0.183 ($p=0.226$)	-0.154 ($p=0.317$)	-0.035 ($p=0.819$)	-0.206 ($p=0.183$)	0.396 ($p=0.001$)
Inflamación	0.172 ($p=0.021$)	-0.157 ($p=0.033$)	-0.123 ($p=0.057$)	-0.100 ($p=0.340$)	0.258 ($p=0.041$)
Fibrosis	-0.060 ($p=0.694$)	0.045 ($p=0.767$)	0.083 ($p=0.596$)	-0.121 ($p=0.437$)	0.021 ($p=0.869$)

IRI: insulinemia; **G:** glucemia; **PC:** péptido C; **G/IRI:** índice de insulinorresistencia; **G/PC:** índice de secreción pancreática de insulina; **PC/IRI:** índice de extracción hepática de insulina; **n** =número de enfermos en los que se determinó

Al correlacionar la insulinemia e índices de insulina con los factores de riesgo para EHNA se encontró una asociación muy significativa entre obesidad y existencia de hiperinsulinemia ($p=0.005$), insulinorresistencia ($p=0.008$), y mayor síntesis pancreática de insulina ($p=0.004$). Sin embargo, la extracción hepática de insulina no resultó ser significativamente diferente a la de los no obesos ($p=0.2$) (Tabla 49).

Tabla 49. Coeficientes de correlación entre la insulinemia e índices de insulina y el índice de masa corporal (IMC) en 41 pacientes con EHNA

	IRI	G /IRI	G/PC	PC/IRI
IMC	0.412 (p= 0.005)	-0.393 (p=0.008)	-0.430 (p=0.004)	-0.178 (p= 0.273)

IRI: insulinemia; G: glucemia; PC: péptido C; G/IRI: índice de insulinorresistencia; G/PC: índice de secreción pancreática de insulina; PC/IRI: índice de extracción hepática de insulina

No se halló correlación de la insulinemia con los lípidos plasmáticos; tampoco con las lipoproteínas VLDL (Tabla 50).

Tabla 50. Coeficientes de correlación entre la insulinemia, los lípidos plasmáticos y las lipoproteínas VLDL en 41 pacientes con EHNA

	COLESTEROL	TG	VLDL
IRI	-0.197 (p= 0.385)	-0.099 (p=0.515)	-0.010 (p= 0.554)

IRI: insulinemia; TG: triglicéridos; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

En la Tabla 51 se muestra la ausencia de correlación entre la insulinemia e insulinorresistencia y los valores séricos de $TNF\alpha$ y de ferritina.

Tabla 51. Coeficientes de correlación entre insulinemia (IRI) e insulinorresistencia (G/IRI) y $TNF\alpha$ y ferritina

	IRI	G /IRI
TNFα (n=38)	0.080 (p=0.632)	-0.193 (p=0.252)
Ferritina (n=41)	-0.151 (p=0.338)	0.141 (p=0.377)

n= número de pacientes en los que se determinó

No se encontró correlación alguna entre la insulinemia, la CPT y la carnitina (Tabla 52). Al analizar la correlación entre la carnitina y sus ésteres con los lípidos plasmáticos y lipoproteínas, se encontró una asociación significativa entre los valores de CPT y de los ésteres de carnitina de cadena larga (CCL) con los de las lipoproteínas VLDL transportadoras de colesterol y de triglicéridos (Tabla 52). El resto de correlaciones no fueron significativas.

Tabla 52. Coeficientes de correlación de la insulinemia (IRI), insulinoresistencia (G/I), glucagón (GL) y cociente insulina/glucagón (IRI/GL) con la carnitin-palmitoil-transferasa (CPT), carnitina libre y ésteres de carnitina de cadena larga (CCL) y corta (CCC) en pacientes con EHNA

	IRI (n=10)	G/IRI (n=10)	GL (n=10)	IRI/GL (n=10)
CPT (n=26)	0.265 (p=0.429)	-0.293 (p=0.380)	-0.106 (p=0.755)	0.315 (p=0.344)
CL (n=23)	-0.144 (p=0.654)	-0.073 (p=0.819)	0.136 (p=0.707)	-0.459 (p=0.145)
CCL (n=23)	-0.036 (p=0.920)	0.308 (p=0.385)	0.153 (p=0.717)	0.339 (p=0.410)
CCC (n=23)	0.457 (p=0.183)	-0.566 (p=0.087)	0.436 (p=0.240)	0.569 (p=0.109)

n= número de pacientes en los que se determinó

Al correlacionar la actividad de los complejos de la CRM con la carnitina se obtuvo una correlación positiva entre la actividad del complejo III de la CRM y la concentración de carnitina de cadena larga en el hígado de los pacientes con EHNA (Tabla 53).

Tabla 53. Coeficientes de correlación de la carnitina con la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en el hígado de pacientes con EHNA

CRM	C.CADENA LARGA	C.CADENA LARGA	C.LIBRE
I (NADH2COQ1) (n=7)	0.004 (p=0.992)	-0.249 (p= 0.589)	0.305 (p=0.505)
II (SDH) (n=6)	-0.457 (p=0.361)	-0.154 (p= 0.769)	-0.267 (p= 0.608)
III (DBH2CITC) (n=6)	0.004 (p= 0.993)	-0.257 (p=0.622)	0.913 (p=0.010)
IV (COX) (n=6)	0.475 (p=0.340)	0.359 (p= 0.483)	0.672 (p= 0.143)
V (ATPASA) (n=2)	- -	- -	- -

n= número de pacientes en los que se determinó

No se encontraron correlaciones entre la actividad de los complejos de la CRM y el valor del TNF en el suero de los pacientes con EHNA. Tampoco con la concentración de ferritina en sangre periférica (Tabla 54).

Tabla 54. Coeficientes de correlación de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial con la concentración sérica de $TNF\alpha$ y ferritina en pacientes con EHNA

CRM	$TNF\alpha$	FERRITINA
I (NADH2COQ1) (n=7)	-0.378 (p=0.459)	0.071 (p= 0.879)
II (SDH) (n=8)	-0.353 (p=0.492)	0.479 (p=0.239)
III (DBH2CITC) (n=11)	0.530 (p= 0.920)	-0.011 (p=0.970)
IV (COX) (n=12)	-0.241 (p=0.450)	0.194 (p= 0.560)
V (ATPASA) (n=3)	0.536 (p=0.639)	-0.974 (p=0.144)

n= número de pacientes en los que se determinó

En el presente estudio hemos efectuado un análisis anatomoclínico de una serie amplia de enfermos con EHNA y hemos investigado algunos de los mecanismos que actualmente se invocan en la patogenia de la enfermedad .

CARACTERÍSTICAS ANATOMOCLÍNICAS

La EHNA es una enfermedad que cada vez se diagnostica con mayor frecuencia y que se considera en el momento actual la tercera causa de hepatopatía, tras el alcohol y el virus de la hepatitis C (18-20). Aunque resulta difícil determinar la prevalencia real de esta enfermedad, por existir un número significativo de pacientes con EHNA y transaminasas normales (22,39,472), en una serie reciente personal encontramos un marcado incremento en el número de casos de EHNA con respecto al total de biopsias efectuadas en el hospital 12 de Octubre durante los últimos años (3,38% vs. 0,97%) (29). Este hecho, junto con la mayor disponibilidad de la biopsia hepática, ha facilitado la posibilidad de efectuar el presente estudio prospectivo.

A la hora de establecer comparaciones y conclusiones se debe considerar que la información de que disponemos actualmente sobre la EHNA presenta varias limitaciones: la mayoría son series retrospectivas; los criterios diagnósticos de la enfermedad han sido variables; y pocas veces se ha excluido el virus de la hepatitis C, puesto que en muchos de estos estudios aún no se disponía de las técnicas que permiten detectar dicha infección (16,29,34,36,136,137).

Desde el punto de vista morfológico, en ocasiones se han incluido a pacientes que solo presentaban esteatosis e inflamación lobular (hepatitis), sin requerirse la presencia de otros cambios típicos de la EHNA como la degeneración hepatocitaria, necrosis, cuerpos de Mallory o fibrosis (1,16,32). Otros estudios han empleado una definición más estricta para efectuar el diagnóstico histológico de esteatohepatitis y, además de esteatosis e inflamación, han exigido la presencia de degeneración hidrópica o de fibrosis (26,32). De acuerdo con Sheth (26), en nuestro estudio se consideró necesario demostrar la presencia de cambio hidrópico hepatocitario o de al menos mínima fibrosis interhepatocitaria pericentral para establecer el diagnóstico de esteatohepatitis basado exclusivamente en la morfología.

Con respecto al diagnóstico clínico de la EHNA, de acuerdo con la literatura (20), hemos considerado imprescindibles dos requisitos: primero, excluir la

exposición al alcohol; y segundo, demostrar la negatividad de los marcadores virales, autoinmunes y metabólicos de enfermedad hepática.

1. Exclusión del alcoholismo

Aunque resulta difícil verificar de forma absoluta la ausencia de consumo de alcohol, ninguno de los pacientes incluidos en el presente estudio bebía alcohol en cantidades que se hayan demostrado tóxicas para el hígado (>20 g/día en las mujeres y >40 g/día en los hombres) (22). Teniendo en cuenta la elevada frecuencia con la que los bebedores subestiman la cantidad de alcohol que ingieren, que muchos de ellos son bebedores sociales, y que cada vez es más frecuente el bebedor de fin de semana, se cuantificaron los gramos por semana y se excluyeron a aquellos pacientes que admitían un consumo mayor de 40 g/semana, lo que es equivalente a 4 botellines de cerveza, 4 copas de vino de mesa, o un cubalibre de ron o de whisky (164). Con el fin de ser lo más estrictos posible en este criterio diagnóstico, además del interrogatorio habitual que aplican la mayoría de las series de EHNA, utilizamos un test específico de alcoholismo y excluimos aquellos casos en los que existía alguna duda por parte del clínico (381). Con respecto a los marcadores hematológicos y bioquímicos de consumo de alcohol determinados en los 85 pacientes, el valor del VCM se encontraba por debajo de la normalidad en el 97,5% y en dos casos el valor estaba por encima de 100 fl, como dato aislado; el cociente AST/ALT resultó ser <2 en los 85 enfermos y <1 en el 96% (82 casos). Ninguna de las series de EHNA publicadas hasta la actualidad disponen de la determinación del marcador que por el momento ha demostrado mayor sensibilidad y especificidad en detectar el consumo de alcohol en cantidad tóxica (384-388). En este estudio fue posible cuantificar el valor de la CDT en el suero de 63 de los 85 pacientes, encontrándose en todos ellos dentro del rango normal.

2. Exclusión de otras hepatopatías

Con respecto a los marcadores virales, la determinación de los anticuerpos para el virus C fue negativa en todos los casos. En 6 pacientes (7%) existía inmunización pasiva para el virus de la hepatitis B (anti-HBs y/o anti-HBc IgG positivos), pero en los 6 casos el antígeno de superficie (AgHBs) era negativo. En relación con las

causas metabólicas de hepatopatía, un paciente presentaba valores de ceruloplasmina en el límite bajo de la normalidad, aunque con cupremia y cupruria normales, no demostrándose depósito de cobre en el tejido hepático ni anillo de Kayser-Fleischer en el examen oftalmológico. Se halló una alteración del perfil metabólico del hierro en el 37% de los 85 enfermos, y este dato se discutirá más adelante. Algunos autores han encontrado algún marcador de autoinmunidad en pacientes con EHNA, aunque generalmente a título bajo (1/40-1/80) (16,36,394). Poniachik et al. (394) hallaron algún marcador autoinmune en el 44% de su serie de EHNA, ANA en el 18% (5/27), ASMA en el 22% (6/27) y AMC en el 4% (1/27), sin otras manifestaciones clínicas ni rasgos histológicos sugestivos de autoinmunidad en ninguno de ellos. Bacon et al. (16) encontraron positividad de los ANA en 4 casos, acompañándose de alguna enfermedad autoinmune en todos ellos, aunque sin demostrarse características histológicas hepáticas sugestivas de autoinmunidad ni mejoría de las aminotransferasas tras un ciclo corto de tratamiento con corticoides. En nuestra serie los ANA fueron positivos (título de 1/80 y 1/160) en 2 casos (2%) y los AML en 8 pacientes (9%) (título de 1/20 en 6 casos; 1/40 en 1 caso; 1/80 en 1 caso). Los AMC y a-LKM resultaron negativos en los 85 pacientes. Además, sólo se encontró hipergammaglobulinemia en el 7% del total de casos (5/85), en todos ellos a expensas de IgG y policlonal.

3. Factores de riesgo

Aunque tradicionalmente la EHNA ha sido considerada una enfermedad de mujeres de edad media, obesas y con frecuencia diabéticas, (1,4,30-32,39,416), series más recientes han propuesto un nuevo perfil clínico en el que la mayoría son varones, muchos sin obesidad ni diabetes, e incluso sin ninguno de los factores aceptados como de riesgo (obesidad, diabetes tipo 2, hiperlipemia, fármacos) (16,29,167). Según las series clásicas, el 65-83% de los casos pertenecían al sexo femenino, la edad media era de 51 ± 5 años, el 47-100% presentaban obesidad, el 34-55% diabetes tipo 2, y el 20-81% hiperlipemia, y era frecuente la asociación de varios factores, especialmente la obesidad y diabetes (70-95%) (1,4,12,27,30-35). Sin embargo, Bacon et al. (16) encontraron en su serie de 33 pacientes con EHNA que el 53% eran varones y que solo el 39% presentaban obesidad y el 21%

diabetes, mientras que en el 46% de casos no existía ningún factor de riesgo conocido para la enfermedad.

En nuestro grupo de EHNA el 74% eran varones, con una edad media en el momento del diagnóstico de 41 ± 12 años (mediana de 35 años), y la mayoría con varios factores de riesgo para la EHNA asociados (54%). La obesidad fue la condición más frecuente (77%), seguida por la hiperlipemia (53%) y la diabetes tipo 2 (20%). La mayoría de los pacientes presentaban una obesidad leve ($IMC = 27-30 \text{ Kg/m}^2$), y en ningún caso mórbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$). Aunque con frecuencia se ha atribuido la mayor prevalencia del sexo femenino entre los pacientes con EHNA a la mayor prevalencia de la obesidad entre las mujeres (26,39), en este estudio no se hallaron diferencias significativas en cuanto al sexo, ni tampoco con respecto a la edad, entre los enfermos obesos y no obesos. Entre los pacientes con hiperlipemia (45/85), el hallazgo más frecuente fue la hipertrigliceridemia (21/45). En relación con la diabetes tipo 2, 17 de los 85 pacientes incluidos en este estudio eran diabéticos, 14 con diabetes ya conocida y 3 fueron diagnosticados durante el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG). Sin embargo, no se puede descartar que existan más casos de diabetes subclínica en nuestro grupo de estudio, puesto que el test de sobrecarga oral con glucosa se efectuó en 41 de los 85 pacientes con EHNA. Se ha especulado que, al igual que sucede con la cirrosis hepática, la EHNA puede ser diabetógena y precipitar la aparición de la diabetes (60); sin embargo, no hay estudios que avalen esta hipótesis. En el presente estudio, 10/41 pacientes (24%) presentaban alguna forma de intolerancia a la glucosa: 3 casos con diabetes, 5 con intolerancia a la sobrecarga oral con glucosa y 2 con intolerancia a la glucosa en ayunas. La edad resultó ser significativamente mayor entre los pacientes con EHNA diabéticos o intolerantes a la glucosa, dato que va a favor de que la enfermedad pueda intervenir en el debut de la diabetes y que se proponga un seguimiento en todos los pacientes con EHNA, con el fin de prevenir y detectar de manera precoz la aparición de una diabetes manifiesta (473).

Se ha implicado un número creciente de fármacos en la aparición del hígado graso. La mayoría de ellos se asocian a esteatosis hepática de tipo microvesicular, aunque se han documentado casos de esteatosis macrovesicular (tetraciclinas, glucocorticoides), y de lesiones pseudoalcohólicas (amiodarona, maleato de perhexilina) (115-119). Aunque en la mayoría de los casos se ha podido demostrar el mecanismo de producción de la lesión (alteración en alguna de las etapas de la β -

oxidación de los ácidos grasos; aumento de la síntesis hepática de ácidos grasos; disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial), en otros se ha establecido una relación causal a partir del hallazgo de una mera asociación temporal entre la toma del medicamento y la aparición de la EHNA (97,99). En algunas ocasiones no es posible atribuir la lesión hepática solamente al fármaco, ya que con frecuencia también están presentes otros factores de riesgo para la EHNA, fundamentalmente la obesidad y/o diabetes. Según algunas series, hasta 2/3 de pacientes con EHNA consumen medicamentos de forma crónica, generalmente por presentar otras enfermedades asociadas, de forma que en ocasiones resulta difícil establecer dicha asociación patogénica (27). En nuestro estudio, el 22% de individuos tomaba alguno de los fármacos que se han implicado en la aparición de la EHNA (corticoides, ibuprofeno, diltiazem, nifedipino, estrógenos, tetraciclinas, ácido valproico, sulfasalazina y ácido acetilsalicílico, por orden de frecuencia), y hasta el 40% consumía algún medicamento por otras enfermedades asociadas (antidiabéticos orales, antihipertensivos y antiinflamatorios no esteroideos, fundamentalmente). Sin embargo, todos los individuos que tomaban algún medicamento de riesgo para la EHNA eran también obesos y/o diabéticos y/o hiperlipémicos.

Se han publicado casos de EHNA hasta en el 90% de los enfermos afectados por el SAT, así como su aparición como lesión tardía en el 24% de pacientes (93-95). Esta asociación tan frecuente ha sugerido una relación causa-efecto. En nuestro grupo de EHNA solo dos de los 85 enfermos habían sido diagnosticados de SAT durante la década de los años 80, y ambos habían mantenido transaminasas dentro del rango normal hasta 10 y 12 meses antes de efectuarse la biopsia hepática diagnóstica de EHNA. Ambos presentaban otras condiciones asociadas a la EHNA, por lo que es posible que otros mecanismos diferentes a la acción del aceite tóxico hayan intervenido en la producción de la lesión hepática. No se detectó ningún caso de exposición a gases industriales potencialmente hepatotóxicos, como se ha descrito recientemente en la literatura (96).

Ningún paciente de la presente serie tenía antecedentes de cirugía gástrica o intestinal, nutrición parenteral o pérdida importante de peso. Entre las condiciones menos frecuentes que se han asociado a la EHNA, se encontró un caso de hipoβlipoproteinemia heterocigota en el que la EHNA no se asociaba al resto de manifestaciones características de esta enfermedad (intestinales, oculares, hematológicas, neurológicas). Mientras que el 54% de los 85 pacientes con EHNA

presentaban varios factores de riesgo asociados de manera simultánea, en 7 individuos (8%) no se detectó ninguno de ellos. Otros autores encuentran casos idiopáticos de EHNA hasta en el 46% de pacientes, aunque no incluyen otras condiciones diferentes a la obesidad, diabetes o hiperlipemia (16,36,37). Nosotros hemos propuesto que en estos casos puedan existir factores genéticos que intervengan de alguna manera en la aparición de la enfermedad y, entre ellos, hemos investigado la distribución de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) en 57 pacientes de nuestro grupo de estudio. Según nuestros resultados, no existe ninguna asociación entre los antígenos investigados y la EHNA pero, puesto que para llegar a una conclusión similar en la enfermedad hepática alcohólica se ha precisado de un meta-análisis de 28 estudios (474), se necesitan otros trabajos, además del nuestro, antes de establecer conclusiones definitivas.

Aunque algunos estudios de hace ya algunos años habían llamado la atención sobre la elevada prevalencia de otras condiciones clínicas como la HTA y la hiperuricemia entre los pacientes con EHNA (27,34), no ha sido hasta los últimos años cuando se ha intentado interpretar dicho hallazgo. Diversos estudios muy recientes (64,67,475,476) han encontrado una elevada prevalencia del denominado síndrome X entre los pacientes con EHNA, y han propuesto que en realidad la EHNA es una enfermedad metabólica en la que el hígado es el órgano diana. El síndrome metabólico o síndrome X es una entidad definida por un trastorno en la regulación del metabolismo de la glucosa (intolerancia o diabetes), dislipemia (hipertrigliceridemia o niveles bajos de HDL-colesterol), obesidad e HTA. Su base fisiopatológica consiste en la existencia de hiperinsulinemia e insulinoresistencia, y este parece ser el nexo común a la tetraada que constituye dicho síndrome y que probablemente también comparte con la EHNA, como se comentará mas adelante (61-63,65,66,477). Knobler et al. (65) en su serie de 48 pacientes consecutivos con diagnóstico clínico-morfológico de EHNA, encontraron que la mayoría cumplían los criterios que definen al síndrome de insulinoresistencia o síndrome X: el 64% eran obesos, el 73% tenían hipertrigliceridemia, un 68% cifras de HDL-colesterol consideradas como aterogénicas, el 58% eran hipertensos y presentaban alguna forma de intolerancia a la glucosa o hiperinsulinemia el 90% de ellos. Puesto que pocos trabajos han efectuado un TTOG o determinación de insulinemia, así como estudio lipídico detallado en pacientes con EHNA, es muy probable que la prevalencia de este síndrome haya sido subestimada. En nuestro estudio hallamos

HTA (TA > 160/90 mm Hg) en el 29%, obesidad (definida según los criterios del síndrome X como un IMC > 30 Kg/m²) en el 36% y dislipemia (Triglicéridos > 150mg/dl y/o HDL-colesterol < 35 mg/dl) en el 47% de los 85 enfermos. Como se discutirá posteriormente, encontramos alguna forma de alteración en el metabolismo de la glucosa en el 59% de pacientes con EHNA. Considerando que fue posible efectuar el TTOG en 41 de los 85 pacientes con EHNA, cumplían los criterios diagnósticos del síndrome X el 24% de individuos enfermos. De acuerdo con otros autores, hallamos una asociación entre la presencia de este síndrome y la edad más avanzada (61,64-67,474,475). Otro dato asociado con frecuencia al denominado síndrome X como es la hiperuricemia, se encontró en el 12% de los pacientes.

