

## Progresión de la esteatohepatitis a cirrosis. Papel del estrés oxidativo y la muerte celular

J.A. Solís-Herruzo

Hospital Universitario 12 de Octubre. Universidad Complutense. Madrid. España.

Es bien sabido que las lesiones hepáticas producidas por el abuso de bebidas alcohólicas pueden incluirse en alguna de las 3 categorías siguientes: *a*) hígado graso, *b*) hepatitis alcohólica y *c*) cirrosis alcohólica. En el hígado graso los hepatocitos están deformados por la presencia de una gran vacuola grasa (*esteatosis macrovacuolar*), que rechaza hacia la periferia celular al núcleo y las restantes organelas, o múltiples microvesículas que permiten al núcleo conservar su localización habitual en el centro de la célula (*esteatosis microvacuolar*). En ocasiones se encuentran lipogranulomas y puede hallarse fibrosis perivenular central. En la hepatitis alcohólica existe una combinación de lesiones en las que, además de la degeneración grasa, hay degeneración hidrópica de los hepatocitos, hialina alcohólica o cuerpos de Mallory, megamitocondrias, infiltrados inflamatorios mixtos con predominio de los neutrófilos polimorfonucleares y fibrosis pericentral y pericelular. La cirrosis hepática alcohólica es primariamente micronodular, aunque secundariamente pueda evolucionar a cirrosis macromicronodular. Al igual que ocurre en las cirrosis de otras etiologías, la cirrosis alcohólica también puede complicarse con un carcinoma hepatocelular.

Estas lesiones, principalmente las correspondientes a la hepatitis alcohólica, han sido consideradas muy indicativas de abuso alcohólico. Sin embargo, desde hace décadas se sabe que lesiones similares a las provocadas por el alcohol se pueden encontrar en personas que no lo consumen o lo hacen de forma no abusiva. Por esta razón, Thaler propuso sustituir el término «hepatitis alcohólica» por el de «hepatitis grasa» («*Fettleberhepatitis*»)<sup>1-3</sup>. En los diabéticos y en los obesos se puede encontrar esteatosis hepática en el 21-78% y cirrosis hepática en el 1,2-13,4%<sup>4</sup>. Igualmente, en pacientes sometidos a anastomosis yeyuno-ileal por obesidad mórbida, era conocida la ra-

pidez con que se puede desarrollar una cirrosis hepática o un fallo hepático agudo<sup>5,6</sup>. En 1980, Ludwig et al<sup>7</sup> propusieron el empleo del término «esteatohepatitis no alcohólica» (EHNA) para designar estas lesiones que reproducen las producidas por el alcohol pero que se encuentran en personas que no abusan de él. En la actualidad se considera que la EHNA forma parte de un espectro más amplio de lesiones que incluye, además de la EHNA, al hígado graso no alcohólico, al hígado graso e inflamación y probablemente también a un gran número de cirrosis hepáticas criptogénicas<sup>8,9</sup>. Para designar todo este espectro de lesiones, se ha acuñado el término «enfermedad grasa del hígado no alcohólica» (EGHNA). La trascendencia pronóstica de todas estas lesiones no es homogénea. Mientras que la esteatosis es una lesión estable que sólo en el 3% de los casos evoluciona a lesiones más graves, la EHNA evoluciona a cirrosis en el 15-25% de los casos.

El diagnóstico de EHNA requiere la presencia de esteatosis, degeneración hidrópica de los hepatocitos e infiltrados inflamatorios mixtos en los que predominen los neutrófilos. Además, frecuentemente, se encuentran cuerpos hialinos de Mallory, megamitocondrias y grados variables de fibrosis. Un elemento conceptual y diagnóstico crítico de EGHNA es la ausencia de consumo abusivo de alcohol. Se considera que el consumo de alcohol no es abusivo, en el caso de que lo haya, cuando en el varón es menor de 20 g/día y en la mujer menor de 10 g/día.

La EGHNA es una lesión frecuente en la población occidental y tiene tendencia a hacerse más frecuente. En la actualidad es la tercera causa de hipertransaminasemia, tras las infecciones virales y el abuso alcohólico. Se estima que entre el 17 y el 33% de la población general presenta una EGHNA y que quizá en el 5,7-17% de esa misma población la lesión existente corresponde a la EHNA<sup>10,11</sup>. Cuando se investiga la causa de hipertransaminasemia en sujetos sin marcadores de infección viral ni abuso alcohólico, se encuentran lesiones de EGHNA en el 26-90% de los casos. En un estudio realizado por nosotros hace unos 20 años, encontramos lesiones de EHNA en el 3,38% de las biopsias hepáticas y que aproximadamente 1/10 esteatohepatitis halladas correspondía a una

Correspondencia: Dr. J.A. Solís Herruzo.  
Hospital Universitario 12 de Octubre.  
Ctra. de Andalucía, km 5,400. 28041 Madrid. España.  
Correo electrónico: jsolis.hdoc@salud.madrid.org

EHNA<sup>12,13</sup>. La EGHNA se ha detectado en asociación con un gran número de condiciones metabólicas, quirúrgicas y tóxicas. Sin embargo, el principal factor asociado con la EGHNA es el síndrome metabólico, definido éste como la asociación en un mismo individuo de, al menos, 3 de las siguientes alteraciones: hipertensión arterial, obesidad, diabetes, hiperglucemia y descenso de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Un trastorno común a este síndrome es la resistencia a la insulina<sup>14-16</sup>.

Mientras que la resistencia a la insulina es decisiva en el origen de la esteatosis hepática, el estrés oxidativo y la disfunción de las mitocondrias son determinantes en que el hígado graso se complique y evolucione a EHNA.

La insulina es la principal hormona anabolizante del organismo. Bajo su efecto se produce un aumento de la síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos, se facilita la entrada de glucosa en las células y disminuye la gluconeogénesis y la lipólisis. Se conocen sólo parcialmente los mecanismos por los que se producen efectos tan variados. Se sabe que:

1. En las células adiposas y en el músculo esquelético la unión de la insulina a su receptor específico determina la activación de la tirosinasa de este receptor. Consecuencia de ello es la fosforilación en tirosina/activación del IRS-1 (receptor de sustrato insulínico 1) y éste de la PI3K (cinasa fosfatidilinositol 3). Esta cinasa activa un transportador de glucosa que normalmente se encuentra en el citoplasma, el Gluc-4, y determina que se desplace a la membrana plasmática y facilite la entrada de glucosa en las células. En éstas, la glucosa es utilizada como fuente de energía o, si no es necesaria, se almacena en forma de glucógeno. Cuando hay resistencia a la insulina, la fosforilación en tirosina del IRS-1 no tiene lugar; se detiene la entrada de glucosa en las células; la glucosa se retiene en el espacio extracelular y se produce hiperglucemia, la cual estimula la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas. Una vez que se agota la capacidad de estas células para compensar la hiperglucemia, surge la diabetes mellitus del tipo 2. Los factores que determinan la resistencia a la insulina probablemente son múltiples, pero sin duda los ácidos grasos libres (AGL) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) son decisivos. No se sabe con exactitud cuáles son los mecanismos por los que éstos determinan tal resistencia, pero probablemente interviene que ambos factores determinan la fosforilación en serina –no en tirosina– del IRS-1. La fosforilación en serina es incompatible con la simultánea fosforilación en tirosina. Es posible que tanto el TNF $\alpha$  como los AGL produzcan esa fosforilación tras activar la JNK (cinasa terminal Jun-N). La cascada de fenómenos que siguen a la unión de la insulina a su receptor es más amplia que la mencionada.

