

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

***“ESTEATOHEPATITIS NO
ALCOHÓLICA EN POBLACIÓN
ADULTA CON RASGOS DE
SÍNDROME METABÓLICO”***

Tesis Doctoral presentada por:

Dº. Víctor Manuel Aguilar Urbano

Dirigida por:

Dr. D. Raúl Andrade Bellido

(Departamento de Medicina)

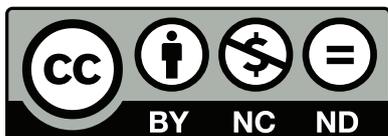
MÁLAGA 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Victor Manuel Aguilar Urbano

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

D. Raúl Andrade Bellido, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático en Medicina por la Universidad de Málaga y Jefe de Servicio del Área de Aparato Digestivo del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral que presenta, al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, Don Víctor Manuel Aguilar Urbano con DNI 74840660-V, sobre el tema **“Esteatohepatitis No Alcohólica (EHNA) en población adulta con rasgos de Síndrome Metabólico”**, ha sido realizado bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Málaga, Septiembre de 2014

Fdo. Raúl J. Andrade Bellido

ABREVIATURAS

AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases

AG: Ácidos grasos

AGNE: Ácidos grasos no esterificados

ALT: Alanino-aminotransferasa

AST: Aspartato-aminotransferasa

AUDC: Ácido ursodeoxicólico

AUROC: Área bajo la curva de operaciones

BH: Biopsia hepática

CEH: Células estrelladas hepáticas

CK-18: Citoqueratina-18

CM: Centímetros

DM: Diabetes Mellitus

EE:UU.: Estados Unidos

EHDG: Enfermedad hepática por depósito de grasa

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

ELF: Índice del European Liver Fibrosis Group

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ET: Elastografía de transición

FA: Fosfatasa alcalina

FLI: Fatty Liver Index

FLIRT: Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy

FS: Fibroscan®

GGT: Gamma-gutamil-transpeptidasa

GPT: Alanino-aminotransferasa

GOT: Aspartato-aminotransferasa

HA: Ácido hialurónico

HGNA: Hígado graso no alcohólico

HOMA: Homeostatic Model Assessment

HTA: Hipertensión arterial

IDF: International Diabetes Federation

IMC: Índice Masa Corporal

ITB: Índice tobillo-brazo

KG: Kilogramos

kPa: Kilopascal

LAP: Lipid Accumulation Product

NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NAS: NAFLD Activity Score

NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis

NCEP-ATP III: National Cholesterol Education Program´s Adult Treatment Panel III

ON: Óxido nítrico

PAS: Periodic Acid Schiff

PIIINP: Péptido amino terminal de Procolágeno III

PNPLA-3: Patatin-like phospholipase domain containing 3

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3

TIMP-1: Inhibidor tisular de la metaloproteinasas 1

QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

RE: Retículo endoplásmico

RI: Resistencia a la insulina

RNM: Resonancia magnética nuclear

SAOS: Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño

SM: Síndrome Metabólico

T: Tiempo

TAC: Tomografía axial computerizada

TZDs: Tiazolindionas

UI: Unidades internacionales

US: Ultrasonografía o ecografía

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VN: Valor normal

ÍNDICE

	Páginas
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1 - 64
1.- Introducción.....	1 - 2
2.- Antecedentes y estado actual del tema.....	2 - 3
3.- Epidemiología.....	4 - 8
4.- Etiopatogenia y Fisiopatología.....	9 -27
4. 1. Fisiopatología del NAFLD como estado proinflamatorio.....	14 - 27
5.- Diagnóstico.....	28 - 46
5.1. Manifestaciones clínicas.....	28 - 29
5.2. Datos de laboratorio.....	30 - 30
5.3. Pruebas de diagnóstico no invasivas. Pruebas de imagen.....	30 - 31
5.4. Diagnóstico del Síndrome Metabólico.....	31 – 34
5.4.1. Determinación de la resistencia a la insulina.....	32 - 33
5.4.2. Enfermedades asociadas a NAFLD.....	33 – 33
5.4.3. Valoración del riesgo vascular.....	33 - 34
5.5. Biopsia hepática.....	34 - 40
5.5.1. <i>Indicación</i>	34 - 36

5.5.2. Clasificación histológica.....	36 - 40
5.6. Diagnóstico con marcadores serológicos	
indirectos.....	41 – 43
5.7. Determinación no invasiva de la	
fibrosis hepática.....	43 - 46
6. Pronóstico, historia natural	46 – 51
7.- Determinantes genéticos.....	52 - 53
8.- Tratamiento	54 – 64
8.1. Estilo de vida.....	54 – 56
8.2. Fármacos.....	56 – 63
8.2.1. Metformina.....	56 – 57
8.2.2. Tiazolindionas.....	57 – 59
8.2.3. Sensibilizadores de la insulina.....	59 – 60
8.2.4. Antioxidantes.....	60 – 61
8.2.5. Ácido ursodeoxicólico.....	61 - 61
8.2.6. Hipolipemiantes.....	61 – 63
8.2.6.1. Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3	
(PUFA).....	61 - 62
8.2.6.2. Fibratos.....	62 - 62
8.2.6.3. Estatinas.....	62– 62
8.2.6.4. Probucol.....	63 - 63
8.2.7. Otros fármacos.....	63 - 63

7.2.7.1. Agentes anti-TNF α	63 - 63
7.2.7.2. Fármacos antihipertensivos.....	63 - 63
7.3. Cirugía bariátrica.....	63 – 64
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65 - 66
1. Hipótesis.....	65 - 65
2. Objetivo principal.....	65 - 65
3. Objetivos secundarios.....	66 - 66
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODO.....	67 – 80
1. Diseño del estudio.....	67 – 73
1.1. Ámbito y sujetos del estudio.....	67 – 67
1.2. Criterios de inclusión.....	68 – 68
1.3. Criterios de exclusión.....	68 - 69
1.4. Tamaño muestral.....	69 - 69
1.5. Tiempo.....	69 - 69
2. Variables de estudio.....	69 – 74
2.1. Variable principal o dependiente.....	69 – 71
2.2. Variables secundarias o independientes.....	71 – 73
2.2.1. <i>Sociodemográficas</i>	71 - 71
2.2.2. <i>Factores de riesgo cardiovascular o rasgos de</i> <i>síndrome metabólico</i>	71 - 71

2.2.3. <i>Enfermedades crónicas o degenerativas</i>	
<i>preexistentes</i>	72 - 72
2.2.4. <i>Fármacos de uso diario</i>	72 - 72
2.2.5. <i>Parámetros antropométricos</i>	72 - 72
2.2.6. <i>Parámetros analíticos</i>	73 – 73
2.3. Variables medición de fibrosis hepática.....	74 - 74
3. Instrumentación.....	75 – 77
3.1. Determinación de medidas antropométricas.....	75 - 75
3.2. Determinación analítica.....	75 – 75
3.3. Determinación de estudio histopatológico.....	75 – 76
3.4. Determinación no invasiva de la fibrosis	
hepática.....	76 – 77
3.4.1. <i>Determinación del NAFLD Fibrosis Score</i>	76 – 77
4. Recogida de datos.....	77 – 78
5. Análisis de los datos.....	78 - 79
6. Aspectos éticos del estudio.....	79 – 80
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	81 – 92
1. Análisis descriptivo.....	81 – 83
2. Prevalencia del NASH y asociación de los distintos rasgos de SM	
 con el grado de NASH.....	84 – 87
3. Asociación de los rasgos de SM con la	

fibrosis hepática.....	88 – 90
4. Comparativo Biopsia hepática- NAFLD	
score.....	91 – 92
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	93 – 106
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	107 - 108
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	109– 130
ANEXOS.....	131 – 134
ICONOGRAFÍA.....	135 - 140

Capítulo I: Introducción

1. Introducción

La *enfermedad grasa del hígado* es una enfermedad hepática crónica caracterizada por depósitos de grasa intrahepatocitaria asociada o no a diferentes grados de daño hepatocelular, cambios inflamatorios, con o sin fibrosis que simulan la afectación hepática inducida por el alcohol, pero sin que medie éste último en su aparición. Se han utilizado muchos términos para referirse a esta entidad, aunque la definición aceptada internacionalmente es *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)* o *Enfermedad hepática por depósito de grasa (EHDG)*. (1) (2) Nos referiremos en adelante a ella con su acrónimo en inglés.

Esta entidad fue descrita por primera vez por *Ludwig en 1980*. (3) NAFLD engloba un espectro de lesiones que va desde la forma más benigna (esteatosis hepática simple) a formas más severas, que en orden progresivo de severidad son la esteatohepatitis no alcohólica, la cirrosis hepática e, incluso, el hepatocarcinoma. La enfermedad tiene como sustrato patogénico la resistencia periférica a la insulina y el síndrome metabólico, aunque hay factores genéticos que la condicionan y que cada vez están más definidos. (4)

El **síndrome metabólico** abarca un grupo de morbilidades que tienen importancia sanitaria por ser muy frecuentes en la población que son: *obesidad, hipertensión arterial (HTA), dislipemia, diabetes mellitus o hiperglucemia*. Estos rasgos de la enfermedad pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, y en ellos influyen una combinación de factores genéticos y ambientales asociados al

estilo de vida en los que la resistencia a la insulina (RI) se considera el componente patogénico fundamental. (5)

NAFLD se considera a día de hoy como la expresión hepática del síndrome metabólico y de la RI, y de ahí deriva el creciente interés en abordar la enfermedad desde todos los puntos de vista (epidemiológico, investigación básica incluidos estudios genéticos, terapéutico, etc.), aunque tiene especial relevancia identificar subgrupos de pacientes que tenga más riesgo de desarrollar formas más graves.

En este sentido, un subgrupo de la población que no ha sido suficientemente estudiado lo forma la población adulta con rasgos de síndrome metabólico y que es aparentemente “sana” desde el punto de vista hepático, por no existir en ellos ninguna sospecha clínica ni analítica de hepatopatía.

2. Antecedentes y estado actual del tema

Las enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por permanecer largos períodos de tiempo asintomáticas. Incluso en la fase final de la evolución de la enfermedad, que es la cirrosis hepática, los pacientes pueden no tener síntomas de la misma, y por ello pueden pasar tiempo sin ser diagnosticados. (6, 7)

Las enfermedades hepáticas son muy prevalentes, debido a que el hígado es el órgano diana de múltiples factores que actúan como noxas externas con potencial patogénico, tan frecuentes como son el consumo de alcohol y las infecciones crónicas por virus hepatotropos (virus de la hepatitis B y C), consumo de fármacos, etc., que pueden producir en el hígado un daño persistente e irreversible.

Otras causas son las enfermedades de base autoinmune (hepatitis crónica autoinmune, Cirrosis Biliar primaria, Colangitis Esclerosante primaria), y los trastornos de base genética (Hemocromatosis Hereditaria, Enfermedad de Wilson). Es por ello que, cuando

nos enfrentamos a una hepatopatía crónica debemos hacer un amplio diagnóstico diferencial que explore todas estas posibilidades. En general, el agente causal debe actuar durante un lapso relativamente largo de tiempo (en algunas ocasiones durante muchos años) y si bien es posible que la histología nos oriente sobre el posible agente causal, una vez instaurada la cirrosis es difícil establecer la etiología basándose exclusivamente en datos histológicos. Características epidemiológicas y/o analíticas nos ayudarán a descubrir cuál es el agente causal. Reservamos el nombre de *cirrosis criptogenética* para aquellos casos poco frecuentes (menos del 5% del total) en los cuales es imposible establecer la etiología. **(8)**

El síndrome metabólico es el condicionante que se ha relacionado con la mayoría de las cirrosis catalogadas como *criptogenéticas* **(9)**, pero es un factor aún insuficientemente estudiado.

NAFLD es actualmente una de las enfermedades hepáticas más frecuentes junto con las relacionadas con el virus de la hepatitis C y el alcohol y se considera que es el componente hepático del síndrome metabólico, caracterizado por obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia e HTA. NAFLD tiene un sustrato anatomopatológico caracterizado por unas lesiones hepáticas similares a las producidas por el alcohol que aparecen en sujetos que no consumen cantidades tóxicas de alcohol y engloba un amplio espectro de lesiones que incluyen desde la esteatosis simple (ES), la esteatohepatitis con vacuolas grasas, cambios necroinflamatorios y/o un grado variable de fibrosis (denominándole en este caso *Non Alcoholic Steatohepatitis* o *NASH*) y finalmente la cirrosis hepática. En los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento del NASH (que es la que define un peor pronóstico), pero aún quedan muchos aspectos por dilucidar en relación con la patogenia y la historia natural. **(10, 11)**

3. Epidemiología

Las verdaderas incidencia y prevalencia del NASH no se conocen bien porque el *estudio histológico*, que es el gold estándar del diagnóstico, sólo se realiza a grupos de enfermos muy seleccionados. Los estudios actuales muestran una gran heterogeneidad.

NAFLD es un trastorno aún no bien definido desde el punto de vista epidemiológico por los sesgos de los estudios publicados, que obligan a ser muy cautos en la interpretación de resultados.

La incidencia de NAFLD es desconocida, probablemente esté infracomunicada y es muy dispar. Por ejemplo, un estudio de salud realizado sobre empleados del gobierno japonés reveló una incidencia global de NAFLD con hipertransaminasemia de 31 casos por cada 1000 personas/ año, mientras que otro reciente estudio en Inglaterra reportó una tasa de incidencia de 29 casos por 100.000 personas/ año. La clara discrepancia entre las tasas de incidencia de ambos estudios indica que son necesarios más estudios.

(12)

La prevalencia de NAFLD en la población general es desconocida, aunque se estima que es ya la tercera causa de enfermedad hepática crónica en nuestro medio, tras las hepatitis víricas y la hepatopatía alcohólica. Estimaciones basadas en estudios poblacionales sugieren que, alrededor del 20-30% de los adultos de Estados Unidos y de otros países occidentales, presentan esteatosis, pero se puede incrementar cuando se busca en poblaciones seleccionadas (69% en obesidad mórbida). Se estima que en alrededor del 10% de estos individuos, un 2-3% de los adultos, cumplen criterios de NASH. (10, 11)

La prevalencia del NASH también es difícil de establecer ya que se precisa un diagnóstico histológico. Hasta la actualidad, la prevalencia del NASH en la población general no ha sido claramente definida. Un estudio en autopsias de la década de 1980

encontró que la prevalencia de NASH era de 2,7% en personas delgadas, aumentando a 18,5% en los pacientes obesos. **(13)** Más recientemente, tres estudios que evaluaron el hígado de donantes hepáticos encontraron una prevalencia de NASH del 1,1 % al 14%. Aunque estos estudios han sido los primeros en evaluar la prevalencia de NASH con criterios histológicos en individuos sanos, el sesgo del consumo de alcohol no fue analizado. **(14, 15)** La prevalencia del hígado graso no alcohólico y de NASH en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica se ha estimado en 91% y 37%, respectivamente; **(16, 17)** y en pacientes diabéticos NAFLD es del 40% al 69%, sin datos para la prevalencia de NASH. **(14)**

La prevalencia de NAFLD en la población general se ha evaluado con gran variedad de herramientas diagnósticas. La biopsia hepática es el gold estándar actual, pero es una técnica invasiva y no se puede utilizar de rutina en estudios poblacionales. Sin embargo, si podemos disponer de estudios con biopsia hepática realizados en donantes de trasplante hepático considerados previamente sanos. Un estudio coreano en el que se realizó biopsia hepática de forma consecutiva en 589 posibles donantes de trasplante hepático, comunican una prevalencia de NAFLD del 51%. **(18)** En Estados Unidos, un estudio similar reveló que el 20% de los donantes no cumplían los requisitos para la donación de órganos en base al grado de esteatosis (> 30%). **(19)**

También los estudios de series de autopsias muestran un resultado mixto sobre la prevalencia de NAFLD. Un estudio de la India informó sobre los hallazgos de 1230 autopsias de adultos, 195 (16%) de los cuales mostraron hígado graso. **(20)** Sólo el 5% de estos pacientes eran obesos y con un consumo elevado de alcohol; en otra serie de autopsias de individuos no obesos de Canadá, la prevalencia de esteatohepatitis y fibrosis fue del 3% y el 7%, respectivamente; **(21)** y por último, un estudio realizado en Grecia reveló pruebas de esteatosis en el 31% y NASH en el 40% de los casos de

muerte por cardiopatía isquémica o muerte por accidente de tráfico, tras la exclusión de la hepatitis B o seropositividad hepática conocida. **(22)** Un estudio posterior sobre la prevalencia de esteatohepatitis en la población griega mostró que es mucho mayor en comparación con otros estudios poblacionales, hallazgo que los autores atribuyeron a la disminución de la actividad física y cambios en los hábitos dietéticos en la población griega en las últimas décadas. **(22)**

Una de las limitaciones de los estudios epidemiológicos es que en la mayoría de casos hay que recurrir a **métodos no invasivos para el diagnóstico de NAFLD y NASH**. Estos métodos son menos sensibles que el estudio histológico, aunque permiten extraer información relevante. Uno de ellos es el *diagnóstico radiológico de NAFLD* mediante **Resonancia magnética (RM), Tomografía computerizada (TAC) y ecografía**. Ambas técnicas son sensibles para detectar depósitos grasos en el hígado, aunque su sensibilidad decrece para discernir gravedad entre los distintos grados de NASH. **(23)** Hay multitud de estudios poblacionales realizados con técnicas radiológicas, sobre todo con ecografía. Un reciente estudio multicéntrico poblacional español, basado en el diagnóstico ecográfico, detectó una prevalencia de NAFLD del 33% en hombres y 20% en mujeres. **(12)** El estudio *DIONYSOS*, basado también en la ecografía, mostró que la prevalencia de NAFLD en sujetos italianos con y sin sospecha de enfermedad hepática fue del 25% y 20%, respectivamente. **(23)** Otro estudio japonés halló un incremento de prevalencia de NAFLD identificada con ultrasonografía en una cohorte de 35.519 individuos japoneses del 13% al 30% después de un seguimiento de 10 años. **(24)** En India, el uso de la ecografía para determinar la prevalencia de NAFLD estima una prevalencia del 17%. **(25)** Otro estudio realizado en el Centro Médico Militar Brooke reveló una prevalencia aún mayor de NAFLD ecográfico, en el 46%, lo que fue confirmado con biopsia en el 12% de la cohorte total (30% de los pacientes con

ultrasonido positivo). **(26)** Aunque es menos comúnmente aplicable a los grandes estudios de detección de NAFLD que la ecografía, la RNM se ha utilizado también para determinar la prevalencia de NAFLD. En los EE.UU., un estudio ampliamente citado de RNM del Condado de Dallas (Texas) identificó NAFLD en el 31% de una muestra de base poblacional en una sociedad multiétnica. **(27)**

Otros estudios estiman prevalencia utilizando determinaciones de *enzimas hepáticas*, (alanina aminotransferasa –ALT- y la aspartato aminotransferasa –AST-), como indicadores no invasivos del NAFLD. Los datos del US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (1988-1994) reportaron niveles elevados de ALT en el 3% de la población, **(28)** con un incremento en los datos reportados en el período 1999-2002, estando la ALT elevada en el 7%, la AST en 4% y cualquier elevación ALT/AST en el 8%. **(29)** Una tasa mucho más alta se registra en una revisión retrospectiva de registros médicos electrónicos de los pacientes atendidos en el programa ejecutivo de salud del Hospital Johns Hopkins. En este estudio se registraron niveles elevados de AST en 2294 sujetos y niveles de ALT en 1309 de ellos. **(30)** Se observaron niveles elevados de enzimas hepáticas en el 14% de los sujetos no alcohólicos que tenían al menos una prueba, y el 21% de los sujetos no alcohólicos que tenían ambas pruebas. En otros estudios, la prevalencia de niveles elevados de ALT osciló entre el 8% y el 9%. **(31)** Al considerar los resultados de los estudios de población basados en parámetros analíticos como marcador de NAFLD, es importante interpretar con cautela los rangos de normalidad en los niveles de transaminasas. **(32, 33)** Es importante destacar que si bien los niveles de ALT elevados están generalmente asociados con NASH histológico, la sensibilidad de las transaminasas para detectar daño histológico, incluso fibrosis, es baja. Por tanto, la actividad de ALT por sí sola no puede utilizarse para descartar enfermedad hepática significativa en pacientes con

sospecha de NAFLD, especialmente aquellos con diabetes tipo II o hepatomegalia. (34) Un estudio publicado por *Powell y cols* (35) comunicó que uno de cada tres adultos americanos presenta esteatosis simple, lo que supone que cerca de 70 millones de adultos presentan NAFLD. En este estudio, el 79% de los pacientes muestran niveles normales de transaminasas, concluyendo que la utilización de las transaminasas como parámetro diagnóstico de esteatosis podría infraestimar la verdadera prevalencia de la enfermedad.

Otro enfoque interesante para toda la población pro-presentación de la prevalencia de NAFLD se basa en **combinaciones de variables clínicas fáciles de medir**. Los ejemplos de perfiles de NAFLD de este tipo incluyen *Fatty Liver Index (FLI)*, [IMC, circunferencia de cintura, triglicéridos y ácido gamma-glutamyl-transferasa (GGT)], (36) y *Lipid Accumulation Product (LAP)* (circunferencia de la cintura y triglicéridos en ayunas). (37) Estos índices son aplicables en comunidades con establecimientos de salud, y podrían contribuir a los estudios de prevalencia del NAFLD, pero hasta ahora sólo se han aplicado a las poblaciones preseleccionadas.

La presencia de NAFLD es alta cuando se selecciona población de riesgo. En este sentido la obesidad es un factor de riesgo de NAFLD muy reconocido. El 20-40% de pacientes que se someten a cirugía abdominal derivativa para el tratamiento de la obesidad mórbida, como gastroplastia y derivación intestinal (yeyunoileal o yeyunocólica), desarrollan NASH. (38)

4. Etiopatogenia y Fisiopatología

La esteatosis hepática es una forma muy común de afectación del hígado ante situaciones clínicas muy diversas, como se refleja en la **tabla 1**, factores metabólicos adquiridos y fundamentalmente los componentes del síndrome metabólico, la cirugía (como el bypass yeyunoileal o la reducción de intestino delgado), y fármacos (corticoesteroides, estrógenos, amiodarona, metotrexato, tamoxifeno, diltiazem, nifedipino) o la exposición laboral (disolventes orgánicos). Aunque algunos pacientes pueden tener NASH de causa desconocida, es excepcional que no haya ninguno de estos factores.

Las causas metabólicas son, con diferencia, las más frecuentes.

El **Síndrome Metabólico** (SM) cuyos criterios de diagnóstico se resumen en la **tabla 2**, presenta una prevalencia del 20% sobre el total de la población. El SM fue reconocido hace más de 80 años y en él se da una asociación de problemas de salud que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales, incluidos aquellos asociados al estilo de vida en los que la resistencia a la insulina (RI) se considera el componente patogénico fundamental. La presencia de SM se relaciona con un incremento significativo de riesgo de diabetes, enfermedad coronaria y enfermedad cerebrovascular, y viene gravado por la disminución en la supervivencia. **(39, 40)**

Tabla 1.- Factores etiológicos asociados a esteatohepatitis no alcohólica.

Factores etiológicos asociados a esteatohepatitis no alcohólica	
Nutricionales y Metabólicos	Tratamiento con fármacos
<ul style="list-style-type: none"> • Obesidad • DM tipo 2 • Hiperlipemia • Pérdida de peso rápida • Ayuno prolongado • Malnutrición calórico-proteica • Nutrición parenteral total 	<ul style="list-style-type: none"> • Amiodarona • Maleato de perihexilina • Tamoxifeno • Estrógenos sintéticos • Bloqueadores del calcio • Tetraciclina • Glucocorticoides • Tóxicos industriales • Metotrexato • Naproxeno • Espironolactona • Sulfasalazina • Ácido valproico • Cocaína • Aspirina
Enfermedades metabólicas hereditarias	
<ul style="list-style-type: none"> • Abetalipoproteinemia • Síndrome de Weber-Christian • Galactosemia • Tirosinemia 	
Técnicas quirúrgicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Derivación yeyunoileal • Derivación yeyunocólica • Derivación biliopancreática • Gastroplastia • Resección extensa del intestino delgado 	
Miscelánea de factores	
<ul style="list-style-type: none"> • Exposición ocupacional a hepatotóxicos • Diverticulosis yeyunal con sobrecrecimiento bacteriano • Síndrome del aceite tóxico 	

Como se ha comentado, la RI es un factor patogénico fundamental del síndrome metabólico. En este sentido, la OMS estableció como criterio fundamental para definir el síndrome en 1999 la presencia de diabetes mellitus, intolerancia a la glucosa, alteración de la glucemia en ayunas o, en el caso de que el individuo tenga una tolerancia normal a la glucemia se exige demostrar la existencia de resistencia periférica a la insulina. Otras definiciones han obviado la determinación de RI, como el NCEP-ATP III (*National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*), pero utiliza como marcador de ella una hiperglucemia mantenida. Durante el año 2005, la

IDF (*International Diabetes Federation*) estableció como criterio fundamental para diagnosticar síndrome metabólico la obesidad central. (41) *NAFLD* se considera la expresión hepática del síndrome metabólico, especialmente se asocia con la obesidad y diabetes mellitus tipo 2.

Tabla 2.- Criterios diagnósticos de síndrome metabólico.