4. Manifestaciones clínicas y diagnóstico

De acuerdo con la literatura, más de 2/3 de los pacientes incluidos en este estudio estaban asintomáticos (85%) y solo el 15% presentaban algún signo a la exploración física, siendo la hepatomegalia el hallazgo más frecuente (1,4,16,30-32,38,365,357). Aunque no existe ningún cambio analítico específico de la EHNA, el dato más constante es la elevación de la ALT (4,16,30,32,34,38). El 91% de nuestros pacientes presentaban niveles de ALT por encima de la normalidad y, con menor frecuencia, de la AST (28%). Más de la mitad de enfermos tenían alterados los valores de GGT y pocos los de fosfatasa alcalina. Presentaban hiperbilirrubinemia un 10% de pacientes, siendo atribuible a una enfermedad de Gilbert en todos los casos (bilirrubina directa normal e indirecta elevada y sin bilirrubinuria ni anemia hemolítica). Siguiendo los criterios de Child-Pugh para valorar la función hepatocelular, no detectamos datos analíticos ni clínicos de enfermedad hepática avanzada en ningún caso.

En nuestra serie el diagnóstico de sospecha de EHNA se estableció ante una hipertransaminasemia crónica (> de 6 meses) inexplicada y un patrón de hígado brillante en la ecografía abdominal, especialmente cuando existía además alguno de los factores de riesgo para la EHNA. Pero el diagnóstico de confirmación solo puede obtenerse con la biopsia hepática. No obstante, en algunos estudios se establece el diagnóstico de EHNA basándose exclusivamente en los hallazgos clínicos antes mencionados, mientras que en otros se exige también un diagnóstico morfológico. Y es que en la actualidad, la importancia de efectuar una biopsia hepática durante la

evaluación de una hipertransaminasemia crónica continúa siendo una cuestión debatida. La elevada sensibilidad y especificidad de la ecografía abdominal en el diagnóstico de la infiltración grasa y la detección de datos indirectos de enfermedad hepática avanzada, como cirrosis o hipertensión portal, junto con la historia clínica y la exclusión de otras causas de enfermedad hepática crónica, plantean esta duda (26). Sin embargo, la biopsia hepática es la única prueba diagnóstica capaz de identificar y cuantificar la necrosis hepática, la inflamación y la fibrosis. Y estos datos aportan información muy valiosa para definir el pronóstico y la pauta a seguir con respecto a las visitas de seguimiento, así como para ensayos terapéuticos y para el propio enfermo. Sin embargo, por el momento, dado lo poco que se conoce de la historia natural de la EHNA y la carencia de medidas terapéuticas específicas que hayan demostrado su efectividad, no están claros los beneficios de la biopsia ni en qué casos debería recomendarse (26,161). Diversos autores han establecido que la seguridad diagnóstica de la EHNA sin efectuar un estudio histológico es de solo un 44-56% (161,478). Este dato, unido al hecho de que no existen cambios clínicos o analíticos que permitan predecir el estadio de la enfermedad, apoyan la idea de hacer una biopsia hepática en el estudio de una hipertransaminasemia inexplicada, especialmente en aquellos casos con factores de peor pronóstico (22).

5. Características histopatológicas y factores asociados a progresión de la lesión hepática

En la actualidad no existe una clasificación morfológica evolutiva de la EHNA que haya sido aceptada internacionalmente. Algunos autores han utilizado los mismos estadios empleados por Gerber y Popper para la hepatopatía alcohólica (27). Pero la mayoría han evaluado la severidad histológica de las lesiones de EHNA mediante una valoración semicuantitativa de los distintos cambios morfológicos característicos de la lesión de manera independiente (3,4,16,30,31). De acuerdo con la literatura (26,167), en nuestro estudio la esteatosis era fundamentalmente macrovesicular, coexistiendo en ocasiones un patrón mixto, y tenía una distribución preferentemente centrozonal o difusa, característica de la EHNA. Esta esteatosis, en la mayoría de los casos, era de intensidad moderada-severa. En más de la mitad de los pacientes dicha esteatosis se acompañaba de una actividad inflamatoria poco intensa (L1-L2) y sin inflamación portal o periportal, como suele suceder. Combinando los resultados

de distintas series (1,4,16,30-32), se ha encontrado fibrosis en el 15-50% de EHNA y cirrosis en el 15% (1,4,16,31,32). En nuestros pacientes se detectó alguna forma de fibrosis en el 65% de casos, aunque ninguno en estadio de cirrosis. En más de 2/3 se trataba de un estadio de fibrosis muy inicial, caracterizado por fibrosis sinusoidal en la zona 3 del lobulillo hepático (F1).

Recientemente algunos autores han establecido un sistema de evaluación numérica que permite cuantificar la severidad de la esteatohepatitis basándose en la intensidad de la actividad necroinflamatoria (grado) y de la fibrosis (estadio) (368,378,379). Brunt et al. (378) en su estudio retrospectivo de 51 pacientes con EHNA encontraron que la mayoría tenían un “grado” leve o moderado de esteatohepatitis (cambio hidrópico e infiltrado inflamatorio) y de distribución fundamentalmente lobulillar; con respecto al “estadio”, detectaron alguna forma de fibrosis en el 80% de pacientes, la mayoría en estadio 3 (fibrosis perisinusoidal y periportal, con puentes de fibrosis), con 3 casos en estadio de cirrosis. Nosotros en este estudio hemos propuesto un protocolo de estudio morfológico que valora la actividad necroinflamatoria y la fibrosis, utilizando la estadificación de Gerber y Popper para la fibrosis y la graduación de Brunt para la actividad necroinflamatoria (372,378), adaptándolas a la metodología de Scheuer para las hepatitis crónicas, y separando la actividad lobulillar (parénquima) de la portal-periportal (377). Siguiendo esta clasificación morfológica, en este estudio hemos exigido como criterios mínimos para ser incluidos como esteatohepatitis aquellos hígados con esteatosis, cambio hidrópico mínimo e inflamación lobulillar o portal-periportal leve (L1 P1 F0). Sin embargo, puesto que actualmente se admite que la EHNA es un complejo lesional que va desde la esteatosis hasta la cirrosis, probablemente deban incluirse pacientes con diagnóstico clínico de esteatohepatitis que en el estudio histológico solo presenten esteatosis, sin inflamación ni fibrosis (L0 P0 F0).

Al igual que otros autores, no hemos incluido en el sistema de graduación morfológica el resto de características de la EHNA, puesto que no aportan información sobre la severidad histológica (378). De forma similar a otros estudios, nosotros encontramos una elevada prevalencia de núcleos glucogenados o claros (72%), cambio que se ha propuesto como característica diferencial con respecto a la hepatitis alcohólica, por su elevada asociación con la diabetes mellitus tipo 2 (30,34,395). Vargas et al. (395) hallaron núcleos glucogenados en el 75% de EHNA vs. 10% de hepatopatía alcohólica, siendo un dato muy específico (77%) aunque

poco sensible (47%) para el diagnóstico diferencial de la EHNA. Otros hallazgos como los cuerpos de Mallory o megamitocondrias se describen en la mayoría de las series con una frecuencia muy variable (9-90%) (1,4,16,32,34,38,39,137). En nuestra serie ambos cambios se hallaron en el 20% de casos.

Existen pocos estudios de seguimiento de pacientes con EHNA y la mayoría incluyen un pequeño número de enfermos y poco tiempo de evolución. Globalmente se considera que existe progresión a fibrosis o cirrosis hasta en el 8-60% de EHNA durante un tiempo medio de 1-9 años (4,16,27,32). Sin embargo, al igual que en la hepatopatía alcohólica, dicha progresión es muy variable y no se sabe qué factores pueden determinarlo. Diferentes autores han buscado algún parámetro clínico, analítico o histológico que pueda ayudar a identificar a aquellos enfermos con mayor riesgo de progresión y que, por tanto, deban someterse a una biopsia hepática e incluirse en ensayos terapéuticos (21,39,46,70,164,165,357). Al menos cuatro estudios han encontrado que la edad avanzada, la diabetes mellitus tipo 2 y la obesidad son condiciones clínicas que se asocian de manera significativa e independiente a la presencia de fibrosis hepática más severa (21,46,164,165). Angulo et al. (164) encontraron que el 60% de pacientes mayores de 50 años de edad con obesidad y/o diabetes tipo 2, tenían fibrosis hepática severa. Se ha especulado que el efecto de la obesidad puede haber sido sobreestimado por la presencia de otros factores y que probablemente sea la diabetes la que se relacione con la enfermedad progresiva en los obesos (39,46,48). Además, debe considerarse que muchas de las series que encuentran asociación de la obesidad con la severidad de la lesión están constituidas exclusivamente por pacientes con obesidad mórbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$) y que además han sido seleccionados entre aquellos que van a ser sometidos a cirugía para perder peso (21,45,46,48,164). Ratzu et al. (165) han propuesto recientemente el uso de un índice clínico-biológico que permita identificar aquellos casos de EHNA con mayor riesgo de progresión, el cual combina la edad, el IMC y los valores de triglicéridos séricos. En el presente estudio hallamos una asociación muy significativa entre la diabetes tipo 2 y la severidad de la lesión histológica, tanto con el estadio de fibrosis, como en la intensidad de la inflamación lobulillar y portal-periportal. Sin embargo, no encontramos asociación de ninguno de los demás factores de riesgo de EHNA (obesidad, hipertrigliceridemia) con la lesión histológica.

La edad parece ser un indicador pronóstico de la enfermedad (21,27,38,164,165). De acuerdo con otros trabajos también hallamos en nuestra serie de enfermos una tendencia a presentar más fibrosis en aquellos pacientes de mayor edad. Sin embargo, resulta difícil comparar nuestros resultados con los obtenidos en otras series, puesto que nuestro estudio es prospectivo e incluye a pacientes más jóvenes (mediana de 35 años) y con una severidad de lesión histológica leve: la mitad con fibrosis sinusoidal; un tercio sin fibrosis; ningún caso de cirrosis. Por el contrario, la mayor parte de estudios de que disponemos incluyen a pacientes en la 5ª-6ª década de la vida y con una proporción mayor de hígados con fibrosis o cirrosis. Este hallazgo puede justificarse porque se trata de series retrospectivas en las que la biopsia hepática se efectuó en muchos casos ante la sospecha de una enfermedad hepática avanzada. Además, resulta especialmente interesante comparar nuestros resultados con los obtenidos por Moreno et al. (27) en su serie retrospectiva de pacientes diagnosticados de EHNA durante los años 1987-1989 en nuestro hospital (edad media: 41 ± 12 vs. 51 ± 13 años; fibrosis: 65% vs. 90%; cirrosis: 0% vs. 35%). Con respecto al sexo y de acuerdo con la literatura, encontramos en nuestro estudio una tendencia significativa a presentar mayor fibrosis entre las mujeres (39,164).

No disponemos de datos concluyentes con respecto a la utilidad de algún marcador de laboratorio en la identificación de pacientes con EHNA y lesión más severa (407,411). Además, en algunas series casi la mitad de los pacientes tienen aminotransferasas dentro del rango normal (21). La mayoría de estudios no encuentran correlación entre las cifras de aminotransferasas y la actividad histológica, aunque aquellos pacientes sin fibrosis suelen tener valores más elevados (92,400,401): Matteoni et al. (162) encontraron cifras de transaminasas más elevadas en pacientes con lesiones histológicas de EHNA, frente a aquellos con esteatosis aislada. Piñol et al. (167) también hallaron en su estudio comparativo de esteatosis-EHNA valores mayores de ALT y de GGT en los casos de lesión histológica más avanzada. En el estudio de Ratziu et al. (165), los valores de $ALT > 2N$ se correlacionaron de manera independiente con la severidad de la lesión. Angulo et al. (164) encontraron que aquellos pacientes con un cociente $AST/ALT > 1$ presentaban más fibrosis, dato consistente con estudios previos que encontraban este cociente por encima de la unidad en cirrosis, independientemente de su etiología, posiblemente por alteración del aclaramiento de AST por las células

sinusoidales (342,479). Brunt et al. (378) también encontraron una asociación significativa entre los valores de AST y la intensidad de la lesión. Ueno et al. (407) hallaron una correlación positiva entre los valores de AST y ALT y el grado de esteatosis, pero no con la inflamación ni con la fibrosis. Otros autores han hallado que la actividad de la colinesterasa podría ser un predictor significativo de la esteatosis hepática (359). En nuestro estudio también hallamos una asociación significativa entre las aminotransferasas y la lesión histológica: los valores de ALT y AST eran mayores cuanto más intensa era la actividad inflamatoria y los niveles de AST se correlacionaron positivamente con el estadio de fibrosis. No consideramos el valor del cociente AST/ALT como posible índice de severidad de la lesión, puesto que en el 96% de los pacientes de nuestra serie (82/85) era menor de la unidad, dato que además empleamos para excluir la exposición al alcohol. Nosotros no encontramos ninguna correlación entre los valores de la colinesterasa y el grado de esteatosis.

Aunque el riesgo de progresión probablemente sea proporcional a la severidad histológica, no existe ningún hallazgo morfológico que se acepte de manera universal como indicador del pronóstico de la EHNA (36,162,164,378,379). Además, el hecho de que se dispongan de pocos estudios que efectúen un seguimiento morfológico de pacientes con EHNA dificulta que se dispongan de más datos. Según la secuencia patogénica actualmente aceptada para explicar las lesiones de EHNA, sería lógico encontrar una asociación entre la severidad de la esteatosis y la necrosis e inflamación y la aparición de fibrosis. Algunos autores han encontrado correlación entre el grado de infiltración grasa del hígado y la severidad de la fibrosis (21,39,48), aunque otros estudios no han confirmado dicha asociación (164); otros han hallado asociación entre la actividad necroinflamatoria y la fibrosis septal (21,165). Nosotros también encontramos una correlación positiva del grado de esteatosis con la actividad inflamatoria y el estadio de fibrosis; y también entre la inflamación y la fibrosis. Es probable que estos hallazgos se justifiquen porque la mayoría de pacientes tenían una lesión poco avanzada, ya que la cantidad de grasa en el hígado disminuye según progresa la enfermedad a fibrosis severa y cirrosis, y posiblemente por ello otros autores no han encontrado dicha asociación (164).

MECANISMOS PATOGENICOS

Dada la naturaleza tan variada de las condiciones que han sido asociadas a la EHNA, no sorprende que aún no se haya identificado un mecanismo común que pueda explicar la patogénesis de esta enfermedad. Actualmente existe consenso en que la esteatosis hepática constituye el primer evento en la EHNA y que se requiere un segundo suceso capaz de inducir necrosis, inflamación y fibrosis para desarrollar EHNA (20). Diferentes estudios recientes en humanos y modelos animales sugieren varios candidatos para este segundo evento. Pueden agruparse en tres grupos: 1º) factores que contribuyen al estrés oxidativo y subsiguiente peroxidación lipídica; 2º) factores asociados con la producción anormal de citocinas; 3º) factores relacionados con una alteración del metabolismo de los ácidos grasos e insulinoresistencia. De acuerdo con la hipótesis y objetivos del presente estudio, se ha investigado el papel que algunos de estos mecanismos pueden jugar en la aparición de la enfermedad, cuyos resultados vamos a analizar a continuación:

1. DEFICIENCIA DE CARNITINA Y CARNITIN-PALMITOIL-TRANSFERASA

Múltiples evidencias acumuladas durante las dos últimas décadas indican que la EHNA se inicia con un aumento de los ácidos grasos libres (AGL) intrahepáticos. En situaciones en las que existe un incremento en el flujo de AGL al hígado (obesidad, ayuno, pérdida importante de peso, bypass yeyunoileal), un aumento en su síntesis endógena (nutrición parenteral total rica en hidratos de carbono y pobre en lípidos, glucosa parenteral), una alteración en el catabolismo de los AG (deficiencias congénitas o adquiridas de la β -oxidación o defectos de la cadena respiratoria mitocondrial), o bien un defecto en la producción o secreción de partículas VLDL, se puede producir un exceso de AGL en el hígado. A estos AGL se incorpora el glicerol-3-fosfato para formar triglicéridos, los cuales se acumulan en el citoplasma de los hepatocitos y constituyen el hígado graso (480). Desde el punto de vista histológico el hígado graso puede manifestarse en forma de grandes vacuolas (esteatosis macrovesicular) o de múltiples y pequeñas vesículas que ocupan el citoplasma del hepatocito (esteatosis microvesicular). La esteatosis microvesicular se observa en una variedad de condiciones genéticas o adquiridas como el hígado graso del embarazo, síndrome de Reye, y reacciones tóxicas a drogas (99,314,378). Estas

condiciones parecen compartir un mecanismo que consiste en una alteración en la β -oxidación de los AGL y un cuadro de insuficiencia hepatocelular grave. Por otro lado, la esteatosis macrovesicular se asocia a situaciones caracterizadas por trastornos nutricionales, metabólicos o drogas: alcohol, nutrición parenteral total, Kwashiorkor, bypass yeyunoileal, diabetes tipo 2, obesidad y síndrome X (3,67,91,389). Tradicionalmente la EHNA se ha incluido en el grupo de esteatosis macrovesicular, pero es muy frecuente encontrar en las biopsias hepáticas de pacientes con EHNA algunas lesiones de esteatosis microvesicular. Por tanto, aunque no disponemos de estudios que hayan determinado el estado de la β -oxidación en la EHNA, es posible que exista cierto grado de alteración en la β -oxidación de las grasas en esta enfermedad (31,395).

La *deficiencia de carnitina* ha sido invocada por algunos autores para explicar las lesiones de esteatosis y esteatohepatitis que aparecen en situaciones como la nutrición parenteral total (86-88,208,214,434), la enfermedad hepática alcohólica (151,207,215,217,218) y la obesidad (220).

A la hora de analizar nuestros resultados y compararlos con los obtenidos en otros estudios es importante considerar los siguientes aspectos: a) disponemos de pocos trabajos que investiguen el metabolismo de la carnitina en sujetos con esteatosis no alcohólica o EHNA; b) muchos autores han incluido a pacientes con enfermedad hepática en estadio de cirrosis, fase en la que puede estar comprometida la síntesis hepática de carnitina; c) en la mayoría de estudios se ha determinado la concentración de carnitina en plasma, y se sabe que la sangre actúa como transportadora de la carnitina y que, por lo tanto, los niveles séricos no reflejan necesariamente el estado del metabolismo tisular de la carnitina (192,229); y, d) la metodología empleada para el análisis de la carnitina y de sus ésteres no siempre ha sido la misma.

Krähenbühl et al. (215) cuantificaron la carnitina plasmática en pacientes con cirrosis de etiología alcohólica y vírica así como en sujetos con enfermedad hepática crónica sin cirrosis y establecieron comparaciones con un grupo control de individuos sanos. No encontraron diferencias en la concentración de carnitina en el grupo de enfermos sin cirrosis, mientras que en aquellos con cirrosis alcohólica hallaron un aumento en la concentración de ésteres de carnitina de cadena corta y larga, y en la de etiología viral sólo se incrementaron los de cadena larga. No

hallaron correlación entre la concentración de carnitina total en plasma o de sus ésteres y el grado de función hepatocelular evaluado según la puntuación de Child-Pugh. De Sousa et al. (207) analizaron el metabolismo de la carnitina en un grupo de pacientes alcohólicos con hígado graso y sin cirrosis y, de manera similar a nuestro estudio, no encontraron diferencias significativas en la concentración de carnitina hepática libre ni esterificada. El estudio de la carnitina y sus ésteres en plasma tampoco resultó ser diferente entre los pacientes. Por otro lado, Harper et al. (220) encontraron un aumento significativo en la concentración de carnitina hepática en un grupo de pacientes con obesidad mórbida e hígado graso. A diferencia de nuestro estudio, demostraron que los obesos tenían mayor concentración de carnitina hepática total y libre, pero sin diferencias en el contenido de carnitina esterificada con respecto a los controles.

En nuestro trabajo estudiamos el metabolismo de la carnitina mediante su cuantificación en tejido hepático y no hallamos deficiencia de carnitina tisular en los pacientes con EHNA. Los contenidos de carnitina total y de carnitina libre en el hígado resultaron similares en nuestro grupo de enfermos al compararlos con los controles. Sin embargo, los sujetos con EHNA presentaron un contenido hepático de carnitina esterificada con AG de cadena larga (acil-carnitina de cadena larga o ACCL) significativamente mayor que los controles ($p=0.04$) y una disminución de la carnitina esterificada con AG de cadena corta (acil-carnitina de cadena corta o ACCC) ($p=0.01$). A pesar de no detectar una deficiencia de carnitina en la EHNA, el aumento obtenido en la ACCL, sin diferencias en la concentración de carnitina libre, sugiere que estos pacientes pudieran tener una insuficiencia relativa de carnitina secundaria a un aumento en sus necesidades metabólicas o bien a un trastorno en la β -oxidación, o a ambas (199,203). La ausencia de una deficiencia real de carnitina en nuestro grupo de enfermos resulta lógica puesto que no parece que exista un defecto en el aporte exógeno de carnitina o signos de malnutrición (deficiencia de suplementos en la dieta), la mayoría de los pacientes presentan un estadio de la enfermedad inicial y conservan una función hepática normal (defecto en la síntesis hepática de carnitina), y ninguno tiene insuficiencia renal (alteración en la síntesis o transporte renal). Tampoco existen datos a favor de que pueda existir un trastorno en el transporte celular hepatocitario en estos pacientes.

Además del transporte de los AG de cadena larga al interior de la mitocondria, la carnitina también tiene la función de extraer los acil-CoA de cadena corta y media

que se acumulan en la mitocondria durante la β -oxidación o la oxidación del piruvato. Estos ésteres de carnitina son transportados fuera de la matriz mitocondrial por la carnitina-acilcarnitina translocasa y se consideran un índice de oxidación de los AG (192,211). Aunque desconocemos el significado de la disminución en la concentración de la carnitina esterificada con AG de cadena corta en los pacientes con EHNA, este hallazgo podría reflejar una disminución en la producción de acetil-CoA y acilcarnitina, principal éster de carnitina de cadena corta, secundaria a un trastorno en la β -oxidación. Sin embargo, tampoco es posible descartar que, de manera similar a lo que sucede en el músculo, la fuente principal del grupo acetyl en el hígado sea la glucosa, vía piruvato deshidrogenasa, y que se produzca una disminución en la concentración de acilcarnitina precisamente porque se produzca un aumento en la oxidación de los lípidos (481).