2. La activación de la PI3K que sigue a la fosforilación del IRS-1 induce la activación de la fosfodiesterasa y, en consecuencia, la degradación del adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) y su agotamiento. La ausencia de AMPc determina que la proteincinasa A (PKA) no se active y, en consecuencia, que tampoco lo haga la lipoproteinlipa-

sa (LPL). Es decir, no se produce la hidrólisis de los triglicéridos ni la liberación de AGL por el tejido adiposo. Una de las consecuencias de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo es que el AMPc permanece aumentado, lo cual activa la PKA y ésta, a su vez, la LPL. Consecuencia de ello es la lipólisis y la liberación a la sangre de AGL.

3. Además, la PI3K es un activador del SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), un factor de transcripción esencial en la activación de diversos genes implicados en la lipogénesis, tanto de triglicéridos como de colesterol<sup>17</sup>. Por ello, en ausencia de actividad insulínica, todos estos genes están reprimidos y con ello también la lipogénesis<sup>18</sup>.

4. Los efectos de la insulina en el hígado difieren ligeramente de los que ejerce en el tejido adiposo y el músculo esquelético, ya que el receptor de insulina fosforila en tirosina a otro sustrato, al IRS-2 que, a través de la PI3K y de la Akt-2/PKB, fosforila la cinasa glucógeno sintetasa (GSK) y ésta deja de inhibir a la glucógeno sintetasa. Consecuencia de ello es que la insulina en el hígado aumenta la síntesis de glucógeno. La resistencia a la insulina da lugar en el hígado a los efectos contrarios. Disminuye la síntesis de glucógeno y aumenta su glucólisis, la gluconeogénesis y la liberación de glucosa a la sangre.

Como ya hemos mencionado, el resultado del aumento de la lipólisis que acompaña a la resistencia a la insulina es la liberación a la sangre de grandes cantidades de AGL. Si ello ocurre en la grasa abdominal, el hígado, que ocupa un lugar estratégico en el curso de la sangre portal, recibe los AGL liberados durante ese proceso. En los hepatocitos de los pacientes y los animales con esteatosis se puede comprobar que las concentraciones de estos ácidos están muy aumentadas. Estos ácidos poseen numerosos efectos biológicos y pueden seguir diversas rutas metabólicas. Por ejemplo, pueden ser utilizados para la síntesis de triglicéridos (esteatosis) y fosfolípidos o en la gluconeogénesis (hiperglucemia) o pueden ser oxidados en las mitocondrias, en los peroxisomas o en los microsomas. Estas últimas oxidaciones tienen gran trascendencia, ya que pueden ser origen del estrés oxidativo celular. La betaoxidación en las mitocondrias puede conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), durante la fosforilación oxidativa. La betaoxidación en los peroxisomas conduce a la formación de peróxido de hidrógeno, mientras que la oxidación en los microsomas, con la participación de los citocromos P450, determina la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y ácidos dicarboxílicos. Además, los AGL participan en la inducción de la muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis.

Si la resistencia a la insulina es fundamental en la patogénesis del hígado graso, el estrés oxidativo probablemente sea definitivo en su evolución a EHNA y lesiones más avanzadas de la EGHNA. Se ha postulado que la EHNA sería la consecuencia de dos agresiones. La primera sería el hígado graso; la segunda, el estrés oxidativo<sup>19,20</sup>. El estrés oxidativo puede determinar la peroxidación lipídica, la degeneración y la necrosis de las células, la muerte de

éstas por apoptosis, la formación de aldehídos reactivos, tales como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinoenal (4-HNE), la expresión de citocinas proinflamatorias, la activación de las células estrelladas del hígado y la fibrogénesis<sup>19-21</sup>.

Las mitocondrias y su disfunción participan de forma decisiva tanto en la génesis del hígado graso como en el origen del estrés oxidativo, ya que están implicadas tanto en la betaoxidación de los ácidos grasos como en la generación de las ROS<sup>22-26</sup>. En los pacientes con EHNA se ha descrito que las mitocondrias son grandes, están hinchadas, presentan escasez de crestas y, frecuentemente, inclusiones paracrystalinas<sup>27,28</sup>. Estos mismos cambios se han encontrado en diversas miopatías mitocondriales asociadas a alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial (CRM)<sup>29</sup>. Además, la generación de [<sup>13</sup>C]CO<sub>2</sub> a partir de la <sup>13</sup>C-metionina y la resíntesis de ATP tras una sobrecarga de fructosa están marcadamente disminuidas en los pacientes con esteatosis hepática<sup>30,31</sup>. Ambos defectos indican que la función de las mitocondrias, además de su morfología, está alterada en los pacientes con EHNA. Las mitocondrias representan el lugar principal de la betaoxidación de los AGL. En este proceso se pueden diferenciar diferentes pasos<sup>32,33</sup>:

1. *Entrada de los AGL en las mitocondrias.* En este proceso interviene una enzima, la CPT-1 (carnitina-palmitoil transferasa I), y una translocasa y es necesario que los ácidos grasos de cadena larga se unan previamente a la carnitina. Una vez que el ácido graso se encuentra en la matriz mitocondrial, se libera la carnitina y ésta regresa al citoplasma. Una ausencia de carnitina<sup>34-36</sup>, una deficiencia de CPT-I<sup>37</sup> o un defecto en la translocasa pueden determinar que se altere el paso de los ácidos grasos a las mitocondrias y su posterior betaoxidación. Ello puede contribuir a que los ácidos grasos se retengan en el citoplasma y que posteriormente se reesterifiquen a triglicéridos. En un estudio realizado por nosotros en pacientes con EHNA pudimos demostrar que la cuantías intrahepáticas de carnitina libre y total eran normales<sup>38</sup>, lo cual coincidía con lo hallado por otros en obesos y en alcohólicos con hígado graso<sup>39,40</sup>. Igualmente la medición de la actividad de la CPT-I en el hígado de los pacientes con EHNA mostró que era normal<sup>38</sup>, por lo que no podemos atribuir a una deficiencia de la actividad de esta enzima la patogenia de la EHNA.