<p>A) Criterios diagnósticos del SM según la OMS 1999</p>
<p>Criterio fundamental: DM, intolerancia glucosa, alteración glucemia en ayunas o, si el individuo tiene una tolerancia normal a la glucemia, resistencia a la insulina demostrada, más dos de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. HTA en tratamiento o sin tratar > 160/90 mmHg. 2. Dislipemia: TG > 150 mg/ dl, HDL < 35 mg/ dl en hombres ó < 40 en mujeres. 3. Obesidad general (IMC > 30 kg/ m2) o visceral (índice cintura abdominal/ cadera > 0,9 en varones o > 0,85 en mujeres). 4. Microalbuminuria > 30 mg de albúmina/ g de creatinina.
<p>B) Criterios diagnósticos de SM según el NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program´s Adult Treatment Panel III). No existe criterio prioritario.</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Obesidad abdominal (cintura abdominal > 102 cm en hombres o 88 cm en mujeres). 2. Triglicéridos > 150 mg/ dL. 3. HDL < 40 mg/ dL en hombres o 50 mg/ dL en mujeres. 4. Tensión arterial > 130/ 85 mmHg. 5. Glucosa basal > 110 mg/ dL
<p>C) Criterios diagnósticos de la IDF (International Diabetes Federation) 2005.</p>
<p>Criterio fundamental: Obesidad central, definida como cintura abdominal > 94 cm para varones y > 80 cm para mujeres de origen europeo, y además dos de cualquier otro de estos factores:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Triglicéridos elevados (de al menos 150 mg/ dl) o tratamiento específico para esta anomalía lipídica. 2. HDL colesterol bajo (inferior a 40 mg/ dl en varones e inferior a 50 mg/ dl en mujeres), o tratamiento específico para esta anomalía lipídica. 3. TA elevada: sistólica de al menos 130 mmHg, diastólica de al menos 85 mmHg o tratamiento antihipertensivo en pacientes previamente diagnosticados. 4. Glucemia plasmática en ayunas elevada (de al menos 100 mg/ dl) o diabetes mellitus tipo 2 previamente diagnosticada.

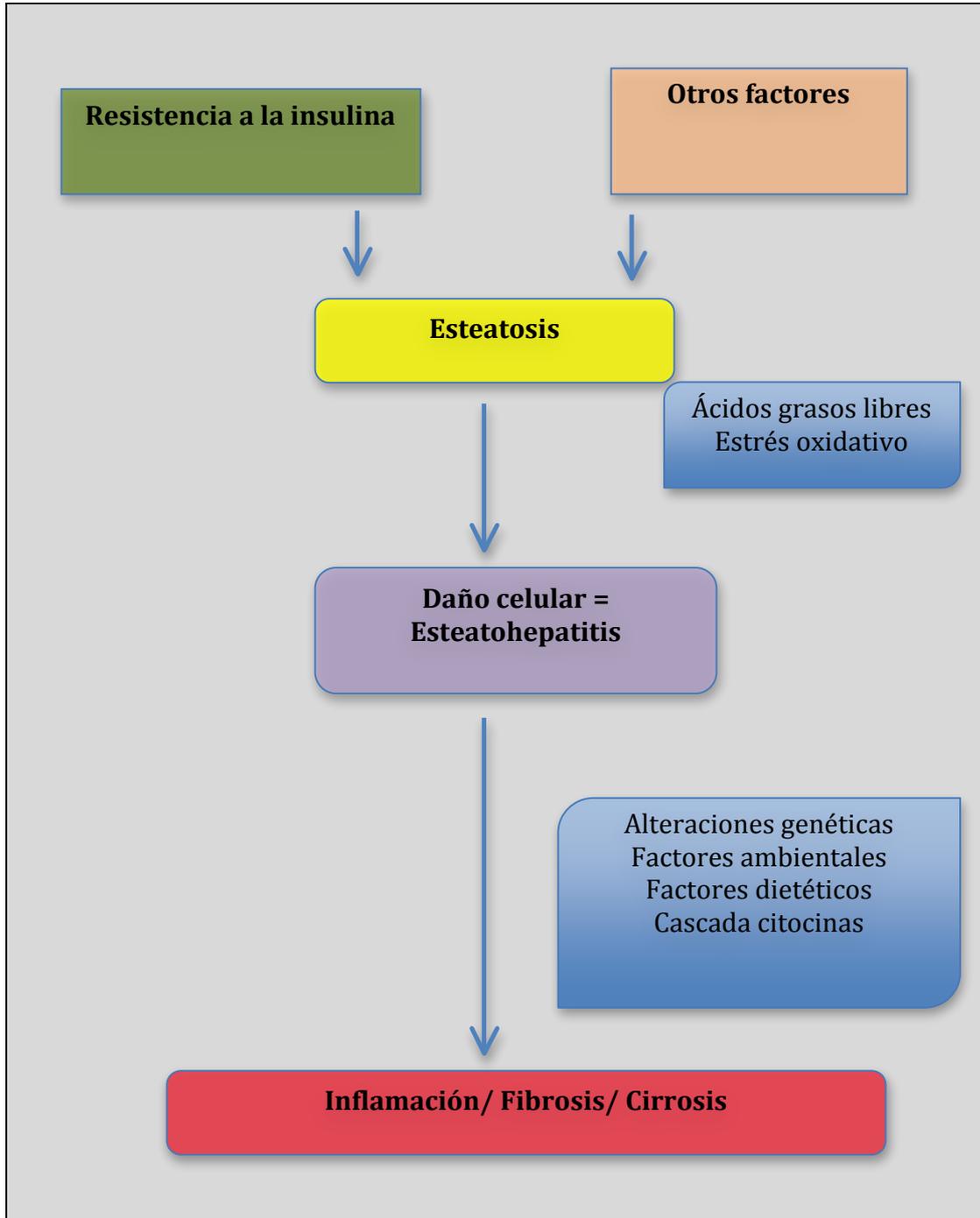
En la actualidad se admite que su etiopatogenia es multifactorial, donde concurren diferentes fenómenos biológicos según la **teoría del “doble impacto”**, postulada por *Day y James* en 1998 y representada en la **figura 1. (42)**

En relación con la influencia de los distintos rasgos del SM, estudios epidemiológicos han observado signos histológicos de NASH entre el 20 y el 90% de la población obesa. **(43)** La DM, generalmente no insulino dependiente o tipo 2, es la segunda entidad, en términos de frecuencia, asociada al NASH, encontrándose entre el 34 y 75% de los pacientes, frecuentemente asociada a obesidad. La hiperinsulinemia de hecho induce una situación de estrés oxidativo intrahepático, que es uno de los factores más importantes en la patogenia del NASH. **(43)**

La **dislipemia**, ya sea hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia de perfil aterogénico o ambas, se asocia con frecuencia al NASH, habiéndose comunicado cifras muy variables que oscilan entre el 20 y el 81% de los casos. **(44)**

Aproximadamente el 50% de los pacientes con HTA presentan RI e hiperinsulinemia. Este desorden metabólico se encuentra involucrado en la patogénesis de las complicaciones de la HTA, tanto en sujetos obesos como no obesos. *Donati y cols* **(45)** demuestran que hasta el 30,9% de pacientes no obesos y no diabéticos hipertensos y con transaminasas normales presentan infiltración grasa ecográfica, frente al 12,7% de pacientes del grupo control. Estos resultados también apoyan la función que desempeña la RI en la etiopatogenia del NASH.

Figura 1.- Patogenia de la esteatohepatitis no alcohólica. Teoría de los dos “impactos” de Day y James.

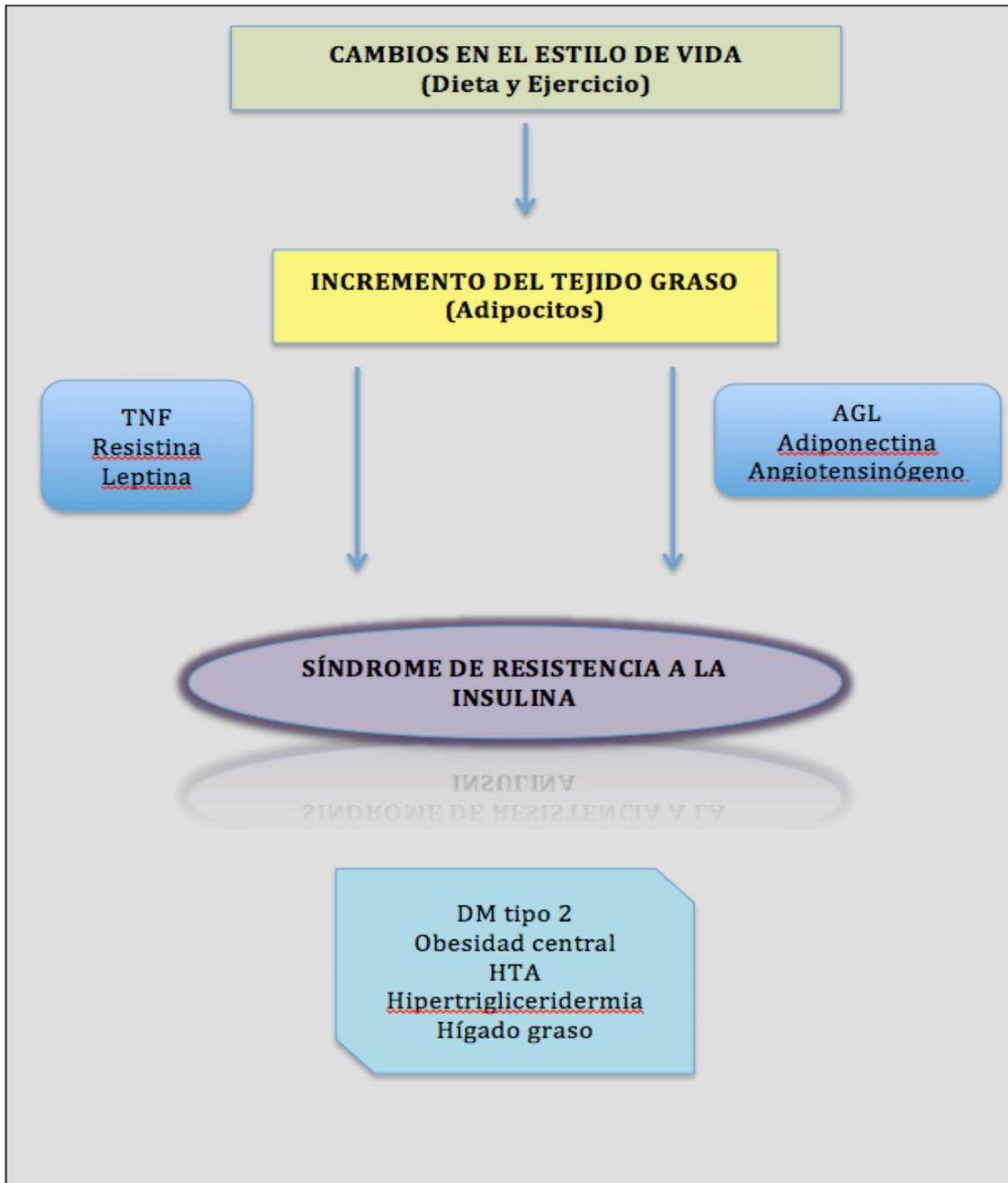


4.1. Fisiopatología del NAFLD como estado proinflamatorio

El SM y la RI están fuertemente relacionado con la producción anormal de citoquinas, estado inflamatorio crónico y subclínico, que finalmente conducen a un exceso de la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular prematura, diabetes y algunos tipos de cáncer. (46, 47) (*Figura 2*) En todo este proceso el tejido adiposo abdominal juega un papel importante, como órgano endocrino.

En condiciones fisiológicas, la homeostasis lipídica requiere de la existencia de interacciones metabólicas coordinadas entre el hígado, el músculo y el tejido adiposo, ejercidas en gran medida por la acción reguladora de la insulina. El hígado tiene un papel central en el metabolismo de los lípidos: capta los ácidos grasos (AG) circulantes que proceden fundamentalmente del tejido adiposo y en menor medida de la absorción intestinal de la grasa de la dieta. Además, los hepatocitos pueden sintetizar AG de novo. Una vez en el hígado, los AG pueden seguir 2 rutas: incorporarse a las vías de oxidación intracelular para generar ATP o esterificarse para convertirse en triglicéridos y así secretarse a la sangre unidos a la apolipoproteína B100 y formar lipoproteínas de muy baja densidad. Por tanto, aquellos procesos que aumenten la captación hepática de AG o alteren su metabolismo (síntesis, oxidación o esterificación) y su posterior secreción pueden producir un acúmulo de grasas en el hígado, que son el primer “impacto” en el modelo patogénico de la NAFLD propuesto por *Cristopher P Day* y *Oliver W James* en 1998. (42) (*Figura 1*)

Figura 2.- Representación esquemática del papel del estilo de vida en la etiopatogenia del NAFLD.

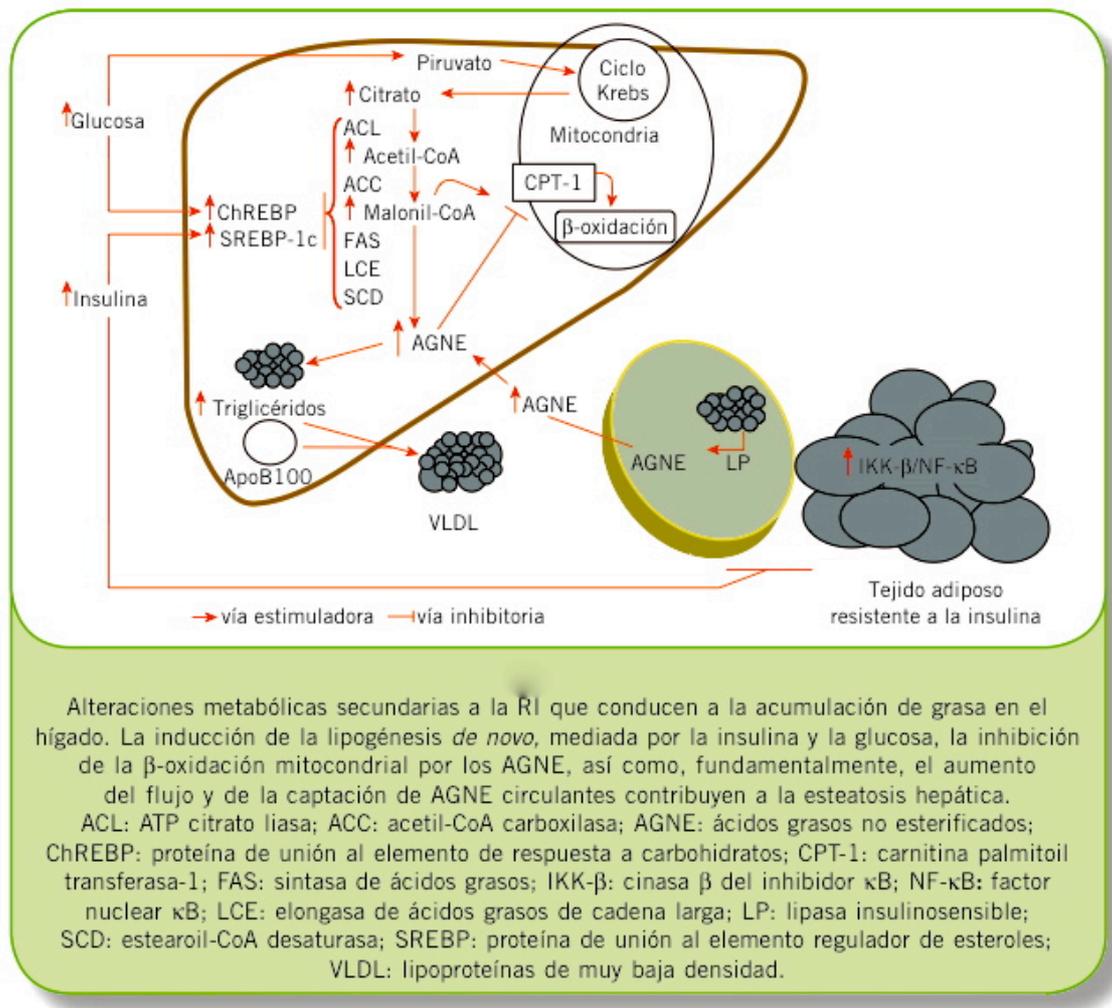


La RI constituye el pilar patogénico básico de este proceso, ya que puede interferir el metabolismo hepático de los AG a diferentes niveles (*Figura 3*). En primer lugar produce un aumento del flujo de AG no esterificados (AGNE) al hígado debido al incremento de la hidrólisis de los triglicéridos por una activación mantenida de la lipasa

adipocitaria. **(48)** Además, la RI se acompaña de la degranulación de la tasa de captación hepática de AGNE, y en pacientes diabéticos se demuestra una relación directamente proporcional con las concentraciones séricas de AGNE. **(49)** La hiperinsulinemia y el aumento de la producción hepática de glucosa, que se producen como consecuencia de la RI, inducen la expresión de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) y de la proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP), respectivamente, que a su vez activan la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis hepática (de novo) de AG a partir del exceso de hidratos de carbono. **(50)** Por otro lado, la SREBP-1c inhibe la transcripción del sustrato del receptor de la insulina-2, lo que induce o exacerba la RI a nivel hepático. **(51)**

La teoría más clásica sobre la patogenia de la esteatosis hepática, denominada *teoría portal*, atribuye un papel clave al tejido adiposo visceral como fuente principal de AGNE al hígado que circulan por la vena porta. **(52)** Esta teoría se ha visto reforzada con resultados provenientes de estudios clínicos y experimentales en pacientes con NASH, en los que se han observado concentraciones séricas elevadas de AGNE **(53)** al tiempo que se ha demostrado que la mayoría (60%) del contenido intrahepático de triglicéridos proviene del pool circulante de los AGNE, mientras que un 25% procede de la síntesis de novo de Ag y un 15% de los AG de la dieta. **(54)**

Figura 3.- Alteraciones metabólicas secundarias a la RI que conducen al acúmulo de triglicéridos en el hígado.



También se han descrito otros factores que pueden contribuir al acúmulo de triglicéridos en el hígado, como la disminución de la betaoxidación mitocondrial. (55) Se ha demostrado que la insulina inhibe esta vía fisiológica de oxidación hepática de AG al producir la activación, mediada por SREBP-1c, de la isoforma 2 de la acetil-CoA carboxilasa que produce maloil-CoA a nivel de la membrana mitocondrial. (56) El aumento de la síntesis de maloil-CoA disminuye la oxidación mitocondrial de los AG al inhibir la enzima carnitina palmitoiltransferasa que se encarga de transportar los AG de cadena larga desde el citoplasma al interior de la mitocondria. (57) El aumento de la

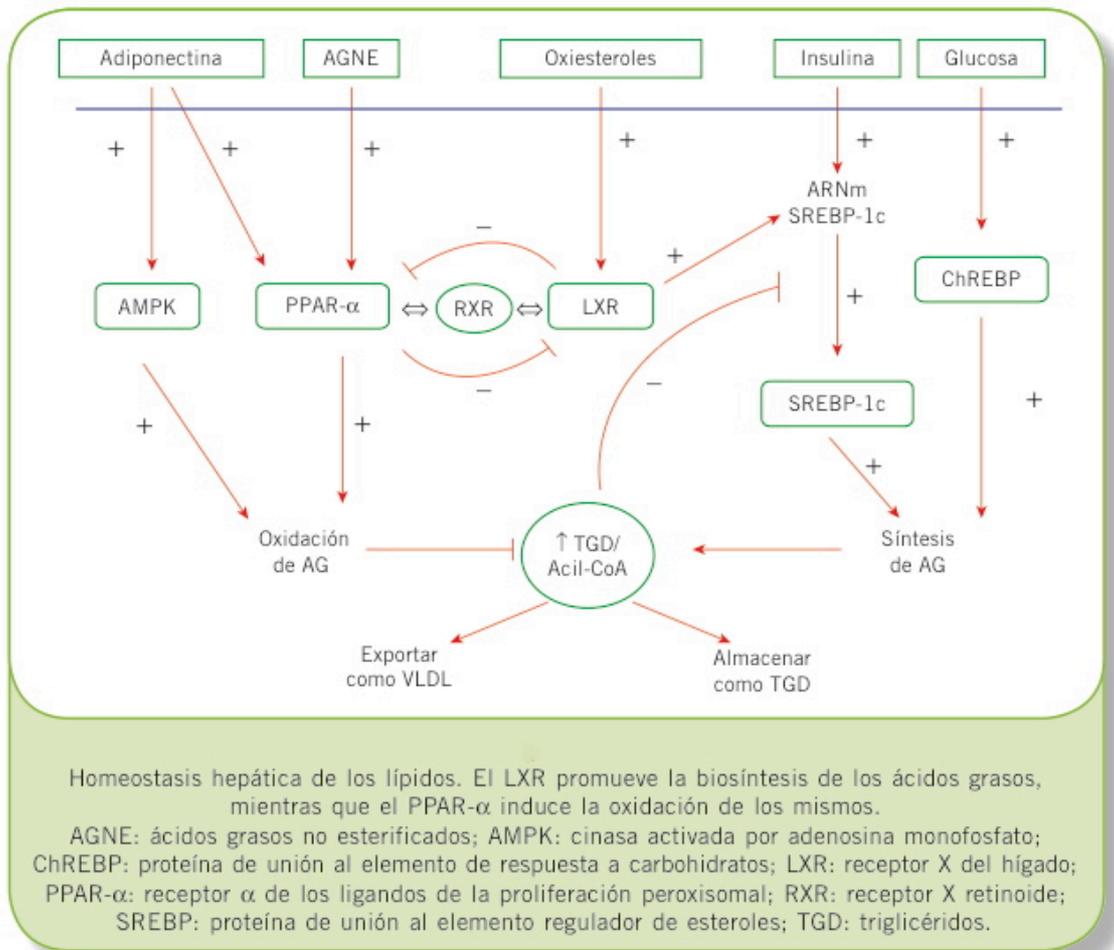
lipogénesis hepática puede también contribuir, aunque de forma modesta como ya se ha mencionado, al acúmulo de triglicéridos. Se sabe que el metabolismo lipídico hepático está estrechamente regulado por una serie de moléculas mediadoras, como los receptores de los ligandos activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR), el receptor X del hígado (LXR) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). **(50)**

Se conocen tres subtipos de PPAR: PPAR- α , PPAR- γ y PPAR- δ ; este último se expresa casi exclusivamente en el músculo y tiene un papel menos relevante. El subtipo α se expresa fundamentalmente en los tejidos que utilizan los AG como fuente de energía, como el hígado, el músculo, el corazón y el riñón. **(58)** Cuando la concentración hepática de AG aumenta, el PPAR- α se activa y promueve la transcripción de genes implicados en la betaoxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal (acil-CoA oxidasa y citocromo P450 4^a), así como en el transporte y la secreción de los AG del hígado (la proteína microsomal transportadora de triglicéridos y la apolipoproteína B100). **(59, 60)** Por tanto, el resultado final de su activación es el incremento del catabolismo hepático de AG.

Otro mediador importante en la homeostasis hepática de las grasas es el LXR. Tras su activación por parte de ciertos ligandos, forma complejos heterodiméricos con el receptor X retinoide que se comportan como transactivadores de la transcripción de genes implicados en la síntesis de AG, como el SREBP-1c y el ChREBP, lo que podría contribuir a la esteatosis. **(61)** El LXR interacciona con el PPAR- α de una manera recíprocamente inhibitoria, de modo que los receptores ejercen funciones opuestas sobre el metabolismo lipídico. El LXR promueve la biosíntesis de los AG mientras que el PPAR- α induce la oxidación de éstos. **(Figura 4)** La competición por el receptor X retinoide disponible en el citoplasma de la célula es el exclusivo mecanismo que regula

la activación de uno u otro receptor, que polarizan a la célula hacia la síntesis o hacia el catabolismo lipídico. (62, 63)

Figura 4.- Homeostasis hepática de las grasas.



La AMPK funciona como un sensor de los niveles energéticos de la célula. Esta proteína cinasa se activa cuando aumentan los niveles intracelulares de AMP, lo que ocurre cuando disminuyen las reservas celulares de energía. La AMPK activada estimula las vías catabólicas de la célula que producen ATP, como la betaoxidación mitocondrial, e inhibe los procesos que consumen ATP, como la lipogénesis,

directamente fosforilando proteínas reguladoras e indirectamente regulando la expresión de genes involucrados en estas vías metabólicas. (64) La composición de AG en el hepatocito puede modular la actividad de la AMPK. En ausencia de la enzima esteroil-CoA desaturasa, la AMPK se activa (65) fosforilando e inhibiendo la acetil-CoA carboxilasa y la ChREBP (66, 67), así como disminuyendo los niveles de expresión de la SREBP-1c. (68) Las tiazolidindionas son fármacos antidiabéticos que se caracterizan por activar el PPAR- γ . Además, tanto estos fármacos como la metformina son capaces de activar la AMPK hepática. (68-70) Sus efectos beneficiosos en pacientes con NASH (71-73) serían en parte la consecuencia de unos acontecimientos moleculares que básicamente tienen que ver con la activación de la vía de la AMPK.