Puesto que se ha comprobado en condiciones experimentales que el glucagón aumenta la concentración hepática de carnitina y que la insulina atenúa dicho estímulo (223,224), no se puede descartar la posibilidad de que la insulina, el glucagón o el cociente insulina/glucagón, puedan estar implicados en los resultados obtenidos en el metabolismo de la carnitina en nuestro grupo de estudio. Harper et al. (220) no encontraron correlación entre el cociente insulina/glucagón y el contenido hepático de carnitina, aunque sí una tendencia a una correlación negativa entre la concentración de insulina plasmática y de carnitina en el hígado. De acuerdo con la posibilidad de que exista una insuficiencia o deficiencia funcional de carnitina en la EHNA, se podría especular que la hiperinsulinemia hallada en nuestros pacientes podría atenuar una señal que estimule el acúmulo adecuado de carnitina en el hígado de acuerdo con las necesidades metabólicas (224). Sin embargo, no encontramos correlación estadística entre el contenido de carnitina hepática y la concentración de insulina plasmática, de glucagón, ni tampoco con el cociente insulina/glucagón en nuestro grupo de estudio.

De manera similar a otros trabajos (207,215,220), tampoco nosotros hallamos correlación entre la carnitina hepática y el grado de infiltración grasa de los hepatocitos. Sin embargo, sí encontramos una correlación significativa entre la carnitina esterificada con AG de cadena larga y el estadio de fibrosis. Este hallazgo no es comparable a otros estudios puesto que en éstos se valora el grado de depósito de grasa como hallazgo histopatológico principal, sin entrar a analizar otros cambios.

La alteración en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentra entre las causas de deficiencia secundaria de carnitina (482). Aunque existen algunos estudios que evalúan la deficiencia de carnitina en pacientes con miopatía mitocondrial, no disponemos de información publicada al respecto en la enfermedad hepática. Se han descrito aumentos en la concentración plasmática de carnitina esterificada y disminución en la fracción libre en pacientes con deficiencia de citocromo c oxidasa y acidosis láctica (483). Campos et al. (199) encontraron deficiencia de carnitina plasmática total y libre sólo en 4 sujetos (8%) de un grupo de 48 pacientes con miopatía mitocondrial, mientras que el 44% presentaban un aumento del cociente carnitina esterificada/carnitina libre. Esta insuficiencia/deficiencia de carnitina podría indicar un trastorno de la oxidación de los AG secundario a una alteración en la función oxidativa y ciclo de los ácidos tricarboxílicos como consecuencia de un trastorno de la función mitocondrial. Por otro lado, se ha descrito que la carnitina es capaz de inducir un aumento en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en el músculo, probablemente por mecanismos que involucran al ADNmt puesto que afecta fundamentalmente a los complejos codificados por éste (484). Al establecer correlaciones de la concentración de carnitina hepática con la actividad de los cinco complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en nuestro grupo de EHNA, encontramos una correlación positiva muy significativa entre la concentración hepática de carnitina libre y la actividad del complejo III ($r= 0.91$; $p=0.01$). No encontramos correlación con el resto de los complejos. Sin embargo, se trata de un número pequeño de pacientes, por lo que parece prudente esperar a disponer de otros estudios antes de establecer conclusiones.

Según nuestra información, no existen datos acerca de la actividad hepática de la carnitin-palmitoil-transferasa (CPT) en la EHNA. La *deficiencia de la actividad enzimática de la CPT* en el hígado se ha documentado en pocos casos y generalmente corresponde a mutaciones que causan un déficit del enzima con clínica generalmente muscular (234,235). Además, se sabe que el alcohol es un potente inhibidor de este enzima (485). En nuestro estudio la actividad de la CPT total no mostró diferencias significativas al compararla con los controles, aunque este hallazgo no descarta un trastorno en el funcionamiento de la β -oxidación. Por otro lado, la insulina es capaz de disminuir la actividad de la CPT al aumentar la sensibilidad de dicho enzima a la acción inhibidora que el malonil-CoA ejerce sobre

él (272). En el presente estudio no obtuvimos correlación entre la insulinemia y la actividad hepática de dicho enzima.

2. TRASTORNO EN EL FUNCIONAMIENTO DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

No se conoce el papel que la disfunción mitocondrial puede jugar en la patogénesis de la EHNA. Se han descrito cambios morfológicos y ultraestructurales mitocondriales característicos de esta enfermedad (megamitocondrias, inclusiones cristalinas), pero su significado en la actualidad es incierto, ya que no se sabe si son reflejo de procesos adaptativos o de daño mitocondrial (486). La mitocondria juega un papel clave en el metabolismo energético celular. En ella se llevan a cabo procesos tan importantes como la β -oxidación de los ácidos grasos y la producción de energía en la cadena de transporte electrónico. Además, es el órgano diana sobre el que actúan determinadas citocinas como el $\text{TNF}\alpha$ (487).

En el presente trabajo hemos investigado la posibilidad de que exista una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en la EHNA. Dicha disfunción podría estar implicada en la aparición de microesteatosis, por insuficiencia en la β -oxidación, así como en la evolución de esteatosis a EHNA, al ser una fuente de ROS, los cuales son capaces de producir peroxidación lipídica (97).

En nuestro estudio determinamos la actividad de los cinco complejos de la CRM en el hígado de pacientes con EHNA y encontramos que la actividad de todos ellos estaba disminuida de forma significativa al compararla con los controles sanos. Los mecanismos por los que pueden producirse estos defectos y si son primarios o secundarios no se conocen (488).

Se ha comprobado que la acumulación de AGL y sus derivados dicarboxílicos, producto de la ω -oxidación microsomal, son capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa (99). Entre los posibles mecanismos capaces de alterar la CRM, que además se han implicado en la patogenia de la EHNA, se encuentran las endotoxinas bacterianas, algunas citocinas pro-inflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$, tóxicos como el alcohol, sustancias petroquímicas o el aceite desnaturalizado de colza, algunas drogas como la amiodarona, y delecciones-mutaciones del ADNmt (99,119,159,315). Además, la propia producción de ROS es capaz de dañarla (487).

En presencia de endotoxemia las mitocondrias sufren una pérdida del control respiratorio, una disminución en el contenido de citocromos y una inhibición en la oxidación de sustratos, con la consiguiente producción insuficiente de ATP. La intensidad de estas alteraciones está en relación directa con la dosis de endotoxina y la duración de su presencia en contacto con las células (82,158). Además, en el desarrollo de todas estas alteraciones se ha implicado al $\text{TNF}\alpha$, el cual ha demostrado en estudios experimentales ser capaz de inhibir la actividad del complejo I de la CRM, promover el estrés oxidativo, bloquear el metabolismo aeróbico e inducir la muerte celular (489,490). En nuestro estudio, no hallamos una correlación significativa entre la disfunción de los complejos de la CRM y los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$. Sin embargo, como se comentará más adelante, este hecho no descarta que los hepatocitos sean más susceptibles a la acción tóxica de esta citocina o que exista un aumento en su concentración tisular (158).

Aunque la mayoría de las drogas que se asocian a la EHNA lo hacen a través de una inhibición de la β -oxidación y microesteatosis (tetraciclinas, glucocorticoides, etc), otras son capaces de inducir directamente lesiones pseudoalcohólicas (99,119). La amiodarona, el maleato de perhexilina y el 4-4'-dietilaminoetoxihexestrol han demostrado in vitro su capacidad para inhibir la β -oxidación y la cadena de transporte electrónico. De esta manera no solo inducen la aparición de esteatosis, sustrato de la peroxidación lipídica, sino también la producción de ROS, los cuales oxidan la grasa, iniciándose la cascada patogénica de las lesiones de la EHNA (99,315). Estudios in vitro han demostrado que el maleato de perhexilina y la amiodarona son capaces de inhibir la actividad de los complejos I y II y disminuir la formación de ATP (116,117). Otros fármacos, como los análogos de nucleósidos o el interferón alfa son capaces de inducir lesiones de EHNA al alterar la replicación o la transcripción del ADNmt (119). Ninguno de los pacientes con EHNA incluidos en nuestro estudio había sido tratado con alguna de estas drogas.

Varios estudios experimentales han demostrado una disminución en la actividad de la CRM en el hígado graso alcohólico. Dicha disfunción se ha atribuido a alteraciones en la transcripción de las subunidades de las proteínas de la CRM codificadas por el ADNmt (491). Diferentes autores han encontrado una elevada prevalencia de deleciones del ADNmt en alcohólicos con esteatosis microvesicular, pero muy baja o ausente en alcohólicos con macroesteatosis y en sujetos con

esteatosis macro o microvesicular no bebedores (252,253). Sin embargo, el único estudio en humanos que determina la actividad de los complejos de la CRM en el hígado graso por alcohol encuentra que la actividad del complejo IV, codificada por el ADNmt, es normal, mientras que la del II, que lo es por el ADNn, está alterada (492). En nuestro estudio obtuvimos una disminución en la actividad de los cinco complejos, incluido el II. Por ello, es poco probable que la disfunción de la CRM encontrada en nuestro grupo de EHNA sea secundaria a una mutación del ADNmt. Caldwell et al. (486) han estudiado recientemente la actividad de los complejos I y IV de la CRM en híbridos citoplásmicos (cíbridos), los cuales contienen mitocondrias derivadas de plaquetas, en un grupo de 10 pacientes con EHNA y la han comparado con la de 10 pacientes con enfermedad hepática por alcohol y 10 sujetos con otras enfermedades hepáticas. No encontraron disfunción de la CRM y tampoco detectaron una delección “común” del ADNmt. Sin embargo, la ausencia de expresión sistémica del defecto de la CRM en este estudio no descarta necesariamente un trastorno en los hepatocitos, puesto que puede existir una deficiencia adquirida en el hígado o bien heteroplasmia heredada (493). En la última condición, la anomalía mitocondrial puede ser distribuida de forma desigual en los distintos tejidos de un mismo organismo. Además, aunque descartan una delección “común”, que son las que suelen acompañar al envejecimiento, no se descartan otras. Mansouri et al. (253) han encontrado delecciones del ADNmt asociadas al envejecimiento con compromiso de la actividad de los complejos I, IV y V de la CRM. Dicha asociación resultó ser más frecuente a partir de los 50 años en los sujetos sanos, aunque también fue más prevalente entre pacientes con cirrosis hepática de diferentes causas y menores de esta edad. En nuestro estudio la mayoría de sujetos con EHNA eran menores de 50 años (mediana de 35 años) y el estadio de la enfermedad era leve, datos que inducen también a excluir la existencia de alguna delección del ADNmt como causa de disfunción mitocondrial.

No encontramos en nuestra serie de EHNA correlación entre la disfunción de los complejos de la CRM y la severidad de la esteatosis. Tampoco con la presencia de microesteatosis ni con el estadio de la enfermedad. Podríamos especular que, a pesar de que según nuestros resultados existe una alteración importante en el funcionamiento de la CRM, es posible que en estos pacientes la alteración de la β -oxidación secundaria al aumento del cociente NADH/NAD^+ pueda ser moderada. Este hecho justificaría que la esteatosis microvesicular sea menos frecuente y

menos severa en ellos. En estos enfermos posiblemente predominen los mecanismos de esteatosis macrovesicular como el aumento de la movilización de AG procedentes del tejido adiposo, el incremento en la síntesis hepática de AG o un defecto en la secreción de triglicéridos desde el hígado (252). Sin embargo, en determinadas condiciones como exposición a tóxicos, determinadas drogas, infecciones, sobrecrecimiento bacteriano intestinal, endotoxemia, etc, la inhibición de la β -oxidación podría llegar a ser severa y provocar la aparición de microesteatosis añadida a la esteatosis macrovesicular.

Determinar si la alteración de la CRM es causa o consecuencia de la formación de ROS no se ha establecido en todos los casos. La inhibición in vitro del complejo II de la CRM con antimicina A produce un aumento significativo de la producción mitocondrial de anión superóxido (O_2^{\bullet}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (494). Este hecho sugiere que cuando la CRM se bloquea, los electrones se acumulan en las etapas iniciales, específicamente en el complejo I y coenzima Q, desde donde pueden ser transferidos directamente al oxígeno molecular (O_2) y dar lugar al anión superóxido (O_2^{\bullet}). Este radical libre, por acción de la superóxido dismutasa (SOD), es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El sistema mitocondrial glutatión (GSH) es capaz de transformar finalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O). En caso de existir sobreproducción de ROS, un déficit de los sistemas antioxidantes, entre los que figura fundamentalmente el GSH, y en presencia de hierro, puede formarse el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (reacción de Fenton o Haber-Weiss), el cual es muy tóxico (495). Así, dicho radical es capaz de producir peroxidación de las membranas celulares, y daño de la CRM y del ADNmt (254,494). En nuestro estudio, no encontramos correlación entre la ferritinemia y la alteración de los complejos de la CRM.

Recientemente se ha implicado a la denominada “proteína desacoplante de la fosforilación oxidativa” (UCP2) en la disfunción de la CRM y muerte celular (352). Rashid et al. (353) han encontrado un aumento en la expresión de esta proteína en hepatocitos de ratas y de pacientes con EHNA asociada a amiodarona, nutrición parenteral total, y obesidad. Puesto que su función es despolarizar la mitocondria, desacoplar la fosforilación oxidativa y disminuir la síntesis de ATP, es posible que sea uno de los mecanismos que alteren el funcionamiento de la CRM o que aumente

la vulnerabilidad de la mitocondria a diferentes estímulos como las endotoxinas/ $TNF\alpha$ (158).

Futuros estudios podrán establecer el papel de la disfunción de la CRM en la EHNA y determinar en qué medida dicha alteración tiene un papel patogénico o es solamente un índice de disfunción metabólica inespecífica.

3. SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO INTESTINAL Y PRODUCCIÓN DE $TNF\alpha$

Diferentes estudios sugieren que la producción anormal de citocinas inducida por endotoxinas bacterianas puede jugar un papel importante en la patogénesis de la EHNA (158,159,496). Se sabe que las endotoxinas bacterianas son capaces de provocar la liberación de citocinas proinflamatorias, principalmente el $TNF\alpha$, el cual ha sido identificado como mediador del daño producido por aquellas en muchos tejidos, incluido el hígado (333).

En condiciones normales los hepatocitos son resistentes a los efectos citotóxicos del $TNF\alpha$, pero existen dos mecanismos que pueden favorecer el daño hepático mediado por esta citocina (158): a) la producción masiva de $TNF\alpha$ por los macrófagos como respuesta a un estímulo, como las endotoxinas; y b) la existencia de una mayor susceptibilidad del hepatocito a cantidades normales de $TNF\alpha$. El órgano diana de la hepatotoxicidad inducida por el $TNF\alpha$ es la mitocondria, donde es capaz de alterar el funcionamiento normal de la cadena de transporte electrónico y promover la consiguiente formación de radicales libres de oxígeno (ROS) (333,497).

Múltiples evidencias sugieren un papel del $TNF\alpha$, inducido por endotoxinas, en la enfermedad hepática alcohólica (496,349). Se ha detectado un aumento de endotoxinas en el suero de pacientes alcohólicos, así como niveles elevados de $TNF\alpha$ en plasma y en parénquima hepático en la esteatohepatitis alcohólica (354,498,499). Por otro lado, recientemente el grupo de Diehl (158) ha demostrado que los ratones con obesidad genética y esteatosis severa son muy sensibles a dosis bajas de lipopolisacáridos. Esta hipersensibilidad se expresa en que desarrollan con facilidad lesiones de EHNA, a pesar de no detectarse el incremento esperado en los niveles plasmáticos de $TNF\alpha$.

En el momento actual no existe información acerca de la producción de $TNF\alpha$ en pacientes con EHNA. En nuestro grupo de EHNA solamente el 21% de sujetos

(13/63) tenía valores séricos de $\text{TNF}\alpha$ por encima de la normalidad. Sin embargo, este hallazgo no descarta que en la EHNA se produzca un aumento en la expresión/síntesis local de $\text{TNF}\alpha$, ni tampoco que pueda existir mayor susceptibilidad de los hepatocitos a la acción tóxica de dicha citocina (158,500). Además, es posible que en algunos pacientes con EHNA el mecanismo de producción de la lesión hepática sea por una vía diferente a la inducida por las citocinas.

Se ha demostrado que el tejido adiposo es capaz de producir $\text{TNF}\alpha$ y justificar así el aumento de la concentración plasmática de $\text{TNF}\alpha$ detectada en sujetos obesos. Sin embargo, se ha observado que los adipocitos, a diferencia de los macrófagos, no responden al estímulo de las endotoxinas aumentando la expresión/síntesis de dicha citocina, hecho que atenúa la producción sistémica de $\text{TNF}\alpha$, y que aparentemente no impide su producción local por las células de Kupffer (290,330,501). En nuestro estudio no hallamos asociación entre la concentración sérica de $\text{TNF}\alpha$ y la presencia de obesidad, aunque este dato no descarta que pueda existir una sobreexpresión local de interferón γ , el cual sensibiliza a los hepatocitos a la toxicidad por el $\text{TNF}\alpha$, ni una disminución de la concentración de IL-10, que lo inhibe, como se ha observado en estudios de experimentación en animales obesos tratados con endotoxinas (158).

La mayoría de estudios en la enfermedad hepática alcohólica han encontrado correlación entre los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$ y la severidad de la lesión hepática (158,328). La ausencia de dicha correlación en nuestro grupo de enfermos no sorprende, puesto que la mayoría de pacientes presentaban una lesión hepática leve. Yang et al. (158) demostraron que los animales obesos con esteatosis más severa eran más sensibles a la acción del $\text{TNF}\alpha$. Además, estudios en animales de experimentación han demostrado que el $\text{TNF}\alpha$ es capaz de estimular la síntesis hepática de ácidos grasos y de triglicéridos (334). De acuerdo con estos datos, en nuestro estudio encontramos correlación entre los niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$ y la severidad de la esteatosis hepática. En este sentido es importante señalar que la producción de $\text{TNF}\alpha$ por el tejido adiposo es uno de los mecanismos implicados en la insulinoresistencia de los obesos. Aunque no está bien establecido el mecanismo por el que es capaz de producir resistencia a la insulina, parece que interfiere en su acción al inhibir la actividad de la tirosina quinasa del receptor de la insulina. Esta

insulinorresistencia es probablemente la causa de la hiperinsulinemia de los sujetos con obesidad, la cual es capaz de mantener la lipogénesis hepática, aunque no de inhibir la lipólisis en el tejido adiposo, con el consecuente aumento en el flujo de ácidos grasos libres al hígado y aparición de esteatosis (285,330,444,502). No hallamos correlación entre los niveles de $\text{TNF}\alpha$ en el suero y la presencia de diabetes, de hiperinsulinemia ni de insulinorresistencia en nuestro grupo de EHNA.

Estudios experimentales han evidenciado que el *sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI)* juega un papel en la traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana intestinal de los cirróticos, aunque no se conoce bien su papel en la propia cirrosis (503,504). La traslocación de productos bacterianos, como las endotoxinas, desde la luz intestinal a la circulación mesentérica y sus linfáticos induce la producción regional y sistémica de $\text{TNF}\alpha$ y otras citocinas proinflamatorias, siendo uno de los mecanismos implicados en la aparición de la esteatohepatitis alcohólica (333). La elevada incidencia de EHNA en situaciones de SBI como el bypass yeyunoileal y la diverticulosis de intestino delgado apoyan la hipótesis de que el SBI y la consiguiente endotoxemia portal puedan jugar un papel en la patogenia de la EHNA (70,141).

Se ha detectado SBI en aproximadamente un tercio de pacientes con cirrosis hepática de diferentes etiologías (viral, alcohólica, idiopática). Nosotros detectamos la existencia de SBI en el 29% de pacientes con EHNA (16/56). De acuerdo con otros estudios, no hallamos asociación significativa entre la presencia de SBI y la edad o el sexo de los pacientes; tampoco con los enzimas hepáticos. Sin embargo, a diferencia de otros autores (328,336), no encontramos asociación del SBI con la severidad de la lesión hepática, probablemente porque, como ya se ha mencionado, la mayoría presentaban una lesión histológica poco avanzada. La ausencia de asociación significativa entre los valores séricos del $\text{TNF}\alpha$ y la presencia de SBI obtenida en nuestro estudio podría explicarse por la ausencia del estímulo de producción de $\text{TNF}\alpha$ en el tejido adiposo por las endotoxinas, no descartándose que pueda existir asociación con la concentración de $\text{TNF}\alpha$ en el tejido hepático. La observación de que el SBI se asocia a la producción endógena de etanol y que las bacterias intestinales pueden metabolizar el etanol a acetaldehído, sugiere otro mecanismo por el que el SBI puede producir daño hepático diferente al de las citocinas (81). Además, el hallazgo reciente en ratones con obesidad genética de

pequeñas cantidades de etanol en el aire espirado, apunta la posibilidad de que la producción endógena de este tóxico intervenga en el desarrollo de la esteatohepatitis, incluso en no bebedores (505).

No se conocen los mecanismos exactos por los que puede producirse SBI en los pacientes con cirrosis y como posibles causas se han propuesto la hipoacidez gástrica, alteraciones de la motilidad intestinal, disfunción de los mecanismos defensivos y posibles anormalidades de la mucosa intestinal secundarias a hipertensión portal (506-508). En el presente estudio se excluyeron aquellos pacientes con causas de SBI conocidas como tratamientos antsecretorios, diverticulosis de intestino delgado, diabetes, trastornos de la motilidad intestinal, etc. No se descartaron pequeñas anormalidades de la mucosa intestinal o alteraciones de los mecanismos de defensa intestinal, pero su implicación es muy improbable. Por otro lado, la asociación hallada entre SBI y la presencia de factores de riesgo para la EHNA como la obesidad o la hiperlipemia, apuntan la posibilidad de que otros factores, adquiridos o genéticos, aumenten la susceptibilidad para el desarrollo de SBI en estos pacientes.