2. El segundo paso en este proceso de oxidación mitocondrial de los ácidos grasos consiste en una serie de sucesivas betaoxidaciones que conducen a la formación de acetyl-CoA, de ácidos grasos cortos-CoA y a la conversión del NAD<sup>+</sup> en NADH. Hay pocos estudios en los que se haya medido la betaoxidación de los ácidos en la EGHNA. Utilizando métodos indirectos, se ha deducido que la betaoxidación de los ácidos grasos está aumentada en los pacientes con EHNA<sup>28,41</sup>. Nosotros, en ratones ob/ob, con lesiones de EGHNA y EHNA, hallamos que la betaoxidación mitocondrial (ácido palmítico) y peroxisomal (ácido lignocérico) estaba significativamente aumentada<sup>42</sup>. Esto coincidía con lo hallado en el mismo tipo de ratones por

Li et al<sup>43</sup>. Se ha atribuido este aumento de la betaoxidación a la resistencia a la insulina y, en consecuencia, al aumento de la lipólisis y la mayor llegada de AGL al hígado<sup>17,28</sup>.

3. El NADH formado durante la betaoxidación se reoxida a NAD<sup>+</sup> durante el proceso conocido como fosforilación oxidativa, que concluye en la formación de ATP. Ésta es la única fuente de energía aprovechable por las células. En esta fosforilación interviene una serie de complejos enzimáticos situados en la membrana mitocondrial interna (complejos I a V), que se conoce como cadena respiratoria mitocondrial (CRM). En ella, los electrones del NAD<sup>+</sup> y del FADH<sub>2</sub> pasan de un complejo a otro de esta cadena hasta que finalmente se combinan con el oxígeno y los protones para formar agua. Este proceso se acopla con otro simultáneo, por el que los protones de la matriz mitocondrial son enviados al espacio intermembranoso de las mitocondrias y se genera un gradiente electroquímico entre la matriz y este espacio. Cuando estos protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintetasa (complejo V), determinan la conversión del ADP en ATP y, con ello, que la energía electroquímica acumulada en el espacio intermembrana se emplee en la formación de una energía utilizable por las células<sup>44</sup>. Normalmente, durante este proceso de fosforilación oxidativa, pueden escaparse algunos electrones que, tras unirse al oxígeno de la matriz mitocondrial, dan lugar a la formación de las ROS, principalmente de O<sub>2</sub><sup>-45,46</sup>. Un trastorno en la fosforilación oxidativa como consecuencia de una baja actividad de la CRM determinaría no sólo que se forme menos ATP, sino que la cuantía de electrones que se escapan del sistema sea mayor y aumente la formación de ROS<sup>47</sup>. Esta formación de ROS estaría potenciada en caso, como ocurre en la EHNA, de que la llegada de AGL al hígado y la betaoxidación estén aumentadas.

La información existente sobre la función de la fosforilación oxidativa y de la CRM en los pacientes con NASH es muy limitada. Cadwell et al<sup>27</sup> encontraron que la actividad de los complejos I y III de la CRM era normal en las mitocondrias de las plaquetas de pacientes con EHNA, y Sanyal et al<sup>28</sup> no encontraron defectos en la expresión de las enzimas de esta cadena cuando lo estudiaron en el músculo de un paciente con EHNA. Nosotros hemos estudiado directamente la actividad de todos los complejos enzimáticos de la CRM en el hígado de los pacientes con EHNA<sup>38</sup>. En ese estudio pudimos demostrar por primera vez que la actividad de estos complejos estaba reducida en un 30-50% de la actividad control. Este defecto compromete a los complejos cuyos componentes estaban codificados tanto por genes mitocondriales (complejos I, III, IV y V) como por genes nucleares (complejo II). Concordantes con estos hallazgos fueron los comunicados por Haque et al<sup>48</sup>, quienes comunicaron que la actividad de la citocromo *c* oxidasa estaba disminuida. La causa de estos defectos enzimáticos quedó sin explicar; sin embargo, nosotros observamos que la actividad de esos complejos se correlacionaba, de forma inversa, con las tasas de TNF $\alpha$  en sangre, el índice de masa corporal y el índice HOMA de resistencia a la insulina.

Con el fin de estudiar los factores que pudieran determinar la hipofunción de la CRM y de la fosforilación oxidativa, recurrimos a un modelo animal de EGHNA que reproduce muchas de las alteraciones que se encuentran en la enfermedad humana. Los ratones ob/ob tienen neutralizado el gen de la leptina, por lo que carecen de esta hormona y, en consecuencia, presentan polifagia, engordan, desarrollan resistencia a la insulina, hiperglucemia e hiperlipemia. Histológicamente, el hígado de los animales estudiados por nosotros presenta esteatosis en el 42% de los hepatocitos, degeneración hidrópica, hialina de Mallory e infiltrados inflamatorios. Es decir, se trata de animales que reproducen muchas de las características de los enfermos con EGHNA. El estudio de la actividad de los complejos enzimáticos de la CRM nos mostró que también estos animales presentan un defecto similar al hallado en los pacientes con EHNA. Su actividad estaba reducida al 40-60% de la que tienen esos complejos en los animales sanos<sup>42</sup>. Por ello, parece que se trata de un buen modelo experimental para poder investigar la posible etiopatogenia de la disfunción mitocondrial que hemos encontrado en los pacientes con EHNA.

La disfunción de la CRM hallada en estos ratones permite suponer que el escape de electrones de esta cadena y la formación de ROS deben de estar aumentados en estos ratones<sup>49</sup>. En efecto, la determinación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), un marcador de estrés oxidativo, nos mostró que sus tasas se encuentran muy elevadas. Estos hallazgos son concordantes con los comunicados por otros que también encuentran evidencias de que el hígado de los pacientes con EHNA está sometido a estrés oxidativo<sup>28,43,50-52</sup>.

Los mecanismos que pudieran estar implicados en la disfunción mitocondrial de los pacientes con EGHNA o en los ratones ob/ob son variados. Uno de ellos pudiera ser el propio estrés oxidativo. Se sabe que el MDA y el 4-HNE, dos productos resultantes de la peroxidación de los lípidos celulares, son capaces de inhibir la actividad de la citocromo c oxidasa (complejo IV de la CRM) tras formar con los péptidos de este complejo diversos conjugados<sup>53</sup>. Además, los ROS pueden lesionar el ADN mitocondrial (ADNmt)<sup>54-56</sup> y las enzimas mitocondriales dotadas del núcleo hierro-sulfuro<sup>57</sup> y, tras ello, determinar la hipofunción de la CRM<sup>58</sup>. Tales lesiones en el ADNmt, de difícil reparación en las mitocondrias, deben de repercutir en la expresión de los complejos I, III, IV y V de esta cadena, ya que el ADNmt codifica 13 de los polipéptidos que forman esos complejos. Concordante con ello, Haqué et al<sup>48</sup> demostraron que en los pacientes con EHNA existe una depleción del ADNmt. El estrés oxidativo en las células es capaz de iniciar una serie de círculos viciosos que contribuyen a aumentar el daño al ADNmt y producir un mayor trastorno mitocondrial<sup>59</sup>.