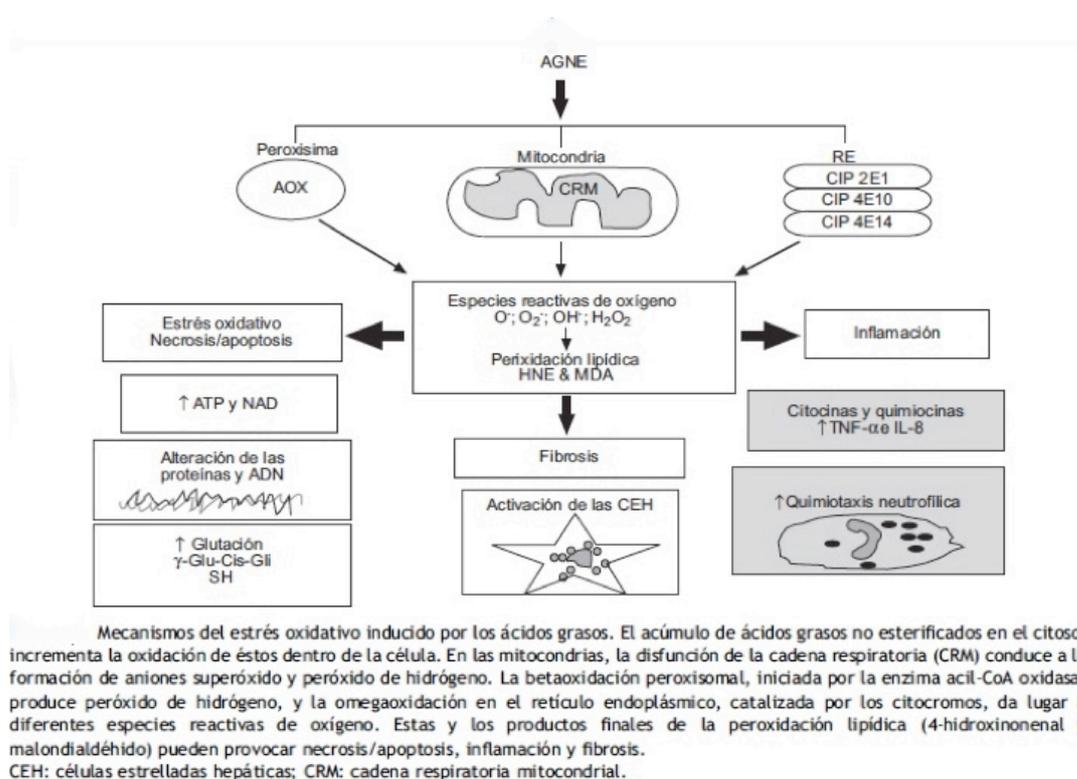
Es un hecho conocido por estudios clínicos que sólo una proporción de pacientes con esteatosis hepática progresan a esteatohepatitis con o sin fibrosis. (74) El conocimiento de *los mecanismos implicados en la progresión* de una esteatosis simple, hasta ahora considerada como un trastorno hepático puramente metabólico, a una esteatohepatitis, el denominado “segundo impacto” patogénico, es importante para poder diseñar estrategias más racionales para el tratamiento y la prevención de los pacientes que tienen o que están en riesgo de tener NASH. Inicialmente se consideraron como los principales candidatos para el “segundo impacto” el estrés oxidativo, con la consiguiente peroxidación lipídica, y las citoquinas, fundamentalmente el TNF- α . En los últimos años se ha incrementado el conocimiento sobre las fuentes intracelulares de radicales libres y citoquinas y, en particular, del importante papel de la RI, de los AGNE y de la inflamación del tejido adiposo y hepático, lo que ha llevado a revisar el modelo patogénico original. Ha aparecido un tercer candidato potencial a “segundo impacto” patogénico: el estrés del retículo endoplásmico (RE), y también se ha puesto de manifiesto que la apoptosis es un fenómeno frecuente en el NASH. (75)

La peroxidación lipídica mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO) es uno de los más firmes candidatos como “segundo impacto” en la patogenia del NASH, ya que explicaría todas las lesiones histológicas características de esta enfermedad hepática. **(Figura 5) (76)** La peroxidación de las membranas plasmáticas y mitocondrial puede producir directamente la muerte celular por necrosis o apoptosis y las megamitocondrias, respectivamente. También las ERO inducen la expresión hepatocelular del ligando de Fas, que puede activar la apoptosis en los hepatocitos Fas+ que se han descrito en pacientes con NASH. **(75)** Los aldehídos 4-hidroxinonenal y malondialdehído, productos finales de la peroxidación lipídica, pueden formar aductos proteicos y actuar como antígenos e iniciar una respuesta inmune intrahepática, **(77)** pueden unirse a citoqueratinas hepatocelulares para formar hialina de Mallory y pueden estimular la quimiotaxis de los neutrófilos. **(78)** El estrés oxidativo puede también activar la cinasa β del inhibidor κ que, a su vez, activa al factor nuclear $\kappa\beta$, con el consiguiente incremento de la transcripción de genes implicados en inflamación y muerte celular, **(79)** como se ha visto en pacientes con NASH. Además, se han encontrado marcadores de estrés oxidativo (p. Ej.: proteínas nitradas en tirosina) en modelos animales y en pacientes con NASH **(80, 81)** que relacionan la magnitud del estrés oxidativo con la gravedad de la enfermedad hepática. **(82)**

Clásicamente se ha considerado que las células inflamatorias son la fuente fundamental de ERO en el NASH, pero recientemente se ha observado que los hepatocitos pueden ser una fuente importante de ERO como consecuencia de la oxidación de un exceso de AGNE en las células hepáticas. **(83)** Tanto los AGNE como sus metabolitos son ligandos del PPAR- α que activa la transcripción de los genes de las enzimas que participan en la oxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal de los AGNE, y genera ERO por al menos 3 vías diferentes que contribuyen al estrés oxidativo

(Figura 5). (84) Se ha descrito mayor actividad del *citocromo 2E1* en el hígado de pacientes obesos con NASH que en el de los pacientes obesos sin NASH, lo que podría indicar que la generación de ERO secundaria al aumento de actividad de la betaoxidación peroxisomal de los AGNE podría ser relevante en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis. (80)

Figura 5.- Mecanismos del estrés oxidativo inducido por ácidos grasos.



La mayoría de los datos provenientes de modelos animales y de pacientes con NASH indica, que las mitocondrias son la fuente intracelular más importante de ERO. (85) Por otro lado, existe una evidencia creciente de que la disfunción mitocondrial que se acompaña de una generación excesiva de ERO es un trastorno muy frecuente en pacientes con NASH. (86, 87)

Las citoquinas son claros candidatos como mediadores en la progresión de una esteatosis simple a esteatohepatitis (“segundo impacto”) por varias razones. Primera, las citoquinas son capaces de reproducir todas las características histológicas clásicas de NASH, incluyendo necrosis/apoptosis hepatocelular (TNF- α /transforming growth factor [TGF- β]), quimiotaxis de los neutrófilos (IL-8), activación de las células estrelladas hepáticas (CEH) (TNF- α /TGF- β) e hialina de Mallory (TGF- β). **(88)** Segundo, las *citoquinas proinflamatorias* (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) desempeñan un importante papel en la patogenia de la RI sistémica y hepática que tienen los pacientes con NASH. **(89)** Tercera, las concentraciones séricas e intrahepáticas de TNF- α y de sus receptores están aumentadas en pacientes con NASH, **(90, 91)** aunque sin discriminar claramente esteatosis de esteatohepatitis, lo que cuestiona el papel de esta citoquina en la inflamación hepática. Y cuarta, el TNF- α podría ser el inductor de apoptosis en los hepatocitos de los pacientes con NASH, ya que se ha demostrado que esta citoquina induce muerte celular programada en los hepatocitos en condiciones de estrés oxidativo **(92)** y que éste aumenta la sensibilidad de las células hepáticas a los efectos mitocondriales del TNF- α . **(93)** Se sabe que los AGNE pueden activar directamente la vía cinasa β del inhibidor κ /factor nuclear $\kappa\beta$ en los hepatocitos, con el consiguiente incremento en la expresión hepatocelular de TNF- α , **(94)** lo que indica que los hepatocitos pueden ser una fuente importante de esta citoquina en el NASH.

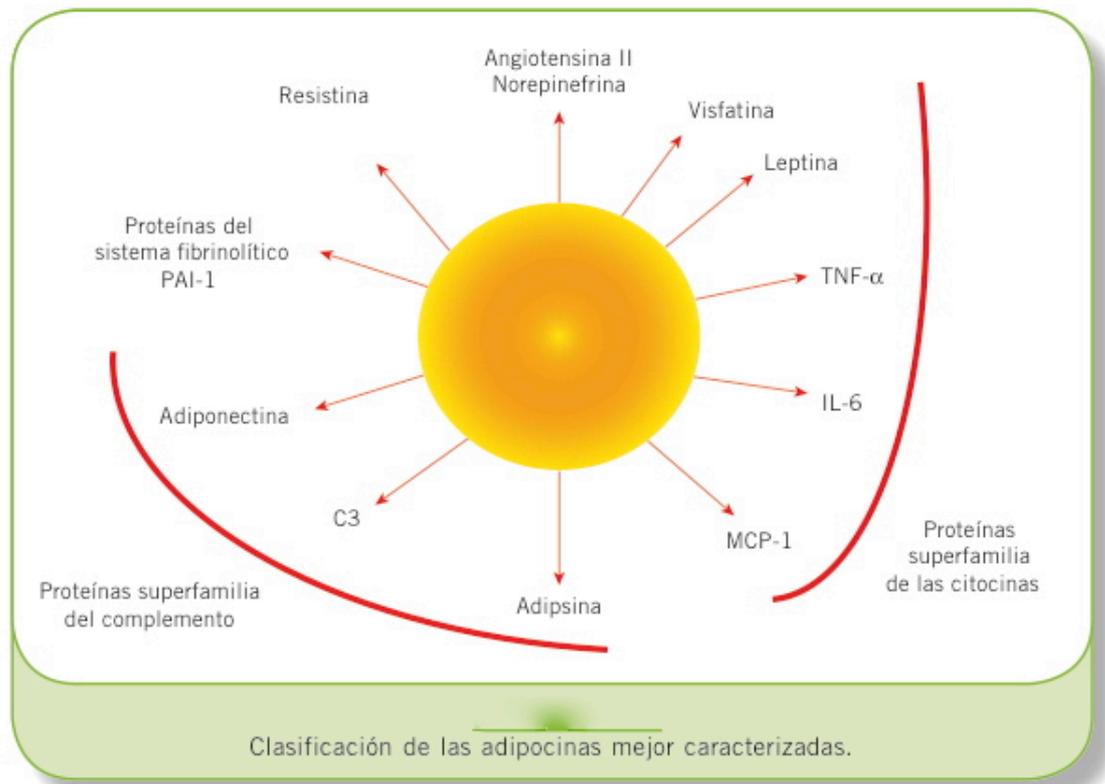
Como se comentó anteriormente, un candidato potencial en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis es **el estrés del RE**. El aumento de la concentración de AG, la hiperinsulinemia, la hipoxia y las infecciones víricas pueden alterar la homeostasis del RE y provocar lo que se denomina *respuesta al estrés del RE*, que provoca la activación de un número de factores de transcripción y cinasas. **(95)** Esta activación transcripcional

conduce a aumento de la síntesis lipídica, inducción de apoptosis, inflamación y disfunción mitocondrial, (96) típicas alteraciones del NASH.

El concepto de que **el tejido adiposo** es un mero y pasivo almacén de triglicéridos ha cambiado considerablemente en los últimos años. Al tejido adiposo se lo considera actualmente como un tejido endocrino complejo y activo que secreta numerosos mediadores que desempeñan importantes funciones reguladoras de la biología vascular y metabólica. (97) Las células adiposas, que incluyen a los adipocitos, los preadipocitos y los macrófagos, son capaces de secretar múltiples moléculas bioactivas que se denominan colectivamente adipoquinas. (*Figura 6*) Entre éstas se incluyen el TNF- α , la adiponectina, la leptina, la resistina, la IL-6, la angiotensina II, la norepinefrina, la adiposina, la visfatina y algunas más. Ciertas adipoquinas actúan predominantemente de una manera autocrina o paracrina, mientras que otras se secretan a la circulación sistémica y actúan como moléculas señalizadoras en tejidos distantes, como el hígado, el músculo y el endotelio; es decir, pueden actuar como verdaderas hormonas. (97)

Evidencias experimentales indican que **la leptina** y **la adiponectina** podrían desempeñar un papel importante en la patogenia del NASH. Se ha comprobado que la administración de leptina a pacientes y ratones con lipodistrofias congénitas que cursan con una práctica ausencia de leptina revierte el NASH. (98, 99) En cambio, en el NASH asociada a obesidad y RI, las concentraciones séricas de leptina están elevadas de manera proporcional al grado de esteatosis hepática. (100, 101) En estos pacientes parece existir un estado de “resistencia a la leptina” que acompaña a la RI y hace que el hígado se vuelva refractario a los beneficiosos efectos antiesteatósicos de la leptina. (100)

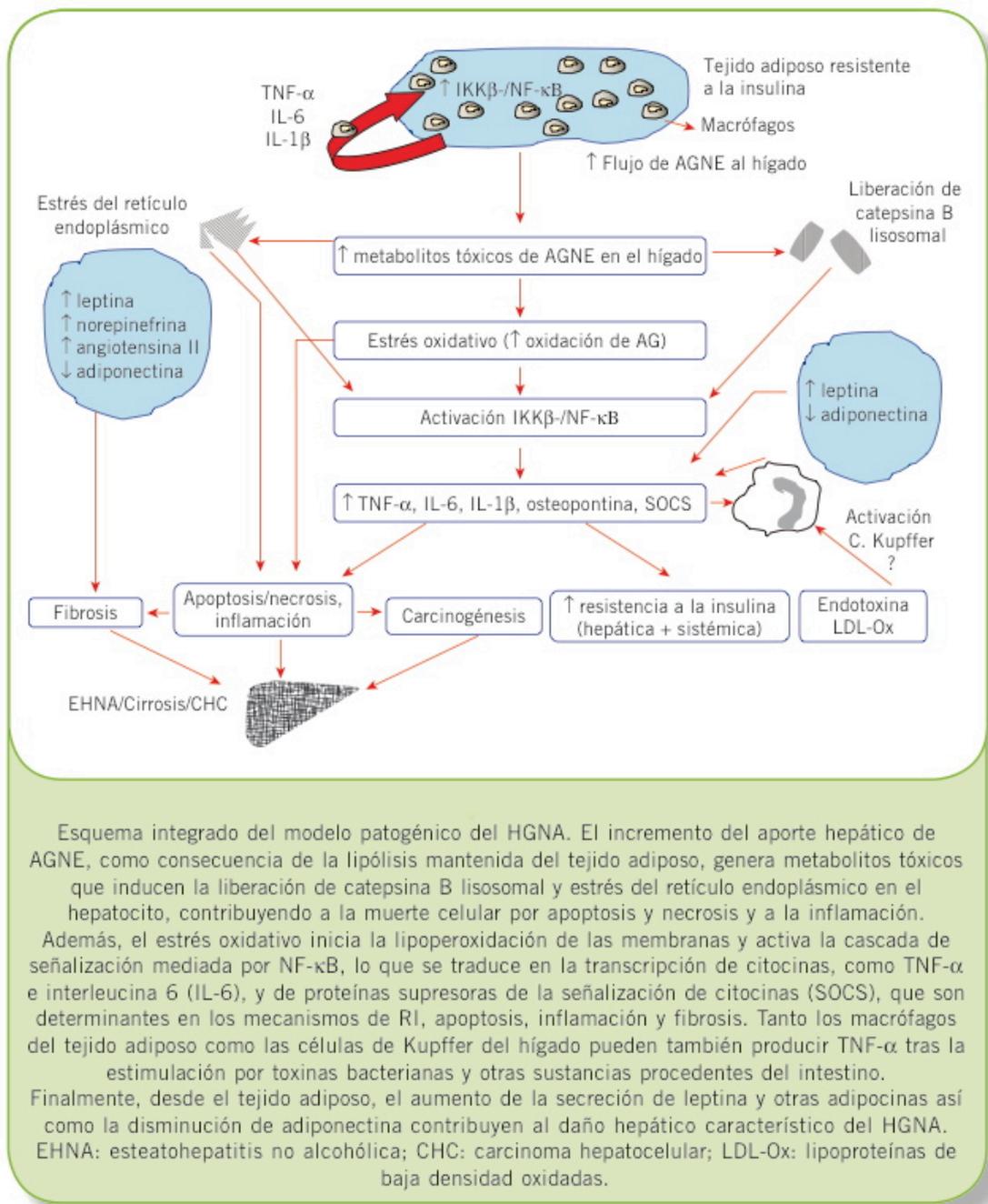
Figura 6.- Clasificación de las adipoquinas mejor caracterizadas.



Esta adipoquina podría contribuir a la inflamación hepática debido a su capacidad para estimular la secreción hepatocelular de una citoquina proinflamatoria de tipo Th1 denominada osteopontina. Existen evidencias clínicas y experimentales que indican que la adiponectina puede desempeñar un importante papel en la patogenia del NASH. Así, se ha visto que las concentraciones séricas de adiponectina son inversamente proporcional al grado de esteatosis hepática, (91, 102) y en un estudio se observó que las concentraciones circulantes de adiponectina eran menores en los casos de NASH que en aquellos con esteatosis simple. (91) En la misma línea, otro estudio demostró que el nivel de expresión intrahepática de adiponectina y de su receptor tipo II era también menor en el NASH que en la esteatosis. (103) La adiponectina es una hormona antiesteatósica que promueve la betaoxidación mitocondrial de los AGNE y ejerce este efecto a través de la activación del PPAR- α y de la AMPK. (104) La adiponectina

también posee un efecto antiinflamatorio que probablemente se deba a su capacidad para inhibir la síntesis y la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos que infiltran el tejido adiposo en la obesidad. **(105)** Curiosamente, estos 2 factores se regulan mutuamente su actividad biológica. El TNF- α inhibe la síntesis y la actividad de la adiponectina y ésta inhibe la síntesis y la actividad del TNF- α . Se ha comprobado que un mecanismo similar puede ser igualmente importante en humanos, **(91)**. Cualquiera de los mecanismos necroinflamatorios descritos hasta ahora podría activar a las CEH, las principales implicadas en el proceso de fibrogénesis hepática. En este sentido, se ha indicado que la apoptosis hepatocitaria, una alteración frecuente en el NASH, **(76)** podría activar la maquinaria fibrogénica de las CEH al inducir la secreción de TGF- β , tanto por parte de las células de Kupffer como por las mismas CEH que fagocitan los hepatocitos apoptóticos. **(106,107)** También se han descrito mecanismos no necroinflamatorios, más bien relacionados con la obesidad y la RI, en la patogenia de la fibrosis hepática asociada al NASH. La leptina es esencial para que se produzca fibrosis hepática en modelos animales de NASH **(104)** pero, en pacientes con NASH, las concentraciones séricas de leptina están elevadas aunque sin una clara asociación con el estadio fibrótico de la enfermedad hepática. **(101)** También se ha visto que la angiotensina II y la norepinefrina pueden activar la fibrogénesis in vitro y en ratones ob/ob deficientes en leptina. **(109,110)** La insulina y la glucosa son capaces de estimular la síntesis del factor de crecimiento del tejido conectivo en las CEH in vitro. **(111)** Además, la expresión intrahepática de este factor de crecimiento se correlaciona positivamente con el estadio fibrótico de pacientes con NASH, **(111)** lo que indica que la hiperinsulinemia y la hiperglucemia podrían jugar un importante papel en la progresión de la fibrosis hepática en estos pacientes. **(Figura 7)**

Figura 7.- Esquema integrado del modelo patológico del NASH.



5. Diagnóstico

La mayoría de pacientes con NAFLD están asintomáticos o presentar manifestaciones clínicas inespecíficas, estableciéndose el diagnóstico de sospecha por el hallazgo casual de una alteración de la analítica hepática, una hepatomegalia o ante el hallazgo de esteatosis hepática detectada en una ecografía de rutina.

La historia clínica, las pruebas de laboratorio y algunas pruebas de imagen ayudan a seleccionar aquellos casos que pueden beneficiarse de una **biopsia hepática**, que es el gold estándar para un diagnóstico de certeza y establecer un pronóstico con mayor fiabilidad. (112-114)

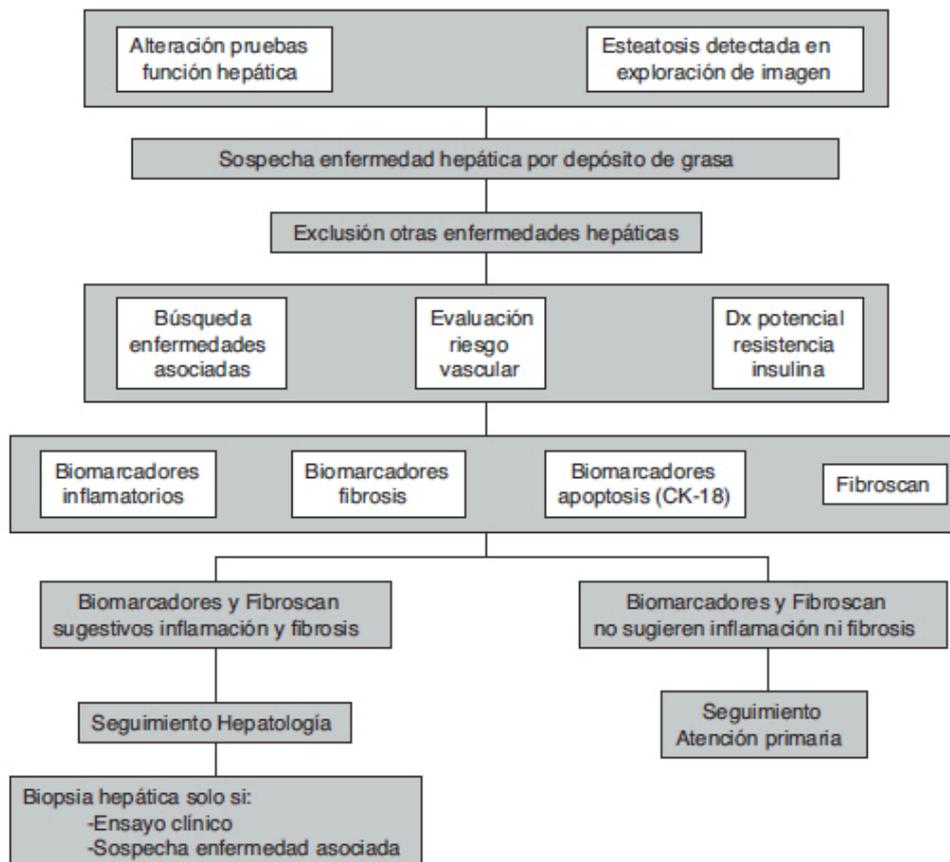
5. 1. Manifestaciones clínicas

El *diagnóstico de NAFLD* debe sospecharse en los individuos que presentan algún factor de riesgo, especialmente obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertrigliceridemia, pérdida rápida de peso, cirugía reciente para el tratamiento de la obesidad mórbida. También debe considerarse en sujetos con una elevación persistente y moderada de las transaminasas de etiología no aclarada o que presentan una hepatomegalia aislada. (Figura 8)

Los pacientes con NAFLD/ NASH suelen estar asintomáticos o presentar síntomas inespecíficos como astenia o molestias en hipocondrio derecho. En la exploración física la hepatomegalia es el hallazgo más frecuente (33-55%) y, en general, el único. La presencia de acantosis nigricans (36-49%) se ha descrito solamente en niños, (115, 116) que consiste en un engrosamiento e hiperpigmentación de la piel, de localización intertriginosa, que ha sido considerada como un marcador de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina.

Otros signos, como son la esplenomegalia, la presencia de borde hepático duro, eritema palmar y teleangiectasias, sugieren la presencia de una enfermedad hepática avanzada con evolución cirrótica.

Figura 8.- Algoritmo diagnóstico del NAFLD. (117)



5.2. Datos de laboratorio

Habitualmente, los pacientes presentan una *elevación de las transaminasas* y el cociente alaninoaminotransferasa (ALT, GPT)/ aspartatoaminotransferasa (AST, GOT) es superior a 1, diferenciándose de la hepatitis alcohólica en la que el cociente es <1. Es igualmente frecuente una elevación moderada de la fosfatasa alcalina (FA) y de la Gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT). No obstante, como se ha comentado previamente, la hipertransaminasemia es un rasgo que tiene poca sensibilidad para el diagnóstico de NAFLD.

El resto de pruebas de la función hepática son normales, excepto en aquellos pacientes con una cirrosis establecida con datos de insuficiencia hepática, en la que presentan elevación de la bilirrubina, descenso de la albúmina y de la tasa de protrombina, y trombopenia. Algunas de las alteraciones biológicas observadas en los pacientes con NAFLD/ NASH se relacionan con el factor etiológico. En este sentido, es frecuente encontrar una elevación de los lípidos séricos, especialmente hipertrigliceridemia, así como hiperglucemia o al menos RI determinada por el HOMA-R.

En todos los casos deberían llevarse a cabo las determinaciones bioquímicas e inmunoserológicas dirigidas a excluir una enfermedad hepática de otra etiología. También debe descartarse de manera cuidadosa el consumo excesivo de alcohol y la ingestión de fármacos hepatotóxicos.

5.3. Pruebas de diagnóstico no invasivas. Pruebas de imagen

La *ecografía abdominal (US)* es la técnica de imagen más utilizada (más accesible y económica) en el diagnóstico de esteatosis hepática, observándose en este caso un aumento de la ecogenicidad hepática que confiere al hígado un aspecto brillante. Esta técnica permite el diagnóstico de esteatosis con una elevada fiabilidad aunque es poco

útil para precisar el estadio evolutivo de la enfermedad, es decir, el grado de fibrosis y de inflamación, **(118)** aunque la utilización de nuevas técnicas (como el uso de ecopotenciadores) ha mejorado la sensibilidad en el diagnóstico de cirrosis. **(119)** La utilidad de la US disminuye en los casos en los que la esteatosis es inferior al 30% **(120)** o cuando existe una obesidad mórbida. **(121)**

Tanto la *tomografía axial computerizada* (TAC) como la *resonancia magnética nuclear* (RNM) permiten evaluar con una precisión discretamente más elevada la presencia de esteatosis, aunque son claramente más costosas y presentan la misma limitación que la ecografía, no sirven para estadiar la gravedad de la enfermedad.