Aunque el “gold standard” para el diagnóstico del SBI consiste en demostrar la presencia de flora bacteriana en cantidades anormales en el aspirado de secreciones de yeyuno, la mayoría de estudios utilizan el test del hidrógeno espirado con glucosa puesto que se trata de una técnica simple, barata, no invasiva, y con buen grado de sensibilidad (62-93%) y especificidad (83-100%) (466,509). Nosotros empleamos este test diagnóstico en nuestra serie de EHNA, aunque es probable que en el futuro deba ser validado en el grupo de pacientes con EHNA (510).

4. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO

Aunque existen múltiples evidencias, clínicas y experimentales, que apuntan la posibilidad de que el hierro esté implicado en la patogenia de la EHNA, no es hasta el año 1997 cuando empieza a analizarse el papel de este metal en la aparición de esta enfermedad (16,37,339,341). Moirand et al. (511) describieron un síndrome de sobrecarga de hierro asociado a la obesidad, diabetes, hiperlipemia e hipertensión arterial, todos ellos factores de riesgo para la EHNA, al que denominaron “síndrome de hiperferritinemia asociado a trastornos polimetabólicos”. Dicho síndrome se caracteriza por un estado de sobrecarga de hierro hepático con

ferritina sérica elevada, saturación de transferrina normal y ausencia de marcadores de hemocromatosis hereditaria (antígeno HLA-A3). Poco después, Bacon et al. (16) llamaron por primera vez la atención sobre este tema al encontrar que el 58% de los pacientes con EHNA incluidos en su estudio tenían elevados los índices de hierro sérico (ferritinemia y/o saturación de transferrina), acompañándose, en algunos casos, de un aumento en los depósitos de hierro hepático. Como consecuencia de estos hallazgos el grupo de George (37), en Australia, y el de Bonkovsky (341), en Norteamérica, han investigado recientemente el estado de los parámetros del hierro, así como el papel que pueden jugar las mutaciones del gen de la hemocromatosis hereditaria (HFE) en la patogénesis de la EHNA. Ambos estudios han confirmado que muchos pacientes con EHNA tienen una alteración de los parámetros clínicos del hierro (hierro, ferritina, saturación de la transferrina) y depósito hepático de hierro, independientemente de que presenten o no alguna mutación del gen HFE. George et al. (37) encontraron que el 62% de su grupo de 51 sujetos con EHNA tenían una ferritina >300 ng/ml, aunque sólo el 22% presentaban además una saturación de la transferrina >55%. Además, el 41% presentaba siderosis hepática, aunque el 15% de aquellos con ferritinemia elevada no mostraban depósito de hierro en el hígado. Según los valores establecidos recientemente para los parámetros del hierro en la Conferencia Europea de Consenso Internacional (512), el 37% de sujetos con EHNA de nuestro estudio (28/76) presentaban niveles séricos de ferritina por encima del rango normal (>300 ng/ml en varones y >200 ng/ml en mujeres), aunque solo el 6% (3/51) tenía la saturación de la transferrina > 45%. Además, encontramos una asociación fuerte entre los niveles elevados de ferritina en suero, el depósito de hierro en el hígado y el estadio de fibrosis.

El descubrimiento reciente del gen HFE ha permitido identificar dos mutaciones específicas de la hemocromatosis hereditaria (HH): la mutación Cys282Tyr, en la que existe una sustitución de la cisteína por la tirosina en el aminoácido 282, y la His63Asp, en la que el aspartato sustituye a la histidina en el aminoácido 63. Según distintas series de diferentes países, un 72-100% de pacientes con el fenotipo típico de HH son homocigotos para la mutación C282Y, un 0.5-5% son heterocigotos compuestos (C282Y/H63D), y el resto (0.5-5%) se distribuye entre heterocigotos para la mutación C282Y, homo y heterocigotos para la H63D. Además, un 0-12% de pacientes con HH no presentan ninguna de las dos

mutaciones, a pesar de ser fenotípicamente similares al resto de pacientes (468,513,514).

Se ha encontrado un incremento de dichas mutaciones en algunas enfermedades como la porfiria cutánea tarda (515,516), el déficit de α_1 -antitripsina (517) y la hepatitis crónica por VHC (518). Dos estudios recientes han investigado la prevalencia de las mutaciones del gen HFE en pacientes con EHNA con el fin de conocer el papel que su presencia puede ejercer en el desarrollo de la sobrecarga férrica descrita en algunos sujetos con EHNA, así como su posible asociación con el grado de lesión hepática (37,341). George et al. (37) encontraron una prevalencia significativamente mayor de la mutación C282Y entre los 51 pacientes con EHNA estudiados (EHNA: 31% vs. control: 19%), y la mayoría en estado heterocigoto (C282Y +/-: 23.5% ; C282Y +/+: 8%). Sin embargo, no detectaron diferencias significativas en cuanto a la mutación H63D (EHNA: 31% vs. control: 24%). Bonkovsky et al. (341) hallaron que la prevalencia de cualquiera de las dos mutaciones estaba aumentada en su grupo de 36 casos de EHNA (EHNA: 69% vs. control: 40.5%). Sus resultados fueron similares a los de la serie australiana en cuanto a la mutación C282Y (19.5%vs. 31%; $p=0.2$), pero la prevalencia de la mutación H63D resultó ser significativamente mayor entre los norteamericanos con EHNA (50% vs. 31%; $p=0.008$). En nuestro estudio efectuamos la determinación de ambas mutaciones en 60 pacientes con EHNA y los resultados fueron algo diferentes a los obtenidos en las dos series previas:

- La prevalencia de cualquiera de las dos mutaciones entre los sujetos con EHNA fue del 35%, significativamente menor que la obtenida en la serie norteamericana (35% vs. 69%; $p < 0.01$) y similar a la australiana (35% vs. 62%; $p > 0.05$).
- La mutación H63D, en estado homo o heterocigoto, estaba presente en un porcentaje similar de pacientes con EHNA al hallado en la serie australiana (35% vs. 31%) y norteamericana (35% vs. 50%).
- A diferencia de las dos series previas, en nuestro grupo de enfermos con EHNA, no encontramos mayor prevalencia de la mutación C282Y, ya que solo la presentaba un sujeto (2%) y lo hacía en estado heterocigoto compuesto (C282Y/H63D).
- De manera similar al estudio australiano y norteamericano, hallamos que la mayoría de portadores de la mutación H63D presentaba una sola copia.

- La prevalencia del estado heterocigoto compuesto, al igual que en las dos series previas, fue muy baja (1/60).
- Aunque Bonkovsky et al. (341) encontraron una asociación entre la presencia de la mutación H63D y el sexo femenino, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en cuanto al sexo para ninguna de las dos mutaciones.

En el único trabajo existente referido a la población española sobre la prevalencia de ambas mutaciones, el 87% de pacientes con HH eran homocigotos para la mutación C282Y, ninguno para la H63D y el 6.5% eran heterocigotos compuestos. Entre los 512 sujetos sanos controles, solo 1 (0.2%) era homocigoto para la mutación C282Y y 29 (6%) heterocigotos; 4% (24/487) de los controles eran homocigotos para la mutación H63D, mientras que el 35% (171/487) eran heterocigotos (519). No encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la prevalencia de las dos mutaciones entre los sujetos con EHNA de nuestro estudio y dicha población española control (C282Y +/+ : 0% vs. 0.2%; C282Y +/- : 2% vs. 6%; H63D +/+ : 5% vs. 4%; H63D +/- : 30% vs. 35%; H63D/C282Y : 2% vs. 1.4%).

En las series de George y de Bonkovsky se encontró asociación significativa de los parámetros clínicos del hierro (ferritina, saturación de la transferrina, hierro) con la presencia de cualquier mutación del gen HFE (37,341). En el presente estudio, la presencia de la mutación H63D se asoció a cifras mayores de ferritina sérica, sobre todo en el estado homocigoto de la citada mutación. Por otro lado, el único caso que era heterocigoto compuesto, tenía una ferritinemia normal.

En conclusión, el análisis de nuestros datos se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Confirmamos que muchos pacientes con EHNA tienen valores de ferritina sérica elevados, aunque la saturación de transferrina sea normal.
2. Aproximadamente un tercio de sujetos con EHNA presentan alguna mutación del gen HFE, que consiste fundamentalmente en el estado H63D heterocigoto, aunque sin diferencias significativas con una población española control.
3. A diferencia de otras series, no encontramos mayor prevalencia de ninguna de las dos mutaciones en nuestro grupo de EHNA.
4. La presencia de la mutación H63D se asoció a ferritinemia elevada y ésta a siderosis hepática y a fibrosis. Como consecuencia de ello, la presencia de valores

altos de ferritina sérica podrían considerarse indicadores de mayor daño hepático y, por tanto, ser útiles a la hora de seleccionar a aquellos pacientes que se beneficiarían de una biopsia hepática diagnóstica.

El mecanismo por el que el hierro puede intervenir en la patogenia y progresión de la EHNA no está claro, aunque parece que un factor importante podría ser el estrés oxidativo. El hierro es capaz de aumentar el estrés oxidativo al favorecer la formación de radicales libres e intervenir en la cascada patogénica propuesta en la EHNA: esteatosis → formación de radicales libres → lipoperoxidación → síntesis de aldehídos (malonildialdehído y 4-hidroxinonenal) → fibrosis (337-339). Además, este metal es capaz de producir daño peroxidativo de la membrana mitocondrial, y por tanto, alterar el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, así como disminuir la integridad de las membranas lisosomales, favoreciendo la suelta de enzimas de los lisosomas (340,520). Sin embargo, existe controversia sobre si la sobrecarga de hierro que existe en algunos pacientes con EHNA participa por si misma en el daño hepático o bien si es secundaria a un proceso inflamatorio (16,37). En el presente estudio encontramos correlación entre los parámetros clínicos del hierro y la presencia de siderosis y de fibrosis, aunque en muchos casos en ausencia de mutación del gen HFE. Este hecho podría explicarse porque en algunos casos el aumento de la ferritina sérica sea secundario a la EHNA, y en otros porque se trate de pacientes portadores de alguna mutación del gen HFE diferente a las dos conocidas, de forma que convendría efectuar en estas situaciones un seguimiento del paciente por si apareciera una HH. Por otro lado, como consecuencia de estos hallazgos, algunos autores han propuesto que, al igual que sucede con la hepatitis crónica viral, el tratamiento con flebotomías e incluso con quelantes del hierro podría ser beneficioso en estos pacientes (292,521).

Diferentes autores han relacionado la alteración del metabolismo del hierro con la hiperinsulinemia y el síndrome de insulinoresistencia (286,291,292,294). Estudios experimentales han demostrado que la exposición aguda a la insulina produce un aumento en la expresión de los receptores de la transferrina en la superficie celular (276). Además, existen evidencias recientes de que las mutaciones C282Y y H63D, aumentando el pool de hierro, pueden potenciar el efecto de la hiperinsulinemia y exacerbar el daño hepático en la EHNA (522). Se ha especulado que la insulinoresistencia inducida por el hierro podría obedecer a una disminución

en la extracción hepática de la insulina por sobrecarga de hierro y daño hepático (523) o bien porque el depósito de hierro interfiere en la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa (524). En pacientes con HH y hemosiderosis se ha encontrado correlación de la insulinoresistencia, evaluada por un clamp de glucosa euglicémico, con la sobrecarga de hierro, incluso en pacientes con test de tolerancia oral a la glucosa normal (525). Se ha encontrado que la resistencia a la insulina se halla en relación directa con los depósitos de hierro, cuantificados mediante la cifra de ferritina sérica (286). Así, la ferritinemia podría ser un marcador indirecto del síndrome de insulinoresistencia (477) e incluso considerarse como parte del actualmente denominado síndrome de insulinoresistencia asociado a sobrecarga hepática de hierro (292). Sin embargo, en el presente estudio no hallamos correlación estadística entre los valores de ferritina sérica, la insulinemia ni el índice de insulinoresistencia. Tampoco la encontramos al correlacionar la ferritinemia con la presencia de situaciones asociadas a hiperinsulinemia, como la diabetes o la obesidad.

5. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA E INSULINA

Existen evidencias que apoyan el papel de la insulina en la patogenia de la EHNA como son la presencia de hiperinsulinemia e insulinoresistencia en las condiciones clínicas asociadas con mayor frecuencia a la EHNA (obesidad, diabetes tipo 2, síndrome X, nutrición parenteral), la capacidad de la insulina para producir lesiones hepáticas directas de esteatosis y esteatohepatitis, y la estrecha relación que existe entre enfermedad hepática e intolerancia a la glucosa o diabetes (57,62,266,526). La insulina ejerce una acción reguladora fundamental en el metabolismo de las grasas (2): en el tejido adiposo inhibe la lipólisis y, por lo tanto, disminuye el flujo de AGL hasta el hígado; en el hígado bloquea la β -oxidación de los AGL y estimula la lipogénesis. Se ha propuesto que la hiperinsulinemia e insulinoresistencia intervienen en el primer paso de la patogénesis de la EHNA al proporcionar el sustrato, los triglicéridos y ácidos grasos libres (AGL), para la peroxidación lipídica (65).

Múltiples estudios han demostrado una prevalencia elevada de hiperinsulinemia y alteración en la tolerancia a la glucosa en enfermedades crónicas avanzadas del hígado (57,58,296). Sin embargo, pocos han evaluado el estado del

metabolismo de la glucosa/insulina en enfermedades hepáticas leves y en la EHNA. La importancia actual del síndrome X como factor de riesgo cardiovascular y su asociación al hígado graso no alcohólico ha favorecido la aparición de estudios recientes que, de forma similar al nuestro, analizan la situación del metabolismo de la glucosa e insulina en pacientes con EHNA mediante el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG). Knobler et al. (64) han encontrado alguna forma de intolerancia en el metabolismo de la glucosa/insulina en el 90% de individuos de su grupo de 48 pacientes con EHNA: 29% con intolerancia en el test de la glucosa (ITG), 44% con diabetes, e hiperinsulinemia normoglucémica en el 17%. Sólo 5 enfermos (10%) tenían el TTOG e insulinemia dentro de la normalidad. Pinto et al. (63) han hallado alguna forma de intolerancia en el 69% de los 30 sujetos con EHNA incluidos en su estudio: 17% con ITG, 33% con diabetes, 20% con hiperinsulinemia normoglucémica y normalidad en 9 casos (31%). En nuestro grupo de 41 EHNA, el 59% presentaba alguna forma de intolerancia: 17% con ITG, 8% eran diabéticos y 34% tenían hiperinsulinemia normoglucémica. Diecisiete enfermos (41%) no presentaban ninguna alteración en el control de la glucemia/insulina.

Se han propuesto dos mecanismos fundamentales que podrían explicar la hiperinsulinemia presente en estos enfermos: a) un aumento en la síntesis de insulina por la célula β pancreática y b) una disminución en el metabolismo hepático de la insulina. En la obesidad parece que la insulinoresistencia es la alteración primaria. Se ha observado que los obesos tienen una disminución en la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo y este hecho provoca un aumento en el flujo de AGL al hígado y esteatosis. De forma secundaria la célula β pancreática produce un aumento compensador en la secreción de insulina. En aquellos individuos obesos en los que este mecanismo no sea capaz de compensar la insulinoresistencia, aparecerá una diabetes manifiesta (527). Por el contrario, en la enfermedad hepática avanzada el aumento en la concentración plasmática de insulina parece ser el evento precoz, habiéndose comprobado que la propia hiperinsulinemia, mantenida de forma crónica, es capaz de disminuir la sensibilidad a la acción periférica de la insulina (296). La mayoría de los pacientes con cirrosis hepática tienen hiperinsulinemia, el 60-80% son intolerantes a la glucosa y aproximadamente el 20% desarrollan diabetes manifiesta (297). Puesto que el hígado es el principal lugar donde se metaboliza la insulina, parece que la disfunción hepática y la consiguiente disminución en la extracción hepática de insulina por el mismo, constituye el

mecanismo fundamental de hiperinsulinemia en dicha enfermedad. Además, es probable que en estos casos el desarrollo de hipertensión portal y derivaciones portosistémicas contribuyan a la disminución del aclaramiento hepático de la insulina (299).

Actualmente no existen métodos lo suficientemente validados que determinen el funcionamiento de la célula β pancreática (para medición de la secreción pancreática de insulina) ni la extracción de insulina por el hígado (283,528). Además, aunque se acepta como método de referencia en la evaluación de la insulinoresistencia la disminución en la sensibilidad a la insulina, demostrada durante el clamp hiperinsulinémico de la glucosa, su complejidad técnica hace que sea poco aplicable en el estudio de un número amplio de pacientes (62,475,529). De acuerdo con otros trabajos, nosotros determinamos la insulinoresistencia, el funcionamiento de la célula β pancreática, y la extracción hepática de insulina mediante el cálculo de tres índices, representados por un cociente molar (58,270,283,300,476): índice de insulinoresistencia (cociente glucosa/insulina), índice de secreción pancreática de insulina (cociente glucosa/péptido C) e índice de extracción hepática (cociente péptido C/insulina). A favor del empleo de estos índices en el estudio del metabolismo de la glucosa e insulina se encuentran los siguientes datos: 1) el aumento en la concentración plasmática de insulina sin hipoglucemia e incluso con hiperglucemia, como sucede en nuestro estudio, traduce la existencia de insulinoresistencia (\downarrow cociente glucosa/insulina); 2) puesto que la insulina y el péptido C son secretados en cantidades equimolares por el páncreas y que el péptido C no sufre metabolismo hepático, cualquier aumento en la concentración plasmática de péptido C, en respuesta a la glucemia, indica un incremento en la síntesis de insulina por la célula β del páncreas (\downarrow cociente glucosa/péptido C); 3) como la insulina, a diferencia del péptido C, sí es degradada en el hígado, los cambios en la relación péptido C/insulina plasmática representan alguna alteración en su extracción hepática (\downarrow cociente péptido C/insulina) y 4) la facilidad de realización de la técnica en comparación con el clamp glucosa/insulina. Según los resultados de nuestro estudio, es probable que la hiperinsulinemia hallada en más de la mitad de los pacientes con EHNA resulte de una compleja relación entre el aumento de la secreción pancreática, para compensar el estado de insulinoresistencia, y la alteración en la degradación hepática de la insulina. De

manera similar a lo que ocurre en la obesidad, nosotros encontramos que, aunque la EHNA se asocia a una disminución en la sensibilidad de los tejidos a la insulina, las células β pancreáticas son capaces de aumentar la secreción de la misma para vencer la insulinoresistencia (530). El resultado es un estado metabólico compensado y, por ello, la mayoría de los pacientes de nuestro estudio presentan un estado de tolerancia a la glucosa normal. Sin embargo, es posible que con el tiempo este aumento en la producción de insulina no pueda mantenerse y aparezca intolerancia o una diabetes franca (531). Además, según nuestros resultados, la disminución en el metabolismo hepático también contribuye a la hiperinsulinemia de la EHNA. El hecho de que los pacientes con EHNA e hiperinsulinemia tengan una disminución en el metabolismo hepático de la insulina y, sin embargo, aquellos con insulinemia normal lo tengan similar al de los controles, apoya la hipótesis de que la alteración en la degradación hepática de la insulina sea el mecanismo principal de hiperinsulinemia en la EHNA. La propia esteatosis podría contribuir a la hiperinsulinemia e insulinoresistencia en los pacientes con EHNA al alterar el metabolismo hepático de la insulina (300,532). Inokuchi et al. (300) atribuyeron la hiperinsulinemia hallada en su grupo de obesos con hígado graso a una disminución en la extracción hepática de insulina. Además, justificaron la alteración en el metabolismo hepático de la insulina por la propia infiltración grasa, puesto que hallaron una correlación negativa entre el índice de extracción hepática (péptido C/insulina) y el grado de esteatosis. A diferencia de estos autores, nosotros no encontramos dicha correlación.

Globalmente, nuestros resultados sugieren que la EHNA se asocia a insulinoresistencia e hiperinsulinemia. Es probable que como consecuencia de la disminución en el efecto periférico de la insulina, la lipólisis se acelere y el flujo de AGL al hígado se incremente. Mientras, el aumento compensador de la concentración plasmática de insulina actúa en el hígado, en el que la sensibilidad a la insulina está menos afectada (475), acelerándose la lipogénesis e inhibiéndose la β -oxidación de los AG. La consecuencia es la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos y la aparición de esteatosis, paso previo a la inflamación y fibrosis características de la EHNA (533).

Desconocemos el mecanismo de hiperinsulinemia e insulinoresistencia en la EHNA, aunque la obesidad probablemente juegue un papel muy importante. En el presente estudio encontramos una correlación positiva entre el IMC (índice de masa

corporal) y la hiperinsulinemia e insulinoresistencia. Sin embargo, puesto que algunos pacientes con EHNA no son obesos y también tienen hiperinsulinemia e insulinoresistencia, es posible que en estos casos intervengan factores genéticos que disminuyan la sensibilidad a la insulina y que, por lo tanto, la insulinoresistencia sea un fenómeno primario en ellos (65).

El mecanismo celular que interviene en la insulinoresistencia no se ha esclarecido, aunque se han propuesto varios mediadores como los AGL plasmáticos (175,282,284), el $TNF\alpha$ (285-290), el glucagón (85,268), la ferritina (291-294,337), e incluso la propia hiperinsulinemia crónica (2,297,534).

Se ha detectado un aumento de AGL en el plasma y en el hígado de obesos, pacientes con EHNA y en otros estados de insulinoresistencia. Los AGL, además de tener un efecto tóxico en la peroxidación lipídica (297), pueden intervenir en la intolerancia a la glucosa e insulinoresistencia, puesto que son capaces de inhibir la captación de glucosa estimulada por la insulina (66). Además parece que también disminuyen el metabolismo hepático (283) y estimulan la secreción de insulina (274).