A pesar de estos datos, los resultados de nuestros estudios en los ratones ob/ob no apoyan que el estrés oxidativo sea la causa de la disfunción mitocondrial. En efecto, el tratamiento de estos animales durante 3 meses con N-acetilcisteína por vía peritoneal disminuyó de forma muy marcada la concentración de TBARS en el hígado, pero no

logró mejorar la actividad de los complejos de la CRM ni revertir las lesiones histológicas del hígado<sup>42</sup>. Estos resultados, junto con el hecho de que en la EHNA y en los ratones ob/ob la actividad del complejo II de la CRM –cuyos componentes no están codificados por el ADNmt– también esté disminuida, hacen dudar del papel del estrés oxidativo en la patogenia de este defecto mitocondrial. No obstante, antes de rechazar definitivamente el papel de tal estrés, es imprescindible repetir los experimentos empleando un antioxidante que actúe preferentemente en las mitocondrias, por ejemplo, los análogos de la Mn-superoxidasa.

Otro factor importante que se debe considerar en la patogenia de la disfunción mitocondrial es el TNF $\alpha$ . Contamos con numerosas evidencias que abogan por la participación de esta citocina en la patogenia de la EHNA<sup>60,61</sup>. En los pacientes con EHNA se ha comprobado que existen tasas elevadas de TNF $\alpha$  en sangre<sup>38,62,63</sup> y nosotros encontramos que el descenso de la actividad de la CRM se correlacionaba con los ascensos del TNF $\alpha$  en sangre<sup>38</sup>. En un estudio previo pudimos demostrar que el tratamiento de las células con TNF $\alpha$  produce un aumento de los ROS, un descenso del ARN mensajero de algunos componentes de la ATPasa y una reducción de la cuantía de los péptidos que componen la ATPasa y la citocromo c oxidasa<sup>64</sup>. En los ratones ob/ob, pudimos comprobar que las concentraciones del TNF $\alpha$  en el tejido hepático eran unas 20 veces más altas que las encontradas en los ratones normales<sup>42</sup>. El origen de este TNF $\alpha$  probablemente no sea único, ya que tanto el tejido adiposo como los adipocitos y las células de Kupffer pueden producir TNF $\alpha$ <sup>65-67</sup>. El tejido adiposo abdominal pudiera ser una fuente importante de TNF $\alpha$ , cuyo paso por el hígado es obligado. Además, los mismos AGL liberados durante la lipólisis de la grasa abdominal pueden inducir la expresión del TNF $\alpha$  tanto en el tejido adiposo<sup>68</sup> como en los hepatocitos<sup>69</sup>.

En un estudio previo, pudimos demostrar que la exposición de las células al TNF $\alpha$  determina, además de la muerte por apoptosis, importantes cambios morfológicos y funcionales en las mitocondrias<sup>70</sup>. Tras 8 h de incubación de las células con el TNF $\alpha$ , las mitocondrias se hinchaban, se redondeaban, perdían las crestas, la matriz se aclaraba y se rompía la membrana mitocondrial externa. Otros autores han encontrado cambios mitocondriales similares. Además, nuestro estudio reveló que el TNF $\alpha$  puede interferir con el flujo de electrones de los complejos I y III de la CRM<sup>70,71</sup>. Esta citocina determina que los electrones queden retenidos en el citocromo b y que éste pueda ceder al oxígeno los electrones retenidos y que se empleen en formar ROS<sup>70</sup>. En realidad, muchos de los trastornos existentes en la EHNA se podrían justificar por los efectos biológicos del TNF $\alpha$ , ya que éste no sólo produce la disfunción de la CRM, sino que además aumenta la resistencia de las células a la insulina, induce la expresión genética de diversas citocinas proinflamatorias y enzimas, entre otras, de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) e induce la muerte celular por apoptosis o necrosis, entre otras.

El posible papel patogénico del TNF $\alpha$  en la EHNA y en la disfunción de la mitocondrias se sustenta en los resultados obtenidos en ratones ob/ob tratados durante 3 meses con anti-TNF $\alpha$  (infliximab) por vía peritoneal. A pesar de que este tratamiento no fue suficiente para normalizar completamente las tasas de TNF $\alpha$  en el tejido hepático, sí lo fue para que la actividad de los complejos I, II, III y V se normalizara o mejorara de forma llamativa<sup>42</sup>. Además, este tratamiento redujo los lipoperóxidos en el tejido hepático, disminuyó la actividad de la betaoxidación y normalizó casi totalmente la histología hepática. La esteatosis hepática había desaparecido completamente, no había infiltrados inflamatorios ni se reconocían cambios hidrópicos en los hepatocitos. El efecto apreciado por nosotros en la betaoxidación ha sido también observado por Li et al<sup>43</sup> y se puede atribuir a los efectos del TNF $\alpha$  en la sensibilidad a la insulina<sup>72,73</sup>, el estrés oxidativo<sup>73</sup> y la esteroil-CoA desaturasa<sup>43</sup>, una enzima que participa en la síntesis de los ácidos grasos<sup>74</sup>.

La simultánea mejoría de la disfunción mitocondrial y de las lesiones histológicas tras el tratamiento con los anti-TNF $\alpha$  permite apoyar que el TNF $\alpha$  participa en la patogenia de ambos trastornos y que los defectos mitocondriales pudieran participar en la génesis de las lesiones.

Entre sus múltiples efectos biológicos, el TNF $\alpha$  induce la expresión de la iNOS. Esta enzima cataliza la oxidación de la L-arginina en presencia de oxígeno para formar óxido nítrico (NO). El hígado normal sólo expresa la NOS endotelial. Sin embargo, en determinadas circunstancias, por ejemplo, bajo el efecto del TNF $\alpha$ , la expresión en el hígado de la iNOS aumenta de forma muy llamativa y el hígado genera grandes cantidades de NO<sup>75</sup>. Este efecto del TNF $\alpha$  está mediado por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>76</sup>, cuya actividad está muy aumentada en los ratones ob/ob<sup>43</sup>. En nuestro estudio pudimos comprobar que en el hígado de estos ratones, además de un gran aumento del TNF $\alpha$ , también había una marcada inducción de la iNOS mitocondrial. Sin duda, esa inducción enzimática depende del TNF $\alpha$ , ya que en los ratones obesos tratados con anti-TNF $\alpha$  se redujo su expresión de forma muy llamativa y se aproximó a los valores de control.

Estos hallazgos pueden tener implicaciones en la patogenia, ya que el NO y otras sustancias reactivas derivadas del nitrógeno pueden alterar la función de las mitocondrias y de la CRM<sup>77</sup>. En efecto, el NO reacciona con la citocromo c oxidasa (complejo IV) y bloquea el paso de electrones y su fijación al oxígeno<sup>78</sup>. Por otro lado, el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un producto derivado de la reacción del NO con el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, es un inhibidor de la actividad de diferentes proteínas, incluidos algunos componentes de la CRM<sup>77,79</sup>. Estudios *in vitro* han mostrado que el peroxinitrito puede inactivar los complejos I, II, V y el citocromo c<sup>79-81</sup> y, en algunas circunstancias, también el complejo III<sup>82</sup>. Los mecanismos por los que el peroxinitrito ejerce esos efectos son variados e incluyen su capacidad oxidativa<sup>83</sup>, de lesionar el ADN<sup>84</sup> y nitrar los residuos de tirosina de las proteínas y generar proteínas 3-tironitrosadas<sup>85</sup>. Se considera que la presencia de proteínas 3-tironitrosadas en los tejidos es un marcador de agresión tisular por el ra-

dical peroxinitrito<sup>86</sup>. Por ello, nosotros buscamos la presencia de tales proteínas en el hígado de los ratones ob/ob.