El problema común de todas estas pruebas no invasivas es que no presentan la suficiente sensibilidad y especificidad para estadiar la enfermedad y por tanto no permiten distinguir la esteatosis simple de NASH con o sin fibrosis. **(122, 123)**

5.4. Diagnóstico del Síndrome Metabólico

El *Síndrome Metabólico* (SM) se puede definir como una asociación compleja de factores de riesgo vascular asociados con una dieta hipercalórica rica en grasa, inactividad física y obesidad abdominal. **(124)** La RI es un factor patogénico fundamental del SM, pero ambos conceptos (SM y RI) son intercambiables, siendo uno de los problemas fundamentales la ausencia de criterios diagnósticos uniformes. En este sentido, la OMS estableció como criterio fundamental para definir el síndrome en 1999 la presencia de DM, intolerancia a la glucosa, alteración de la glucemia en ayunas o, en el caso de que el individuo tenga una tolerancia normal a la glucemia se exigía demostrar la existencia de RI. Además de este criterio fundamental el paciente debía tener al menos 2 de los criterios apuntados en la *tabla 2*. Por otro lado, en EE.UU. en 2001 el National Cholesterol Education Program adult Treatment Panel III (NCEP-ATP

III) estableció unos criterios fácilmente utilizables en la clínica habitual, dado que no exigen la demostración de RI. Estos criterios también se exponen en la **tabla 8**. En 2005, la International Diabetes Federation estableció como criterio fundamental para diagnosticar síndrome metabólico la obesidad central. Finalmente, durante el año 2009 se llegó a un consenso entre las principales sociedades científicas involucradas en el estudio del síndrome metabólico, en el que la característica fundamental fue que la obesidad central pasa de ser un requisito imprescindible en la definición de SM a ser un requisito más. Estos criterios también se exponen en la **tabla 2. (125)**

5.4.1. Determinación de la resistencia a la insulina

Se considera que existe RI cuando una cantidad normal de esta hormona produce una respuesta biológica inferior a la esperada. A nivel celular, esta resistencia puede deberse a una disminución de la sensibilidad a la insulina, a una sensibilidad a la insulina normal pero con disminución de la capacidad de respuesta máxima o a una combinación de ambos fenómenos. La técnica de referencia para su diagnóstico es el ***pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico***, (126) aunque este procedimiento es caro y complejo por lo que no se utiliza de forma sistemática en la clínica diaria. La sensibilidad a la insulina también puede estimarse analizando las curvas de respuesta de glucosa e insulina tras la administración intravenosa de un bolo de glucosa. Existen varios modelos que se basan en este principio, siendo el más utilizado el *modelo mínimo del metabolismo de la glucosa*.

Frente a estos modelos mínimos, se han desarrollado otras formas de medición de la RI basadas en las cifras basales de glucosa, insulina y/o péptido C, entre las cuales se encuentran el **Homeostatic Model Assessment (HOMA)**, el HOMA 1 y el HOMA IR. Un derivado del HOMA, el **Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI)**

usa el *logaritmo del producto de insulina x glucosa* = $1 / [\log (\text{insulina} \times \text{glucosa})]$.
(127, 128)

5.4.2. Enfermedades asociadas a NAFLD

Cada día se reconocen más entidades capaces de inducir o asociarse con NAFLD, como la psoriasis, cuya asociación se ha descrito recientemente, o la apnea obstructiva del sueño, cuya severidad es paralela a la del NAFLD. (129, 130) De hecho, la gravedad del SAOS se ha postulado como un factor predictivo de fibrosis en los sujetos con NAFLD. (131) El hecho de que sea una enfermedad relativamente de reciente descripción hace que el número de enfermedades potencialmente asociadas se incremente cada día, aunque existe una notable dificultad para diferenciar entre entidades realmente asociadas o enfermedades que coexisten dado que presentan factores etiológicos comunes. En el congreso de la AASLD celebrado en 2010 en Boston, se comunicó el incremento de enfermedad renal crónica en los sujetos con NAFLD o el aumento en la prevalencia de adenomas de colon tanto en mujeres como en hombres, lo que pudiera tener consecuencias de cara a un cribado del cáncer colorrectal en este colectivo de pacientes. (132)

5.4.3. Valoración del riesgo vascular

NAFLD se asocia a un incremento del riesgo vascular, siendo este incremento primario e independiente de la asociación con el SM u otros factores de riesgo vascular presentes en estos pacientes. Cabe la posibilidad de que el NASH no sea solo un marcador de enfermedad cardiovascular sino que esté involucrado en su patogenia. De hecho parece que la grasa intrahepática, y no la visceral, se asocia con las complicaciones metabólicas de la obesidad y que el hígado es clave en la regulación del

metabolismo lipídico y de la glucosa, y por tanto éste debe ser considerado como uno de los factores iniciadores del SM más que su diana. **(133-135)**

Dado que el NAFLD se caracteriza por el incremento del riesgo vascular, se debería prestar especial atención a este aspecto. En este sentido, se debería recurrir a las nuevas técnicas para la detección de aterosclerosis subclínica, como son la *medición del índice tobillo-brazo* (ITB), la *ecografía carotídea*, el TAC y la RNM de alta resolución. **(136)** Todas estas exploraciones son incruentas, y algunas de ellas muy sencillas de realizar, caso de la ecografía carotídea y el ITB. Estas exploraciones son especialmente útiles para pacientes con riesgo cardiovascular intermedio, situación en la que se encuentran una parte muy importante de la población con NAFLD. **(137, 138)**

5.5. Biopsia hepática

5.5.1. Indicación

El diagnóstico de certeza de NAFLD/ NASH se establece mediante biopsia hepática (BH), que es el *“gold estándar”* en la actualidad. Las alteraciones que pueden observarse en la biopsia son esteatosis, en general macrovacuolar, infiltrado inflamatorio, *balonización* de los hepatocitos, focos de necrosis, hialina de Mallory y un grado mayor o menor de fibrosis. Dependiendo de la combinación de lesiones que se observan en la biopsia puede establecerse la fase de la enfermedad. **(139)** Cuando se establece una cirrosis tanto la esteatosis como los cambios inflamatorios pueden haber desaparecido, por lo que el *diagnóstico etiológico debe hacerse por exclusión* de otras causas y presentar el paciente alguno de los factores asociados.

La BH sirve para establecer la *gravedad de las lesiones* y, en este sentido, se ha propuesto una clasificación que es aceptada por la mayoría de autores de la que hablaremos más adelante.

La BH hepática también puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre el NAFLD y otras causas de elevación aislada de transaminasas, especialmente en aquellos pacientes sin componentes del síndrome metabólico. En ocasiones la confirmación histológica de que existe una esteatosis simple sin fibrosis, puede ser importante para definir el pronóstico. Finalmente y dada la mala correlación entre expresividad clínica y biológica y la intensidad de las lesiones hepáticas, la biopsia es necesaria en el momento de incluir a un paciente en un estudio terapéutico con el fin de obtener grupos homogéneos de pacientes. En estos casos lo ideal es repetir una biopsia al final del tratamiento para valorar los efectos de la medicación ensayada.

A pesar de todo lo anterior, la **necesidad de BH** en el manejo de los pacientes con NAFLD es todavía objeto de controversia. (*Tabla 3*) Los argumentos en contra de la práctica sistemática de una biopsia a los pacientes con sospecha de NAFLD es que en general están asintomáticos, que el pronóstico en la mayoría de los casos es bueno, que no existe tratamiento bien establecido para estos pacientes y que la biopsia es una técnica con un coste y un riesgo que debe ser tenido en cuenta. Otra limitación adicional de la BH es el *posible error de muestra*. Un estudio reciente ha mostrado que un 35% de pacientes con NASH y fibrosis en puente en una muestra de biopsia, tenían sólo una fibrosis leve o ausencia de fibrosis en otra muestra de hígado obtenida simultáneamente. (140) Finalmente la BH sólo ofrece información del estado del hígado en un momento determinado de un proceso muy dinámico y cambiante.

Tabla 3.- La biopsia hepática en el hígado graso no alcohólico.

BIOPSIA HEPÁTICA EN NAFLD	
Ventajas	
<p>Confirmar el diagnóstico</p> <p>Diferenciar entre esteatosis simple y esteatohepatitis</p> <p>Establecer la gravedad de las lesiones (grado, estadio)</p> <p>Descartar enfermedades hepáticas de otra etiología</p> <p>Seleccionar grupos homogéneos de pacientes para estudios terapéuticos</p> <p>Evaluar el resultado de nuevos tratamientos</p>	
Limitaciones	
<p>Coste</p> <p>Morbilidad</p> <p>Proporcionar información puntual de un proceso dinámico</p> <p>Error de muestra</p>	

5.5.2. Clasificación histopatológica

Ha habido varias **definiciones de NASH** desde el punto de vista histológico. *Brunt y cols*, (141) en 1999 propusieron una clasificación semicuantitativa del *índice de actividad histológica de la NAFLD*, que se basaba en la distinción de 4 grados de esteatosis, 3 de actividad necroinflamatoria y 4 estadios de fibrosis, que se puntúan de menos a más dependiendo de la severidad de las lesiones histológicas. (**Tabla 4**)

Tabla 4.- Índice de actividad histológica del NASH propuesto por *Brunt y cols.* (141)

<p>Grado</p> <p>1. Esteatosis macrovesicular</p> <p>Grado 0: No</p> <p>Grado 1: < 33%</p> <p>Grado 2: 33-66%</p> <p>Grado 3: > 66%</p> <p>2. Actividad necroinflamatoria</p> <p>Grado 1 (leve): esteatosis < 66%, algunos hepatocitos balonizados (zona 3), escasos neutrófilos +/- linfocitos (zona 3), inflamación portal mínima o inexistente.</p> <p>Grado 2 (moderada): esteatosis, abundantes hepatocitos balonizados (zona 3), inflamación portal.</p> <p>Grado 3 (intensa): esteatosis pantolobulillar, degeneración balonizante difusa, infiltración difusa por neutrófilos, inflamación portal.</p> <p>Estadio</p> <p>0. Sin fibrosis</p> <p>1. Fibrosis perisinusoidal/pericelular (zona 3).</p> <p>2. Fibrosis perisinusoidal/pericelular (zona 3) y fibrosis portal o periportal</p> <p>3. Fibrosis perisinusoidal/pericelular (zona 3) y fibrosis portal y fibrosis en puentes focal o extensas</p> <p>4. Cirrosis</p>
--

Otros autores, (142) han clasificado la NAFLD en 4 tipos: tipo 1: esteatosis simple; tipo 2: esteatosis + inflamación lobulillar; tipo 3: esteatosis + degeneración balonizante; y tipo 4: esteatosis + degeneración balonizante + hialina de Mallory o fibrosis.

Recientemente *Kleiner y cols.*, (140) proponen un sistema validado de puntuación para el diagnóstico de las lesiones de NAFLD y NASH, que se apoya y redefine el índice ya descrito por *Brunt y cols* (141) en 1999. En particular, el estadio de fibrosis fue subdividido y los grados de esteatosis fueron cambiados. Así, esta reciente clasificación describe 14 características histológicas de las cuales, 4 son evaluadas de forma

semicuantitativa: esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-2), balonización hepatocelular (0-2) y fibrosis (0-4). (**Tabla 5**)

De acuerdo con este sistema, el diagnóstico de esteatohepatitis vendría dado por la suma total de los puntos de cada ítem recogido en la tabla. Así, se considera probado “**diagnóstico de NASH**” cuando existen ≥ 5 puntos, “no diagnóstico de NASH” cuando presenta 0-2 puntos y “bordeline o posible NASH” cuando la puntuación se encuentra entre 3 y 4.

A partir de 2002, el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales patrocinó el desarrollo de un estudio multicéntrico de investigación clínica de cooperación en red para NASH. (**143**) Entre los objetivos de la red estaban: 1.- Formar una base de datos a largo plazo sobre las observaciones en la historia natural de los pacientes con NAFLD; 2.- Recoger muestras clínicas para estudios de inmunología, metabólicos, moleculares y genéticos del NAFLD para definir la etiología de esta enfermedad; 3.- Evaluar terapias prometedoras para NASH, tanto en población adulta como pediátrica. Una de las intenciones de esta red fue desarrollar y validar un sistema de evaluación histológica que abarque todo el espectro de hígado graso no alcohólico, que podría ser aplicado a NAFLD pediátrica, y que permitiría la evaluación de los cambios con la terapia.

Tabla 5.- Índice de actividad histológica del NASH propuesto por Kleiner y cols. (140)

Table 1. NASH Clinical Research Network Scoring System Definitions and Scores in Study Set

Item	Definition	Score/Code	% Responses in Category for Study Set Cases	
			Adult (n = 576)	Pediatric (n = 162)
Steatosis				
Grade	Low- to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis			
	<5%	0	10%	3%
	5%-33%	1	34%	29%
	>33%-66%	2	31%	31%
	>66%	3	26%	36%
Location	Predominant distribution pattern			
	Zone 3	0	31%	14%
	Zone 1	1	1%	12%
	Azonal	2	37%	22%
	Panacinar	3	31%	52%
Microvesicular steatosis*	Contiguous patches			
	Not present	0	90%	96%
	Present	1	10%	4%
Fibrosis				
Stage	None	0	40%	29%
	Perisinusoidal or periportal	1		
	Mild, zone 3, perisinusoidal	1A	15%	4%
	Moderate, zone 3, perisinusoidal	1B	6%	5%
	Portal/periportal	1C	6%	27%
	Perisinusoidal and portal/periportal	2	12%	10%
	Bridging fibrosis	3	15%	17%
	Cirrhosis	4	6%	9%
Inflammation				
Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci			
	No foci	0	14%	15%
	<2 foci per 200× field	1	53%	60%
	2-4 foci per 200× field	2	27%	22%
	>4 foci per 200× field	3	6%	3%
Microgranulomas	Small aggregates of macrophages			
	Absent	0	57%	53%
	Present	1	43%	47%
Large lipogranulomas	Usually in portal areas or adjacent to central veins			
	Absent	0	86%	99%
	Present	1	14%	1%
Portal inflammation	Assessed from low magnification			
	None to minimal	0	67%	67%
	Greater than minimal	1	33%	33%
Liver cell injury				
Ballooning*	None	0	33%	49%
	Few balloon cells	1	38%	36%
	Many cells/prominent ballooning	2	29%	15%
Acidophil bodies	None to rare†	0	89%	90%
	Many	1	11%	10%
Pigmented macrophages	None to rare†	0	87%	82%
	Many	1	13%	18%
Megamitochondria*	None to rare†	0	86%	95%
	Many	1	14%	5%
Other findings				
Mallory's hyaline	Visible on routine stains			
	None to rare†	0	80%	94%
	Many	1	20%	6%
Glycogenated nuclei	Contiguous patches			
	None to rare†	0	57%	71%
	Many	1	43%	29%
Diagnostic classification‡				
	Not steatohepatitis	0	31%	32%
	Possible/borderline	1	26%	33%
	Definite steatohepatitis	2	43%	35%

*Ballooning classification: few indicates rare but definite ballooned hepatocytes as well as case that are diagnostically borderline; examples are shown in Fig. 1. Examples of patches of microvesicular steatosis and megamitochondria are shown in Fig. 2.

†The "None to rare" category is meant to alleviate the need for time-consuming searches for rare examples or deliberation over diagnostically borderline changes. If the feature is identified after a reasonable search, it should be coded as "many."

‡Diagnostic classification was not available on 2 sets of adult biopsy observations, reducing the total of such observations to 512.

Aunque aún hay lagunas de conocimiento importantes en el valor pronóstico de estas clasificaciones histológicas descritas en adultos, es aún más desconocido los criterios diagnósticos de NAFLD en niños, ya que existen estudios publicados en la literatura que describen diferentes formas histológicas de la enfermedad, que supondría un

comportamiento evolutivo y pronóstico distinto al de los adultos. (140, 142, 144, 145) Así, *Schwimmer y cols*, (145) describen dos tipos de NASH en niños; el “tipo 1” que sería indistinguible de la presentada en adultos, consistente en la presencia de esteatosis con degeneración balonzante y/o fibrosis perisinusoidal en ausencia de lesión portal; y el “tipo 2” definido por la presencia de esteatosis simple con inflamación y/o fibrosis portal en ausencia de degeneración balonzante y fibrosis perisinusoidal, siendo este tipo, la forma de presentación más común de NASH en niños. (Tabla 6)

Aunque el “tipo 2” de NASH no es reconocida en adultos, en una revisión cuidadosa de múltiples estudios de NAFLD en adultos sugieren que dicha forma no es exclusiva en niños. (144) En una serie de obesos adultos sometidos a cirugía bariátrica presentaban un 24% de inflamación portal. (146) *Bacon y cols*, (147) describe la presencia de un 63% de inflamación portal y un 6% de fibrosis portal en una serie de obesos mórbidos; y *Dixon y cols*, (148) publica la presencia de fibrosis portal en 27 de 105 pacientes con obesidad mórbida. *Ubiña y cols*, (149) realizó un estudio de la NASH en la población pediátrica diagnosticada mediante métodos radiológicos sin realizar biopsias.

Tabla 6.- Definición de los tipos de NASH en niños.

	Tipo 1			Tipo 2		
Degeneración balonzante	+	+	-	-		
Fibrosis perisinusoidal	-	+	+	-		
Esteatosis	+			+		
Inflamación portal	-			+	+	-
Fibrosis portal	-			-	+	+

5.6. Diagnóstico con marcadores serológicos indirectos

En los últimos años están cobrando importancia la aplicación de fórmulas matemáticas basadas en **combinaciones de variables clínicas fáciles de medir**, para evaluar NAFLD sin necesidad de estudio histológico. Algunas de ellas son *Fatty Liver Index* (FLI), [IMC, circunferencia de cintura, triglicéridos y ácido gamma-glutamyl-transferasa (GGT)], (36) y *Lipid Accumulation Product* (LAP) (circunferencia de la cintura y triglicéridos en ayunas). (37) Estos índices tendrían aplicabilidad en estudios poblacionales de prevalencia de NAFLD, pero hasta ahora sólo se han aplicado a las poblaciones preseleccionadas.

Los niveles de séricos de aminotransferasas y las pruebas de imagen no son fiables para evaluar la esteatohepatitis y la fibrosis en pacientes con NASH. Por lo tanto, ha habido un interés creciente en la utilización de biomarcadores en pacientes con NASH. (150, 151) y también ha habido un gran interés en desarrollar modelos no invasivos predictores de fibrosis avanzada en pacientes con NASH, (150) entre los cuales se incluyen el NAFLD Fibrosis Score y el European Liver Fibrosis Group (ELF) panel. (152)

La *combinación de marcadores serológicos y biomarcadores* en modelos matemáticos ha mejorado la sensibilidad de los test individuales. El *FibroTest* ha sido uno de los primeros modelos para la predicción del grado de fibrosis, que presenta aceptables valores predictivos positivo y negativo. La necesidad de pago para su cálculo y la utilización de marcadores que generalmente no se utilizan en la práctica diaria disminuyen su utilidad. Los *índices de APRI y Forns* comparten la utilización de variables comúnmente utilizadas en la práctica diaria para elaborar sus modelos predictivos pero se han validado para pacientes con hepatitis por VHC. (153) El *índice del European Liver Fibrosis Group (ELF)* valora la combinación de los niveles de ácido hialurónico, PIIINP, TIMP-1 y la edad. La sensibilidad para la detección de fibrosis significativa (> F2-F4) es del 90%, resultados recientemente validados. (154) *Angulo et al* (155) han diseñado y validado otro modelo matemático basado en parámetros sistemáticos de laboratorio y variables clínicas habituales en la práctica clínica. Aplicando este modelo, la biopsia hepática podría evitarse en el 75% de los casos. Este estudio identificó como variables independientes la DM, la edad, el HOMA-IR elevado, el cociente GOT/ GPT elevado, las plaquetas disminuidas, el ácido hialurónico y el IMC. (155) El *NAFLD Fibrosis Score* se basa en seis variables

fácilmente disponibles (edad, IMC, hiperglucemia, recuento de plaquetas, albúmina, cociente AST/ALT) y se calcula mediante la fórmula publicada (**Tabla 7**) (<http://naflscore.com>). **(151)** En un meta-análisis de 13 estudios sobre 3064 pacientes, **(150)** NAFLD Fibrosis Score obtuvo un área bajo la curva ROC de 0,85 para la predicción de fibrosis avanzada (es decir, fibrosis o cirrosis) y un score < -1,455 tenía un 90% de sensibilidad y 60% de especificidad para excluir fibrosis avanzada, mientras que un score > 0,676 tenían 67% sensibilidad y 97% de especificidad para identificar la presencia de fibrosis avanzada. **(155)**

Además de los marcadores que son capaces de detectar la presencia de fibrosis, en los últimos años se han evaluado diferentes **biomarcadores** (solos o agrupados en paneles) útiles para diferenciar entre pacientes con esteatosis hepática simple y, por lo tanto, con escasa capacidad de progresión, de aquellos pacientes con NASH, independientemente de la presencia o ausencia de fibrosis. En este sentido, el análisis de los fragmentos de la *citoqueratina 18* (CK-18), un marcador de apoptosis, ha demostrado una clara utilidad para diferenciar entre los sujetos con esteatosis simple de aquellos con NASH, con una elevada sensibilidad y especificidad. **(156)** Además, la concentración sérica de la CK-18 se correlaciona, de forma moderada, con los cambios histológicos en la actividad del NASH. **(157)** Tanto la *PCR ultrasensible* como la *petraxina 3* ayudan en la diferenciación entre NAFLD y NASH, aunque también se pueden elevar en otras enfermedades caracterizadas por un estado inflamatorio crónico. **(158, 159)**

Tabla 7.- Fórmula de NAFLD score.

$$\text{NAFLD} = -1.675 + 0.037 \times \text{Edad (años)} + 0.094 \times \text{IMC (kg/m}^2\text{)} + 1.13 \times \text{IFG/diabetes}$$

$$\text{(yes = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{plaquetas (}\times 109/\text{l)} - 0.66 \times$$

$$\text{albúmina (g/dl)}$$

$$\text{NAFLD Score} < -1.455 = \text{F0-F2}$$

$$\text{NAFLD Score } -1.455 - 0.675 = \text{indeterminado score}$$

$$\text{NAFLD Score} > 0.675 = \text{F3-F4}$$

También se han analizado diferentes combinaciones de **variables clínicas y analíticas** para el diagnóstico de NAFLD y NASH. Entre ellas destacan el *SteatoTest* y el *Nash-Test* (Biopredictive®). El Nash-Test incluye 13 parámetros (edad, sexo, IMC, colesterol, triglicéridos, GOT, GPT, GGT, bilirrubina, alfa 2 microglobulina, haptoglobina y apolipoproteína A1) que presenta alta especificidad, aunque su sensibilidad es discreta. *Poynard T y cols. (160)* demostraron una elevada concordancia entre el FibroTest y la existencia de fibrosis F3-F4 ($r: 0,82, p < 0,0001$) y una sensibilidad del SteatoTest superior al 90% en pacientes incluidos en un ensayo clínico, lo que pudiera disminuir la necesidad de biopsias incluso en pacientes muy seleccionados. **(160, 161)** Otro modelo, que combina 5 variables (edad > 50; GOT > 45; IMC > 30; relación GOT/GPT > 0,8; ácido hialurónico > 55) predice la presencia de EHNA con elevada fiabilidad siempre que estén presentes 3 o más de estos factores. **(162)** *Shimada y cols. (163)* han desarrollado otro modelo predictivo de NASH en pacientes con esteatosis hepática basándose en la combinación de adiponectina, HOMA-IR y colágeno sérico de tipo IV; quizás el dato más interesante de este estudio es la posibilidad de establecer un diagnóstico precoz, ya que es capaz de detectar a cerca del 90% de los pacientes con NASH. **(163)** En pacientes obesos, un sencillo score clínico (incluyendo HTA, DM tipo 2, SAOS, GOT > 27 UI/l, GPT > 27 UI/l y raza no negra) es capaz de predecir la presencia de NASH en los pacientes obesos con un NAFLD. **(164)**

Una de las principales limitaciones de estos modelos de predicción y biomarcadores es que en gran parte han sido investigados en estudios de corte transversal y por lo tanto su utilidad en el seguimiento de la historia natural de la enfermedad, predecir resultados o la respuesta a la intervención terapéutica es desconocido. **(151)** Además de ello, muchos de estos scores utilizan en su cálculo parámetros no accesibles en práctica clínica habitual.

5.7. Determinación no invasiva de la fibrosis hepática

La fibrosis hepática marca el pronóstico de la enfermedad hepática crónica.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo procedimiento no invasivo de medición indirecta de la fibrosis hepática, la *elastografía transitoria*, que es un método simple y reproducible que permite determinar la elasticidad hepática que sería el marcador del grado de rigidez o fibrosis hepática. *La elastografía de transición (ET) o “elastografía*

por pulso unidimensional” se basa en la medición de la rigidez de un tejido utilizando un pulso de vibración mecánica y una onda de ultrasonidos. El pulso mecánico produce una onda elástica que se transmite a través del tejido. La onda de ultrasonidos mide la velocidad de propagación de la onda elástica. La velocidad de propagación de la onda elástica es proporcional a la rigidez del tejido (más rápida cuanto más duro sea el tejido). El resultado se expresa en unidades de kilopascal (kPa). **(165, 166)**.