La hipótesis de la insulinoresistencia inducida por $TNF\alpha$ está avalada por la sobreexpresión de esta citocina en el tejido adiposo de animales y humanos obesos y la mejoría en la sensibilidad del receptor de la insulina al neutralizar la acción del $TNF\alpha$ (286,288-290). En el presente estudio no hallamos correlación de la insulinemia ni la insulinoresistencia con la concentración plasmática de dicha citocina. Sin embargo, no puede descartarse que exista un aumento en la concentración y efectos del $TNF\alpha$ a nivel tisular, como ya se ha comentado en otros apartados de la discusión.

Estudios experimentales demuestran que el glucagón interviene en el control de la glucemia por la insulina, posiblemente por interacción con su receptor (268). La administración exógena de glucagón mejora e incluso previene la aparición de esteatosis hepática al disminuir el cociente insulina/glucagón y regular la lipogénesis/lipólisis (85). En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en la concentración periférica de glucagón en los pacientes con EHNA, aunque el cociente insulina/glucagón estaba significativamente aumentado al comparar con los controles.

Pocos estudios previos de EHNA han incluido perfiles lipídicos detallados (64). Se ha descrito una estrecha asociación entre la hiperinsulinemia e

hipertrigliceridemia en la obesidad y la diabetes (63,475,477). Existen evidencias que sugieren que la insulinoresistencia, a través de la hiperinsulinemia, provoca un aumento en la síntesis hepática de partículas VLDL y contribuye al aumento de los triglicéridos plasmáticos observado en estos sujetos. Además, la resistencia de la lipoprotein lipasa específica de los adipocitos a la acción de la insulina y la disminución en la síntesis y secreción de apoproteína B, contribuyen a la hipertrigliceridemia y disminución en el aclaramiento de partículas VLDL. Sin embargo, al igual que Marchesini et al. (65), no encontramos en nuestro estudio correlación entre la insulinemia y la concentración periférica de triglicéridos ni de partículas VLDL.

Diferentes autores han demostrado una asociación entre la insulinemia e insulinoresistencia y los valores de ALT en pacientes con EHNA (475). De acuerdo con otros estudios (64), en nuestro grupo de EHNA no hallamos correlación entre la insulinemia, o alguno de sus índices y los enzimas hepáticos

En resumen, parece probable que la hiperinsulinemia e insulinoresistencia sean el nexo común para las diferentes condiciones clínicas asociadas a la EHNA y que jueguen un papel clave en la patogenia de la enfermedad. La elevada prevalencia de alguna alteración en el metabolismo de la glucosa/insulina en la EHNA sugiere que debería efectuarse un test de tolerancia oral a la glucosa junto con una determinación de la insulinemia en todos los pacientes con EHNA no diabéticos, así como realizar un seguimiento en aquellos normoglucémicos, sobre todo si presentan hiperinsulinemia e insulinoresistencia, por la posibilidad de que desarrollen con el tiempo una diabetes. Además, estos resultados podrían tener implicaciones terapéuticas que deberían evaluarse en ensayos clínicos (dietas para perder peso en obesos y drogas que mejoren la sensibilidad periférica a la insulina). Se precisan más estudios prospectivos que investiguen el estado del metabolismo de la glucosa/insulina en pacientes con enfermedad hepática leve de diferentes etiologías, incluyendo la EHNA.

CONCLUSIONES

1. El diagnóstico de EHNA debe sospecharse en pacientes con aumento sérico de la alanino-amino-transferasa y un patrón ecográfico de hígado brillante, especialmente si se trata de obesos y/o hiperlipémicos y/o diabéticos y/o consumidores de determinados fármacos, con independencia del sexo.
2. El sexo femenino, la edad avanzada, la diabetes mellitus tipo 2, las transaminasas elevadas y el aumento de la ferritina sérica se asocian a una lesión histológica de EHNA más avanzada. Su presencia puede ayudar a seleccionar a aquellos pacientes con diagnóstico clínico de EHNA en quienes se debe realizar una biopsia hepática.
3. En más de la mitad de los casos con EHNA existe fibrosis hepática, aunque en la mayoría se encuentra en un estadio inicial. La esteatosis e inflamación se asocian con grados mayores de fibrosis.
4. En la EHNA el transporte de los ácidos grasos libres al interior de la mitocondria es normal, pero la actividad de los cinco complejos de la cadena respiratoria mitocondrial está disminuida aproximadamente al 50%. Dicha disfunción justifica que exista una insuficiente oxidación de los ácidos grasos libres, que se produzca estrés oxidativo y, secundariamente, que aparezca esteatosis, inflamación y fibrosis.
5. El 59% de los pacientes con EHNA sin diabetes mellitus presenta un trastorno en el metabolismo de la glucosa e insulina que, al igual que en los diabéticos, debe contribuir a la aparición de las lesiones de esteatohepatitis.
6. El sobrecrecimiento bacteriano intestinal está presente en el 29% de pacientes con EHNA pero esta alteración no se asocia a ninguna de las condiciones que favorecen la colonización bacteriana, aunque es más frecuente cuando existen obesidad, hiperlipemia o consumo de fármacos.

7. El 21% de sujetos con EHNA tiene niveles plasmáticos de $TNF\alpha$ elevados. Dicho aumento no se relaciona con la existencia de sobrecrecimiento bacteriano intestinal, hiperinsulinemia, insulinoresistencia ni con la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.
8. La EHNA cursa con hiperferritinemia y saturación normal de la transferrina en aproximadamente un tercio de casos, pero la prevalencia de las mutaciones asociadas a la hemocromatosis hereditaria es similar a la población sana española.
9. No hemos encontrado ninguna asociación entre los antígenos del sistema HLA y la EHNA, aunque no podemos descartar que otros factores genéticos intervengan en la aparición de la enfermedad.

1. **Ludwig J, Viggiano RT, McGill DB.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 342-348.
2. **Fong DG, Nehra V, Lindor D, Buchman AL.** Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2000; 32: 3-10.
3. **Ludwig J, McGill DB, Lindor KD.** Metabolic liver disease. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 398-403.
4. **Lee RG.** Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20: 594-598.
5. **Zelman S.** The liver in obesity. *Arch Intern Med* 1958; 90: 141-156.
6. **Payne JH, DeWind LT, Commons RR.** Metabolic observations in patients with jejunoileal shunts. *Am J Surg* 1963; 106: 273-289.
7. **Bondar GF, Pisesky W.** Complications of small intestinal short circuiting for obesity. *Arch Surg* 1967; 94: 707-716.
8. **Moxley RT, Pozefsky T, Lockwood DH.** Protein nutrition and liver disease after jejunoileal bypass for morbid obesity. *N Engl J Med* 1974; 290: 921-926.
9. **Danö P, Vagn Nielsen O, Petri M, Jörgensen B.** Liver morphology and liver function before and after intestinal shunt operation for morbid obesity. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 409-416.
10. **Peters RL, Gay T, Reynolds TB.** Post-jejuno-ileal-bypass hepatic disease. Its similarity to alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol* 1975; 63: 318-331.
11. **Miller DJ, Ishimaru H, Klatskin G.** Non-alcoholic liver disease mimicking alcoholic hepatitis and cirrhosis. *Gastroenterology* 1979; 77: 27-29.
12. **Adler M, Schaffner F.** Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med* 1979; 67: 811-816.
13. **French SW, Eidus LB, Freeman J.** Nonalcoholic fatty hepatitis: An important clinical condition. *Can J Gastroenterol* 1989; 3: 189-197.
14. **Baker AL.** Nonalcoholic steatonecrosis: A unique histopathologic lesion of the liver with multiple causes. *Surv Dig Dis* 1985; 3: 154-164.
15. **Nagore N, Scheuer PJ.** The pathology of diabetic hepatitis. *J Pathol* 1988; 156: 155-160.
16. **Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA.** Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
17. **James OF, Day CP.** Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999; 353: 1634-1635.
18. **Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR.** Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 1996; 80: 1147-1165.
19. **James OF.** Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and natural history. En: Bloomer JR, Goodman ZD, Ishak KG, eds. *Clinical and pathological correlations in liver disease: approaching the next millennium.* Chicago, Illinois: AASLD Postgraduate Course, 1998: 187-193.
20. **James OF, Day CP.** Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998; 29: 495-501.

21. **García-Monzón C, Martín-Pérez E, Lo Iacono O, Fernández-Bermejo M, Majano P, Apolinario A, et al.** Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000;33: 716-724.
22. **Daniel S, Ben-Menachem T, Gopikrishan V, Man CK, Blumenkehl M.** Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3010-3014.
23. **Flegal KM, Carrol MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL.** Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes* 1998; 22: 39-47.
24. **Solís Herruzo JA, González Ramírez JA.** Esteatohepatitis no alcohólica. En: Rodés J, Chantar C, eds. V Curso de Actualización en Gastroenterología y Hepatología. Barcelona: J.R. Prous, 1992: 1-18.
25. **Spech HJ, Liehr H, Mitschke H.** Nicht alkoholbedingte fettleberhepatitiden und fettzirrhosen unter dem täuschenden bild alcoholtoxischer lebererkrankungen. *Z Gastroenterol* 1983; 21: 651-659.
26. **Sheth SG, Gordon FD, Chopra S.** Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145.
27. **Moreno D, Solís-Herruzo JA, Vargas J, Colina F, Lizasoain M.** Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio clínico-analítico de 40 casos. *Med Clin (Barc)* 1987; 89: 188-193.
28. **Castellano G, Moreno D.** Esteatohepatitis no alcohólica. ¿Una nueva entidad?. En: Rodés J, Arroyo V, Piqué JM, eds. Controversias en Gastroenterología. Barcelona: Ediciones Doyma, S.A., 1992: 103-108.
29. **Pérez-Carreras M, Castellano G, Gutiérrez MA, Colina F, Marcos MS, Solís JA.** Esteatohepatitis no alcohólica: una entidad no tan infrecuente. *Rev Esp Enf Digest* 1998; 90:240-241.
30. **Itoh S, Yougel T, Kawagoe K.** Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 650-654.
31. **Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG.** Alcohol-like liver disease in nonalcoholics. A clinical and histopathological comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1989; 95: 1056-1060.
32. **Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW.** The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
33. **Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J.** Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 1996; 23: 1464-1467.
34. **Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC.** Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 172-179.
35. **Hilden M, Juhl E, Thomen AC, Christoffersen P.** Fatty liver persisting for up to 33 years. *Acta Med Scand* 1973; 194: 485-489.
36. **Teli M, Oliver FW, Burt AD, Bennett MK, Day CP.** A natural history of nonalcoholic fatty liver: A follow-up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714-1717.
37. **George DK, Goldwurm S, Macdonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, et al.** Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998; 114: 311-318.
38. **Baldrige AD, Pérez-Atayde AR, Graeme-Cook HL, Higgins L, Lavine JE.** Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *J Pediatr* 1995; 127: 700-704.
39. **Wanless IR, Lentz JS.** Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-1110.

40. **Björntorp P.** Obesity. *Lancet* 1997; 350: 423-426.
41. **Thaler H.** Die Fettleber und ihre pathogenethische Beziehung zur Leberzirrhose. *Virchow Arch Path Anat* 1962; 335: 180-188.
42. **Thaler H.** Atiologie und therapie der fettleber. *Deuts Medizin J* 1972; 23: 648-653.
43. **Westwater JD, Fainer D.** Liver impairment in the obese. *Gastroenterology* 1958; 34: 686-693.
44. **Kern WH, Heger AH, Payne JH, DeWind LT.** Fatty metamorphosis of the liver in morbid obesity. *Arch Pathol* 1973; 96: 342-346.
45. **Klain J, Fraser D, Goldstein J, Peiser J, Avinoah E, Ovnat A, et al.** Liver histology abnormalities in the morbidly obese. *Hepatology* 1989; 10: 873-876.
46. **Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, et al.** Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1345-1355.
47. **Capron JP, Delamarre J, Dupas JL, Braillon A, Degott C, Quenum C.** Fasting and obesity. *Dig Dis Sci* 1982; 27: 265-268.
48. **Braillon A, Capron JP, Herve MA, Degott C, Quenum C.** Liver in obesity. *Gut* 1985; 26: 133-39.
49. **Weindruch R, Sohal RS.** Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 1997; 337: 986-994.
50. **Falchuk KR, Fiske SC, Haggitt RC, Federman M, Trey C.** Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. *Gastroenterology* 1980; 78: 535-541.
51. **Cruezfeldt W, Frerichs H, Sickinger K.** Liver disease and diabetes mellitus. En: Popper H, Schaffner F, eds. *Progress in Liver Disease*. Vol 3. New York: Grune and Stratton, 1973; 371-407.
52. **Conner CL.** Fatty infiltration of the liver and development of cirrhosis in diabetes and chronic alcoholism. *Am J Pathol* 1938; 14: 347-364.
53. **Reinberg MH, Lipson M.** The association of Laennec's cirrhosis with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1950; 33: 1195-1202.
54. **Jacques WE.** The incidence of portal cirrhosis and fatty metamorphosis in patients dying with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1953; 249: 442-445.
55. **Gomis R, Fernández-Alvarez J.** Trastornos del metabolismo de la glucosa y el hígado. En: Vilardell F, Rodés J, Malagelada JR, Pajares JM, Pérez Mota A, Moreno E, Puig J, eds. *Enfermedades digestivas*. Vol 3. Madrid: Grupo Aula Médica S.A., 1998: 1981-1985.
56. **Procetto J, Alford F, Dudley H.** The mechanism of the carbohydrate intolerance of cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1030-1035.
57. **Petrides AS.** Liver disease and diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1994; 2: 2-18.
58. **Kruszynska YT, Home PD, McIntre N.** Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 103-111.
59. **Bloodworth JMB.** Diabetes mellitus and cirrhosis of the liver. *Arch Intern Med* 1961; 108: 95-101.
60. **Batman PA, Scheuer PJ.** Diabetic hepatitis preceding the onset of glucose intolerance. *Histopathology* 1985; 9: 237-243.
61. **Hasen BC.** The metabolic syndrome X. En: Hasen BC, Saye J, Wennogle LP, eds. *The metabolic syndrome X*. New York: Annals of the New York Academy Sciences., 1999: 892: 1-19.

62. **Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP.** Hyperinsulinemia: The key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* 1991; 34: 416-422.
63. **DeFronzo RA, Ferrannini E.** Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 415-459.
64. **Pinto HC, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC.** Nonalcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?. *Clin Nutr* 1999; 18: 353-358.
65. **Knobler H, Schattner A, Zhornicki T, Malnick SDH, Keter D, Sokolovskaya N, et al.** Fatty liver-an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *Q J Med* 1999; 92: 73-79.
66. **Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bigianesi E, McCullough AJ, et al.** Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-455.
67. **Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, et al.** Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-1517.
68. **Payne JH, DeWind LT, Schwab CE.** Surgical treatment of morbid obesity: Sixteen years of experience. *Arch Surg* 1973; 106: 432-437.
69. **McGill DB, Humphreys SR, Baggenstoss AH, Dickson ER.** Cirrhosis and death after jejunioleal shunt. *Gastroenterology* 1972; 63: 872-877.
70. **Haines NW, Baker AL, Boyer JL, Glagov S, Scheir H, Jaspán J, et al.** Prognostic indications of hepatic injury following jejunal ileal bypass for refractory obesity: a prospective study. *Hepatology* 1981; 1: 161-165.
71. **McFarland RJ, Gazet JC, Pilkington TR.** A 13 year review of jejunioleal bypass. *Br J Surg* 1985; 72: 81-87.
72. **Mangla JC, Hoy WK, Kim Y, Chopek M.** Cirrhosis and death after jejunioleal shunt for obesity. *Am J Dig Dis* 1974; 19: 759-765.
73. **Iber F, Cooper M.** Jejunioleal bypass for the treatment of massive obesity. Prevalence, morbidity, and short and long term consequences. *Am J Clin Nutr* 1977; 30: 4-15.
74. **Baddeley RM.** An epilogue to jejunioleal bypass. *World J Surg* 1986; 9: 842-849.
75. **Craig RM, Neumann T, Jeejeebhoy KN, Yokoo H.** Severe hepatocellular reaction resembling alcoholic hepatitis with cirrhosis after massive small bowel resection and prolonged total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1980; 79: 131-137.
76. **Marubbio Jr AT, Buchwald J, Schwartz M, Varco R.** Hepatic lesions of central pericellular fibrosis in morbid obesity and after jejunioleal bypass. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 684-691.
77. **Halverson JD, Wise L, Wazna MF, Ballinger WF.** Jejunioleal bypass for morbid obesity. A critical appraisal. *Am J Med* 1978; 64: 461-475.
78. **Cello JP, Grendell JH.** The liver in systemic conditions. En: Zakim D, Doyer TD, eds. *Hepatology: A textbook of liver disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 1428-1429.
79. **Styblo T, Martin S, Kaminski DL.** The effects of reversal of jejunioleal bypass operations on hepatic triglyceride content and hepatic morphology. *Surgery* 1984; 96: 632-641.
80. **Kim WR, Poterucha JJ, Porayko MK, Dickson ER, Steers JL, Wiesner RH.** Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 1802-1805.

81. **Grim I, Shaheen N.** Small bowel bacterial overgrowth: epiphenomenon or bad actor in cirrhosis?. *Gastroenterology* 1996; 110: 955-960.
82. **Hamilton DL, Vest TK, Brown BS, Sham AN, Meivguy RB, Chey WY.** Liver injury with alcoholic-like hyalin after gastroplasty for morbid obesity. *Gastroenterology* 1983; 85: 722-726.
83. **Moen PW.** Fatal non-alcoholic steatohepatitis and cirrhosis following gastric bypass surgery: A case report. *Clin Nutr* 1986; 5: 199-202.
84. **Ito Y, Shils ME.** Liver dysfunction associated with long-term total parenteral nutrition in patients with massive bowel resection. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15: 271-276.
85. **Nussbaum MS, Li, Bowyer RH, McFadden DW, Dayal R, Fisher JE.** Addition of lipid to total parenteral nutrition prevents hepatic steatosis in rats by lowering the portal venous insulin/glucagon ratio. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1992; 16: 106-109.
86. **Nussbaum MS, Fischer JE.** Pathogenesis of hepatic steatosis during total parenteral nutrition. *Surg Annu* 1991; 23: 1-11.
87. **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: 434-438.
88. **Bowyer BA, Fleming CR, Listrup DM, Burnes JU, Nelson J, Reek S.** Plasma carnitine levels in patients receiving home parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1986; 43: 85-91.
89. **Bowyer BA, Fleming CR, Ludwig J, Petz J, McGill DB.** Does home long term parenteral nutrition in adults patients cause chronic liver disease?. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1985; 9: 11-17.
90. **Peura Da, Stromeyer FW, Johnson LF.** Liver injury with alcoholic hyaline after intestinal resection. *Gastroenterology* 1980; 79: 127-130.
91. **Drenik EJ, Fisler J, Johnson D.** Hepatic steatosis after intestinal bypass. Prevention and reversal by metronidazole irrespective of protein-calorie malnutrition. *Gastroenterology* 1982; 82: 534-548.
92. **Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P.** Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991; 12: 224-229.
93. **Solís Herruzo JA, Vidal JV, Colina F, Castellano G, Muñoz-Yagüe MT, Morillas JD.** Clinico-biochemical evolution and late hepatic lesions in the toxic oil syndrome. *Gastroenterology* 1987; 93: 558-568.
94. **Solís Herruzo JA, Castellano G, Colina F, Morillas JD, Muñoz-Yagüe MT, Coca MC, et al.** Hepatic injury in the toxic epidemic syndrome caused by ingestion of adulterated cooking oil (Spain, 1981). *Hepatology* 1984; 4: 131-138.
95. **Canga F, Castellano G, Colina F, González A, Garfia C, Sánchez F, et al.** Liver diseases associated with the toxic oil syndrome (TOS). A twelve years follow up: 1981-1993. *J Hepatol* 1995; 23 (Suppl): 242.
96. **Cotrim RP, Portugal M, Lyra L, Andrade Z, Freitas LAR.** Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and industrial toxins. Follow up of patients removed from one industrial area. *Hepatology* 1997; 26 (Suppl): 149.
97. **Berson A, Fromenty B, Lettéron P, Pessayre D.** Drug-induced steatosis and steatohepatitis: from mitochondrial dysfunction to lipid peroxidation. En: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J, eds. *Therapy in liver diseases*. Barcelona: Ediciones Masson S.A., 1997: 261-270.
98. **Castellano G, Pérez-Carreras M.** Esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica. En: Berenguer J, Bruguera M, García M, Rodrigo L, eds. *Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares*. Madrid: AEEH, Elba, S.A., 2001: 211-219.

99. **Fromenty B, Berson A, Pessayre D.** Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1997; 26: 13-22.
100. **Itoh S, Igarashi M, Tsukada Y, Ichinoe A.** Non-alcoholic fatty liver with alcoholic hyalin after long-term glucocorticoid therapy. *Acta Hepato Gastroenterol* 1977; 24: 415-418.
101. **Deschamps D, Fisch C, Fromenty B, Berson A, Degott C, Pessayre D.** Inhibition by salicylic acid of the activation and thus oxidation of long-chain fatty acids. Possible role in the development of Reye's syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259: 894-904.
102. **Kesterson JW, Granneman GR, Machinist JM.** The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. Toxicologic, biochemical, and histopathologic studies. *Hepatology* 1984; 4: 1143-1152.
103. **Vitorino RM, Silveira JC, Baptista A, De Moura MC.** Jaundice associated with naproxen. *Portgrad Med J* 1980; 56: 368-370.
104. **Genève J, Hayat-Bonan B, Labbe G, Pessayre D.** Inhibition of mitochondrial β -oxidation of fatty acids by pirofen. Role in microvesicular steatosis due to this nonsteroidal antiinflammatory drug. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 242: 1133-1137.
105. **Dutertre JP, Bastides F, Jonville AP.** Microvesicular steatosis after ketoprofen administration. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991; 3: 953-954.
106. **Fréneaux E, Fromenty B, Berson A, Labbe G, Degott C, Lettéron P, et al.** Stereoselective and nonstereoselective effects of ibuprofen enantiomers on mitochondrial β -oxidation of fatty acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 529-535.
107. **LeDinh T, Fréneaux E, Labbe G, Lettéron P, Degott C, Genève J, et al.** Amineptine, a tricyclic antidepressant, inhibits the mitochondrial oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 247: 745-750.
108. **Fromenty B, Fréneaux E, Labbe G, Deschamps D, Larrey D, Lettéron P, et al.** Tianeptine, a new tricyclic antidepressant metabolized by β -oxidation of its heptanoic side chain, inhibits the mitochondrial oxidation of medium and short chain fatty acids in mice. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 3743-3751.
109. **Fréneaux E, Labbe G, Lettéron P, Le Dinh T, Degott C, Genève J, et al.** Inhibition of the mitochondrial oxidation of fatty acids by tetracycline in mice and in man: possible role in microvesicular steatosis induced by this antibiotic. *Hepatology* 1988; 8: 1056-1062.
110. **Okanoue T, Sakamoto S, Itoh Y, Minami M, Yasui K, Sakamoto M, et al.** Side effects of high dose interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 25: 283-291.
111. **Noda S, Umezani H, Yamamoto K, Arabi T, Murakami T, Ishii N.** Reye-like syndrome following treatment with the pantothenic acid agonist, calcium hopantenate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 582-585.
112. **Wanless IR, Dore S, Gopinath N, Tan J, Cameron R, Heathcote EJ, et al.** Histopathology of cocaine hepatotoxicity. Report of four patients. *Gastroenterology* 1990; 98: 497-501.
113. **McKenzie R, Fried MW, Sallie R, Conjeevaram H, Di-Bisceglie AM, Park Y, et al.** Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1995; 33: 1099-1105.
114. **Fortgang IS, Belitsos PC, Chaisson RE, Moore RD.** Hepatomegaly and steatosis in HIV-infected patients receiving nucleoside analog antiretroviral therapy. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1433-1436.
115. **Simon JB, Manley PN, Brien JF, Armstrong PW.** Amiodarone hepatotoxicity simulating alcoholic liver disease. *N Engl J Med* 1984; 311: 167-172.