Mediante estudios de inmunofluorescencia en los que los cortes histológicos del hígado fueron tratados con anticuerpos específicos frente a proteínas nitrosadas en 3-tirosina, pudimos comprobar que las proteínas del hígado de los ratones ob/ob se encuentran intensamente 3-tironitrosadas en relación con lo que ocurría en el hígado de los ratones controles. Estos hallazgos indican que las proteínas del hígado de los ratones obesos han sufrido la agresión del radical peroxinitrito o algunos de sus derivados. Tras aislar las proteínas de las mitocondrias del tejido hepático, pudimos comprobar que las proteínas mitocondriales se encontraban nitrosadas y, en consecuencia, que habían sufrido la agresión del radical peroxinitrito. Cuando inmunoprecipitamos las proteínas de las mitocondrias con anti-3-nitrotirosina y las proteínas 3-tironitrosadas fueron identificadas con anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas de la CRM, pudimos comprobar que, al menos, el citocromo c y la proteína ND4, un componente del complejo I, se encontraban 3-tironitrosadas.

Considerando que la nitración de esas enzimas se ha asociado con descensos de su actividad catalítica<sup>87</sup>, existe la posibilidad de que la nitración de las proteínas de la CRM fuera la causa de su baja actividad enzimática y de las lesiones halladas en el hígado de los ratones obesos. Con el fin de valorar el papel del peroxinitrito y sus derivados reactivos<sup>88</sup> en la patogenia de estos defectos, tratamos a ratones ob/ob, durante 3 meses, con ácido úrico administrado por vía intraperitoneal. Este ácido reacciona rápidamente con el peroxinitrito y da lugar a la formación de uratos nitrogenados inactivos<sup>88,89</sup>. Por ello, se considera al ácido úrico un limpiador natural de peroxinitrito<sup>88,90</sup> y otros derivados reactivos del peroxinitrito<sup>88,89</sup>. Se ha demostrado que el tratamiento de ratones con ácido úrico reduce la formación de proteínas 3-tironitrosadas<sup>88,89</sup> y previene la evolución de las lesiones neurológicas en un modelo experimental de esclerosis múltiple<sup>86,91</sup>. Los efectos del tratamiento con el ácido úrico en los ratones ob/ob fueron muy llamativos, ya que logró la normalización de la actividad de los complejos I y V de la CRM y la marcada mejoría de los complejos II y III. Además, logró reducir la tasa de lipoperóxidos en el hígado y de proteínas 3-tironitrosadas en los cortes histológicos del hígado. El estudio de las proteínas mitocondriales y las fracciones correspondientes al citocromo c y el péptido ND4 nos demostró que este tratamiento ocasionaba una marcada reducción de esas proteínas 3-tironitrosadas. Por último, este tratamiento logró la regresión de las lesiones hepáticas y consiguió que la estructura del hígado recuperara su aspecto normal. Los efectos en la CRM observados con el ácido úrico apoyan el concepto de que el peroxinitrito está implicado en la patogenia de la disfunción de esa cadena y de las lesiones hepáticas.

Los resultados de nuestros estudios nos llevan a proponer que el TNF $\alpha$  del hígado, probablemente procedente del tejido adiposo abdominal o de la estimulación de su expresión en los hepatocitos por los AGL, da lugar a la in-

ducción de la iNOS y, en consecuencia, a una mayor formación de NO. Este radical, en presencia de  $O_2^-$ , origina la formación del radical peroxinitrito, que se uniría a las proteínas de la CRM y determinaría la reducción de su actividad funcional.

El descenso de la actividad enzimática de la CRM, además de disminuir la fosforilación oxidativa y la generación de ATP, condiciona que aumente el número de electrones que se escapan de este sistema, que se unan al oxígeno y que den lugar a la formación de ROS. La cuantía de estos sería particularmente alta en las situaciones en que la llegada de AGL al hígado para su oxidación mitocondrial –como ocurre en la EHNA– esté elevada. Los elevadas cantidades de lipoperóxidos hallados en el hígado de estos ratones obesos tendría ese origen.

Los ROS pueden inducir la peroxidación de los lípidos, en especial de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares. Las consecuencias de esta agresión son variadas. Por un lado, repercute en las propiedades fisicoquímicas de las membranas y ello, en la actividad de las enzimas y los receptores situados en ellas, la expresión de antígenos, las interacciones intercelulares<sup>92-94</sup> y la permeabilidad de la membrana. Consecuencia de esto último puede ser que se produzcan cambios que comprometen la viabilidad de las células (paso de calcio a las células)<sup>95</sup> y determinan su muerte por necrosis. Los aldehídos reactivos derivados de la peroxidación de los lípidos, tales como el MDA y el 4-HNE, pueden participar en la fibrogénesis hepática. En efecto, Chojkier et al<sup>96</sup> mostraron que el MDA aumentaba de forma muy significativa la expresión del ARN mensajero (ARNm) del colágeno  $\alpha 1(I)$  en cultivos de fibroblastos humanos. Maher et al<sup>97,98</sup> encontraron que la síntesis de colágeno se duplicaba cuando los fibroblastos eran cultivados con MDA. Hallazgos compatibles con los anteriores fueron comunicados por otros investigadores<sup>99-102</sup>. Aunque los mecanismos de este efecto no son únicos, es muy probable que intervengan los conjugados que estos aldehídos reactivos forman con los aminoácidos o radicales sulfidrilos de las proteínas<sup>103</sup>. La formación de estos conjugados se ha demostrado en modelos animales en los que se induce la peroxidación lipídica y en diversas circunstancias clínicas en las que hay fibrogénesis activa<sup>102,104-108</sup>. Por otro lado, los tratamientos antioxidantes disminuyen la formación de esos conjugados y previenen la fibrogénesis<sup>102,107,109</sup>. En un estudio previo nosotros encontramos evidencias de que los conjugados de los aldehídos participan en el aumento de la expresión genética del colágeno<sup>21</sup>, ya que el tratamiento de las células con p-hidroximercuribenzoato (pHMB) o con piridoxal-5'-fosfato (P5P) abolía tanto los efectos del MDA como los de una combinación oxidante (cloruro ferroso, ácido ascórbico, ácido cítrico) en la expresión genética del colágeno. En estos estudios, pudimos determinar que esos aldehídos ejercen esos efectos a través de unos elementos localizados entre las secuencias -116 y -110 pb del promotor del colágeno  $\alpha 1(I)$  y que los factores de transcripción Sp1 y Sp3 intervienen como mediadores de ese estímulo. Estos factores reconocen las secuencias ricas en G+C<sup>111</sup> y actúan como factores que estimulan la

expresión de una amplia variedad de genes, incluido el del colágeno  $\alpha 1(I)$ <sup>111-115</sup>.