En la actualidad el aparato que utiliza la ET para medir la rigidez del hígado se denomina **Fibroscan®** (FS). **(Figura 9)**

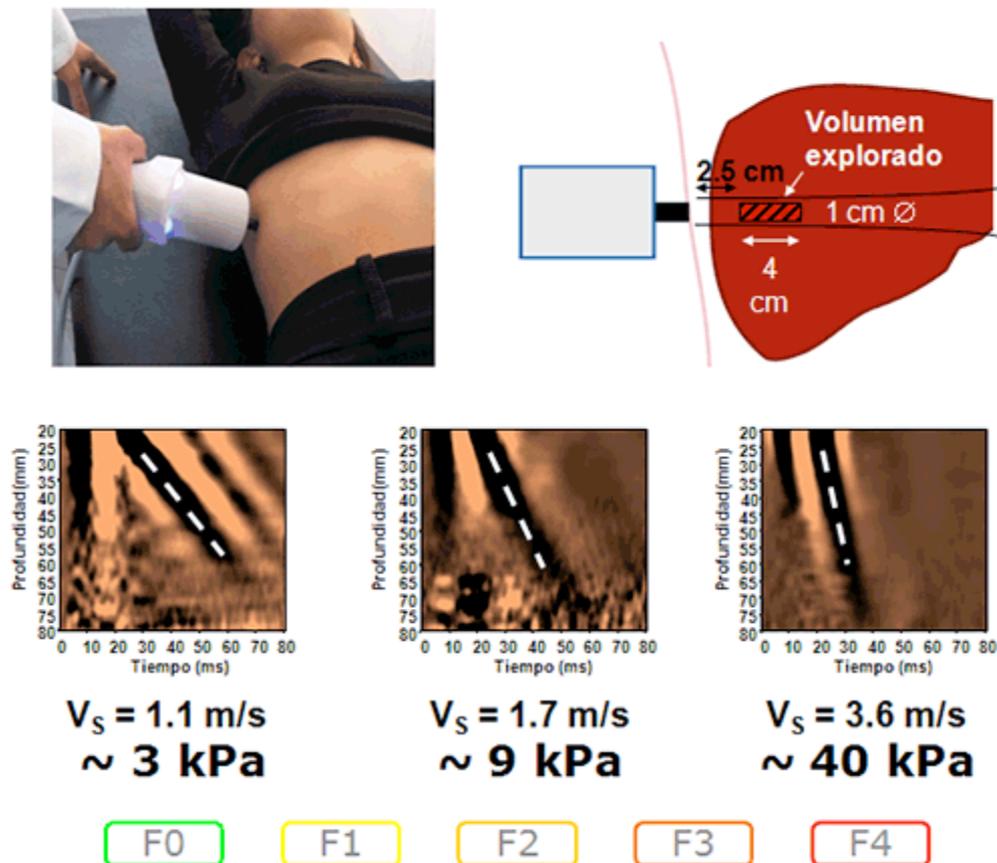
El FS permite conocer la rigidez hepática de manera no invasiva, rápida, fácil y fiable. Sin embargo, el grado de correlación entre diferentes observadores es menor en pacientes con escasa fibrosis, en pacientes con esteatosis o con un elevado índice de masa corporal (IMC). **(167)** Además la ET puede verse influenciada por cualquier proceso que modifique la consistencia del hígado. Podemos observar valores elevados del FS (sin que exista fibrosis) en pacientes con hepatitis aguda **(168)** o crónica **(169)** con mucha inflamación o necrosis lobulillar, en pacientes con estasis biliar secundaria a colestasis extrahepática **(170)** o en pacientes con congestión venosa por fallo cardiaco. **(171)** En estos casos, se puede observar un descenso progresivo de la rigidez hepática coincidiendo con la resolución del problema.

Finalmente la penetración del pulso mecánico-ultrasónico puede estar disminuida o ausente en pacientes con espacios intercostales estrechos y en pacientes obesos o con ascitis. **(166)** En estos pacientes se pueden obtener registros anómalos o ausentes a pesar de realizar múltiples mediciones. La tasa de fracasos utilizando el FS oscila en torno al 4-5% de las exploraciones, siendo el principal factor responsable un IMC elevado. **(172)**

Como ocurre con otros métodos no invasivos, la mayoría de estudios que han evaluado la precisión del FS para identificar fibrosis ($F \geq 2$) y cirrosis (F4) se han realizado en pacientes con hepatitis crónica C. Los primeros estudios con el FS demostraron una excelente relación entre el estadio de fibrosis y la rigidez hepática. *Ziol y cols.* **(173)** evaluaron un total de 251 pacientes, 163 con $F \geq 2$. Los valores de FS (mediana) para pacientes con mínima fibrosis portal (F0-1), fibrosis peri-portal (F2), puentes de fibrosis (F3) y cirrosis (F4) fue de 5.5, 6.6, 10.3 y 30.8 kPas, respectivamente y un valor de $FS \geq 8.7$ kPa identificó al 62% de los pacientes con fibrosis significativa. Un segundo estudio demostró como la fiabilidad del Fibroscan® para identificar fibrosis hepática puede aumentar si se combina con otros métodos no

invasivos. *Castera y cols. (174)* demostraron como la combinación del FS y el Fibrotest (FT) era superior a ambos métodos por separado para identificar pacientes con fibrosis y el 95% de los pacientes con un valor de FS ≥ 7.1 kPa presentaban fibrosis significativa ($F \geq 2$) en la biopsia hepática.

Figura 9.- Elastografía transitoria



Datos preliminares sugieren que el FibroScan también puede ser útil en NAFLD. (175) Sin embargo, falta aclarar algunos aspectos como la posible interferencia del depósito masivo de grasa y la aplicabilidad de esta técnica en pacientes con NAFLD y obesidad mórbida. (176)

Más recientemente se han publicado resultados preliminares que sugieren que la elastografía mediante resonancia magnética sería una buena técnica para determinar la intensidad de la fibrosis hepática. (177) Los estudios efectuados en grupos pequeños de pacientes con enfermedades hepáticas de diferente etiología, incluyendo pacientes con

NAFLD, muestran una buena correlación entre la elasticidad hepática y el grado de fibrosis y que el grado de esteatosis no influye en los resultados. **(178)**

En el año 2010 se realizó un meta-análisis para valorar la elastografía hepática como método no invasivo en NAFLD, donde demostró una sensibilidad y especificidad 0.94 (0.88-0.99) y 0.95 (0.89-0.99), con un AUROC agrupado de 0.94 (0.90-0.99). El Fibroscan ha sido actualmente validado para su uso en NAFLD, y representa una herramienta útil para la valoración no invasiva de fibrosis hepática y evitar la necesidad de biopsia. **(179)** La resonancia magnética como equivalente a la elastografía demostró recientemente una exactitud diagnóstica excelente con sensibilidad y especificidad de 98% y 99% en todos los grados de fibrosis. La elastografía por MR tiene mejores resultados que la elastografía por US, demostrando que la consistencia del hígado no estaba afectada por la esteatosis. **(180-182)**

6. Pronóstico, historia natural

La historia natural de NAFLD no es suficientemente conocida, y el pronóstico hay que enfocarlo desde dos prismas: el del riesgo cardiovascular y el del riesgo de la progresión de la hepatopatía.

Es generalmente aceptado que los pacientes con esteatosis simple tienen una progresión histológica muy lenta, si la hubiera, mientras que los pacientes con NASH pueden presentar una progresión histológica a *cirrosis*, describiéndose también cada vez más casos de *carcinoma hepatocelular*. **(168, 183)**

Los resultados a largo plazo de los pacientes con NAFLD y NASH se han publicado en varios estudios, **(184-192)** resumiéndose en lo siguiente: A) los pacientes con NAFLD tienen un incremento en la mortalidad en comparación con las poblaciones de control, B) la causa más común de muerte en los pacientes con NAFLD y NASH es la enfermedad cardiovascular y C) los pacientes con NASH (pero no NAFLD) tienen un aumento de la tasa de mortalidad relacionada con enfermedad hepática. **(169)**

Otra evidencia indirecta que apoya la naturaleza progresiva de NASH es que los pacientes con *cirrosis criptogénica* tienen una incidencia desproporcionadamente alta de factores de riesgo metabólico (diabetes mellitus tipo 2, obesidad, síndrome metabólico,..) típica de los pacientes con NAFLD, sus biopsias muestran con frecuencia una o más características de NASH, y los estudios demuestran la pérdida de las

características histológicas de NASH cuando hay evolución a cirrosis. **(183, 168, 193, 194)** Los pacientes con NAFLD también presentan un mayor riesgo de hepatocarcinoma, pero este riesgo probablemente se limite a personas con fibrosis avanzada y cirrosis. **(195-200)**

No se conoce bien porque sólo un grupo de pacientes que padecen esteatosis evolucionan a formas más severas (NASH, fibrosis y cirrosis). El curso evolutivo de NASH en fases precoces (esteatosis simple o inflamación sin afectación hepatocelular) es claramente benigno. Sin embargo, en los casos con lesión hepatocelular o fibrosis, la evolución a cirrosis en un plazo de 10 años es relevante (21 y 26%, respectivamente) influyendo con ello en las tasas de supervivencia (aunque no se hallan diferencias significativas en la mortalidad global, sí en la mortalidad relacionada con enfermedades hepáticas). **(2)**

Los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de formas severas de la enfermedad parecen bien definidos en el adulto, y son la edad, sexo femenino, sobrepeso y diabetes mal controlada. **(201)** La obesidad y la diabetes no sólo intervienen en la etiopatogenia, sino que también influyen negativamente en el pronóstico, de forma que la obesidad disminuye la supervivencia e incrementa el riesgo de hepatocarcinoma tanto en la cirrosis criptogénica como en la cirrosis de otro origen **(202)**; y la diabetes aumenta el riesgo de producir formas más graves de NAFLD y de carcinoma hepatocelular en comparación con no diabéticos. **(203)**

La evolución clínica y la progresión histológica del NAFLD pueden ser muy variables. No existe ningún parámetro clínico o analítico que haya demostrado valor pronóstico de la progresión de esta enfermedad. En cualquier caso, son el grado y el estadio histológico de la enfermedad hepática los parámetros que mejor predicen el riesgo evolutivo y la mortalidad de NAFLD. **(204)** En los primeros años del conocimiento de esta entidad se comunicó que los pacientes con una esteatosis hepática simple tenían un curso clínico benigno, **(142, 205, 206)** con mínimas posibilidades de progresar histológicamente en un período de 15 años. Sin embargo se ha descrito que hasta un 3% de estos pacientes pueden desarrollar cirrosis. **(142)** Por el contrario, los pacientes con otras formas histológicas más agresivas, como la esteatohepatitis, presentan un claro potencial hacia la progresión histológica, estimándose que entre el 15-25% de los casos desarrollarán cirrosis en 10 años. **(142, 207)**

Una vez establecida la cirrosis, el 30-40% de los pacientes fallecerán en un período de 1 años **(142)**, siendo la tasa de mortalidad similar **(208)** ó incluso mayor **(202)** a la presentada por cirrosis asociada al virus de la hepatitis C. En *la tabla 9* se resumen los datos de varios estudios de seguimiento que describen la evolución natural de la enfermedad. **(204)** En un estudio realizado sobre una cohorte de 109 obesos daneses **(206)** con esteatosis simple, seguidos durante 17 años, encontraron que tan solo un paciente desarrollo cirrosis durante el seguimiento, siendo dicho paciente el único que falleció por causa hepática. Por el contrario, estudios realizados en pacientes con la enfermedad en estadio de cirrosis, presentaron un peor pronóstico. En esos estudios, el 9-26% de los pacientes murieron a los 4-10 años de seguimiento, siendo la enfermedad hepática la causa de la muerte de los pacientes. **(202, 207, 209)**

Varios estudios y revisiones sistemáticas establecen un *mayor índice de marcadores de riesgo cardiovascular subclínicos* (como el engrosamiento medio intimal carotídeo) en pacientes afectos de NAFLD **(38)** comparando con grupos control, de forma estadísticamente significativa. Muchos otros estudios han establecido una mayor prevalencia de coronariopatía, enfermedad cerebrovascular o vasculopatía periférica en los pacientes afectos de NAFLD frente a controles. En todos aquellos estudios, tanto retrospectivos como prospectivos, en los que la biopsia es el método diagnóstico de NAFLD, se hace hincapié en el enorme riesgo y vigilancia que debiera hacerse en pacientes con NAFLD (esteatohepatitis o cirrosis) con respecto a la enfermedad cardiovascular, ya que ésta es una de las principales causas de muerte en este grupo de pacientes. La mayoría de estos estudios, no obstante, realizan análisis retrospectivos de la historia natural de pacientes en los que se diagnosticó histológicamente NAFLD, por lo que son estudios con un importante sesgo de selección de pacientes procedentes de centros de tercer nivel donde presumiblemente acabarían los pacientes con enfermedades más graves. **(210)**

Recientemente se han publicado dos estudios poblacionales, que comparan la mortalidad hepática presentada en pacientes con NAFLD con respecto a la presentada en la población general. *Adams y cols*, **(211)** incluyen 420 pacientes con NAFLD, encontrando que la tercera causa de muerte en estos pacientes fueron complicaciones relacionadas con el hígado, comparando con la posición decimotercera en la población general. Los pacientes que murieron por dicha causa presentaban estadios más avanzados de NAFLD, como ya se había observado en series más pequeñas. **(206, 208 209, 212)** El segundo estudio **(213)** realizado sobre 129 pacientes con elevación de las

enzimas hepáticas, encontraron una tasa de mortalidad significativamente más alta en este grupo que en la población general, tras realizar un seguimiento de 14 años. De nuevo, las complicaciones hepáticas fueron la tercera causa de muerte en los pacientes con NAFLD, siendo la enfermedad cardiovascular y las enfermedades neoplásicas extrahepáticas la primera y segunda causa de muerte en este grupo de pacientes, respectivamente.

Los pacientes con obesidad mórbida que se someten a cirugía abdominal derivativa, como gastroplastia y derivación intestinal (yeyunoileal o yeyunocólica), desarrollan NASH en el 20-40%. **(38)** Estos pacientes pueden evolucionar hacia una insuficiencia hepática aguda grave de curso fulminante en un 2-8% de los casos. **(210)**

NAFLD y, fundamentalmente, NASH se puede considerar una enfermedad inflamatoria sistémica de bajo grado. Del mismo modo, la aterosclerosis también se considera una enfermedad inflamatoria de bajo grado; una y otra comportan múltiples mecanismos patogénicos. Varios estudios prospectivos que analizan la asociación entre NAFLD y la incidencia de eventos cardiovasculares mayores han demostrado un claro incremento del riesgo de eventos cardiovasculares tanto mortales como no mortales independientemente de otros factores de riesgo vascular clásicos como edad, sexo, perímetro abdominal, HTA, etc. **(214-217)** En la cohorte incluida en el estudio NAHNES III compuesta por 15866 pacientes, de los cuales 2862 presentaban una hepatopatía crónica, se ha demostrado que la DM tipo 2 y la RI eran predictores independientes de mortalidad global y de mortalidad relacionada con la enfermedad hepática en los pacientes con una hepatopatía crónica, no solo por grasa sino también de etiología viral o alcohólica. **(218)** Por otro lado, los escasos trabajos acerca de la historia natural de la enfermedad, demuestran que la principal causa de muerte en estos pacientes es la cardiovascular, pasando la causa de muerte hepática a la tercera en este subgrupo de pacientes. **(219)**

El riesgo de *aterosclerosis acelerada* también depende de otros factores como la disfunción endotelial o la liberación de moléculas inflamatorias proaterogénicas y procoagulantes. La disfunción endotelial es un paso inicial del desarrollo de la aterosclerosis; ésta puede definirse como una capacidad deteriorada de la arteria para dilatarse en respuesta a estímulos físicos y químicos, debido a la reducción de la liberación o a la mayor degradación del óxido nítrico (ON). La disfunción endotelial puede determinarse con facilidad de modo no invasivo valorando la vasodilatación

mediada por flujo después de la oclusión de la arteria braquial, usando ecografía de alta resolución. En NAFLD se ha descrito una disminución de la reactividad de la arteria braquial mediada por flujo, que es más intensa en los pacientes con NASH; **(220)** un incremento del espesor de la íntima-media carotídea directamente proporcional al estadio de la NASH e independiente de los factores de riesgo vascular clásicos, **(221)** un incremento del número de placas tanto calcificadas como no calcificadas en las coronarias **(222-224)** o una disminución diastólica en pacientes con HTA en relación con la severidad de la NASH. Además, se ha documentado una elevación de la concentración plasmática de algunos factores proinflamatorios y proaterogénicos como la PCR ultrasensible, el PAI 1 y el fibrinógeno o una disminución de adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina. **(225)** Estos últimos resultados están ajustados en función de la grasa visceral, lo cual parece indicar que la enfermedad hepática desempeña un factor aterogénico independiente.

Por último, la presencia de NAFLD en otras enfermedades hepáticas como la hepatopatía crónica por VHC, la producida por alcohol y la hemocromatosis, incrementa la severidad y progresión de la enfermedad. **(35)**

Tabla 8.- Estudios publicados sobre el pronóstico de NAFLD.

1 NAFLD incluye a los pacientes con simple esteatosis y a los que presentan esteatohepatitis no alcohólica; 2 La prevalencia de esteatosis incluye a aquellos pacientes que la presentan desde el inicio del estudio como la desarrollada durante el seguimiento.

Autor, año	Diagnóstico ¹	n	Prevalencia Cirrosis % ²	Mortalidad por causa hepática n/%	Mortalidad total n/%
Teli ¹¹⁰ , 1995	Esteatosis	40	0	0	14/35
Dam-Larsen ¹¹¹ 2004	Esteatosis	109	1	1/0,9	27/24,8
Matteoni ¹⁰⁵ , 1999	NAFLD	98	20	9/9	48/49
Adams ¹¹⁷ , 2005	NAFLD	420	5	7/1,7	53/12,6
Ekstedt ¹¹⁸ , 2006	NAFLD	129	7,8	2/1,6	26/20,2
Lee ¹⁵ , 1989	NASH	39	16,3	1/3	10/26
Powell ¹¹² , 1990	NASH	42	7	1/2	2/5
Evans ¹¹⁹ , 2002	NASH	26	4	0	4/15
Hui ¹¹³ , 2003	Cirrosis	23	100	5/21	6/26
Hashimoto ¹¹⁵ , 2005	NASH + fibrosis septal o cirrosis	89	48	6/6,7	8/9
Sanyal ¹¹⁶ , 2006	Cirrosis	152	100	22/14,5	29/19,1

7. Determinantes genéticos

Como hemos comentado anteriormente, en la actualidad nadie duda del papel primordial que juegan los factores ambientales en la patogenia del NAFLD. A pesar de ello, es muy probable que otros factores individuales puedan también intervenir, determinando que la existencia y la gravedad del NAFLD varíe mucho de unos individuos a otros y que sólo una minoría de personas con esteatosis hepática evolucione de forma desfavorable. Por ello, muchos autores se han planteado el papel que pudieran jugar los factores genéticos en la patogenia del NAFLD. A favor de ello, existe evidencia de asociación familiar de NAFLD (226-228) y el hecho de que en algunos países asiáticos (Japón, China, Filipinas, etc.) esta enfermedad sea especialmente frecuente, y que, en los Estados Unidos, NAFLD sea mucho más frecuente en hispanos, nativos americanos y asiáticos, que en caucásicos y afroamericanos. (229, 230)

No se conoce aún cuáles son los genes responsables de esta supuesta predisposición genética, sin embargo, la disponibilidad de nuevas técnicas de análisis genómico está proporcionando datos que nos están ayudando a conocer las bases hereditarias de NAFLD.

Un gen que se ha implicado ha sido el de la **adiponeutrina**, conocido internacionalmente como *Patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) que es una glicerol lipasa que media en la hidrólisis de triglicéridos en los adipocitos. (231) Recientemente *Kumari y cols.* (232) describe nuevos aspectos sobre la regulación del gen de PNPLA3 y definiendo polimorfismos como el I148M que promueve un aumento de la síntesis lipídica hepática debido a un aumento de su función, y que esto proporciona un mecanismo plausible para el desarrollo bioquímico de esteatosis hepática en sujetos con la variante 148M (rs 738409, alelo G). Este efecto se ha demostrado en diversos estudios in vitro. (233, 234)

La cuestión de si el papel del polimorfismo G de rs738409 en la patobiología de NAFLD se asocia a una ganancia o pérdida de la función es difícil de responder, ya que la función biológica atribuida a la PNPLA3 en las vías relacionadas con los lípidos se comparte con otras proteínas relacionadas. Por ejemplo, la supuesta interacción entre PNPLA3 y glicerol 3-fosfato aciltransferasa-2 (GPAT2 mitocondrial), que juega un papel esencial en la biosíntesis de glicerolípidos. (235) PNPLA3 y GPAT2 están

involucrados en vías metabólicas comunes, incluyendo la biosíntesis de triglicéridos, el metabolismo de glicerolípidos y la actividad aciltransferasa, que pueden explicar una interacción en la patogénesis de NAFLD. Esta predicción es biológicamente plausible ya que GPAT2 cataliza el paso inicial y es limitante de la velocidad de síntesis de glicerolípidos, y la sobreexpresión de la misma en distintos estudios sugieren que las isoformas de GPAT pueden jugar un papel importante en el desarrollo de esteatosis hepática, resistencia a la insulina y la obesidad. (236)

Sookoian y cols (237) demostraron que el alelo G de rs738409 también se asoció significativamente con la gravedad de la enfermedad histológica, un hallazgo que fue reproducido en otros estudios. (238-240) De hecho, el alelo G aumenta significativamente el riesgo de enfermedad hepática progresiva. (237, 241) Este efecto es quizás uno de los más fuerte jamás registrado por una variante común de modificación de la susceptibilidad genética para una enfermedad compleja. Por otra parte, la variante rs738409 no sólo modifica la biología de NAFLD, sino que también tiene un considerable impacto en la susceptibilidad genética de la enfermedad hepática alcohólica (242-244) y el hígado graso inducido por el virus de la hepatitis C, (240) y es un fuerte predictor de carcinoma hepatocelular concurrente entre los pacientes con cirrosis, (245, 246) lo que indica que estas diversas hepatopatía pueden compartir fisiopatología común.

Sookoian y cols (231) sugieren que la interrupción de la unión de los genes miARN objetivo por los alelos rs738409 pueden desempeñar un papel en el efecto de la variante del gen de susceptibilidad a NAFLD.

8. Tratamiento

Las estrategias terapéuticas frente a esta enfermedad, debido a la estrecha relación patogénica existente entre NAFLD, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina, van encaminadas a identificar dichos factores de riesgo (sobrepeso u obesidad, diabetes, hiperlipemia, hipertensión y/o hiperuricemia) y efectuar un adecuado tratamiento de estas enfermedades asociadas. (247)

Como los pacientes con NAFLD sin esteatohepatitis tienen excelente pronóstico desde un punto de vista hepático, los tratamientos dirigidos a la mejora de la enfermedad hepática se deben limitar a las personas con NASH. En el momento actual no hay ningún tratamiento reconocido para NASH, siendo el único tratamiento que está consensuado son los cambios higiénico-dietéticos. Un reciente metaanálisis (248) recoge los principales estudios sobre el tratamiento de NASH.

8.1. Estilo de vida

Los cambios en el estilo de vida incluyen tanto la dieta destinada a perder peso como el ejercicio físico, también orientado para perder peso. Hay muchos estudios iniciales que avalaron el efecto beneficioso de estos cambios en NAFLD. (249-270) En un metaanálisis de las primeras series que abarcan entre 1967 y 2000, la mayoría de los estudios informaron de reducciones en las transaminasas y en la esteatosis hepática (determinado por ultrasonido), registrando un amplio espectro de dietas de diferente intensidad de restricción calórica y de composición de macronutrientes (baja en hidratos de carbono vs alta, baja vs alta ricas en grasas, grasas saturadas vs insaturadas). (271) Sin embargo, los primeros de estos estudios no fueron concluyentes por tener una metodología insuficiente (pequeños tamaños de muestra, ausencia de grupo control), y muy pocos utilizan la biopsia hepática como el criterio principal de valoración. Más recientemente estudios no controlados han mostrado una mejora en las transaminasas y en la histología hepática con la modificación en el estilo de vida. (272-274)

Influencia en NASH:

Hasta el momento, la mejor demostración de cómo la pérdida de peso mejora la lesión hepática en NASH proviene de un ensayo que aleatoriza a 31 personas obesas con NASH, o bien a un intenso cambio del estilo de vida (dieta, modificación del comportamiento y 200 minutos semanales de ejercicio físico moderado durante 48 semanas) o un régimen de recomendaciones básicas solamente. (275) El brazo

experimental alcanzó una pérdida de peso de 9,3% (frente al 0,2% en el brazo control) apreciando una mejora en la esteatosis, necrosis e inflamación, pero no la fibrosis. Es importante destacar que los participantes con $\geq 7\%$ de pérdida de peso tuvieron una mejoría significativa de la esteatosis, inflamación lobulillar, balonización y en el NAFLD Activity Score (NAS). (275) Hallazgos muy similares encontraron *Harrison y cols.*, (276) en un estudio donde los participantes que perdieron $> 5\%$ de peso corporal, mejorando la esteatosis, mientras que los individuos con $\geq 9\%$ de pérdida de peso tenía una importante mejora de la esteatosis, inflamación lobulillar, balonización y NAS.

Promrat y cols. realizaron un ensayo clínico aleatorizado en pacientes con sobrepeso, realizando un programa de intervención en el estilo de vida. (275) Se produjo una mejora en la esteatosis y en la actividad necroinflamatoria, desapareciendo los criterios de NASH en el 67% de los participantes (en comparación con el 20% de los controles, alcanzando significación estadística). Sólo los pacientes que perdieron un 7% o más del peso corporal mejoraron significativamente la actividad histológica de la enfermedad, mientras que el resto de pacientes mostraron cambios no significativos en comparación con los controles.

También se ha explorado el efecto de las medidas dietéticas en población pediátrica. Un estudio realizado en pacientes pediátricos comparando la intervención en el estilo de vida sólo o con antioxidantes (vitaminas E y C) (277) observó que la esteatosis, la inflamación lobulillar, la balonización y NAS mejoraron significativamente en ambos brazos del estudio, y el NASH se resolvió en el 71% y 92%, respectivamente ($p = 0,27$).

Otro ensayo clínico que evaluó la intervención en el estilo de vida, solo o con Orlistat (un inhibidor de la lipasa intestinal) (278) observó que en ambos brazos del estudio se mejora de manera significativa la esteatosis, necroinflamación y NAS. Los pacientes que perdieron un 5% o más del peso mejoraron esteatosis, RI y glucemia, mientras que en los que perdieron el 9% o más del peso también mejoraron la necroinflamación y NAS.