- 116.Deschamps D, De Beco V, Fisch C, Fromenty B, Guillouzo A, Pessayre D.** Inhibition by perhexiline of oxidative phosphorylation and the β -oxidation of fatty acids: possible role in pseudoalcoholic liver lesions. *Hepatology* 1994; 19: 948-961.
- 117.Guigui B, Perrot S, Berry JP, Fleury-Feith J, Martín N, Métreau JM, et al.** Amiodarone-induced hepatic phospholipidosis: a morphological alteration independent of pseudoalcoholic liver disease. *Hepatology* 1988; 8: 1063-1068.
- 118.Pessayre D, Bichara M, Feldman G, Degott C, Potet F, Benhamou JP.** Perhexiline maleate-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1979; 76: 170-177.
- 119.Fromenty B, Fisch C, Labbe G, Degott C, Deschamps D, Berson A, et al.** Amiodarone inhibits the mitochondrial β -oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 1371-1376.
- 120.Nanki T, Koike R, Miyasaka N.** Subacute severe steatohepatitis during prednisolone therapy for systemic lupus erythematosus. *AJG* 1999; 94: 3379.
- 121.Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, De Costa EB, Valente A, De Moura MC.** Tamoxifen-associated steatohepatitis: report of three cases. *J Hepatol* 1995; 23: 95-97.
- 122.Seki K, Minami Y, Nishikawa M, Kawata S, Miyoshi S, Imai Y, et al.** "Nonalcoholic steatohepatitis" induced by massive doses of synthetic estrogen. *Gastroenterol Jpn* 1983; 18: 197-203.
- 123.Pratt DS, Knox TA, Erban J.** Tamoxifen-induced steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 236.
- 124.Babany G, Uzzan F, Larrey D, Degott C, Bourgeon P, Rene E.** Alcoholic-like liver lesions induced by nifedipine. *J Hepatol* 1989; 9: 252-255.
- 125.Uchimura Y, Sata M, Kage M, Abe H, Tanikawa K.** A histopathological study of alcoholics with chronic HCV infection: comparison with chronic hepatitis C and alcoholic liver disease. *Liver* 1995; 15: 300-306.
- 126.Fischer HP, Willsch E, Bierhoff E, Pfeifer U.** Histopathologic findings in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 24: 35-42.
- 127.Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC, et al.** Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1993; 104: 595-603.
- 128.Lenzi M, Ballarkini G, Fusconi Mcasani F, Selleri L, Volta U, et al.** Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990; 335: 258-259.
- 129.Bruix J, Barrera JM, Calvet X, Costa J, Ventura M, Bruguera M, et al.** Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 2: 1004-1006.
- 130.Parés A, Barrera JM, Caballería J, Ercilla G, Bruguera M, Caballería LL, et al.** Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury. *Hepatology* 1990; 12: 1295-1299.
- 131.Nishiguchi S, Kuroki T, Yabusako T, Seki S, Kobayashi K, Monna T, et al.** Detection of hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus RNA in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1991; 14: 985-989.
- 132.Mendenhall CL, Seeff L, Diehl AM, Ghosn SJ, French SW, Gartside PS, et al.** Antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus in alcoholic hepatitis and cirrhosis: their prevalence and clinical relevance. *Hepatology* 1991; 14: 581-589.

133. **Caldwell SH, Jeffers LJ, Ditomaso A, Millar A, Clark RM, Rabassa A, et al.** Antibody to hepatitis C is common among patients with alcoholic liver disease with and without risk factors. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 1219-1223.
134. **Mason AL, Lau JYN, Noang N, Quian KP, Alexander GJM, Xu L, et al.** Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 328-333.
135. **Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, et al.** Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 30: 1059-1063.
136. **Pérez-Carreras M, Castellano G, Gutiérrez MA, Colina F, Pérez-Arellano E, Solís JA.** Esteatohepatitis no alcohólica y virus de la hepatitis C. *Rev Esp Enf Digest* 1998; 90: 248.
137. **Rogers DW, Lee CH, Pound DC, Kumar S, Cummings OW, Lumeng L.** Hepatitis C virus does not cause nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1644-1649.
138. **Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A.** Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C infection. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 355-359.
139. **Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, et al.** Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999; 29: 1215-1219.
140. **Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, et al.** Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 2000; 33: 106-115.
141. **Nazim M, Stamp G, Hodgson HJF.** Non-alcoholic steatohepatitis associated with small intestinal diverticulosis and bacterial overgrowth. *Hepato-gastroenterol* 1989; 36: 349-351.
142. **Kimura H, Kako M, Yo K, Oda T.** Alcoholic hyalins (Mallory bodies) in a case of Weber-Christian disease: electron microscopic observations of liver involvement. *Gastroenterology* 1980; 78: 807-812.
143. **Powell EE, Searle J, Mortimer R.** Steatohepatitis associated with limb lipodystrophy. *Gastroenterology* 1989; 97: 1022-1024.
144. **Partin JS, Partin JC, Schubert WK, McAdams AJ.** Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: evolution of micronodular cirrhosis. *Gastroenterology* 1974; 67:107-118.
145. **Castellano G, Garfia C, Gómez-Coronado D, Arenas J, Manzanares J, Colina F, et al.** Diffuse fatty liver in familial heterozygous hypobetalipoproteinemia. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: 379-382.
146. **Wishingrad M, Paso B, García G.** Fatty liver due to heterozygous hypobetalipoproteinemia. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1106-1107.
147. **McLaren DS, Bitar GJ, Nassar VH.** Protein-calorie malnutrition and the liver. *Prog Liv Dis* 1972; 4: 527-536.
148. **Lau Y.** Fatty acid levels in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and fatty liver. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 546.
149. **Kumar KS, Malet PF.** Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 733-739.
150. **Björntorp P, Bergman H, Varnauskas E.** Plasma free fatty acid turnover in obesity. *Acta Med Scand* 1969; 185: 351-356.
151. **Palombo JD, Schnure F, Bristrian BR, Buchanan LM, Blackburn GL.** Improvement of liver function tests by administration of L-carnitine to a carnitine-deficient patient receiving home parenteral nutrition: a case report. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11: 88-92.

- 152.Holman RT, Johnson SB, Mercuri O, Itarte HJ, Rodrigo MA, De Tomas ME.** Essential fatty acid deficiency in malnourished children. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 1534-1539.
- 153.Fleming CR, Smith LM, Hodges RE.** Essential fatty acid deficiency in adults receiving total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1976; 29: 976-983.
- 154.Buchman AI, Dubin MA, Mourkrzel AA.** Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology* 1995; 22: 1399-1403.
- 155.Buchman AI, Dubin MA, Jenden D, Moukarzel A, Roch MH, Rice K, et al.** Lecithin increases plasma free choline and decreases hepatic steatosis in long-term total parenteral nutrition patients. *Gastroenterology* 1992; 102: 1363-1370.
- 156.Lombardi B, Pani P, Schlunk FF.** Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides. *J lip Res* 1968; 9: 437-446.
- 157.Sheard NF, Tayek JA, Bistrrian BR, Blackburn GL, Zeisel SH.** Plasma choline concentration in humans fed parenterally. *Am J Clin Nutr* 1986; 43: 219-224.
- 158.Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM.** Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2557-2562.
- 159.Day CP, James OF.** Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party?. *Hepatology* 1998; 27: 1463-1466.
- 160.Day CP, James OF.** Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.
- 161.Diehl AM.** Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 221-229.
- 162.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: 1413-1419.
- 163.Eriksson S, Eriksson K, Bondesson L.** Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta Med Scand* 1986; 220: 83-88.
- 164.Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD.** Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-1362.
- 165.Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al.** Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118: 1117-1123.
- 166.Lettéron 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: 200-208.
- 167.Piñol V, Bessa X, Bruguera M, Rodés J.** Esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica. Análisis comparativo. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 57-61.
- 168.Stryer L.** Metabolismo de los ácidos grasos. En: Stryer L, ed. *Bioquímica*. Vol 2; 4ª ed. Barcelona: Reverté S.A., 1995: 603-625.
- 169.Rawn JD.** El metabolismo de los ácidos grasos. En: Rawn JD, ed. *Bioquímica*. Vol I. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1989: 421-456.
- 170.Guyton AC, Hall JE.** Metabolismo de los lípidos. En: Guyton AC, Hall JE, eds. *Tratado de fisiología médica*. 9ª ed. Madrid: Ediciones Interamericana-McGraw-Hill SA., 1998: 939-951.
- 171.Mavrelis PG, Ammon HV, Gleysteen JJ, Komorowski RA, Charaf UK.** Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and morbid obesity. *Hepatology* 1983; 3: 226-231.

- 172. Cairns SR, Kark AE, Peters TJ.** Raised free fatty acids in a patient with acute fatty liver after gastric surgery for morbid obesity. *J Clin Pathol* 1986; 39: 647-649.
- 173. Eisele JW, Barker EA, Smuckler EA.** Lipid content in the liver of fatty metamorphosis of pregnancy. *Am J Pathol* 1975; 81: 545-560.
- 174. Gorden ES.** Non-esterified fatty acids in blood of obese and lean subjects. *Am J Clin Nutr* 1960; 8: 740-747.
- 175. Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferranini E, DeFronzo RA.** The role of fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 96-107.
- 176. Saleh J, Sniderman AD, Cianflone K.** Regulation of plasma fatty acid metabolism. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 163-180.
- 177. Scott HW Jr, Dean RH, LeQuire V, Swift LL, Younger RK, Butts WH.** Alterations in plasma lipid concentrations in normal and hyperlipidemic patients with morbid obesity before and after jejunoileal bypass. *Am J Surg* 1978; 135: 341-347.
- 178. Carlson LA, Boberg J, Hogstedt B.** Some physiological and clinical implications of lipid mobilization from adipose tissue. En: Renold AE, Cahill GF Jr, eds. *Handbook of physiology*. Vol 5. Washington D.C.: American Physiological Society, 1965: 625-644.
- 179. Stryer L.** Integración del metabolismo. En: Stryer L, ed. *Bioquímica*. Vol 2; 4ª ed. Barcelona: Reverté S.A., 1995: 763-784.
- 180. Stryer L.** Ciclo del ácido cítrico. En: Stryer L, ed. *Bioquímica*. Vol 2; 4ª ed. Barcelona: Reverté S.A., 1995: 509-525.
- 181. Rawn JD.** El ciclo del ácido cítrico. En: Rawn JD, ed. *Bioquímica*. Vol I. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1989: 329-358.
- 182. Stryer L.** Conceptos básicos y visión de conjunto. En: Stryer L, ed. *Bioquímica*. Vol 2; 4ª ed. Barcelona: Reverté S.A., 1995: 443-459.
- 183. Stryer L.** Fosforilación oxidativa. En: Stryer L, ed. *Bioquímica*. Vol 2; 4ª ed. Barcelona: Reverté S.A., 1995: 529-555.
- 184. Rawn JD.** La fosforilación oxidativa. En: Rawn JD, ed. *Bioquímica*. Vol I. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1989: 359-384.
- 185. Enríquez JA, Martínez-Azorín F, Garesse R, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A, Bornstein B, et al.** Sistema genético mitocondrial humano. En: Jiménez-Jiménez FJ, Molina-Arjona JA, Arenas J, eds. *Enfermedades mitocondriales*. *Rev Neurol* 1998; 26 (Supl 1): 21-26.
- 186. Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, de Bustos F, Campos Y, Arenas J.** Déficit de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial. En: Jiménez-Jiménez FJ, Molina-Arjona JA, Arenas J, eds. *Enfermedades mitocondriales*. *Rev Neurol* 1998; 26 (Supl I): 15-20.
- 187. Muñoz-Blanco JL.** Míopatías lipídicas. En: Jiménez-Jiménez FJ, Molina-Arjona JA, Arenas J, eds. *Enfermedades mitocondriales*. *Rev Neurol* 1998; 26 (Supl I): 72-80.
- 188. Bremer J.** Carnitine metabolism and function. *Physiol Rev* 1983; 63: 1420-1480.
- 189. Hoppel C.** The physiological role of carnitine. En: Ferrari R, DiMauro S, Sherwood G, eds. *L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. San Diego: Academic Press Inc., 1992: 5-20.
- 190. Carter AL, Abney TO, Lapp DF.** Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol* 1995; 10 (Suppl 2): 3-7.

- 191. Di Donato S.** Disorders of lipid metabolism affecting skeletal muscle: carnitine deficiency syndromes, defects in the catabolic pathway and Chanarin disease. En: Engel AG, Franzini-Armstrong c, eds. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1994: 1587-1609.
- 192. Silipandri N, Lodovico S, Cinam M, Di Lisa F.** Carnitine: metabolism and clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 1989; 183: 3-12.
- 193. Di Donato S, Garavaglia B, Rimoldi M, Carrara F.** Introduction to clinical and biomedical phenotypes of carnitine deficiencies. En: Ferrari R, DiMauro S, Sherwood G, eds. *L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. San Diego: Academic Press Inc., 1992: 81-96.
- 194. Pons R, de Vivo DC.** Primary and secondary carnitine deficiency syndromes. *J Child Neurol* 1995; 10 (Suppl 2): 8-24.
- 195. Stumpf DA, Parker WD Jr, Angelini C.** Carnitine deficiency, organic acidemias, and Reye's syndrome. *Neurology* 1985; 35: 1041-1045.
- 196. Engel AG.** Carnitine deficiency syndromes and lipid storage myopathies. En: Engel AG, Banker BQ, eds. New York: McGraw-Hill, 1986: 1663-1696.
- 197. Eriksson BO, Gustafson B, Lindsted S, Nordin J.** Transport of carnitine into cells in hereditary carnitine deficiency. *J Inher Metab Dis* 1989; 12: 108-112.
- 198. Treem WR, Stanley CA, Finegold DN, Hale DE, Coates PM.** Primary carnitine deficiency due to failure of carnitine transport in kidney, muscle and fibroblasts. *N Engl J Med* 1988; 319: 1331-1336.
- 199. Campos Y, Huertas R, Lorenzo G, Bautista J, Gutiérrez E, Aparicio M, et al.** Plasma carnitine insufficiency and effectiveness of L-carnitine therapy in patients with mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* 1993; 16: 150-153.
- 200. Di Donato S, Rimoldi M, Garavaglia B, Uziel G.** Propionil carnitine excretion in propionic and methylmalonic acidurias: a cause of carnitine deficiency. *Clin Chim Acta* 1984; 139: 13-21.
- 201. Secombe DW, James L, Booth F.** L-carnitine treatment in glutaric aciduria type 1. *Neurology* 1986; 36: 264-267.
- 202. Bennet MJ, Hale DE.** Defects of mitochondrial oxidation enzymes. En: Ferrari R, DiMauro S, Sherwood G, eds. *L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. San Diego: Academic Press Inc., 1992: 187-203.
- 203. Chalmers RA, Bain MD, Stacey T, de Sousa C.** Carnitine deficiency. *Lancet* 1990; 335: 982.
- 204. 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: 140-143.
- 205. Rose SJ, Stokes TC, Patel S, Cooper MB, Betteridge DJ, Payne JE.** Carnitine deficiency associated with long-term pivampicilin treatment: the effect of a replacement therapy regimen. *Postgrad Med J* 1992; 68: 932-934.
- 206. Dalakas MC, León-Monzón ME, Bernardini I, Gahl WA, Jay CA.** Zidovudine-induced mitochondrial myopathy associated with muscle carnitine deficiency and lipid storage. *Ann Neurol* 1994; 35: 482-487.
- 207. 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: 437-440.
- 208. Sachan DS, Rhew TH, Ruark RA.** Ameliorating effects of carnitine and its precursors on alcohol-induced fatty liver. *Am J Clin Nutr* 1984; 39: 738-744.

- 209.Frohlich J, Hahn P, Cleator I.** Changes in plasma carnitine levels after jejunoileal bypass. *Lancet* 1980; 1: 1085-1087.
- 210.Hammond KD, Tobianski R, Abrahams OL.** Serum carnitine in children with Kwashiorkor. *Ann Trop Paediatr* 1987; 7: 214-216.
- 211.Berner YN, Larchian WA, Lowry SF, Nicroa RR, Brennan MF, Shike M.** Low plasma carnitine levels in patients receiving home parenteral nutrition. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1990; 14: 255-258.
- 212.Pichard C, Roulet M, Schutz Y, Rossle C, Chiolero R, Temler E, et al.** Clinical relevance of L-carnitine-supplemented total parenteral nutrition in postoperative trauma. *Am J Clin Nutr* 1986; 49: 283-289.
- 213.Tao RC, Yoshimura NN.** Carnitine metabolism and its application in parenteral nutrition. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1980; 4: 469-486.
- 214.Worthley LIG, Fishlock RC, Snoswell AM.** Carnitine balance and effects of intravenous L-carnitine in two patients receiving long-term total parenteral nutrition. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1984; 8: 717-719.
- 215.Krähenbühl S, Reichen J.** Carnitine metabolism in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1996; 25: 148-153.
- 216.Harper P, Schmidt D, Hultcrantz R, Cederblad G.** Liver carnitine content in chronic alcoholics in alcohol withdrawal. *Eur J Gastroent Hepatol* 1993; 5: 177-181.
- 217.Fuller RK, Hoppel CL.** Elevated plasma carnitine in hepatic cirrhosis. *Hepatology* 1983; 3: 554-558.
- 218.Amodio P, Angeli P, Merkel C, Menon F, Gatta A.** Plasma carnitine levels in liver cirrhosis: relationship with nutritional status and liver damage. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 619-626.
- 219.Rudman D, Swell CW, Ansley JD.** Deficiency of carnitine in cachectic cirrhotic patients. *J Clin Invest* 1977; 60: 716-723.
- 220.Harper P, Wadström C, Backman L, Cederblad G.** Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 18-25.
- 221.Krähenbühl S, Brass EP.** Fuel homeostasis and carnitine metabolism in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 927-934.
- 222.Jensen K, Gluud C.** The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies. *Hepatology* 1994; 20: 1061-1077.
- 223.McGarry JD, Robles-Valdés C, Foster DW.** Role of carnitine in hepatic ketogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 4385-4388.
- 224.Li BUK, Murray RD, Heitlinger LA, Hughes AM, McClung HJ, O'Doriso TM.** Enterohepatic distribution of carnitine in developing piglets: relation to glucagon and insulin. *Pediatr Res* 1992; 32: 312-316.
- 225.Kispal G, Melegh B, Sandor A.** Effect of insulin and glucagon on the uptake of carnitine by perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1987; 929: 226-228.
- 226.McGarry JD, Foster DW.** Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 395-420.
- 227.Bohles H, Segerer A, Ekl W.** Improved N-retention during L-carnitine supplemented total parenteral nutrition. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1984; 8: 9-13.
- 228.Tonsgard JH.** Serum dicarboxylic acids in patients with Reye syndrome. *J Pediatr* 1986; 109: 440-445.