Además, el estrés oxidativo, a través de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B y c-Myb, induce la activación de las células estrelladas del hígado (CEH) y contribuye a inducir la fibrogénesis hepática. En las CEH activadas se puede comprobar que la actividad de NF- $\kappa$ B está aumentada y que el heterodímero p50/p65 se encuentra en el núcleo. Igualmente, el estrés oxidativo puede inducir la expresión genética del factor c-Myb y su unión al ADN<sup>116</sup>. Este factor de transcripción puede participar en la expresión de la actina del músculo liso y en la contractilidad, la diferenciación y la proliferación de las CEH<sup>116</sup>. Como vemos, el estrés oxidativo se comporta como un importante factor estimulador de la fibrogénesis. Este efecto lo ejerce por diversos mecanismos, principalmente, por activar las CEH e inducir su proliferación y por favorecer la expresión de los genes de la matriz extracelular.

Mediante la activación del NF- $\kappa$ B, que produce el estrés oxidativo, se pueden justificar otros fenómenos que se encuentran en la EHNA, ya que induce la expresión de numerosos genes proinflamatorios, como el TNF $\alpha$ , el ICAM-1<sup>117</sup>, la MCP-1<sup>118</sup>, la IL-6, la MIP-2<sup>119</sup> y CINC (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*)<sup>120</sup>. En este punto, los efectos del estrés oxidativo se superponen con los que origina el TNF $\alpha$ , ya que éste también activa el NF- $\kappa$ B, se comporta como proinflamatorio y puede ser uno de los orígenes de los infiltrados que se hallan en el hígado de los enfermos con EHNA. Nuestros estudios<sup>42</sup>, al igual que los de Li et al<sup>43</sup>, demuestran que el tratamiento de los ratones obesos con anti-TNF $\alpha$  hace que remitan o desaparezcan los infiltrados del hígado.

Algunas otras de las lesiones que se encuentran en la EHNA también pueden producirse por el estrés oxidativo y que los aldehídos reactivos derivados de él las median. En efecto, estos aldehídos pueden generar el entrecruzamiento y la fusión de la citoqueratina y dar lugar a la formación de hialina de Mallory; se unen a proteínas de la superficie de los hepatocitos y pueden iniciar una respuesta inmunitaria. Por este último mecanismo también podría producirse la respuesta inflamatoria que se encuentra en los pacientes con EHNA. De hecho, en estos pacientes se ha demostrado tal tipo de respuesta<sup>121</sup>.

En la EHNA, la muerte celular se produce no sólo por necrosis, sino por apoptosis<sup>122</sup>. Son varios las vías y los factores que pueden conducir a esta muerte programada, como el propio estrés oxidativo, el TNF $\alpha$  y los AGL. Los ROS aumentan la expresión de los ligandos Fas en la superficie de los hepatocitos y de esta manera pueden iniciar la muerte por apoptosis<sup>122</sup>. La interacción del ligando Fas con el receptor Fas determina la activación de la procaspasa 8, el factor Bid<sup>123</sup> y la permeabilización de la membrana mitocondrial por este último. Además, Bid modifica la conformación de Bax (*Bcl-2-associated X protein*) y favorece la formación de canales en la membrana de las mitocondrias que permiten la salida del citocromo c<sup>124</sup> y produce la apoptosis de las células tras activar la procaspasa 9 y la caspasa 3<sup>125</sup>.

El estrés oxidativo, mediante la activación de NF- $\kappa$ B,

puede inducir la formación del TNF $\alpha$  y éste puede ocasionar la apoptosis de los hepatocitos<sup>126,127</sup>. En realidad, esta citocina puede determinar la apoptosis o necrosis de las células dependiendo de la situación energética de éstas, ya que la muerte por apoptosis es un proceso activo en el que se consume gran cantidad de energía<sup>128</sup>. La vía intracelular por el que el TNF $\alpha$  produce la apoptosis celular coincide en gran parte con la descrita para el sistema ligando Fas/Fas. Además, tras la unión del TNF $\alpha$  a su receptor, se produce la activación de la esfingomielinasa, la cual genera ceramida a partir de la esfingomielina de las membranas celulares<sup>127</sup>. La ceramida causa la apoptosis celular por diversas vías, entre otras, actuando directamente en los poros de la membrana mitocondrial<sup>129</sup>. Además, en estudios previos de nuestro laboratorio<sup>64</sup>, demostramos que, al menos en parte, la citotoxicidad del TNF $\alpha$  estaba mediada por ROS.

Para finalizar, los AGL pueden ser importantes en la muerte celular. Hay pruebas que indican que la acumulación de ácidos grasos en células no adiposas se asocia con disfunción y muerte celular. Se trata de un fenómeno que se conoce con el nombre de lipotoxicidad. Esta toxicidad puede contribuir a la patogenia de diversas enfermedades. Por ejemplo, el depósito de ácidos grasos de cadena larga en las células  $\beta$  del páncreas o en los cardiomiocitos de ratas diabéticas determina la muerte de esas células<sup>130,131</sup>. En los diabéticos se ha encontrado que la gravedad de la cardiomiopatía se relaciona con el grado de depósito de triglicéridos en el miocardio<sup>132</sup>. No se conoce el mecanismo por el que el depósito de triglicéridos o de AGL determina esas lesiones o disfunciones. Los fibroblastos y las células endoteliales expuestas a altas concentraciones de ácidos grasos saturados de cadena larga disminuyen su proliferación celular y mueren<sup>133</sup>. Se ha indicado que la muerte se produce por apoptosis, y al menos esto se ha demostrado en cardiomiocitos, células  $\beta$  del páncreas y células hematopoyéticas expuestas al ácido palmítico o esteárico, pero no a ácidos grasos de cadena media o insaturados<sup>134,135</sup>. Algunos han implicado la ceramida como segundo mensajero de muerte celular. Este mediador se forma por hidrólisis de la esfingomielina de las membranas celulares y el TNF $\alpha$  lo utiliza para contribuir a la apoptosis celular<sup>136</sup>. Como ya se ha mencionado, la ceramida favorece la apertura de los poros de las mitocondria, pero se ha considerado también otras dianas moleculares, tales como la proteincinasa activada por ceramidas (CAPK), la proteincinasa C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ), la proteinfosfatasa activada por ceramidas<sup>137</sup>, la proteincinasa activada por mitógenos (MAPK), la JNK y el NF- $\kappa$ B<sup>137,138</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Thaler H. Die Fettleber und ihre pathogenetische Beziehung zur Lebercirrhosis. Virchows Arch Path Anat. 1962;335:180-210.
2. Thaler H. Leber biopsie. Springer-Verlag. Berlin. 1969:176.
3. Thaler H. Die Fettleber, ihre Ursachen und Begleitkrankheiten. Dtsch Med Wschr. 1962;87:1049-55.