Influencia en NAFLD:

Un número de recientes estudios han utilizado la espectroscopia por RNM para evaluar los cambios en la grasa hepática en respuesta al cambio del estilo de vida. Los resultados de estos estudios que utilizan una variedad de intervenciones, ya sea por la dieta sólo (257, 259, 260, 265, 268, 269) o en combinación con diferentes prescripciones de ejercicio (258, 261-264, 268, 270) tienen consistentemente una reducción significativa en la grasa del hígado por un promedio del 40% (desde el 20%

al 81%). El grado de reducción de la grasa hepática era proporcional a la intensidad de la intervención del estilo de vida y requiere por lo general una pérdida de peso corporal entre el 5% al 10%. **(258, 264, 268)**

El efecto del ejercicio, sin modificación de la dieta en la esteatosis hepática se ha investigado en cuatro estudios con espectroscopia por RNM. **(279-282)** Los programas de ejercicio consistieron en 2-3 sesiones semanales de 30-60 minutos en un período de 6 a 12 semanas. En todos menos en un estudio **(278)** el contenido de grasa hepática disminuyó sin un cambio significativo en el peso corporal.

Las indicaciones de la composición de nutrientes en la dieta óptima para NAFLD son escasas, y derivados principalmente de un análisis comparativo de los estudios observacionales. Un estudio en pacientes con NAFLD obesos intolerantes a la glucosa, comparó la restricción calórica con dieta baja en carbohidratos y dieta isocalórica alta en carbohidratos, observándose pérdida de peso, reducción de grasa hepática e intraabdominal comparables, pero la sensibilidad a la insulina fue casi tres veces mayor que en la isocalórica. **(268)** Este ensayo clínico sugiere que la restricción calórica es la meta más importante para mejorar la esteatosis hepática en la EHNA, pero que la restricción de carbohidratos pueden ser beneficiosa para mejorar el metabolismo de la glucosa en los pacientes con intolerancia a la glucosa.

8.2. Fármacos

Debemos diferenciar dos tipos de fármacos para el tratamiento del NASH, aquellos con capacidad para incrementar la sensibilidad a la insulina y aquellos fármacos hepatoprotectores y antioxidantes. Debido a las implicaciones que tiene la resistencia a la insulina en NAFLD, es lógico que ésta sea una de las dianas terapéuticas estudiadas.

8.2.1. Metformina

La metformina es el fármaco de elección en pacientes obesos con diabetes mellitus tipo 2. Su acción es mejorar la insulinoresistencia e hiperinsulinemia disminuyendo la producción de glucosa en el hígado e incrementando la utilización periférica de la glucosa en el músculo. Uno de los mecanismos de acción de la metformina en el hepatocito, es bloquear la acción del TNF- α . El TNF- α inhibe la transmisión de la señal del receptor de la insulina en los hepatocitos, favoreciendo la insulinoresistencia. **(283)**

En diversos estudios se ha investigado el efecto de la metformina en las transaminasas y en la histología hepática en pacientes con NASH. Los primeros estudios demostraron una reducción en la resistencia a la insulina y los niveles de transaminasas, **(284-287)** pero sin ninguna mejoría significativa en la histología hepática. **(285, 286)** Un ensayo clínico abierto que incluyó a 110 pacientes con NASH recibieron metformina 2 gramos/día (55 pacientes), vitamina E 800 UI/ día (28 pacientes) o dieta para inducir pérdida de peso (27 pacientes) durante 12 meses. **(288)** Las transaminasas mejoraron más con metformina que con vitamina E o con dieta sólo. Sin embargo, hubo sólo una mejora modesta en la esteatosis hepática y en la inflamación en el subgrupo de 17 pacientes sometidos a biopsia hepática del grupo con tratamiento con metformina.

Ensayos en NASH:

Un reciente metaanálisis **(187)** concluye que 6-12 meses de metformina más cambios del estilo de vida no mejoró las aminotransferasas o la histología hepática, en comparación con cambios en el estilo de vida solo, independientemente de la dosis y/o duración del tratamiento o la presencia de diabetes. **(287, 289, 290)**

Ensayos en NAFLD:

Dos ensayos clínicos (114 participantes), evaluaron el efecto de la metformina en índices radiológicos y bioquímicos del NAFLD. **(291, 292)** En uno de ellos, la metformina normalizó las transaminasas en el 69% frente al 31% del grupo de dieta ($p=0,003$). En el otro estudio, la mejoría bioquímica y radiológica fue significativa en comparación con la dieta más ejercicio.

En general, cuando se añade a la metformina el cambio en el estilo de vida, metformina produce mayor pérdida de peso (4,3%-7,3%) y la sensibilidad a la insulina y los niveles plasmáticos de glucosa (los últimos efectos fueron más consistentes en pacientes diabéticos y pacientes con sobrepeso la pérdida de peso). **(289-292)** Sin embargo, los cambios que la metformina provoca en la actividad necroinflamatoria hepática no son lo bastante sólidos como para recomendar su uso en pacientes con NASH.

8.2.2. Tiazolindionas

Las tiazolindionas (TZDs) activan al receptor γ activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- γ), incrementando la utilización periférica de la glucosa. En pacientes adultos se han probado la rosiglitazona y la pioglitazona, demostrándose que

la rosiglitazona es capaz de disminuir e incluso normalizar las concentraciones de transaminasas en pacientes con NASH (muchos de ellos no diabéticos), además de que se ha demostrado una disminución en la actividad necroinflamatoria histológica. **(247)** La pioglitazona, en dosis de 30 mg/ día durante 48 semanas en pacientes con diagnóstico histológico de NASH también redujo los niveles de esteatosis y de fibrosis al final del seguimiento. **(284)** Ambos fármacos han sido utilizados como tratamiento en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, hasta que se notificaron casos de muerte cardiovascular asociada a la toma de rosiglitazona. **(293)**

Ensayos en NASH:

Distintos ensayos clínicos han evaluado el efecto de 6 a 24 meses de pioglitazona (cuatro ensayos) o rosiglitazona (un ensayo) sobre la histología hepática en NASH. **(247, 294-298)** Los resultados combinados de los ensayos clínicos mostró que las TZDs mejoran la esteatosis y la inflamación histológica, pero no la fibrosis. La presencia de diabetes, la aplicación de intervención en estilo de vida, la dosis diferente del fármaco o la duración del ensayo no afectó a los resultados.

TZDs mejoran la resistencia insulínica hepática, muscular y en tejido adiposo, **(294, 295, 299)** y reducen la glucosa plasmática y la hemoglobina glicosilada en pacientes intolerantes a la glucosa. **(295-297)** Pioglitazona reduce los triglicéridos plasmáticos en pacientes intolerantes a la glucosa, pero rosiglitazona empeora los niveles de colesterol total y colesterol-LDL. **(297)** Sólo un estudio ha informado sobre el impacto de las TZDs en la presión arterial con efectos significativos. **(296)**

El estudio *FLIRT-1 (Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy)* exploró factores predictivos de respuesta y encontró que la ausencia de diabetes, un mayor nivel basal de adiponectina sérica y esteatosis grave predijo mayor respuesta histológica. **(297)**

El efecto de la terapia prolongada con TZD se desconoce, porque la mayoría de los ensayos clínicos duraron 12 meses o menos. En el estudio *FLIRT-2*, pacientes que completaron FLIRT se les mantuvo rosiglitazona durante 2 años adicionales: a pesar de una continua mejora en la sensibilidad a la insulina y los niveles de transaminasas, la rosiglitazona no logró mejorar aún más la histología hepática. **(300)**

Sanyas y cols. **(301)** compararon Pioglitazona vs Vitamina E vs Placebo para el tratamiento de NASH en pacientes no diabéticos, asignaron al azar 247 pacientes con NASH y sin diabetes para recibir pioglitazona, vitamina E o placebo, durante 96 semanas (se implementó la intervención en el estilo de vida en todos los brazos). La

vitamina E, en comparación con el placebo, se asoció con una tasa significativamente mayor de mejora de NASH (43% vs 19%, $p=0,001$), pero la diferencia en la tasa de mejora con pioglitazona en comparación con el placebo no alcanzó la tasa de respuesta requerida de 0.025 para este estudio (34% vs 19%, respectivamente, $p=0,04$). Los niveles séricos de transaminasas se redujeron con la vitamina E y con pioglitazona, en comparación con placebo ($p<0,001$ para ambas comparaciones), y los dos agentes se asociaron con reducciones en la esteatosis hepática ($p=0,005$ para la vitamina E y $p<0,001$ para pioglitazona) y la inflamación lobular ($p=0,02$ para la vitamina E y $p=0,004$ para pioglitazona), pero no con la mejora en las puntuaciones de fibrosis ($p=0,24$ para la vitamina E y $p=0,12$ para la pioglitazona). Los sujetos que recibieron pioglitazona ganaron más peso que los que recibieron vitamina E o placebo. **(301)**

Estos estudios sugieren que la terapia a largo plazo con TZDs es necesaria para una mejoría histológica sustancial, pero no ofrecen ningún beneficio histológico adicional en la fibrosis. Además, la mejora en la sensibilidad a la insulina puede no ser suficiente para la mejora de la lesión hepática, y otros enfoques terapéuticos podrían garantizar un control duradero de la actividad de la enfermedad en NASH.

8.2.3. Sensibilizadores de la insulina: Tiazolindionas vs Metformina o vs una Combinación de fármacos

Ensayos en NASH:

Dos estudios compararon la combinación de rosiglitazona más metformina frente a cada agente por separado en NASH. **(302, 303)** Después de 1 año, la esteatosis y la necroinflamación mejoró significativamente con rosiglitazona, pero no con la metformina, la combinación de ambos mejoró la pérdida de peso pero no confirió ningún beneficio adicional sobre la histología hepática y el metabolismo de la glucosa.

Ensayos en NAFLD:

En un pequeño ensayo clínico en pacientes diabéticos con NAFLD, rosiglitazona redujo la grasa hepática por siete veces en comparación con la metformina ($p=0,003$), un efecto estrechamente correlacionado con el aumento de los niveles de adiponectina. Ambos fármacos mejoraron la sensibilidad hepática a la insulina, mientras que la sensibilidad periférica a la insulina aumentó sólo con rosiglitazona. **(304)**

8.2.4. Antioxidantes

El papel patogénico propuesto del estrés oxidativo en NAFLD/ NASH impulsó la evaluación de diferentes antioxidantes, como las vitaminas C y E, los donantes de metilo (betaína) destinados a la restauración de depósitos de glutatión hepático, la silimarina y silibina, eliminadores de radicales libres con actividad antifibrótica y Viusid, un suplemento nutricional con molécula antioxidantes diferentes. (247)

Ensayos en NASH:

Ocho ensayos clínicos han evaluado los antioxidantes en NASH, no encontrando en general ningún beneficio significativo en las enzimas hepáticas (277, 305-310)

Los resultados combinados de los mismos no mostraron ningún efecto beneficioso sobre la histología hepática. Sin embargo, comparar estos ensayos entre sí es difícil debido a la variabilidad de criterios para la entrada en el estudio, diferentes dosis y formulaciones de antioxidantes utilizadas que podrían afectar a su biodisponibilidad, el uso adicional de otros antioxidantes u otras drogas, la duración del tratamiento, y además de la intervención en el estilo de vida. y los limitados datos histológicos para evaluar los resultados. A pesar de estas limitaciones se puede concluir que: 1) el uso de vitamina E se asocia con una disminución de las transaminasas en sujetos con NASH, 2) estudios histológicos para evaluar resultados indican que la vitamina E provoca una mejora en la esteatosis, inflamación, balonización y resolución de la esteatohepatitis en pacientes adultos con NASH, y 3) la vitamina E no tiene efecto sobre la fibrosis hepática. La heterogeneidad se explica en su totalidad por dos estudios controlados con placebo con resultados positivos: en el estudio *Dufour*, (305) 2 años de ácido ursodeoxicólico + Vitamina E mejoran significativamente la esteatosis histológica en comparación con doble placebo. En el estudio de *Sanyal y cols.*, (301) la pioglitazona frente vitamina E frente placebo en pacientes no diabéticos con NASH, la vitamina E mejoró la esteatosis, balonización y la inflamación y revirtió la esteatohepatitis en la mitad de los pacientes, frente al 25% con placebo. El punto final primario fue alcanzado en 43% de pacientes con vitamina E frente al 34% de los pacientes con pioglitazona y el 19% de los pacientes tratados con placebo.

Ensayos en NAFLD:

Cuatro estudios evaluaron los antioxidantes en NAFLD. (291, 311-313) El análisis agrupado de los ensayos clínicos mostraron una mejoría significativa de los niveles de ALT con vitamina E; betaína y silibina mejoraron también significativamente la

esteatosis ecográfica. En el ensayo que evaluó Viusid más intervención en estilo de vida, (313) ambos brazos perdió 11% del peso corporal y mejoró la esteatosis y NAS en comparación con el valor inicial, pero la mejoría histológica fue más consistente con Viusid. No se observó efecto metabólico significativo.

La extrema heterogeneidad de los ensayos clínicos impide cualquier conclusión firme acerca del efecto de los antioxidantes en NAFLD/ NASH. Si el beneficio de la vitamina E puede aparecer después de 2 ó más años de tratamiento (314, 305) o puede ser potenciado por la pérdida de peso (313) requiere confirmación. La seguridad a largo plazo de la vitamina E es también un problema, ya que la dosis de 400 UI/ día o superior se han asociado con un aumento de todas las causas de mortalidad. (315)

8.2.5. Ácido ursodeoxicólico (AUDC)

El AUDC tiene un efecto estabilizante de la membrana hepatocitaria, antiapoptótico y disminuye la expresión de moléculas de HLA de tipo II (inmunomodulador).

Ensayos en NASH:

Los resultados agrupados de tres estudios reveló marginalmente una ventaja significativa del AUDC en las transaminasas, el efecto se explica totalmente en un estudio con AUDC a altas dosis. (305, 316, 317) Dos de estos estudios evaluaron post-tratamiento la histología, al no encontrar beneficio sobre el placebo, pero el efecto de las dosis altas de AUDC sobre la histología hepática es desconocida.

Ensayos en NAFLD:

Tres estudios con AUDC durante 1,5 a 6 meses no mejoró significativamente los niveles de ALT ni la esteatosis radiológica. (311, 317, 318)

En general, no se observó ningún beneficio en parámetros metabólicos con AUDC.

8.2.6. Hipolipemiantes

8.2.6.1. Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 (PUFA)

Los ácidos grasos Omega-3, en la actualidad aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, se han investigado para tratar la esteatosis hepática no alcohólica, tanto en modelos animales como en humanos. (319) Una revisión reciente de *Masterton et al.*, (320) de la literatura publicada relacionada con el uso de ácidos Omega-3 en hígado graso no alcohólico, encontró evidencia experimental

para apoyar su uso, pero la interpretación de estudios en seres humanos fue limitada por el tamaño de la muestra y los defectos metodológicos.

8.2.6.2. Fibratos

Distintos ensayos clínicos en NASH han demostrado que los fibratos no tenían ningún beneficio significativo en las respuestas histológicas, bioquímicas o radiológicas. **(321)**

8.2.6.3. Estatinas

Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las estatinas, la coexistencia frecuente del hígado graso no alcohólico y la dislipemia, y el aumento del riesgo vascular de estos pacientes hace de las estatinas una atractiva herramienta terapéutica en NAFLD. A pesar de estas premisas, los datos sobre la eficacia de las estatinas en NAFLD son escasos debido al temor de la hepatotoxicidad de estas drogas. Un metaanálisis de *De Denus y cols.* **(322)** no mostraron aumento de las enzimas hepáticas con estatinas. Además, los pacientes con esteatosis hepática no parecen tener un riesgo mayor de hepatotoxicidad con estatinas. **(323)** Sobre esta base, el panel de expertos del hígado indica que las estatinas pueden ser utilizadas de manera segura en los pacientes con hígado graso no alcohólico y el control de enzimas hepáticas de rutina no está justificado en esta población. **(324)**

Ensayos en NASH:

En un pequeño ensayo clínico, el tratamiento con simvastatina de 1 año fue seguro pero no mejoró la histología hepática. **(325)**

Ensayos en NAFLD:

Athyros y cols. **(326)** realizaron un estudio comparando cambios en estilo de vida más atorvastatina, fenofibrato, o una combinación de ambos. A pesar de la pérdida de peso constante en todos los grupos, la regresión bioquímica y ecográfica de NAFLD fue significativamente mayor con atorvastatina, sola o en combinación, que con fenofibrato. Con respecto a los efectos de las estatinas sobre la histología hepática, **(327)** a pesar de un perfil de riesgo más alto para la progresión de la enfermedad hepática, los pacientes con esteatosis hepática mejoran y la progresión de la fibrosis disminuyó en comparación con los controles.

8.2.6.4. Probuco

El probuco es un fármaco hipolipemiante lipofílico con una fuerte actividad antioxidante.

Ensayos en NAFLD:

En un pequeño estudio el uso de probuco mejoró significativamente las transaminasas en pacientes con NAFLD. (328) Aunque en general es bien tolerado, probuco redujo significativamente los niveles de LDL-colesterol, levantando la preocupación en los pacientes con alto riesgo cardiovascular.

8.2.7. Otros fármacos

8.2.7.1. Agentes anti-TNF α (Pentoxifilina)

Pequeños estudios en NASH de Pentoxifilina controlados con placebo, mejoraron los niveles de ALT. (329-330) Un ensayo clínico de 12 meses con pentoxifilina mejoró significativamente la balonización hepática y NAS, y disminuye la expresión genética hepática de Bip (un indicador de estrés del retículo endoplasmático).

8.2.7.2. Fármacos antihipertensivos

Geogerscu y cols. (332) realizaron un estudio en pacientes hipertensos con NASH, comparando valsartán o telmisartán (un inhibidor del receptor de angiotensina con actividad moduladora del PPAR- γ). Telmisartán produjo mejora significativa sobre la balonización, inflamación lobular y la fibrosis hepática, disminución de resistencia a la insulina y TG y colesterol plasmáticos. Ambos tuvieron el mismo efecto sobre la bajada de la presión arterial.

8.3. Cirugía bariátrica

Como la mayoría de pacientes sometidos a cirugía bariátrica tienen una enfermedad asociada a hígado graso, ha habido un interés de las técnicas malabsortivas como un potencial opción de tratamiento para NASH. No hay ensayos clínicos controlados y aleatorizados que evalúen cualquier tipo de cirugía bariátrica malabsortiva para tratar específicamente la NAFLD o el NASH. Sin embargo, hay varios estudios retrospectivos y prospectivos que compararon la histología hepática en individuos obesos antes y después de la cirugía bariátrica. Desafortunadamente, en la mayoría de estos estudios,

post-bypass las biopsias hepáticas se realizaron a intervalos variables y sólo en pacientes seleccionados sometidos a cirugías como reparación de hernia o adherencias.

Una excepción es el estudio de *Mathurin et al.*, (333) que prospectivamente correlacionaron los datos clínicos y metabólicos con la histología hepática antes y después de 1 y 5 años de la cirugía bariátrica en 381 pacientes adultos con obesidad severa. Comparado al valor basal, hubo una mejoría significativa en la prevalencia y severidad de esteatosis y la inflamación a 1 y 5 años después de la cirugía bariátrica. La mayoría de los beneficios histológicos fueron evidentes en un año, sin diferencias histológicas entre 1 y 5 años.

El meta-análisis de *Mummadi et al.*, (334) mostró que la esteatosis, esteatohepatitis y la fibrosis parecen mejorar o desaparecer por completo después de la cirugía bariátrica. Sin embargo, una revisión de la Cochrane recientemente publicada (335) llegó a la conclusión que la falta de ensayos clínicos aleatorizados impide una evaluación definitiva de los riesgos y beneficios de la cirugía bariátrica como aproximación terapéutica para los pacientes con NASH.

Capítulo II:

Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis

El **síndrome metabólico** (SM) y, sobre todo, cualquiera de los rasgos del mismo son muy frecuentes. La **EHDG** o **NAFLD** es una enfermedad relacionada con el SM, bien caracterizada en el adulto, con distribución universal, con una prevalencia variable entre países en torno al 10-24%, pero que se puede incrementar cuando se busca en poblaciones seleccionadas (69% en obesidad mórbida). **(10)** Las transaminasas no predicen el riesgo y/o grado de hepatopatía en estos pacientes.

Hipotetizamos que pacientes con rasgos de SM y transaminasas normales pueden tener algún grado de EHDG o NAFLD, y dentro de este grupo podríamos identificar a un subgrupo de pacientes con formas más severas de EHNA o NASH.

Como consecuencia de todo lo citado nos planteamos como objetivos a investigar en este trabajo los siguientes:

2. Objetivo principal

- Determinar la prevalencia de esteatohepatitis no alcohólica definida por criterios histopatológicos, en población adulta mayor de 40 años con rasgos de síndrome metabólico y sin sospecha clínico-analítica de hepatopatía previa conocida, que vayan a ser sometidos a cirugía abdominal programada.

3. Objetivos secundarios

- Describir que rasgos de síndrome metabólico se asocian a mayor riesgo de NASH.
- Valorar si hay relación entre la duración de los distintos rasgos de SM y el daño hepático
- Determinar que rasgos o parámetros se asocian con un mayor daño hepático.
- Comparar si hay correlación entre la medición de fibrosis hepática por estudio histopatológico (Gold-estándar) y el NAFLD Fibrosis Score.

Capítulo III:

Material y Método

1. Diseño del estudio

Estudio de prevalencia de corte transversal.

1.1. **Ámbito y sujetos del estudio**

El ámbito de estudio fue el área sanitaria de la Costa del Sol Occidental. Los sujetos a estudio fueron reclutados de dos ámbitos asistenciales:

- Consultas externas hospitalarias y ambulatorias de Aparato Digestivo y/o Cirugía General y Digestiva de las zonas de influencia de la Agencia Sanitaria Costa del Sol (Marbella) y de la zonas de influencia del Hospital Quirón Marbella.
- Planta de hospitalización de Aparato Digestivo y/o Cirugía General y Digestiva de la Agencia Sanitaria Costa del Sol (Marbella) y del Hospital Quirón Marbella (Marbella).

1.2. Criterios de inclusión

La población de estudio fueron adultos con edades superiores a 40 años que fuesen a ser sometidos a cirugía abdominal programada, de ambos sexos, con algún o algunos rasgos de síndrome metabólico y por tanto con diagnóstico de hipertensión arterial, y/o dislipemia, y/o diabetes mellitus, y/u obesidad y/o hiperuricemia.

Se definieron los rasgos de síndrome metabólico mediante los criterios de la ATP-III propuesta en 2005 por la American Heart Association y por el National Heart, Lung, and Blood Institute, siendo los siguientes:

- Obesidad abdominal, aumento del perímetro de la cintura > 102 cm en hombres ó 88 cm en mujeres.
- Elevación de los Triglicéridos > 150 mg/ dL (1,7 mmol/l), o tratamiento farmacológico por elevación de los triglicéridos.
- Disminución del c-HDL < 40 mg/ dL (0,9 mmol/l) en hombres o 50 mg/ dL (1,1 mmol/l) en mujeres, o tratamiento farmacológico para disminuir las concentraciones de c-HDL.
- Elevación de la presión arterial: 130 mmHg la sistólica y 85 mmHg la diastólica, o bien tratamiento medicamentoso de la hipertensión.
- Elevación de la glucemia en ayunas: 100 mg/ dl o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia.

1.3. Criterios de exclusión

- Adultos con daño hepático conocido previamente a la inclusión en el estudio.
- Adultos con una patología conocida previamente que justifique por si misma una alteración hepática (por ejemplo una hepatopatía vírica, autoinmune, metabólica, enfermedad congénita, patologías reumáticas), consumo de fármacos o alcohol, etc.
- Negativa a autorización del paciente a entrar en el estudio.

- Consumo de alcohol > 40 grs/ día en hombres y > 20 grs/ día en mujeres, en los últimos 10 años. (169)

1.4. Tamaño muestral

Dado que la población candidata a nuestro estudio eran pacientes que no presentaban hepatopatía previa conocida y el interés del estudio era establecer la prevalencia de esteatohepatitis no alcohólica en pacientes que presentaran rasgos de síndrome metabólico, siendo esta prevalencia desconocida, no se consideró necesaria la estimación de tamaño muestral.

1.5. Tiempo

El estudio se realiza sobre las unidades de estudio descritas a fecha de enero de 2007. Los datos correspondientes a las variables de estudio se recogieron desde junio de 2007 a marzo de 2012.

2. Variables de estudio

2.1. Variable principal o dependiente:

Esteatohepatitis no alcohólica ó Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)

Se trata de una variable cualitativa dicotómica (si/no), que quedará definida por criterios histopatológicos (biopsia hepática laparoscópica). El estudio anatomopatológico se realizará en base al sistema de puntuación definida por el NASH Clinical Research Network. (Tabla 9) (140)

Tabla 9.- Sistema de puntuación definida por el NASH Clinical Research Network.

DATOS HISTOLÓGICOS		PUNTUACIÓN
Grado de esteatosis:	< 5%	0
	5% - 33%	1
	33% - 66%	2
	> 66%	3
Esteatosis microvesicular*:	Ausencia	0
	Presencia	1
Estadio de fibrosis hepática:	No fibrosis	0
	Perisinusoidal o Periportal	1
	Leve- Zona 3- Perisinusoidal	1A
	Moderada- Zona 3- Perisinusoidal	1B
	Portal/ Periportal	1C
	Perisinusoidal y portal/ Periportal	2
	Puentes de fibrosis	3
Inflamación lobulillar:	No	0
	< 2 focos por 200 x campo	1
	2 – 4 focos por 200 x campo	2
	>4 focos por 200 x campo	3
		4
Microgranulomas:	Ausencia	0
	Presencia	1
Lipogranulomas:	Ausencia	0
	Presencia	1
Balonización*:	Ninguna célula con balonización	0
	Pocas células con balonización	1
	Muchas células con balonización	2
Cuerpos acidófilos:	No ó Raro	0
	Muchos	1
Megamitocondrias*:	No ó Raro	0
	Muchas	1
Hialina de Mallory:	No ó Raro	0
	Muchas	1
Núcleos de glucógeno:	No ó Raro	0
	Muchas	1
Clasificación diagnóstica:	No esteatohepatitis	≤2
	Posible/Borderline	3 - 4
	Esteatohepatitis definida	≥ 5

Las muestras fueron visualizadas y valoradas por un anatomopatólogo (*Dra. Teresa Pereda*) con adiestramiento especial en la valoración de pacientes con NASH, y que desconocía las variables clínicas y analíticas de cada paciente.