- 229.Linz DN, García VF, Arya G, Hug G, Tombragel E, Landrigan E, et al.** Weanling and adults differ in fatty acid and carnitine metabolism during sepsis. *J Pediatr surg* 1995; 30: 959-966.
- 230.Di Mauro S, Di Mauro PM.** Muscle carnitine palmityl transferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 1973; 182: 929-931.
- 231.Zierz S.** Carnitine palmitoyltransferase deficiency. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1994:1577-1586.
- 232.Kieval IR, Sotrel A, Weinblatt ME.** Chronic myopathy with a partial deficiency of the carnitine palmitoyltransferase enzyme. *Arch Neurol* 1989; 46: 575-576.
- 233.Ross NS, Hoppel CL.** Partial muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency: rhabdomyolysis associated with transiently decreased muscle carnitine content after ibuprofen therapy. *JAMA* 1987; 257: 62-65.
- 234.Tein I, Demaugre F, Bonnefont JP, Saudubray JM.** Normal muscle CPT I and CPT 2 activities in hepatic presentation of patients with CPT I deficiency in fibroblasts. *J Neurol Sci* 1989; 92: 229-245.
- 235.Yamamoto S, Abe H, Kohgo T, Ogawa A, Ohtake A, Hayashibe H, et al.** Two novel gene mutations (Glu 74^{Lys}, Phe 383^{Tyr}) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet* 1996; 98: 116-118.
- 236.Stanley CA, Boxer J, de Leeuw S.** Mitochondrial inner membrane acylcarnitine translocase deficiency in an infant with an inborn error of fatty acid oxidation. *Pediatr Res* 1991; 29 (Suppl):199.
- 237.Chalmers RA, Stanley CA, English N, Wigglesworth JS.** Mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase deficiency presenting as sudden neonatal death. *J Pediatr* 1997; 131: 220-225.
- 238.Treem WR, Witzleben CA, Piccoli DA, Stanley CA, Hale DE, Coates PM, et al.** Medium-chain and long-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency: clinical, pathologic and ultrastructural differentiation from Reye's syndrome. *Hepatology* 1986; 6: 1270-1278.
- 239.Treem WR, Rinaldo P, Hale DE, Stanley CA, Millington DS, Hyams JS, et al.** Acute fatty liver of pregnancy and long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Hepatology* 1994; 19: 339-345.
- 240.Mock DM.** Fatty acids and Reye's syndrome. *Hepatology* 1986; 6: 1414-1415.
- 241.Wallace DC.** Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 1175-1212.
- 242.Rahman S, Blok RB, Dahl H-HM, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, et al.** Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 1996; 39: 343-351.
- 243.Lomax RB, Robertson WR.** The effects of hypo- and hyperthyroidism on fibre composition and mitochondrial enzyme activities in rat skeletal muscle. *J Endocrinol* 1992; 133: 375-380.
- 244.Cord JM, Turrens JF.** Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion. *Curr Top Bioenerg* 1994; 17: 173-195.
- 245.Willis WT, Dallman PR.** Impaired control of respiration in iron-deficient muscle mitochondria. *Am J Physiol* 1989; 257: 1080-1085.
- 246.James PE, Jackson SK, Grinberg OY, Swartz HM.** The effects of endotoxin on oxygen consumption of various cell types in vitro: An EPR oximetry study. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 641-647.
- 247.Clemens MG.** Nitric oxide and liver injury. *Hepatology* 1999; 30: 1-5.
- 248.Lewis W, Dalakas MC.** Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med* 1995; 1: 417-422.
- 249.Cohen PJ.** Effect of anesthetics on mitochondrial function. *Anesthesiology* 1973; 39: 79-83.

250. **Burkhardt C, Kelly JP, Lim YH, Filley ChH, Parker WD.** Neuroleptic medications inhibit complex I of the electron transport chain. *Ann Neurol* 1993; 33: 512-517.
251. **Cardellach FC, Barrientos A, Miró O, Casademont J.** Patología mitocondrial y enfermedad. *MTA Med Interna* 1995; 13: 501-545.
252. **Fromenty B, Grimbert S, Mansouri A, Beaugrand M, Erlinger S, Rötig A, et al.** Hepatic mitochondrial DNA deletion in alcoholics: association with microvesicular steatosis. *Gastroenterology* 1995; 108: 193-200.
253. **Mansouri A, Fromenty B, Berson A, Robin MA, Grimbert S, Beaugrand M, et al.** Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *J Hepatol* 1997; 27: 96-102.
254. **Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, et al.** GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 1997; 273: 7-17.
255. **Müller-Hocker J, Aust D, Rohbrach H, Napiwotzky J, Reith A, Link TA, et al.** Defects of the respiratory chain in the normal human liver and cirrhosis during aging. *Hepatology* 1997; 26: 709-719.
256. **Krähenbühl S, Reichen J.** Adaption of mitochondrial metabolism in liver cirrhosis. Different strategies to maintain a vital function. *Scand J Gastroenterol* 1992; 193: 90-96.
257. **Calbreath DF.** Lipids and heart disease. En: Ozma S, ed. *Clinical chemistry*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 279-301.
258. **Schaefer ES, Levy RI.** Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med* 1985; 312: 1300-1310.
259. **Avigan MI, Ishak KG, Gregg RE, Hoofnagle JH.** Morphologic features of the liver in abetalipoproteinemia. *Hepatology* 1984; 4: 1223-1226.
260. **Hagve TA, Myrseth LE, Schrumpf E, Blumhoff JP, Christophersen B, Elgjok K, et al.** Liver steatosis in hypobetalipoproteinemia. *J Hepatol* 1991; 13: 104-111.
261. **Tarugi P, Lonardo A, Ballarini G, Erspamer L, Tondelli E, Bertolini S, et al.** A study of fatty liver disease and plasma lipoproteins in a kindred with familial hypobetalipoproteinemia due to a novel truncated form of apolipoprotein B (Apo B-54.5). *J Hepatol* 2000; 33: 361-370.
262. **Di Piazza V, Cacitti M.** Cryptogenic liver cirrhosis with hypobetalipoproteinemia. Typing of HLA histocompatibility system. *Minerva Med* 1992; 83: 197-200.
263. **Linton MF, Farese RV, Young SG.** Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1993; 34: 521-541.
264. **Sreekumar CR, Rasmussen D, Nair K, Lindor K.** Impaired synthesis of apolipoprotein B-100 in NASH. *Hepatology* 2000; 32 (Suppl): 388.
265. **Zeisel SH, Blusztajn, JK.** Choline and human nutrition. *Ann Rev Nutr* 1994; 14: 269-296.
266. **Wanless IR, Bargman JM, Oraopoulos DG, Vas SI.** Subcapsular steatonecrosis in response to peritoneal insulin delivery: A clue to the pathogenesis of steatonecrosis in obesity. *Mod Pathol* 1989; 2: 69-74.
267. **Burrows CJ, Jones AW.** Hepatic subcapsular steatosis in a patient with insulin dependent diabetes receiving dialysis. *J Clin Pathol* 1994; 47: 274-275.
268. **Li S, Nussbaum MS, McFadden DW.** Addition of glucagon to total parenteral nutrition prevents hepatic steatosis in rats. *Surgery* 1988; 104: 350-357.

- 269. Guyton AC, Hall JE.** Insulina, glucagón y diabetes mellitus. En: Guyton AC, Hall JE, eds. Tratado de fisiología médica. 9ª ed. Madrid: Ediciones Interamericana-McGraw-Hill SA., 1998: 1063-1077.
- 270. Hoekstra JBL, Van Rijn HJM, Erkelens DW, Thijssen JHH.** C-Peptide. *Diabetes Care* 1982; 5: 438-446.
- 271. Polonsky KS, Rubenstein AH.** C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. *Diabetes* 1984; 33: 486-494.
- 272. Cook GA, Gamble MS.** Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent K_1 values for malonyl-CoA. *J Biol Chem* 1987; 262: 2050-2055.
- 273. Eckel RH.** Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989; 320: 1060-1068.
- 274. Lewis GF, Steiner G.** Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care* 1996; 19: 390-393.
- 275. Sparks CE, Sparks JD, Bolognino M, Salhanik A, Strumph PS, Amatruda JM.** Insulin effects on apolipoprotein B lipoprotein synthesis and secretion by primary cultures on rat hepatocytes. *Metabolism* 1986; 35: 1128-1131.
- 276. Shepherd PR, Kahn BB.** Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 248-257.
- 277. Beynen AC, Vaartjes WJ, Geelen MJ.** Opposite effects of insulin and glucagon in acute hormonal control of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 1979; 28: 828-835.
- 278. Everson SA, Goldberg DE, Helmrich SP, Lakka TA, Lynch JW, Kaplan GA, et al.** Weight gain and the risk of developing insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998; 21: 1637-1643.
- 279. Unger RH.** Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44: 863-870.
- 280. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM.** Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 1989; 83: 1168-1173.
- 281. Belfiore F, Lannello S.** Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurements methods. *Mol Gen Metab* 1998; 65: 121-128.
- 282. Boden G.** Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 3-10.
- 283. Wiesenthal SR, Sandhu H, McCall RH, Tchishopashvili V, Yoshii H, Polonsky K, et al.** Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. *Diabetes* 1999; 48: 766-774.
- 284. Mason TM, Goh T, Tchishopashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis G, et al.** Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 1999; 48: 524-530.
- 285. Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutiérrez C, Vendrell J, et al.** Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998; 47: 1757-1762.
- 286. Fernández-Real JM, Ricart W.** Insulinorresistencia: nuevas perspectivas. *Med Clin (Barc)* 1999; 112: 219-221.
- 287. Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ.** Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 1992; 130: 43-52.

- 288.Hotamisligil GS.** The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999; 245: 621-625.
- 289.Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
- 290.Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.** Increased adipose expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.
- 291.Fernández-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E, Balanca R, Casamit-Jana-Abella R, Cabrero D, et al.** Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998; 21: 62-68.
- 292.Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, et al.** Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999; 117: 1155-1163.
- 293.Macdonald GA, Powell LW.** More clues to the relationship between hepatic iron and steatosis: an association with insulin resistance. *Gastroenterology* 1999; 117: 1241-1243.
- 294.Fragion S, Mattioli M.** Hyperferritinemia and hepatic steatosis: a possible link between iron and disorders of glucose and/or lipid metabolism. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 437.
- 295.Olefsky JM, Nolan IJ.** Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 980-986.
- 296.Petrides AS, Groop LC, Riely CA, DeFronzo RA.** Effect of physiologic hyperinsulinemia on glucose and lipid metabolism in cirrhosis. *J Clin Invest* 1991; 88: 561-570.
- 297.Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, Vogt C, Bush AJ, Lambeth H.** Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology* 1998; 28: 141-149.
- 298.Cavallo-Perin P, Cassader M, Bozzo C, Bruno A, Nuccio P, Dall'omo AM, et al.** Mechanism of insulin resistance in human liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1985; 75: 1659-1665.
- 299.Johnson PJ.** Efecto de la enfermedad hepática en el sistema endocrino. En: Rodés J, Benhamou JP, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M, eds. *Tratado de Hepatología Clínica*. Vol 2. Barcelona: editorial Masson S.A., 1993: 1425-1437.
- 300.Inokuchi T, Watanabe K, Kameyama H, Orita M.** Altered basal C-peptide / insulin molar ratios in obese patients with fatty liver. *Jpn J Med* 1988; 27: 272-276.
- 301.Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, et al.** Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1998; 338: 867-872.
- 302.Schwartz S, Raskin P, Fonseca V, Graveline JF.** Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1998; 338: 861-866.
- 303.Raskin P, Rappaport EB, Cole ST, Yan Y, Patwardhan R, Freed MI.** Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. *Diabetología* 2000; 43: 278-284.
- 304.Battle EH, Hespenheide EE, Caldwell SH.** Pilot study of troglitazone (rezulin) for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 304.
- 305.Watkins PB, Whitcomb RW.** Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* 1998; 338: 916-917.
- 306.Buckingham RE, Toseland CN, Draper N, Clarke K.** Rosiglitazone reduces hepatic fat content. *Diabetología* 2000; 43: 581^a.
- 307.Seedorf U.** Peroxisomes in lipid metabolism. *J Cell Biochem* 1998; 30/31: 158-167.

- 308.Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI.** Metabolic aspects of peroxisomal β -oxidation. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1085: 141-158.
- 309.Solís Herruzo JA.** Esteatohepatitis no alcohólica. *Revis Gastroenterol* 1999; 1: 551-578.
- 310.Soltys KA.** Evidence supporting increased basal oxidative stress and impaired antioxidant defenses in fatty livers. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 229.
- 311.Halliwell B.** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet* 1994; 344: 721-724.
- 312.Olanow CW.** A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 1993; 16: 439-444.
- 313.Doherty JF, Golden MHN, Brooks SEH.** Peroxisomes and the fatty liver of malnutrition: an hypothesis. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 674-677.
- 314.Fromenty B, Pessayre D.** Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. *J Hepatol* 1997; 26: 43-53.
- 315.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: 764-774.
- 316.Guillette JR, Brodie BB, La Du BB.** The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J Pharmacol Exp Ther* 1957; 119: 532-540.
- 317.Kuthan H, Ullich V.** Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem* 1982; 126: 538-588.
- 318.Pinto HC, Felipe P, Baptista A, Fernandes A, Camilo E, Ramalho F, et al.** Hepatic steatosis and lipid peroxidation in human chronic liver diseases. *Hepatology* 1996; 24 (Suppl): 311.
- 319.Tsakamoto H, Kim CW, Luo ZZ, Horne W, Su LC, Brittenham G.** Role of lipid peroxidation in vivo and in vitro models of liver fibrogenesis. *Gastroenterology* 1993; 104: 1012.
- 320.Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
- 321.Benedetti A, Comporti M.** Formation, reactions and toxicity of aldehydes produced in the course of lipid peroxidation in cellular membranes. *Bioelectrochem Bioenerg* 1987; 18: 187-202.
- 322.Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU.** Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React* 1985; 7: 137-142.
- 323.Lee RG.** Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler. *Hepatology* 1995; 21: 1742-1744.
- 324.Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M.** Stimulation of collagen α 1 (I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis?. *Hepatology* 1994; 19: 1262-1271.
- 325.Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Bellomo G, Thor H, Orrenius S.** Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca^{2+} -dependent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 1986; 191: 231-246.
- 326.Cai J, Jones DP.** Superoxide in apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 11401-11404.
- 327.Romero D, Calvo M, Villalba MP, Amiguet JA, Bueno J.** Radicales libres y especies activas del oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. *An Med Intern* 1987; 4: 672-679.

328. **Lichtman SN, Sartor RB, Keku J, Schwab JH.** Hepatic inflammation in rats with experimental small intestinal bacterial overgrowth. *Gastroenterology* 1990; 98: 414-423.
329. **Yamakawa T, Tanaka S, Yamakawa Y, Kiuchi Y, Isoda F, Kawamoto F, et al.** Augmented production of tumor necrosis factor- α in obese mice. *Immunology (oxf)* 1995; 75: 51-56.
330. **Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T.** Tumor necrosis factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2907-2910.
331. **López-Soriano J, López-Soriano FJ, Bagby GJ, Williamson DH, Argilés JM.** Anti-TNF treatment does not reverse the abnormalities in lipid metabolism of the obese Zucker rat. *Am J Physiol* 1997; 272 (Endocrinol Metab 35): E656-E660.
332. **Pérez-Carreras M, Castellano G, Manzanares J, Garfia C, Martín A, Pérez-Arellano E, et al.** Non-alcoholic steatohepatitis associated with small intestinal bacterial overgrowth. *Hepatology* 2000; 32 (Suppl): 418.
333. **Tilg H, Diehl AM.** Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467-1476.
334. **Feingold KR, Serio MK, Adi S, Moser AH, Grunfeld C.** Tumor necrosis factor stimulates hepatic lipid synthesis and secretion. *Endocrinology* 1989; 124: 2336-2342.
335. **Fiatarone JR, Coverdale SA, Batey RG, Farrell GC.** Non-alcoholic steatohepatitis: impaired antipyrine metabolism and hypertriglyceridemia may be clues to its pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 585-590.
336. **Riordan SM, Mciver CJ, Williams R.** Liver damage in human small intestinal overgrowth. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 234-237.
337. **Macdonald GA, Bridle KR, Ward PJ, Walker NI, Houghlum K, Powell LW, et al.** Hepatic iron stores and steatosis are associated with lipid peroxidation and fibrosis. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 639.
338. **Takemura S, Minamiyama Y, Katsuragi K, Inoue M.** Role of iron and free radicals in steatohepatitis and hepatocarcinogenesis in rats given a choline-deficient diet. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 545.
339. **Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S, et al.** Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995; 96: 620-630.
340. **Bacon BR, Park CH, Brittenham GM, O'Neill R, Tavill AS.** Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. *Hepatology* 1985; 5: 789-797.
341. **Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, LeClair P, Cobb J, Lambrecht RW, et al.** Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 421-429.
342. **Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ.** Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology* 2000; 32: 689-692.
343. **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: 664-669.
344. **Struben VMD, Hespeneide EE, Caldwell SH.** Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000; 108: 9-13.
345. **Squires RH Jr, López MJ.** Steatohepatitis is a serious condition in hispanic children. *Hepatology* 2000; 32 (Suppl): 418.

- 346. Caldwell SH, Harris DM, Hespeneide EE.** Under representation of african-americans in NASH and cryptogenic cirrhosis patients. *Hepatology* 2000; 32 (Suppl): 418.
- 347. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C.** Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27: 128-133.
- 348. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C.** Isolated hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 111: 1645-1653.
- 349. Tsukamoto H.** CYP2E1 and ALD. *Hepatology* 2000; 32: 154-155.
- 350. Leclercq I, Field J.** Involvement of CYP2E1 and CYP4A in the pathogenesis of experimental nonalcoholic steatohepatitis: insights from studies in CYP2E1 knockout mice. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 424.
- 351. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, González FJ, Robertson GR.** CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis, *J Clin Invest* 2000;105: 1067-1075.
- 352. Esterbauer H, Oberkofler H, Liu YM, Breban D, Hell E, Krempler F, et al.** Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res* 1998; 39: 834-844.
- 353. Rashid A, Koteish AK.** Subcellular localization of uncoupling protein UCP2 and evidence for increased UCP2 expression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 407.
- 354. Grove J, Daly AK, Basendine MF, Day CP.** Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 143-146.
- 355. Wilhemsen KC.** Does tumor necrosis factor play a role in alcoholic steatohepatitis?. The potential pitfalls of a case-controlled allelic association analysis. *Hepatology* 1997; 26: 232-233.
- 356. Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL.** Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 374-377.
- 357. Leevy CM.** Fatty liver: A study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1962; 4: 249-58.
- 358. Okolo P, Diehl AM.** Nonalcoholic steatohepatitis and focal fatty liver. En: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, eds. *Gastrointestinal and liver disease*, 6TH ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998: 1215-1220.
- 359. Nomura F, Ohnishi K, Koen H.** Serum cholinesterase in patients with fatty liver. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8: 599-602.
- 360. Rofsky NM, Fleshaker H.** CT and MRI of diffuse liver disease. *Semin Liver Dis* 1995; 16: 16-23.
- 361. Scatarige JC, Williams WS, Donovan PJ, Siegelman SS, Sanders RC.** Fatty infiltration of the liver: ultrasonographic and computed tomographic correlation. *J Ultrasound Med* 1984; 3: 9-14.
- 362. Saverymuttu AH, Joseph AEA, Maxwell JD.** Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J* 1986; 292: 13-15.
- 363. Ducommun JC, Goldberg HI, Corobkin M, Moss AA, Kressel L.** The relation of liver fat to computer tomography number: a preliminary experience in rabbits. *Radiology* 1981; 130: 511-513.
- 364. Ricci C, Longo R, Gioulis E, Bosco M, Pollesello P, Masutti F, et al.** Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol* 1997; 27: 108-113.
- 365. Nomura F, Ohnishi K, Ochiai K, Okuda K.** Obesity-related non-alcoholic fatty liver. CT features and follow-up studies after low caloric diet. *Radiology* 1987; 162: 845-847.

- 366. Gutiérrez A, Pérez-Carreras M, Colina F, Castellano G, Vaillo A, Solis JA.** Histological features of a serie of 94 patients with non alcoholic steatohepatitis (NASH). *Virchow Archiv* 1999; 453: 282.
- 367. Colina F.** Protocolo de lectura histológica de biopsias hepáticas con esteatohepatitis. *Rev Esp Patol* 2000; 33: 347-356.
- 368. Lee RG.** Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis pathology. En: Bloomer JR, Goodman ZD, Ishak KG, eds. *Clinical and pathological correlations in liver disease: approaching the next millennium*. Chicago, Illinois: AASLD Postrgraduate Course, 1998: 274-283.
- 369. Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB.** Alcoholic liver disease: Pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 45-66.
- 370. Hall PD.** Pathological spectrum of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcoholism* 1994; 2 (Supl): 303-313.
- 371. Fernández Salazar L, Mateos Rodríguez JM.** Anatomía patológica de la hepatopatía alcohólica. *Gastrum*, 1997; 136: 9-16.
- 372. Gerber MA, Popper H.** Relation between central canals and portal tracts in alcoholic hepatitis. A contribution to pathogenesis of cirrhosis in alcoholics. *Hum Pathol* 1972; 3: 199-207.
- 373. Goodman ZD, Ishak KG.** Occlusive venous lesions in alcoholic liver disease. A study of 200 cases. *Gastroenterology* 1982; 83: 786-796.
- 374. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al.** Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
- 375. Ludwig J.** The nomenclature of chronic active hepatitis: An obituary. *Gastroenterology* 1993; 105: 274-278.
- 376. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Schewer PJ.** Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520.
- 377. Scheuer PJ.** Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
- 378. 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: 2467-2474.
- 379. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, et al.** Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol* 1998; 11: 560-565.
- 380. Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Menenti F, Sodde M, et al.** Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. *Gut* 1997; 41: 845-850.
- 381. Seppä K, Mäkelä R, Sillanaukee P.** Effectiveness of the alcohol use disorders identification test in occupational health screenings. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 999-1003.
- 382. Bernadt MW, Taylor C, Mumford J, Smith B, Murray RM.** Comparison of questionnaire and laboratory tests in the detection of excessive drinking and alcoholism. *Lancet* 1982; 1:325-328.
- 383. Lelbach WK.** Epidemiology of alcoholic liver disease. *Prog Liver Dis* 1976; 5: 494-513.
- 384. Lumeng L.** New diagnostic markers of alcohol abuse. *Hepatology* 1986; 6: 742-745.
- 385. Storey EL, Anderson GJ, Mack U, Powell LW, Halliday JW.** Desialylated transferrin as serological marker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet* 1987; 6: 1292-1294.