4. Creutzfeldt W, Frerichs H, Sickinger K. Liver diseases and diabetes mellitus. En: Popper H, Schaffner F, editores. Progress in liver diseases. Vol. III. London: William Heinemann Med; 1970. p. 371-407.
5. DeWind LT, Payne JH. Intestinal bypass surgery for morbid obesity. Long-term results. JAMA. 1978;236:2298-301.
6. Campbell JM, Hung TK, Karam JH, et al. Jejunoileal bypass as a treatment of morbid obesity. Arch Intern Med. 1977;137:602-10.
7. Ludwig J, Viggiano RT, McGill DB. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc. 1980;55:342-8.
8. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology. 1999;116:1413-9.
9. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. Am J Gastroenterol. 1999;94:2467-74.
10. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: An agenda for clinical research. Hepatology. 2002;35:746-52.
11. McCullough AJ. The epidemiology and risk factors of NASH. En: Farrell GC, George J, De la M Hall P, et al, editores. Fatty liver disease. NASH and related disorders. Malden: Blackwell; 2005. p. 23-37.
12. Moreno Sánchez D, Solís Herruzo JA, Vargas Castrillón J, et al. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio clínicoanalítico de 40 casos. Med Clin (Barc). 1987;89:188-93.
13. Vargas Castrillón J, Colina Ruiz-Delgado F, Moreno Sánchez D, et al. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio histopatológico de 40 casos. Med Clin (Barc). 1988;90:563-8.
14. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. Am J Med. 1999;107:450-5.
15. Samuel VT, Shulman GI. Insulin resistance in NAFLD: potential mechanisms and therapies. En: Farrell GC, George J, de la M Hall P, et al, editores. Fatty liver disease. NASH and related disorders. Malden: Blackwell; 2005. p. 38-54.
16. Marchesini G, Burgianesi E. NASH as part of the metabolic (insulin resistance) syndrome. En: Farrell GC, George J, de la M Hall P, et al, editores. Fatty liver disease. NASH and related disorders. Malden: Blackwell; 2005. p. 55-65.
17. Senyál AJ. Insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. En: Arroyo V, Navasa M, Foros X, et al, editores. Update in treatment of liver disease. Barcelona: Ars Medica; 2005. p. 279-96.
18. De Fronzo RA, Ferranini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care. 1991;14:173-94.
19. Chittury S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Semin Liver Dis. 2001;21:27-41.
20. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. Lancet. 1999;353:1634-6.
21. García-Ruiz I, De la Torre P, Díaz T, et al. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen  $\alpha$ 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. J Biol Chem. 2002;277:30551-8.
22. Esposito LA, Melov S, Panov A, et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:4820-5.
23. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, et al. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. Diabetes Metab. 2004;30:121-38.
24. Berson A, De Beco V, Lettéron P, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. Gastroenterology. 1998;114:764-74.
25. Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. J Hepatol. 1997;26:13-22.
26. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;282:193-9.
27. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol. 1999;31:430-4.

28. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120:1183-92.
29. Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine*. 1998;77:59-72.
30. Spahr L, Negro F, Leandro G, et al. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the <sup>13</sup>C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med Sci Monit*. 2003;9:CR6-11.
31. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, et al. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA*. 1999;282:1659-64.
32. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:193-9.
33. Morris A. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. *Liver*. 1999;19:357-68.
34. Bowyer BA, Miles JM, Haymond MW, et al. L-Carnitine therapy in home parenteral nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentration. *Gastroenterology*. 1988;94:434-8.
35. Krähenbühl S, Mang G, Kupferschmidt H, et al. Plasma and hepatic carnitine and coenzyme A pools in a patient with fatal, valproate induced hepatotoxicity. *Gut*. 1995;37:140-3.
36. Harper P, Wadström C, Backman L, et al. Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:18-25.
37. Yamamoto S, Abe H, Kohgo T, et al. Two novel gene mutations (Glu 74<sup>Lys</sup>, Phe 383<sup>Tyr</sup>) causing the «hepatic» form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet*. 1996;98:116-8.
38. Pérez-Cerreras M, Del Hoyo P, Martín MA, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;38:999-1007.
39. Harper P, Wadström C, Backman L, et al. Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:18-25.
40. De Sousa C, Leung NWY, Chalmers RA, et al. Free and total carnitine and acylcarnitine content of plasma, urine, liver and muscle of alcoholics. *Clin Sci*. 1988;75:437-40.
41. Miele L, Grieco A, Armuzzi A, et al. Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by <sup>13</sup>C-octanoate breath test. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2335-6.
42. Solís-Herruzo JA, García-Ruiz I, Díaz-Sanjuan T, et al. Uric Acid and anti-TNF<sub>α</sub> antibody improve mitochondrial respiratory chain dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology*. 2005;42 Suppl 1:634A.
43. Li Z, Peraldi P, Yang S, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;37:343-50.
44. Fromenty B, Pessayre D. Mitochondrial injury and NASH. En: Farrell GC, George J, de la M. Hall P, et al, editores. *NASH and related disorders*. Malden: Blackwell; 2005. p. 132-142.
45. Wallace DC. Mitochondrial disease in man and mouse. *Science*. 1999;283:1482-8.
46. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344: 721-4.
47. Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*. 1995;67:101-54.
48. Haque M, Mirshahi F, Campbell-Sargent C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with hepatocyte mitochondrial depletion. *Hepatology*. 2002;36:430A.
49. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, et al. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett*. 2000;466:323-6.
50. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, et al. CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000;105:1067-75.
51. Letteron P, Fromenty B, Terris B, et al. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol*. 1996;24:200-8.
52. Seke S, Kitada T, Yamada T, et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2002;37:56-62.
53. Chen J, Petersen DR, Schenker S, et al. Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:544-52.
54. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene*. 1998;17:2515-24.
55. Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases the steady state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem*. 2000;275:13353-61.
56. Cadet J, Delatour T, Douki T, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*. 1999;424:9-21.
57. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, et al. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett*. 2000;466:323-6.
58. Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, et al. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology*. 2002;123:1278-90.
59. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Cir Res*. 2001;88: 529-35.
60. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34: 1158-63.
61. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2000;343:1467-76.
62. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, et al. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology*. 2003;38:413-9.
63. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF $\alpha$  or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40:46-54.
64. Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Hernández-Muñoz I, et al. Reactive oxygen species mediates the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor- $\alpha$  in L929 cells. *Biochem J*. 2003;370:609-19.
65. Sanyal AJ. The pathogenesis of NASH: human studies. En: Farrell GC, George J, de la M Hall P, et al, editores. *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Malden: Blackwell; 2005. p. 76-90.
66. Kern PA, Saghizadeh M, Org JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995;95:2111-9.
67. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and TNF-receptors, p55 and p75, in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2001;34: 1158-63.
68. Nguyen MTA, Satoh H, Favelyukis S, et al. JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:35361-71.
69. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. Free fatty acids promotes hepatic lipotoxicity by stimulating TNF $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004;40:185-94.
70. Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases the steady state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem*. 2000;275:13353-61.
71. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene*. 1998;17:2515-24.
72. Yang S, Zhu H, Li Y, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000;378: 259-68.
73. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2003;38:32-8.
74. Cohen P, Miyazaki M, Succi ND, et al. Role for stearyl-CoA

- desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*. 2002; 297:240-3.
75. Curran RB, Billiar TR, Stuehr DJ, et al. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med*. 1989;170:1769-74.
  76. Hatano E, Bennett BL, Manning AM, et al. NF- $\kappa$ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF $\alpha$ - and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology*. 2001;120:1251-62.
  77. Radi R, Cassina A, Hodara R, et al. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Rad Biol Med*. 2002;33: 1451-64.
  78. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of NO reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett*. 1994;356:295-8.
  79. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem*. 2002;383:401-9.
  80. Castro L, Eiserich JP, Sweeney S, et al. Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. *Arch Biochem Biophys*. 2004;421:99-107.
  81. Murria J, Taylor SW, Zhang B, et al. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite. *J Biol Chem* 2003;278:37223-30.
  82. Guidarelli A, Fiorani M, Cantoni O. Enhancing effects of intracellular ascorbic acid on peroxynitrite-induced U937 cell death are mediated by mitochondrial events resulting in enhanced sensitivity to peroxynitrite-dependent inhibition of complex III and formation of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 2004;378:959-66.
  83. Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991;266:4244-50.
  84. Szabó C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by ONOO. *Free Rad Biol Med*. 1996;21:855-69.
  85. Viner RL, Williams TD, Schoneich C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry*. 1999;38: 12408-15.
  86. Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, et al. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2528-33.
  87. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*. 1998;37:1613-22.
  88. Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann NY Acad Sci*. 2002;242-59.
  89. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, et al. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharm*. 2005;70:343-54.
  90. Chou SM, Wang HS, Taniguchi A. Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci*. 1996;139 Suppl:16-26.
  91. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J*. 2000;14:691-8.
  92. Hegner D, Platt D. Effect of essential phospholipids on the properties of ATPases of isolated rat liver plasma membranes of young and old animals. *Mech Ageing Dev*. 1975;4:191-200.
  93. Neuberger J, Hegarty JE, Eddleston ALWF, et al. Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on immune-mediated hepatocyte damage. *Gut*. 1983;24:751-5.
  94. Jenkins PJ, Portman BP, Eddleston ALWF, et al. Use of polyunsaturated phosphatidylcholine in HBsAg negative chronic active hepatitis. Results of a prospective double blind controlled trial. *Liver*. 1982;2:77-81.
  95. Masumoto N, Tasaka K, Miyake A, et al. Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cell. *J Biol Chem*. 1990;265:22533-6.
  96. Chojkier M, Houghlum K, Solís-Herruzo J, et al. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? *J Biol Chem*. 1989;264:16957-62.
  97. Maher JJ, Tzagarakis C, Gimenez A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol*. 1994;29:605-10.
  98. Zamara E, Novo E, Marra F, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective profibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2004;40:60-8.
  99. Parola M, Pinzani M, Casini A, et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 1993;194:1044-50.
  100. Parola M, Pinzani M, Casini A, et al. Induction of procollagen type I gene expression and synthesis in human hepatic stellate cells by 4-hydroxy-2,3-nonenal and other 4-hydroxy-2,3-alkenals is related to their molecular structure. *Biochem Biophys Res Comm*. 1996;222:261-4.
  101. Tsukamoto H. Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol*. 1993;10:465-7.
  102. Tsukamoto H, Rippe RA, Niemela O, et al. Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1995;10 Suppl 1:S50-3.
  103. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med*. 1991;11:81-128.
  104. Houghlum K, Venkataraman A, Lyche K, et al. A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 1997;113: 1069-73.
  105. Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest*. 1995; 96:620-30.
  106. Bedossa P, Houghlum K, Trautwein Ch, et al. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology*. 1994;19:1262-71.
  107. Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*. 1992;16: 1014-21.
  108. Houghlum K, Filip M, Witztum JL, et al. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest*. 1990;86:1991-8.
  109. Pietrangelo A, Gualdi R, Casalgrandi G, et al. Molecular and cellular aspects of iron-induced hepatic cirrhosis in rodents. *J Clin Invest*. 1995;95:1824-31.
  110. Hagen C, Müller S, Beato M, et al. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J*. 1994;13:3843-51.
  111. Jian J-G, Chen Q, Bell A, et al. Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors. *Oncogene*. 1997;14:3039-49.
  112. Ihn H, Trojanowska M. Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acid Res*. 1997; 25:3712-7.
  113. Ihn H, Leroy EC, Trojanowska M. Oncostatin M stimulates transcription of the human alpha2(I) collagen gene via the Sp1/Sp3-binding site. *J Biol Chem*. 1997;272:24666-72.
  114. Chen S, Artlett CM, Jiménez SA, et al. Modulation of human alpha1(I) procollagen gene activity by interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors in vitro. *Gene*. 1998;215:101-10.
  115. Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology*. 1995;22:241-51.
  116. Lee KS, Buch M, Houghlum K, et al. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*. 1995;96:2461-8.
  117. Hellerbrand C, Wand SC, Tsukamoto H, et al. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1996;24:670-6.
  118. Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, et al. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1993;92:1674-80.
  119. Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, et al. Induction of neutrophil-attracting chemokine in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 1997;113:277-85.
  120. Maher JJ, Scott MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in primary culture and liver injury in vivo. *Hepatology*. 1996;24:905A.

121. Albano E, Mottaran E, Vidali M, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut*. 2005;54:987-93.
122. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2003;125:437-43.
123. Pessayre D, Feldmann G, Haouzi D, et al. Hepatocytes apoptosis triggered by natural substances (cytokines, other endogenous substances and foreign toxins). En: Cameron RG, Feuer G, editores. *Apoptosis and its modulation by drugs: handbook of experimental pharmacology*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2000. p. 59-108.
124. Nechustan A, Smith CL, Lamensdorf I, et al. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*. 2001;153:1265-76.
125. Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrana rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology*. 2000;31:674-83.
126. Nagai H, Matsumaru K, Feng G, et al. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultures mouse hepatocyte. *Hepatology*. 2002;36:55-64.
127. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med*. 2004;8:445-54.
128. Matsumaru K, Ji C, Kaplowitz N. Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes. *Hepatology*. 2003;37:1425-34.
129. Mari M, Colell A, Morales A, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase IA, contribution to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest*. 2004;113:892-904.
130. Shimabukuro M, Zhou Y-T, Levi M, et al. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:2498-502.
131. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:1784-9.
132. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Myocardial substrate metabolism: implications for diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:169-79.
133. Zhang CL, Lyngmo V, Nordoy A. The effects of saturated fatty acids on endothelial cells. *Thromb Res*. 1992;65:65-75.
134. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, et al. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:3324-49.
135. Hickson-Bick DL, Buja ML, McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:511-9.
136. Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:643-65.
137. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*. 1998;335:465-80.
138. Obeid LM, Hannun YA. Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J Cell Biochem*. 1995;58:191-8.