Los resultados de las muestras anatomopatológicas se clasificaran con el diagnóstico de: *No datos de esteatohepatitis* (*No NASH*) (con score de puntuación ≤ 2), *borderline* (con score de puntuación igual a 3 ó 4) y *esteatohepatitis* (*NASH*) (con score de puntuación ≥ 5).

2.2. Variables secundarias o independientes

2.2.1. Sociodemográficas:

- Edad en años.
- Sexo (Varón/ Mujer).
- Fumador (No/ Sí), definido por consumo de > 4 cigarrillos/ día.

2.2.2 Factores de riesgo cardiovascular o rasgos de síndrome metabólico:

- *HTA* (Ausencia/ Presencia), definida por elevación > 130 mmHg la sistólica y > 85 mmHg la diastólica, o bien tratamiento medicamentoso de la hipertensión.
- *Dislipemia* (Ausencia/ Presencia), definida por TG > 150 mg/ dL (1,7 mmol/l) o tratamiento farmacológico por elevación de los TG; y/o disminución del c-HDL < 40 mg/ dL (0,9 mmol/l) en hombres o 50 mg/ dL (1,1 mmol/l) en mujeres o tratamiento farmacológico para disminuir las concentraciones de c-HDL.
- *Diabetes Mellitus* (Ausencia/ Presencia), definida por elevación de la glucemia en ayunas > 100 mg/ dl o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia.
- *Obesidad* (Ausencia/ Presencia), definida por aumento del perímetro de la cintura > 102 cm en hombres o 88 cm en mujeres.
- *Hiperuricemia* (Ausencia/ Presencia), definida por niveles de ácido úrico $> 5,7$ mg/ dl ó tratamiento para disminuir los niveles de uricemia.

2.2.3. Enfermedades crónicas o degenerativas preexistentes:

- Accidentes vasculares (Cardiopatía estructural o isquémica/ Accidentes cerebrovasculares) (Ausencia/ Presencia).
- Cáncer de algún tipo (Ausencia/ Presencia).
- Enfermedades respiratorias crónicas (Asma/ EPOC) (Ausencia/ Presencia).
- Enfermedades degenerativas (Ausencia/ Presencia).
- Enfermedades autoinmunes (Ausencia/ Presencia).
- Enfermedades hereditarias (Ausencia/ Presencia).

2.2.4. Fármacos de uso diario:

- Antihipertensivos (IECAS/ ARA-II/ Diuréticos/ Otros) (Sí/ No).
- Antidislipémicos (Estatinas/ Fibratos/ Otros) (Sí/ No).
- Antidiabéticos orales (Metformina/ Glitazonas/ Otros) (Sí/ No).
- Insulina (Sí/ No).
- Tratamiento de la hiperuricemia (Sí/ No).

2.2.5. Parámetros antropométricos:

- Peso en kilogramos.
- Talla en centímetros.
- Perímetro cintura en centímetros.
- IMC ($IMC = \text{Peso (Kg)} / \text{Altura}^2 (m^2)$).

2.2.6. Parámetros analíticos:

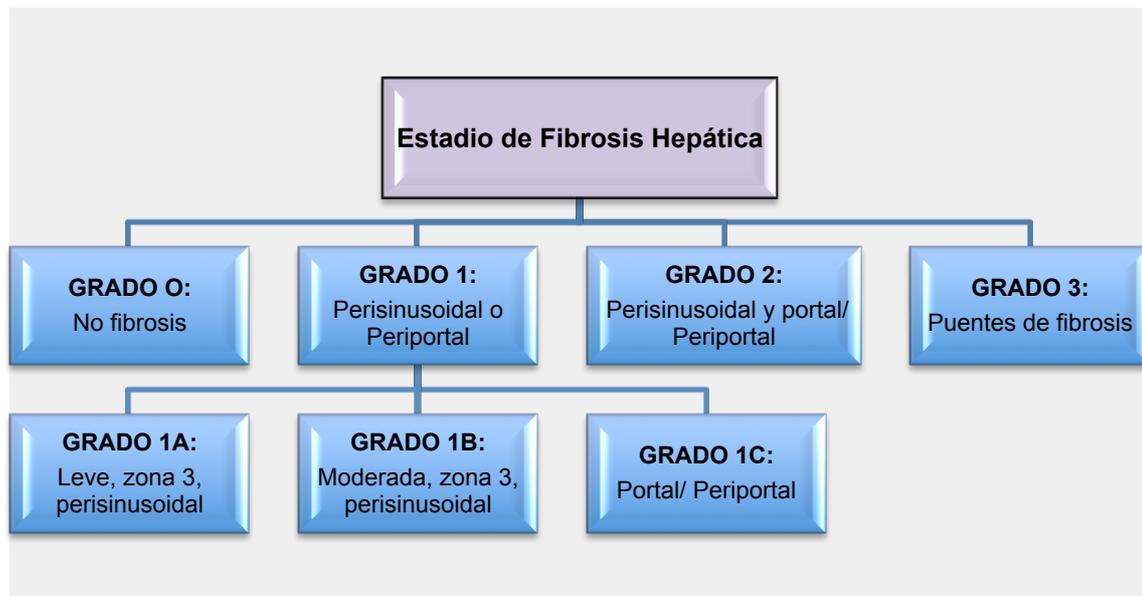
- Perfil hepático en U/L: GOT (Valor normal: (VN) 5 - 39), GPT (VN: 5 - 40), GGT (VN: 7 - 50), FA (VN: 35 - 104).
- Niveles de Bilirrubina total-directa-indirecta en mg/ dl (VN: 0,1 - 1).
- Perfil nutricional: Albúmina en g/dl (VN: 3,7 - 5,3).
- Perfil glucémico: Glucosa en mg/ dl (VN: 70 - 110), Hb-A1c en % (VN: 3,9 - 6).
- Perfil renal en mg/ dl: Creatinina (VN: 0,6 - 0,94), Urea (VN: 10 - 50), Ácido úrico (VN: 2,4 - 5,7).
- Perfil iónico en mEq/ L: Sodio (VN: 135 - 150), Potasio (VN: 3,5 - 5).
- Perfil lipídico en mg/ dl: Triglicéridos (VN: 30 - 200), Colesterol total (VN: 115 - 220), HDL-c (VN: 45 - 75), LDL-c (VN: 50 - 150).
- Metabolismo férrico: Hierro en ug/dl (VN: 40 - 160), Ferritina en ng/ml (VN: 15 - 300), Transferrina en ng/ml (VN: 230 - 420).
- Recuento plaquetario en x1000/ μ l (VN: 140 - 450).
- PCR en mg/dl (VN 0,1 - 0,5).
- Insulinemia en mU/L (VN 3 - 25).
- Insulinresistencia determinada por el nivel de HOMA-R, definido por la fórmula
($HOMA = ((Glucemia(mg/dl) / 18) \times Insulinemia (UI/ mL) / 22,5)$).

2.3. Variables medición de fibrosis hepática

Para el objetivo secundario de obtener la correlación del grado de fibrosis medido por parámetros indirectos (NAFLD Fibrosis Score) con la fibrosis por biopsia, se utilizaron los criterios histológicos definidos en la *figura 11*; y para determinar el NAFLD score se utilizaron los siguientes parámetros:

- Edad en años.
- Hiperglucemia en mg/dl.
- IMC en Kg/m².
- Recuento plaquetario en x10⁹/L.
- Albúmina sérica en g/dL.
- Índice GOT/ GPT.

Figura 11.- Clasificación histológica de la fibrosis hepática.



3. Instrumentación

3.1 Determinación de medidas antropométricas

Se determinó la talla en cm, el peso en kg y el perímetro abdominal en cm. Todas mediciones se hicieron con el mismo modelo de peso y tallímetro (*Marca Seca, modelo 713*).

3.2 Determinación analítica

Las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas de 8 horas, en la mañana ó inmediatamente anterior del día de la intervención quirúrgica.

Se utilizaron los standares del aparato de medida del laboratorio de referencia, en éste caso, de los servicios de análisis clínicos del Hospital Costa del Sol de Marbella.

3.3. Determinación de estudio histopatológico

Fue realizada por un especialista en Cirugía general y Digestiva que tomó una cuña de parénquima hepático mediante la técnica habitual durante una intervención de cirugía abdominal programada y previo consentimiento informado del paciente. La muestra debían tener una profundidad no inferior a 1 cm.

Las muestras fueron enviadas al área de anatomía patológica, donde fueron procesadas para su estudio. Fueron fijadas en formaldehído tamponado y se incluyeron en parafina. De los bloques de tejido resultantes se realizaron cortes finos, de 3-4 micras, sobre portaobjetos para su posterior tinción. Las baterías de tinciones usadas en el estudio de las biopsias hepáticas incluyen de rutina **hematoxilina-eosina** (en cuya

valoración inicial se fundamenta el diagnóstico de base), y técnicas complementarias que aportan información adicional de interés:

- **PAS (Periodic Acid Schiff) diastasa:** para la demostración de lipofucsina, pigmento ceroides, inclusiones de α 1- antitirpsina o de diversas sustancias en algunas enfermedades de almacenamiento.
- **Tricrómico de Masson:** para la detección de la fibrosis colagénica.
- **Tinción de plata para reticulina:** importante para evaluar cambios estructurales.
- **Tinción de Perls':** para los depósitos de hemosiderina.

El análisis de las muestras lo realizó un especialista entrenado, cegado para información clínica y analítica del paciente, que puntuó en base al score del NASH Clinical Research Network. (140)

3.4. Determinación no invasiva de la fibrosis hepática

3.4.1. Determinación del NAFLD Fibrosis Score

Según los parámetros descritos previamente se le aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{NAFLD} = -1.675 + 0.037 \times \text{edad (años)} + 0.094 \times \text{IMC (kg/m}^2\text{)} + 1.13 \times \text{hiperglucemia en ayuno/diabetes (si = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{índice TGO/ TGP} - 0.013 \times \text{plaquetas (}\times 10^9\text{/L)} - 0.66 \times \text{albúmina (g/dL)}.$$

Tabla 10.- Interpretación de los resultados del valor del NAFLD Fibrosis Score.

Valor del NAFLD Fibrosis Score	Gravedad de la Fibrosis Hepática
< -1.455	F0 – F2
< -1.455 – 0.675	Indeterminado score
> 0.675	F3 – F4

4. Recogida de datos

Para la inclusión de los pacientes nos basamos en aquellos que iban a ser sometidos a cirugía abdominal, fundamentalmente colecistectomía, y que presentaban rasgos de síndrome metabólico y que aceptaron participar en el estudio previo consentimiento informado.

Se seleccionaron los pacientes que cumplían criterios de inclusión de:

- Consultas externas de aparato digestivo del Hospital Costa del Sol, HARE de Benalmádena y Hospital Quirón Marbella: Se captaron aquellos pacientes remitidos para estudio por sospecha de patología biliar. Se solicitó consentimiento informado para la participación en el estudio en caso de ser sometido a colecistectomía.
- Consultas externas de cirugía general y digestiva: Se captaron aquellos pacientes remitidos para valoración de realización de colecistectomía. Se solicitó consentimiento informado para realización de biopsia hepática laparoscópica en el mismo acto quirúrgico.

A todos se les entregó previamente el documento de consentimiento de participación en el estudio (Anexo 1). Fueron incluidos exclusivamente aquellos pacientes que firmaron la autorización. Se determinó en estos casos, en el mismo día de la realización de la cirugía, el peso, talla, perímetro abdominal, extracción de analítica con perfil hepático, insulinemia y congeló muestra para determinación de otros parámetros inflamatorios posteriormente. De ello se encargó personal de enfermería del área de hospitalización.

Una vez realizada la analítica y la medición de las medidas antropométricas, el paciente acudió a quirófano como tenía programada. El personal facultativo de aparato digestivo se encargó de recordar al cirujano que realiza la intervención, que el paciente es candidato para el estudio y que ha firmado el consentimiento informado para participar en el mismo.

En caso de detectarse alguna anomalía tanto en el resultado analítico como en el resultado anatómico-patológico de la biopsia hepática, el paciente fue citado telefónicamente a consulta de aparato digestivo para seguimiento y tratamiento pertinente si fue necesario.

5. Análisis estadístico de los datos

Se realizó análisis descriptivo, con medidas de tendencia central, dispersión y posición para variables cuantitativas y distribución de frecuencias para las cualitativas. Utilizando como variables de segmentación de grupo la presencia o ausencia de esteatohepatitis y fibrosis, se realizó análisis bivariado, utilizando el test de la U de Mann-Whitney para variables independientes cuantitativas, el test de Ji-Cuadrado para variables cualitativas independientes (corregido por continuidad para tablas 2x2), y la

asociación lineal por lineal para variables ordinales.

Finalmente, se realizó un análisis de regresión logística multivariante tomando como variable dependiente la presencia de esteatohepatitis, incluyendo por pasos hacia adelante las variables significativas en análisis bivariado, junto el sexo y la edad, valorando la Odds Ratio de Prevalencia (ORP) con respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%). Se estableció el nivel de significación estadística en $p < 0,05$.

6. Aspectos éticos del estudio

El presente es un estudio de prevalencia en el que se pretende analizar la frecuencia de un fenómeno en la población (en este caso la esteatohepatitis no alcohólica). No es un estudio de intervención.

Este estudio ha contado con la aprobación del comité de Ética e Investigación de la Agencia Sanitaria Costa del Sol.

Se solicitó consentimiento informado a todos los pacientes que participaron en el estudio (anexo).

La población estudiada no fue sometida a ningún procedimiento que no estuviera previamente justificado por la práctica clínica. La biopsia hepática laparoscópica que se realizó, fue siempre en una persona que iba a ser sometida a una intervención abdominal por indicación clínica independiente del estudio. Este procedimiento le resulta fácil al cirujano, y los riesgos eran mínimos y se podrían tratar durante la intervención. La toma de biopsia tampoco supone una prolongación del tiempo de intervención ni de su estancia en el hospital.

Independientemente del beneficio particular que podría suponer para cada paciente el conocer alguna enfermedad hepática que pudiera tener oculta o en fases iniciales y que precisaría de un control médico, hay un beneficio general para la población general, ya

que los resultados que se obtengan podrán condicionar un cambio en el manejo de este perfil de pacientes en nuestra comunidad.

El presente estudio se ciñó en todo momento a la declaración de Helsinki y a la ley de protección de derechos de los pacientes (Ley 15/2002).

Todos los datos recogidos en este proyecto fueron registrados de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre).

Con el fin de proteger la confidencialidad de la información personal de los participantes se precisa:

- Todos los datos que pudieran identificar al participante se mantendrán separados del resto de la información recogida en los diferentes cuestionarios del estudio.
- Cada caso del estudio contará con un número de identificación que será el que figure en las bases de datos.
- El análisis de la información se hará siempre de forma agregada y nunca individual.
- Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes.
- Todas las bases de datos del proyecto estarán protegidas electrónicamente con códigos que limiten el acceso únicamente a los investigadores del proyecto.

Capítulo IV: Resultados

1.- Análisis descriptivo

Se analizaron un total de 75 casos de pacientes de forma consecutiva con edades comprendidas entre 40 y 80 años, 33 varones (44%) y 42 mujeres (56%). Las **características clínicas, datos antropométricos y analíticos** analizados de la población estudiada se muestran en la *tabla 11*. De la serie completa más del 60% de los casos tenían al menos dos rasgos de síndrome metabólico, siendo los más frecuentes la **HTA** y la **obesidad**.

El nivel de transaminasas de los pacientes fue normal, salvo 3 pacientes que presentaban un discreto aumento de las mismas (< 2 veces el valor normal) y 2 pacientes que presentaban un aumento claro de las mismas ($\times 2$ veces el valor normal). Todos estos pacientes presentaban previamente a su inclusión en el estudio un nivel de transaminasas normal, pero en la analítica extraída el día de la intervención se observó dicha alteración del perfil hepático.

Tabla 11.- Características basales de la población.

PARÁMETRO	MEDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	RANGO (P75-P25)
Edad (años)	63,6	64	40	80	16
Varón/ Mujer (n/ %)	42 (56,0)/ 33 (44,0)				
HTA (n/ %)	46 (61,3)				
T evolución HTA (años)	9,9574	10	0	30	4
Antihipertensivos (n/ %)	44 (95,7)				
IECAs	16 (34,8)				
ARA-II	18 (39,1)				
Otros	10 (19,6)				
Dislipemia (n/ %)	30 (40,0)				
T evolución Dislipemia (años)	8,5667	8	1	20	6,25
Hipolipemiantes (n/ %)	27 (90,0)				
Estatinas	23 (76,7)				
Fibratos	3 (10,09)				
Ambos	1 (3,39)				
Diabetes Mellitus (n/ %)	17 (22,7)				
T evolución DM (años)	6,9412	5	2	20	6
Antidiabéticos (n/ %)	13 (76,5)				
ADO	12 (75,0)				
Insulina	2 (12,5)				
Obesidad (n/ %)	47 (62,7)				
T evolución Obesidad (años)	12,1304	10	5	20	5
Hiperuricemia (n/ %)	11 (14,7)				
T evolución Hiperuricemia (años)	7,8333	8	4	12	5,75
Uricosúricos (n/ %)	7 (63,6)				
Nº Factores de SM (n/ %)					
Uno	29	38,7			
Dos	21	28			
Tres	21	28			
Cuatro	2	2,7			
Cinco	2	2,7			
Perímetro abdominal (cm)	102,48	100	78	141	12,25
Perímetro cadera (cm)	107,56	104	98	125	14,5
Peso (kg)	77,79	77,50	52	106	17
IMC (kg/m ²)	29,426	28,842	19,4	43,7	6,867
GOT (U/L)	33,0267	24	10	316	11
GPT (U/L)	40,4267	26	9	280	25
GGT (U/L)	74,7467	31	6	460	79
FA (U/L)	84,6533	73	33	241	39
Bilirrubina total (mg/dl)	0,8501	0,6	0,3	6,5	0,5
Albúmina sérica (g/dl)	4,7644	4,3	3,2	42	0,55
Glucemia (mg/dl)	104,3333	100	55	263	16
Creatinina (mg/ dl)	0,8317	0,78	0,51	1,97	0,24
Uremia (mg/dl)	37	35	13	101	17
Ácido úrico (mg/dl)	5,4311	5,5	2,5	9,7	1,825
HbA1c	6,3095	6,3	4,8	9,8	0,7
PCR	1,16	0,31	0,01	10,73	0,59
TG (mg/dl)	128,8	118	32	341	58
Colesterol total (mg/dl)	188,3467	192	108	279	50
HDL-c (mg/dl)	46,7467	44	19	90	19
LDL-c (mg/dl)	116,88	114	50	203	43
Hierro (ug/dl)	81,7209	81	23	177	41
Ferritina (ng/ml)	135,0286	87	16	971	156
Transferrina (ng/ml)	259,5806	256	159	409	67
Insulina (mU/L)	12,0302	8,9	0,2	76,6	8,79
HOMA	3,2568	2,2163	0,05	22,29	2,384

Los **datos anatomopatológicos** analizados son recogidos en la *tabla 12*.

Posteriormente para el análisis se definieron dos grupos, atendiendo a los criterios de diagnóstico de: *No NASH* en 27 casos (36%) y *NASH posible o definida* en 48 casos (64%). (141, 337) En el 89% de los casos las muestras presentan algún grado de **balonización**, considerándose este fenómeno como específico de daño hepatocelular (en el 52% la balonización fue intensa). Con respecto a la **fibrosis**, en el 73,33% de los casos presentaban algún grado de fibrosis (60% un grado importante, grado 1C ó mayor).

Tabla 12.- Hallazgos histológicos de las muestras hepáticas de la población.

DATOS HISTOLÓGICOS	FRECUENCIA (n)	PORCENTAJE (%)
Grado de esteatosis:		
< 5%	14	18,7
5% - 33%	28	37,3
33% - 66%	23	30,7
> 66%	10	13,3
Esteatosis microvesicular	44	58,7
Estadio de fibrosis hepática:		
Grado 0, No fibrosis	19	25,3
Grado 1, Perisinusoidal o Periportal	6	8
Grado 1A, Leve- Zona 3- Perisinusoidal	2	2,7
Grado 1B, Moderada- Zona 3- Perisinusoidal	2	2,7
Grado 1C, Portal/ Periportal	29	38,7
Grado 2, Perisinusoidal y portal/ Periportal	13	17,3
Grado 3, Puentes de fibrosis	3	4
No valorable	1	1,3
Inflamación lobulillar:		
No	27	36
< 2 focos por 200 x campo	39	52
2 – 4 focos por 200 x campo	7	9,3
>4 focos por 200 x campo	2	2,7
Microgranulomas	12	16
Lipogranulomas	0	0
Balonización:		
Ninguna célula con balonización	8	10,7
Pocas células con balonización	28	37,3
Muchas células con balonización	39	52
Cuerpos acidófilos:		
No ó Raro	72	96
Muchos	2	2,7
Megamitocondrias:		
No ó Raro	72	96
Muchas	3	12
Hialina de Mallory:		
No ó Raro	66	88
Muchas	9	4
Núcleos de glucógeno:		
No ó Raro	25	33,3
Muchas	50	66,7

2.- Prevalencia del NASH y asociación de los distintos rasgos de SM con el grado de NASH

La **esteatohepatitis no alcohólica (NASH)** fue diagnosticada en 48 pacientes (64% del total), NASH posible o borderline en 21 casos (28%) y NASH definida en 27 casos (36%).

El análisis de asociación de las distintas **variables clínicas y rasgos de SM** con la aparición de NASH se presenta en la **tabla 13**. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al *sexo*, *HTA*, *Obesidad*, *Hiperuricemia* y *número de rasgos de SM*. Si se encontró asociación de la **dislipemia (Hipercolesterolemia o Hipertrigliceridemia)** con NASH, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p= 0,009$), si bien cabe destacar que en nuestra cohorte de estudio más del 90% de los casos la dislipemia era por hipercolesterolemia).

Al analizar el **número de rasgos de SM** en comparación con la presencia o no de NASH observamos que, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,067$) existe asociación lineal entre el número de factores de SM que presentan los casos y la presencia de NASH.

Al comparar los **antecedentes médicos y de enfermedades** con la presencia o no de NASH, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas salvo en la ausencia de enfermedades autoinmunes ($p= 0,043$), no teniendo dicho dato relevancia clínica por el bajo número de casos y la discrepancia de muestras entre grupos.

Tabla 13.- Diferencias entre grupo NASH y No NASH.

	No NASH (Mediana/ P75-P25) (n= 27)	NASH posible/ definido (Mediana/ P75-P25) (n= 48)	p
Edad (años)	69/ 17	60,50/ 15,50	0,024
Varón/ Mujer (n/%)	12 (36,4)/ 15 (35,7)	21 (63,6)/ 27 (64,3)	1,000
HTA (n/%)	17 (63,0)	29 (60,4)	1,000
T evolución HTA (años)	10/ 3,50	10/ 5,50	0,710
Antihipertensivos (n/ %)	17 (100)	27 (93,1)	0,524
Dislipemia (n/%)	5 (18,5)	25 (52,1)	0,009
T evolución Dislipemia (años)	14/ 13	8/ 5,50	0,276
Hipolipemiantes (n/ %)	6 (100)	21 (87,5)	1,000
Diabetes Mellitus (n/%)	6 (22,2)	11 (22,9)	1,000
T evolución DM (años)	5/ 13	6/ 6	0,839
Antidiabéticos (n/ %)	4 (66,7)	8 (80,0)	0,604
Insulina (n/%)	1 (16,7)	1 (10,0)	1,000
Obesidad (n/%)	17 (63,0)	30 (63,8)	1,000
T evolución Obesidad (años)	15/ 9,25	10/ 0	0,000
Hiperuricemia (n/%)	2 (7,4)	9 (18,8)	0,309
T evolución Hiperuricemia (años)	8/ 9,50	8/ 5,25	0,825
Uricosúricos (n/ %)	2 (100,0)	5 (55,6)	0,491
Nº Factores de SM (n/ %)			
Uno	13 (48,1)	16 (33,3)	0,067
Dos	8 (29,6)	13 (27,1)	
Tres	6 (22,2)	15 (31,2)	
Cuatro	0 (0,0)	2 (4,2)	
Cinco	0 (0,0)	2 (4,2)	
Perímetro abdominal (cm)	105/ 19	99/ 10,50	0,274
Perímetro cadera (cm)	111/ 14,50	100/ 6	0,068
Peso (kg)			
IMC (kg/m2)	28,134/ 10,236	29,063/ 6,578	0,78
Sobrepeso (n/ %)	22 (81,5)	38 (82,6)	1,000
Antecedentes Vasculares (n/ %)	5 (18,5)	8 (16,7)	1,000
Antecedentes Neoplásicos (n/ %)	2 (7,4)	1 (2,1)	0,293
Enfermedades Respiratorias (n/ %)	2 (7,4)	4 (8,3)	1,000
Enfermedades degenerativas (n/ %)	3 (11,1)	2 (4,2)	0,344
Enfermedades Autoinmunes (n/ %)	3 (11,1)	0 (0,0)	0,043
Hipotiroidismo (n/ %)	3 (11,1)	3 (6,2)	0,661
GOT (U/L)	27/ 21	22/ 10,00	0,018
GPT (U/L)	35/ 50	23,50/ 24,25	0,028
GGT (U/L)	39/ 178	28/ 48,75	0,032
FA (U/L)	79/ 51	73/ 31,25	0,518
Bilirrubina total (mg/dl)	0,60/ 0,50	0,60/ 0,50	0,242
Albúmina sérica (g/dl)	4,2/ 0,8	4,30/ 0,475	0,055
Glucemia (mg/dl)	97/ 20	102/ 13,5	0,342
Uremia (mg/dl)	37/ 23	36,29/ 15,5	0,968
Creatinina (mg/ dl)	0,82/ 0,29	0,78/ 0,25	0,683
Ácido úrico (mg/dl)	4,80/2,60	5,60/ 1,50	0,135
HbA1c	6,25/ 0,825	6,30/ 0,80	0,744
PCR	0,33/ 3,67	0,255/ 0,365	0,052
TG (mg/dl)	123/ 47	118/ 68,75	0,952
Colesterol total (mg/dl)	188/ 41	192/ 49,75	0,526
HDL-c (mg/dl)	44/ 28	44/ 16,25	0,540
LDL-c (mg/dl)	107/ 33	124/ 42,50	0,200
Hierro (ug/dl)	78/ 45	81/ 46,50	0,684
Ferritina (ng/ml)	117,5/ 137,75	79,50/ 159,5	0,776
Transferrina (ng/ml)	275/ 98	255,50/ 60	0,302
Insulina (mU/L)	9,05/ 9,19	8,90/ 7,8	0,879
HOMA	2,20/ 2,18	2,27/ 2,65	0,912
Insulinorresistencia (n/ %)	5 (22,7)	11 (25,6)	1,000

También se analizó la asociación que podría haber entre el consumo de **fármacos** para el SM y la presencia o no de NASH. Los fármacos más utilizados fueron los **IECAS** y **ARA-II** para el tratamiento de la HTA y las **estatinas** para el tratamiento de la dislipemia, no encontrando diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los fármacos.