- 386. Henriksen JH, Gronbaek M, Moller S, Bendtsen F, Becker U.** Carbohydrate deficient transferrin (CDT) in alcoholic cirrhosis : a kinetic study. *J Hepatol* 1997; 26: 287-292.
- 387. Stibler H, Hultkrantz R.** Carbohydrate-deficient transferrin in serum in patients with liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 1987; 11: 468-473.
- 388. Fletcher LM, Kwok-Gain I, Powell EE, Powell LW, Halliday JW.** Markers of chronic alcohol ingestion in patients with nonalcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. *Hepatology* 1991; 13: 455-459.
- 389. Clain DJ, Lefkowitz JH.** Fatty liver disease in morbid obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 1987; 16: 239-252.
- 390. Nalpas B, Vassault A, Charpin S, Lacour B, Berthelot P.** Serum mitochondrial aspartate aminotransferase as a marker of chronic alcoholism: diagnostic value and interpretation in a liver unit. *Hepatology* 1986; 6: 608-614.
- 391. Nalpas B, Vassault A, Guillou A, Lesgourges B, Ferry N, Lacour B, et al.** Serum activity of mitochondrial aspartate aminotransferase: a sensitive marker of alcoholism with or without alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1984; 4: 893-896.
- 392. Jaussi R, Sonderegger P, Fluckiger J, Christen P.** Biosynthesis and topogenesis of aspartate aminotransferase isoenzymes in chicken embryo fibroblast. *J Biol Chem* 1982; 257: 13334-13340.
- 393. Friedman LS, Martin PL, Muñoz SJ.** Liver function tests and the objective evaluation of the patient with liver disease. En: Zakim D, Boyer TD, eds. *Hepatology: a textbook of liver disease*, 3th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 818-820.
- 394. Poniachik J, Velasco M, Smok G, Oksenberg D, Madrid AM, Latorre R, et al.** Non-alcoholic steatohepatitis: high prevalence of autoimmune markers. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 192.
- 395. Vargas J, Colina F, Moreno D, Solís-Herruzo JA.** Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio histopatológico de 40 casos. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 563-568.
- 396. Moreno D, Casis B, Martín A, Nevado M, Colina F, Galvao O, Castellano G.** Esteatohepatitis no alcohólica. Evolución clínica e histológica a medio plazo de diez pacientes. *Med Clin (Barc)* 1991; 96: 733-736.
- 397. Saecian K, Reddy SP, Claire RD, Komorowski R, Franco J, Varma RR.** Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) after orthotopic liver transplantation (OLTx). *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 265.
- 398. Weston S, Charlton MR, Lindor KD.** Liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 1998, 114 (Supl): 1364.
- 399. Caldwell SH, Hespeneide EE.** Subacute liver failure in obese females with previously unrecognized cirrhosis and features of NASH. *Hepatology* 2000; 32 (Suppl): 418.
- 400. Sonsuz A, Basaranoglu M, Bilir M, Özbay G, Sentürk H, Akin P.** Relationship between histopathologic findings and aminotransferase level in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 198.
- 401. Bilici A, Unsal B.** Laboratory predictors of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 438.
- 402. Teli M, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF.** Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995; 346: 987-990.
- 403. Chedid A, Mendenhall CL, Gartside P, French SW, Chen T, Rabin L, et al.** Prognostic factors in alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 210-216.

- 404. Propst A, Prospt T, Judmaier G, Vogel W.** Prognosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108:1607.
- 405. Parés A, Caballería J, Bruguera M.** Histologic course of alcoholic hepatitis: influence of abstinence, sex, and extent of hepatic damage. *J Hepatol* 1986; 2: 33-38.
- 406. Castellano G.** Esteatohepatitis no alcohólica. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 13-19.
- 407. Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki S, et al.** Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 1997; 27: 103-107.
- 408. Nomura F, Ohnishi K, Satomura Y, Ohtsuki S, Fukunuga K, Honda M, et al.** Liver function in moderate obesity-study in 534 moderately obese subjects among 4613 male company employees. *Int J Obes* 1980; 10: 349-354.
- 409. Eriksson S, Eriksson K, Bondesson L.** Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta Med Scand* 1986; 220: 83-88.
- 410. Keefe E, Adesman P, Stenzel P.** Steatosis and cirrhosis in an obese diabetic, resolution of fatty liver by fasting. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 441-445.
- 411. Palmer M, Schaffner F.** Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 1990; 99: 1408-1413.
- 412. Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J.** Obesity. *N Engl J Med* 1997; 337: 396-405.
- 413. Technology Assessment Conference Panel. Methods for voluntary weight loss and control: Technology Assessment Conference statement.** *Ann Intern Med* 1992; 116: 942-949.
- 414. Saksena S, Johnson J, Olliff SP, Elias E.** Diet and exercise: importance first steps in the therapy of NASH. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 436.
- 415. Skender ML.** Comparison of a 2-year weight loss trends in behavioral treatments of obesity: diet, exercise, and combination interventions. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 342-346.
- 416. Williamson DA, Perrin LA.** Behavioral therapy for obesity. *Endocrin Metab Clin North Am* 1996; 25: 943-955.
- 417. Auwerx J, Staels B.** Leptin. *Lancet* 1998; 351: 737-742.
- 418. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, et al.** Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* mice. *Diabetes* 1996; 45: 531-535.
- 419. Leclercq I, Enríquez A, Farrell GC, Robertson G.** Rapid reversal of liver steatosis by leptin in *ob/ob* mice. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 420.
- 420. Smith SR.** The endocrinology of obesity. *Endocrin Metab Clin North Am* 1996; 25: 921-942.
- 421. Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, Moser A, Dinarello CA, Feingold KR, et al.** Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol* 1999; 276: 136-142.
- 422. Greenway FL.** Surgery for obesity. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1996; 25: 1005-1021.
- 423. Grim I, Schindler W, Haluszka O.** Steatohepatitis and fatal hepatic failure after biliopancreatic diversion. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 775-779.
- 424. Henry R, Wallace P, Olefsky M.** Effects of weight loss on mechanisms of hyperglycemia in obese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1986; 35: 990-998.

425. **Imura H.** A novel antidiabetic drug, troglitazone-reason for hope and concern. *N Engl J Med* 1998; 338: 908-909.
426. **Koga Y, Kumashiro R, Ishii K, Uchimura Y, Soh A, Fukuizumi K, et al.** Clinicopathological study of troglitazone-induced liver injury. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 333.
427. **Kesäniemi YA, Grundy SM.** Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma tryglicerides in man. *JAMA* 1984; 251: 2241-2246.
428. **Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A.** A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 384.
429. **Saibara T, Onishi S, Ogawa Y, Yoshida S, Enzan H.** Bezafibrate for tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 1999; 353: 1802.
430. **Nikkilä EA, Ylikahri R, Huttunen JK.** Gemfibrocil: effect on serum lipids, lipoproteins, postheparin plasma lipase activities and glucose tolerance in primary hypertriglyceridaemia. *Proc R Soc Med* 1976; 69: 58-53.
431. **Kissebah AH, Adams PA, Wynn V.** Lipokinetic studies with gemfibrozil. *Proc R Soc Med* 1976; 69: 94-97.
432. **Yeh SL, Chen WJ, Huang PC.** Effect of L-glutamine on hepatic lipids at different energy levels in rats receiving total parenteral nutrition. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1994; 18: 40-44.
433. **Reif S, Tano M, Oliverio R, Young C, Rossi T.** Total parenteral nutrition-induced steatosis: reversal by parenteral lipid infusion. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15: 102-104.
434. **Bowyer BA, Fleming CR, Haymond DW, Miles JM.** L-carnitine: effect of intravenous administration on fuel homeostasis in normal subjects and home-parenteral-nutrition patients with low plasma carnitine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 618-623.
435. **Oien KA, Moffat D, Curry GW, Dickson J, Habeshaw T, Mills PR, et al.** Cirrhosis with steatohepatitis after adjuvant tamoxifen. *Lancet* 1999; 353: 36-37.
436. **Ogawa Y, Murata Y, Nishioka A, Inomata T, Yoshida S.** Tamoxifen-induced fatty liver in patients with breast cancer. *Lancet* 1998; 351: 725.
437. **Van Hoof M, Rahier J, Horsmans Y.** Tamoxifen-induced steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1996; 124: 855-856.
438. **Abdelmalek M, Ludwig J, Lindor KD.** Two cases from the spectrum of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20: 127-130.
439. **Kowdley KV.** Ursodeoxycholic acid therapy in hepatobiliary disease. *Am J Med* 2000; 108: 481-486.
440. **Ceriani R, Brunati S, Morini L, Sacchi E, Colombo G.** Effect of ursodeoxycholic acid plus diet in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 386.
441. **Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Yokohama S Tamonk K, Sato Y.** Diagnostic significance of measuring TGF- β 1 level and effect of alpha tocoferol in patients with NASH. *Gastroenterology* 1997; 112 (Suppl): 1278.
442. **Collel C, García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodés J, et al.** Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-methionine. *Hepatology* 1997; 26: 699-708.
443. **Caballería E, Moreno J.** Therapeutic effects of S-adenosylmethionine (SAME) in hepatic steatosis. *Acta Ther* 1990; 16: 253-264.

444. **Pappo I, Bercovier H, Berry E, Gallilly R, Feigin E, Freund H.** Antitumor necrosis factor antibodies reduce hepatic steatosis during total parenteral nutrition and bowel rest in the rat. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1995; 19: 80-82.
445. **Pappo I, Becovier H, Berry EM.** Polimyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J Surg Res* 1991; 51: 106-110.
446. **Pappo I, Becovier H, Berry EM, Haviv Y, Gallilly R, Freund HR.** Polimyxin B reduces total parenteral nutrition-associated hepatic steatosis by its antibacterial activity and blocking deleterious effects of lipopolysaccharide. *JPEN-J Parenter Enteral Nutr* 1992; 16: 529-532.
447. **D'Sauza-Gburek SM, Batts KP, Nikias GA, Wiesner RH, Krom RAF.** Liver transplantation for jejunal bypass-associated cirrhosis. *Liver Transplant Surg* 1997; 3: 23-27.
448. **Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO).** Consenso español 1995 para la evaluación de la obesidad y para la realización de estudios epidemiológicos. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 782-787.
449. **Siedel J, Wahlefeld AW, Ziegenhorn J.** A new iron ferro zine-reagent without deproteinization. *Clin Chem* 1984; 30: 975-979.
450. **Dubois S, Mc Govern M, Ehrhardt V.** Eisenstoffwechsel-Diagnostikmit. Boehringer Mannheim/hitachi-Analysensystemen: Ferritin, transferrin und Eisen. *Git Labor-Medizin* 1988; 9: 468-471.
451. **Silverman LM.** **Amino acids and proteins.** En: NW Tietz, ed. *Textbook of clinical chemistry.* Philadelphia: WB Saunders Company, 1986: 519-524.
452. **Coons AH, Kaplan MH.** Localization of antigen in tissue cells II: Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950; 91: 1-13.
453. **Fontanals-Ferrer N, Serrat-Serrat J, Sorribas-Vivas A, González-García C, González-Sastre F, Gómez-Gerique J.** Quick method of determining lipoproteins, including those of intermediate density, in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 1753-1757.
454. **Second Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults.** *Circulation* 1994; 89: 1333-1432.
455. **Fraga E, Albillos A, de la Mata M.** Biopsia hepática percutánea. En: Abreu L, Garrido A, Albillos A, Barrios C, Calleja JL, Vera M, eds. *Gastroenterología. Endoscopia diagnóstica y terapéutica.* Madrid: ediciones Eurobook S.L., 1998: 429-436.
456. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-271.
457. **Martín MA, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Benito-León J, Ortí-Pareja M, Campos Y, Arenas J.** Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from untreated Parkinson's disease patients. *Neurology* 1996; 46: 1343-1346.
458. **McCance DR, Hanson RL, Pettitt DJ, Bennett PH, Hadden DR, Knowler WC.** Diagnosing diabetes mellitus- do we need new criteria?. *Diabetología* 1997; 40: 247-255.
459. **Alberti KGMM, Zimmet PZ.** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Provisional Report of a WHO consultation. *Diabetic Med* 1998; 15: 539-553.
460. **American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.
461. **Costa B.** Intolerancia a la glucosa. Ese frágil umbral hacia la diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)* 1998; 110:180-182.

- 462. Gallois Y, Vol S, Cacés E, Balkau B.** Distribution of fasting serum insulin measured by enzyme immunoassay in an unselected population of 4,032 individuals. Reference values according to age and sex. *Diabetes Metab* 1996; 22: 427-431.
- 463. Nishino T, Kodaira T, Shin S, Imagawa K, Shima K, Kumahara Y, et al.** Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment. *Clin Chem* 1981;27: 1690-1697.
- 464. Perman JA, Modler S, Barr RG, Rosenthal P.** Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 1984; 87: 1358-1363.
- 465. Van der Klei van Moorsel JM, Douwes AC, Van Deveren JP.** New principle for estimation of hydrogen in expired air. *Eur J Pediatr* 1984; 141: 221-224.
- 466. Mastropaolo G, Rees WDW.** Evaluation of the hydrogen breath test in man, definition and elimination of early hydrogen peak. *Gut* 1987;28: 721-725.
- 467. Leroux-Roels G, Offner F, Philippé J, Vermeulen A.** Influence of blood-collecting systems on concentrations of tumor necrosis factor in serum and in plasma. *Clin Chem* 1988; 34: 2373-2374.
- 468. Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW, et al.** Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996;14: 249-251.
- 469. Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G.** B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. En: P.I. Terasaki, eds. *Histocompatibility testing*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1980: 287-301.
- 470. Gómez-Casado E, del Moral P, Martínez-Laso J, García-Gómez A, Allende L, Silvera-Redondo C, et al.** HLA genes in Arabic-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians. *Tissue Antigens* 2000; 55: 239-249.
- 471. Martínez-Laso J, De Juan D, Martínez-Quiles N, Gómez-Casado E, Cuadrado E, Arnaiz-Villena A.** The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques. *Tissue Antigens* 1995; 45: 237-245.
- 472. Galambos JT, Willis CE.** Relationship between 505 paired liver tests and biopsies in 242 obese patients. *Gastroenterology* 1978; 74:1191-1195.
- 473. Pérez-Carreras M, Vargas C, Castellano G, Fernández I, Tomás ME, Álvarez V, Carreño R, Colina F, Solís Herruzo JA.** Metabolismo de la glucosa /insulina en la esteatohepatitis no alcohólica. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24 (Supl):100.
- 474. List S, Gluud C.** A meta-analysis of HLA-antigen prevalences in alcoholics and alcoholic liver disease. *Alcohol Alcoholism* 1994; 29:757-754.
- 475. Kawasaki T, Hashimoto N, Kikuchi T, Takahashi H, Ichiyama M.** The relationship between fatty liver and hyperinsulinemia in obese japanese children. *J Pediatr Gastroenterol* 1997; 24: 317-321.
- 476. Tankurt E, Biberoglu S, Ellidokuz E, Hekimsoy Z, Akpınar H, Cömlekci A, et al.** Hyperinsulinemia and insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 963-968.
- 477. Reaven GM.** Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Diabetes Care* 1991; 14: 195-202.
- 478. Van Ness MM, Diehl AM.** Is liver biopsy useful in the evaluation of patients with chronically elevated liver enzymes?. *Ann Intern Med* 1989; 111: 473-478.
- 479. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S.** AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:44-48.
- 480. Burt AD, Mutton A, Day CP.** Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15: 246-258.

481. **Ebeling P, Tuominen JA, Arenas J, García-Benayas C, Koivisto VA.** The association of acetyl-L-carnitine with glucose and lipid metabolism in human muscle in vivo: the effect of hyperinsulinemia. *Metabolism* 1997; 46: 1454-1457.
482. **Di Mauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, De Vivo DC.** Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985; 17: 521-538.
483. **Di Mauro S, Mendell JR, Sahenk Z, Bachman D, Scarpa A, Scofield RM, et al.** Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction due to cytochrome-c-oxidase deficiency. *Neurology* 1980; 30: 795-804.
484. **Huertas R, Campos Y, Díaz E, Esteban J, Vechietti L, Montanari G, et al.** Respiratory chain enzymes in muscle of endurance athletes: effect of L-carnitine. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 102-107.
485. **Guzmán M, Castro J.** Ethanol increases the sensitivity of carnitine-palmitoyltransferase I to inhibition of malonyl CoA in short-term hepatocyte incubation. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1002: 405-408.
486. **Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Lezzoni JC, Hespeneide EE, Parks J, et al.** Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 430-434.
487. **Bauer MF, Gempel K, Hofmann S, Jaksch M, Philbrook C, Gerbitz KD.** Mitochondrial disorders. A diagnostic challenge in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 855-876.
488. **Pérez-Carreras M, del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Garfia C, et al.** Activity of the mitochondrial respiratory chain enzymes is increased in the liver of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 379.
489. **Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W.** Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8115-8119.
490. **Higuchi M, Proske RJ, Yeh ETH.** Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998; 17: 2515-2524.
491. **Eaton S, Record CO, Bartlett K.** Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 719-722.
492. **Jenkins WJ, Peters TJ.** Mitochondrial enzyme activities in liver biopsies from patients with alcoholic liver disease. *Gut* 1978; 19: 341-344.
493. **Cardellach FC, Casademont J, Urbano-Márquez A.** Mitocondriopatías secundarias. En: Jiménez-Jiménez FJ, Molina-Arjona JA, Arenas J, eds. *Enfermedades mitocondriales*. *Rev Neurol* 1998; 26 (Supl I): 81-86.
494. **Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC.** Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999; 96: 4820-4825.
495. **Luo X, Pitkänen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH, Lehotay DC.** Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest* 1997; 99: 2877-2882.
496. **McClain CJ, Hill D, Schmidt J, Diehl AM.** Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993; 13: 170-183.
497. **Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, Carmona P, Hernández-Muñoz I, Siles E, et al.** Tumor necrosis factor- α increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 13353-13361.

- 498. Jäverläisen HA, Fang C, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO.** Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology* 1999; 29: 1503-1510.
- 499. Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI.** Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholics. *Hepatology* 1991; 13: 267-276.
- 500. Riordan SM, Mciver CJ, Wakefield D, Duncombe VM, Bolin TD.** Mucosal cytokine production in small-intestinal bacterial overgrowth. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 977-984.
- 501. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Demm 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: 2111-2119.
- 502. Miles PDG, Oreste OM, Romeo M, Higo K, Cohen A, Rafaat K, et al.** TNF- α -induced resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 1997; 46: 1678-1683.
- 503. Heller J, Sogni P, Barrière E, Tazi KA, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, et al.** Effects of lipopolysaccharide on TNF- α production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 376-381.
- 504. García-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB.** Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993; 17: 1081-1085.
- 505. Cope K, Risby T, Diehl AM.** Ethanol may be involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 336.
- 506. Madrid AM, Cumsille F, Defilippi C.** Altered small bowel motility in patients with liver cirrhosis depends on severity of liver disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 738-742.
- 507. Chan CS, Chem GH, Lien HC, Y HZ.** Small intestinal dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28: 1187-1190.
- 508. Casafont F, De las Heras G, Martín L, López MJ, Ledesma F, Pons F.** Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1252-1256.
- 509. Kirsch M.** Bacterial overgrowth. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 231-327.
- 510. Bauer TM, Schwacha H, Steinbrückner B, Brinkmann FE, Ditzen AK, Kist M, et al.** Diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis of the liver: poor performance of the glucose breath hydrogen test. *J Hepatol* 2000; 33: 382-386.
- 511. Moirand R, Mortaji AM, Loréal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y.** A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation *Lancet* 1997; 349: 95-97.
- 512. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis.** *J Hepatol* 2000; 33: 485-504.
- 513. Pardo A, Salido E, Quintero E.** Hemocromatosis hereditaria: implicaciones clínicas del diagnóstico genético. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 415-429.
- 514. Jouanolle AM, Gandon G, Jezequel P, Blayau M, Campion ML, Mosser J, et al.** Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14: 251-252.
- 515. Enríquez R, Morales P, Castro MJ, Rojo R, González M, Arnáiz-Villena A.** The most frequent HFE allele linked to porphyria cutanea tarda in Mediterraneans is His63Asp. *Hepatology* 1999; 30: 819-820.
- 516. Oliva R, Sánchez M, Bruguera M, Rodés J.** Utilidad clínica de la detección de las mutaciones del gen HFE en la hemocromatosis. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 433-435.

517. **Kaserbacher R, Propst T, Propst A, Graziadei I, Judmaier G, Vogel N.** Association between heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency and genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1993; 18: 707-708.
518. **Piperno A, Vergani A, Malosio I, Parma L, Fossati L, Ricci A, et al.** Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology* 1998; 28 (Suppl): 1105-1109.
519. **Sánchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodés J, Ballesta F, Oliva R.** Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998; 29: 725-728.
520. **Jung M, Drapier JD, Weidenbach H, Renia L, Oliveira L, Wang A, et al.** Effects of hepatocellular iron imbalance on nitric oxide and reactive oxygen intermediates production in a model of sepsis. *J Hepatol* 2000; 33: 387-394.
521. **Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL.** Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 759-768.
522. **Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, et al.** The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 14025-14028.
523. **Niederau C, Berger M, Stremmel W, Starke A, Strohmeyer G, Ebert R, et al.** Hyperinsulinemia in non-cirrhotic hemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation?. *Diabetología* 1984; 26: 441-444.
524. **Toumainem TP, Nyssonen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela h, Lakka T, et al.** Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. *Diabetes Care* 1997; 20: 426-428.
525. **Cavallo-Perin P, Pacini G, Ceruti F, Bessone A, Londo C, Sacctetri L, et al.** Insulin resistance and hyperinsulinemia in homozygous β -thalasemia. *Metabolism* 1995; 44:281-286.
526. **Herion DW, Arioglu E, Doo E, Bethesda NIDDK/NIH.** Severe insulin resistance syndromes and NASH. *Hepatology* 1999; 30 (Suppl): 589.
527. **Ludvik B, Nolan JJ, Baloga J, Sacks D, Olefsky J.** Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetes* 1995; 44: 1121-1125.
528. **Phillips DIW, Clark PM, Hales CN, Osmond C.** Understanding oral glucose tolerance: comparison of glucose or insulin measurements during the oral glucose tolerance test with specific measurements of insulin resistance and insulin secretion. *Diabetic Med* 1994; 11: 286-292.
529. **Meigs JB, D'Agostino RB, Wilson PWF, Cupples LA, Nathan DM, Singer DE.** Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 1997; 46: 1594-1600.
530. **DeFronzo RA, Ferrannini E.** Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-194.
531. **Saad F, Knowler C, Pettitt J, Nelson G, Mott M, Bennett H.** Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1989; 1: 1356-1359.
532. **Ikai E, Ishizaki M, Suzuki Y, Ishida M, Noborizaka Y, Yamada Y.** Association between hepatic steatosis, insulin resistance and hyperinsulinemia as related to hypertension in alcohol consumers and obese people. *J Hum Hypertens* 1995; 9: 101-105.
533. **Reaven GM.** Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
534. **Del Prato S, Leonetti F, Simonson DC, Sheehan P, Matsuda M, DeFronzo RA.** Effect of sustained physiologic hyperinsulinemia and hyperglycemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetología* 1994; 37: 1025-1035.