Con respecto a los **datos antropométricos** no se observaron diferencias estadísticamente significativas, si bien el perímetro de la cadera podría ser el más relacionado ($p= 0,068$).

Al analizar la relación de los distintos **datos analíticos** con la presencia o no de NASH se observó que los **niveles de transaminasas** (GOT, GPT y GGT), eran discretamente más bajos en los pacientes con NASH (siendo en ambos casos niveles normales), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Ante este hallazgo, intentamos buscar alguna explicación en la influencia que pudiera tener el consumo de fármacos en el nivel de transaminasas, y como se refleja en la **tabla 14**, los pacientes que consumían estatinas presentaban transaminasas algo más bajas, aunque no pudimos encontrar significación estadística.

Tabla 14.- Niveles transaminasas vs Toma de Fármacos control de Rasgos de SM.

	No Fármacos para SM (Mediana/ P75-P25)	Con Fármacos para SM (Mediana/ P75-P25)	p
GOT (U/L)	25/ 16	22,50/ 8,75	0,304
GPT (U/L)	27/ 33	21,50/ 25,50	0,080
GGT (U/L)	34/ 126	28/ 45	0,104
FA (U/L)	77/ 36,50	71,50/ 36	0,226
PCR	4,40/ 0,45	4,40/ 0,50	0,426

También encontramos como hallazgo llamativo cuando analizamos los **tiempos de evolución de los distintos rasgos de SM y la edad**, que los casos que presentan NASH tienen *menos edad y menor tiempo de evolución de la obesidad*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El **24,6 %** de los casos (16) presentaron insulinoresistencia (IR), que definimos como un valor de **HOMA** $\geq 3,8$. No encontramos ninguna diferencia en la relación de IR con el desarrollo de NASH.

Utilizamos para definir sobrepeso un valor del **índice de IMC** ≥ 25 . El 82,2% de los casos (60) presentaron algún grado de sobrepeso y fueron definidos como obesos 47 casos, mientras que el 17,8% (13) de los casos presentaron normopeso. El grupo de casos con NASH presentaba un 82,6% (38) de sobrepeso frente al grupo no NASH que presentaba un 81,5% (22) de sobrepeso, siendo estas diferencias no estadísticamente significativas.

Del **análisis de regresión logística múltiple**, con criterio de significación estadística con un valor de $p < 0,05$ y teniendo en cuenta que para realizar dicho análisis se han incluido por criterio estadístico, se obtuvo que la **dislipemia** es un factor predictor de aparición de esteatohepatitis no alcohólica (**Odds ratio**= 5,30). Por otro lado, se observó que a mayor edad existe menor riesgo de desarrollar NASH, por lo que se podría decir que la **edad** es un factor protector frente a la aparición de NASH (**Odds ratio**= 0,950).

Tabla 15.- Modelo de Regresión logística múltiple para e NASH.

	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p
Edad (años)	0,950	0,901 - 1,001	0,056
GOT (U/L)	0,975	0,946 - 1,005	0,009
Dislipemia	5,300	1,510 - 18,604	0,102

3.- Asociación de los rasgos de SM con la fibrosis hepática

En relación con el daño hepático en forma de **fibrosis**, encontramos que en 55 casos (73,4%) presentaban *algún grado de fibrosis*, y en 3 casos (4%) el daño hepático fue en estadio de *cirrosis hepática* (**Figura 12**). Para el análisis de nuestros datos, hemos establecido dos grupos: 1) **no fibrosis** o **no significativa** (*grado 1B o menor*) y **fibrosis significativa** (*grado 1C o mayor*), en relación con la afectación del espacio portal. La **figura 13** resume los datos globales, y en general obtenemos fibrosis significativa en 45 casos (60%).

Figura 12.- Estadios de fibrosis hepática.

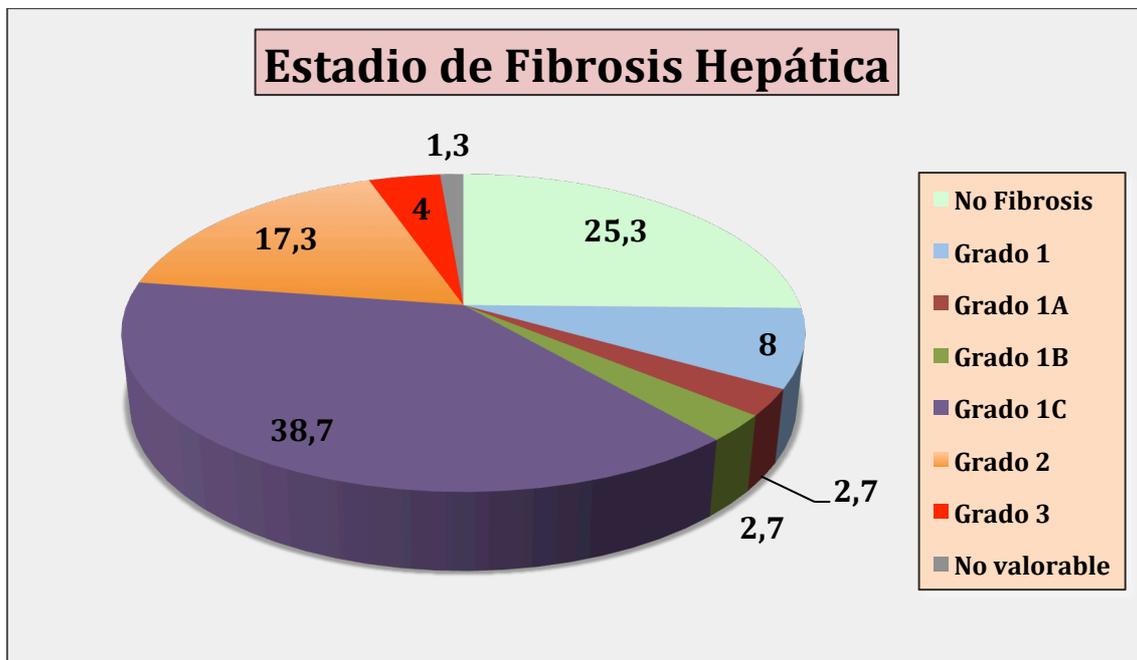
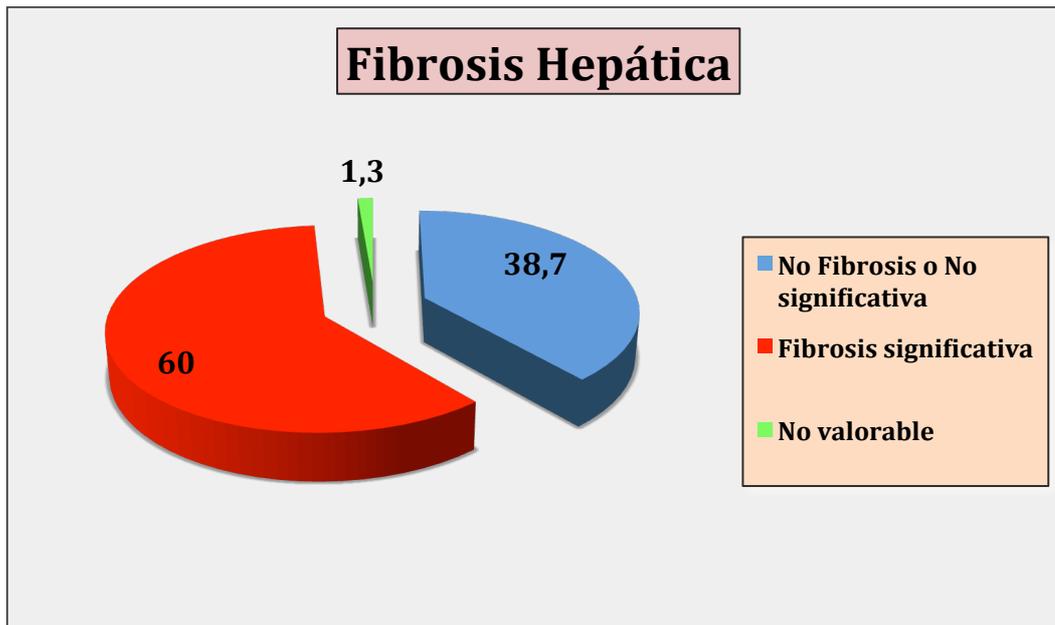


Figura 13.- Severidad de la fibrosis hepática.



El análisis de la asociación de las diferentes variables con el desarrollo de fibrosis significativa se encuentra en la *tabla 16*. De todas ellas parece haber asociación entre la fibrosis y la presencia de **diabetes mellitus**, aunque sin alcanzar significación estadística ($p= 0,073$).

El tiempo de evolución de la HTA y la asociación de varios rasgos de SM, si que alcanzaron significación estadística. Como se aprecia en *la tabla 16*, el que aparezcan más de 1 rasgo de SM como ocurre con NASH, se observa una asociación casi lineal entre el número de rasgos de SM y la presencia de fibrosis hepática. ($p = 0,049$)

Similar resultado se obtiene con el **tiempo de evolución de la HTA**, que encontramos asociado a fibrosis significativa presentación de fibrosis hepática es más frecuente en los casos de *mayor tiempo de evolución de la HTA*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,039$).

Tabla 16.- Diferencias entre grupo con Fibrosis significativa y No Fibrosis hepática.

	No Fibrosis o No significativa (Mediana/ P75-P25) (n = 29)	Fibrosis significativa (Mediana/ P75-P25) (n= 45)	p
Edad (años)	59/ 16	66/ 17,50	0,125
Varón/ Mujer (n/%)	15 (51,7)/ 14 (48,3)	17 (37,8)/ 28 (62,2)	0,346
HTA (n/%)	15 (51,7)	31 (68,9)	0,215
T evolución HTA (años)	8/ 5	10/ 3,50	0,039
Antihipertensivos (n/ %)	15 (100,0)	29 (93,5)	1,000
Dislipemia (n/%)	9 (31,0)	20 (44,4)	0,363
T evolución Dislipemia (años)	10/ 7	8/ 6	0,493
Hipolipemiantes (n/ %)	9 (100,0)	17 (85,0)	0,532
Diabetes Mellitus (n/%)	3 (10,3)	14 (31,1)	0,073
T evolución DM (años)	4/ 1	6,5/ 5,25	0,143
Antidiabéticos (n/ %)	2 (66,7)	10 (76,9)	1,000
Insulina (n/%)	0 (0,0)	2 (15,4)	1,000
Insulinorresistencia (n/%)	4 (18,2)	11 (26,2)	0,683
Obesidad (n/%)	20 (69,0)	26 (59,1)	0,544
T evolución Obesidad (años)	10/ 5	10/ 5	0,894
Hiperuricemia (n/%)	3 (10,30)	7 (15,6)	0,731
T evolución Hiperuricemia (años)	5/ 6	10/ 5,50	0,602
Uricosúricos (n/ %)	2 (66,7)	4 (57,1)	1,000
Nº Factores de SM (n/ %)	15 (51,7)	14 (31,1)	0,049
Uno	7 (24,1)	14 (31,1)	
Dos	7 (24,1)	13 (28,9)	
Tres	0 (0,0)	2 (4,4)	
Cuatro	0 (0,0)	2 (4,4)	

Comparamos la presencia de **NASH** con el hallazgo de **fibrosis hepática**, encontrándose mayor fibrosis en el grupo de NASH, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativas. (*Tabla 17*)

Tabla 17.- Grado de Fibrosis en función de NASH.

	No EHNA (n / %)	EHNA posible o definida (n / %)	p
No Fibrosis o insignificante	13 (44,8)	16 (55,2)	0,214
Fibrosis	13 (28,9)	32 (71,1)	

4.- Comparativo biopsia hepática-NAFLD score

Utilizando la fórmula para el cálculo del NAFLD-score propuesto en la *tabla 7 (151)*, obtuvimos un valor de puntuación *media de 1,864*, con una *mediana de 1,9496* y un *rango intercuartílico de 1,7609*. Categorizando los resultados, subdividimos en tres grupos: sin fibrosis, indeterminado y con fibrosis. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 18*, observándose que según este score el **87,3%** de la muestra de estudio presentaría fibrosis en un grado importante.

Tabla 18.- Grado de Fibrosis según valores del NAFLD-score.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
No Fibrosis (NAFLD score < -1.455 = F0-F2)	0	0
Indeterminado (NAFLD Score -1.455 – 0.675 = indeterminado score)	9	12,7
Fibrosis (NAFLD Score > 0.675 = F3-F4)	62	87,3

La *tabla 19* resume los resultados de la concordancia de la fibrosis con el NAFLD-score, en el que se aprecia un *grado de concordancia bajo (0,036)*.

Tabla 19.- Comparativo del grado de Fibrosis hepática según biopsia hepática vs valores del NAFLD-score.

	No Fibrosis o insignificante (n / %)	Fibrosis (n / %)	κ
NAFLD-score indeterminado	4 (5,7)	38 (54,3)	0,036
NAFLD-score fibrosis	23 (32,9)	5 (7,1)	

Igualmente, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, junto con valores predictivos (*tabla 20*); se observó que el NAFLD-score es muy sensible pero poco específico.

Tabla 20.- Valores de acuerdo del NAFLD-score para detección de fibrosis hepática.

	Valor (%)	Intervalo Confianza (95%)
Sensibilidad	88,37	77,63 – 99,12
Especificidad	14,81	0,00 . 30,07
Índice de validez	60,00	47,81 – 72,19
Valor predictivo +	62,30	49,31 – 75,28
Valor predictivo -	44,44	6,43 – 82,46
Prevalencia	61,43	49,31 – 73,55

Capítulo V: Discusión

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) se define como la presencia de esteatosis hepática sin evidencia de lesión hepatocelular en forma de globo de los hepatocitos (balonización). NAFLD abarca todo el espectro de lesiones de la enfermedad grasa no alcohólica, desde la esteatosis simple hasta la cirrosis. Es actualmente una de las enfermedades hepáticas más frecuentes junto con las relacionadas con el virus de la hepatitis C y el alcohol y se considera que es el componente hepático del síndrome metabólico., caracterizado por obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión. En los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento del NAFLD, pero aún quedan muchos aspectos por dilucidar en relación con la patogenia y la historia natural.

La *esteatohepatitis no alcohólica* o *NASH* es una forma de hepatopatía crónica que se asocia al síndrome metabólico, especialmente con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 y la principal asociación etiológica es la presencia de resistencia a la insulina. Un diagnóstico temprano puede prevenir la evolución a formas más graves de la enfermedad, y por tanto la aparición de *cirrosis hepática* y *hepatocarcinoma*.

El diagnóstico de esta patología puede llegar a ser realmente difícil por la ausencia de marcadores específicos, siendo necesario el estudio histopatológico para su confirmación.

Las *verdaderas incidencia y prevalencia del NASH* no se conocen bien, por las limitaciones que suponen no poder disponer de estudios controlados por razones éticas obvias. El estudio histológico es imprescindible para el diagnóstico y en las series

publicadas la biopsia sólo se realiza a grupos de enfermos seleccionados. Estimaciones basadas en estudios de imagen y en necropsias sugieren que, alrededor del 20-30% de los adultos de Estados Unidos y de otros países occidentales, presentan esteatosis hepática, pero se puede incrementar cuando se busca en poblaciones seleccionadas (69% en obesidad mórbida). Se estima que alrededor del 10% de estos individuos, un 2-3% de los adultos, cumplen criterios de NASH. (10, 12) Hasta el momento hay poca información respecto al impacto que tiene el padecer algunas características SM, ya que la mayoría de estudios no poblacionales han buscado el efecto en pacientes con alteración del perfil hepático.

En nuestro estudio hemos hallado **esteatohepatitis no alcohólica** definida según criterios anatomopatológicos *en el 64%* de adultos con rasgos de síndrome metabólico, sin hepatopatía previa conocida y con transaminasas normales. *En el 89%* de los casos, las muestras presentaban algún grado de **balonización**, considerándose éste uno de los datos más relevantes para el diagnóstico de NASH. Consideramos que son hallazgos relevantes ya que se trata de pacientes en los que no se sospechaba una hepatopatía previa.

Nuestro resultado presenta una elevada prevalencia de NASH, poniendo de manifiesto el infradiagnóstico de dicho proceso, dada la necesidad de estudio anatomopatológico para el mismo y lo silente en los estadios iniciales de la enfermedad. En la literatura no existen estudios similares al nuestro, ya que el estudio histológico se realiza sólo en casos de población de alto riesgo y a grupos seleccionados. *Willians y cols* realizaron un estudio prospectivo en pacientes de mediana edad mediante ecografía y biopsia hepática, encontrando una prevalencia de NAFLD de 46% y NASH de 12,2%. Ejemplos de estudios que han evaluado la prevalencia del NASH en población sana a través de histopatología hepática son el de *Halon y cols* (14) y *Yamamoto y cols* (15), pero en

estos el sesgo del consumo de alcohol no fue ponderado. Estos estudios, al igual que el nuestro, evaluó el daño hepático en forma de NAFLD en población sin hepatopatía previa conocida pero con sospecha ecográfica de esteatosis. Nuestro estudio en cambio, realizó biopsia hepática en población sana sin sospecha alguna de hepatopatía para valorar la afectación hepática por la presentación de rasgos de SM.

La prevalencia del NAFLD y el NASH en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica se ha estimado en hasta un 91% y 37%, respectivamente. **(16, 17)** Entre pacientes diabéticos la NAFLD es del 40% al 69%, sin datos para la prevalencia de NASH. **(14)**

Estos datos hacen pensar en si sería de utilidad el realizar un estudio hepático mayor a los pacientes con rasgos de síndrome metabólico aunque no presenten síntomas, para poder detectar los pacientes con mayor lesión hepática y si este tipo de pacientes se podrían beneficiar de un control más estricto de estos factores para así tratar de evitar el desarrollo de daño hepático en los mismos.

Mientras que las anomalías de las pruebas de laboratorio y los hallazgos de imagen pueden ser indicativos de NAFLD, la *evaluación histológica* sigue siendo el único medio de evaluar con precisión el grado de esteatosis, las distintas lesiones necroinflamatorias de NAFLD y fibrosis, y distinguir NASH de esteatosis simple o esteatosis con inflamación. Actualmente, el estándar para la evaluación de la fibrosis hepática es la *biopsia hepática*, pero se requieren métodos alternativos no invasivos para la evaluación de la fibrosis hepática como la elastografía transitoria (Fibroscan®) y marcadores serológicos como el ELF test y el NAFLD Fibrosis Score.

La evolución de los cambios histológicos hepáticos en pacientes con NAFLD y NASH se ha investigado en varios estudios, pero han tenido la limitación de que son

series con escaso número de pacientes y son además muy seleccionados. Es generalmente aceptado que la esteatosis no siempre evoluciona, y que la progresión histológica de la esteatosis simple (cuando ocurre) es muy lenta, mientras que los pacientes con NASH pueden presentar una progresión histológica a cirrosis. **(168, 183)** En nuestra muestra de estudio observamos algún *grado de fibrosis* en el **73,4%** de los casos, encontrándose en estadio de cirrosis hepática en el 4%. Decidimos dividir el estudio de fibrosis en dos grupos diferenciados, estableciendo como no fibrosis o fibrosis no significativa (\leq grado 1B) y fibrosis significativa (\geq grado 1C), utilizando el criterio de diferenciación la presencia de fibrina portal. En esta nueva clasificación observamos datos de *fibrosis significativa* (grado 1C o mayor) **en el 60%** de los casos, siendo llamativo el hecho de que la población de estudio presentaba valores normales de transaminasas y no tenían sospecha de hepatopatía previa conocida.

Estos datos llaman la atención pues, aunque el criterio de selección de los pacientes para la realización de la biopsia hepática (candidatos a colecistectomía laparoscópica) puede incurrir en un sesgo, la prevalencia de NASH y de fibrosis significativa hallada en nuestro estudio pone de manifiesto el infradiagnóstico de esta enfermedad y la poca sensibilidad de la determinación de las transaminasas para su diagnóstico.

Comparamos en nuestra serie la presencia de **NASH** con el hallazgo histopatológico de **fibrosis hepática**, encontrándose mayor grado de fibrosis en el grupo de NASH, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. **(Tabla 17)** Este hallazgo coincide con lo descrito en la literatura y la falta de significación estadística probablemente se debe al pequeño tamaño muestral de la serie. Otros estudios en los que se realizó biopsia hepática, esta se hizo sobre una población seleccionada y con sospecha previamente de daño hepático. **(18-22)**

La prevalencia del síndrome metabólico está aumentando a nivel mundial, y NAFLD como manifestación hepática del SM, es ahora la principal causa de elevación de transaminasas en la población (31-33) y NAFLD también se asocia con un mayor riesgo para el desarrollo de la diabetes y la enfermedad arterial coronaria. (38-39)

En nuestro estudio de las distintas **variables clínicas** y **rasgos de SM** que se asociaron a NASH, sólo la **dislipemia** encontró significación estadística. Este hallazgo de nuestro estudio, coincide con lo descrito en la literatura. La dislipemia, ya sea hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia de perfil aterogénico o ambas, se asocia con frecuencia al NASH, habiéndose comunicado cifras muy variables que oscilan entre el 20 y el 81% de los casos en los diferentes estudios publicados. (44)

Pagano y cols (43) describe una asociación entre NASH y la presencia de DM, generalmente no insulino dependiente o tipo 2, frecuentemente asociada a la obesidad. Concluye que la resistencia periférica a la acción de la insulina podría desempeñar un papel importante en la génesis del NASH, cuestión que no encontramos en nuestra serie de pacientes. *Donati y cols* (45) también demuestran la implicación de la HTA en el desarrollo de la infiltración grasa hepática en pacientes con transaminasas normales, pero el diagnóstico se realizó mediante hallazgo ecográfico y sin estudio histológico, lo que podría explicar la diferencia con nuestro estudio.

Cuando analizamos el impacto que tiene el número de rasgos de SM en el desarrollo de NASH, observamos que existe asociación lineal, es decir, que a mayor número de rasgos de SM mayor probabilidad de presentar NASH. Se encontró HTA en el 60,4% de los pacientes con NASH, 52,1% de dislipemia, 22,9% de DM, 63,8% de obesidad en algún grado y un 18,8% de hiperuricemia. Agrupado por número de rasgos de SM, se

observó que el 33,3% presentaba algún factor de SM, 27,1% presentaban dos rasgos de M, 31,2% presentaban tres rasgo de SM y un 4,2% presentaban cuatro y cinco rasgos de SM, siendo mayor el riesgo de presentar NASH cuanto mayor número de rasgos presentaban.

No hay estudios que comparen la presencia de todos los rasgos de SM con el desarrollo de NASH, si bien en el estudio de *Christopher Willians y cols*, (27) la obesidad y la diabetes fueron significativamente mayores en el grupo de NAFLD en comparación con los pacientes sin esteatosis hepática. En estos estudios el criterio de inclusión fue por hallazgo ecográfico de esteatosis hepática y nivel elevado de transaminasas en sangre, por lo que se presuponía un daño hepático previo, si bien nuestra serie correspondería con otro espectro de pacientes distinto al de los descrito en la literatura y podrían explicar la falta de coincidencia de estos datos.

En nuestra serie presentaron HTA el 61,3% de la muestra población, mientras que en el grupo de NASH presentaban HTA el 60,4% del mismo. Aproximadamente el 50% de los pacientes con HTA presentan RI e hiperinsulinemia. Este desorden metabólico se encuentra involucrado en la patogénesis de las complicaciones de la HTA, tanto en sujetos obesos como no obesos. *Donati y colaboradores* (45) establecen que hasta el 30,9% del grupo de pacientes no obesos y no diabéticos hipertensos y con transaminasas normales presentan infiltración grasa ecográfica, apoyando la función que desempeña la insulinoresistencia en la etiopatogenia del NASH. Nosotros analizamos el nivel de glucemia y de insulina sérica el mismo día de la recogida de la biopsia hepática, y posteriormente calculamos el nivel de HOMA en nuestros pacientes. El **nivel de insulinemia** y de **HOMA** fue elevado, teniendo en cuenta el número de pacientes diabéticos y las necesidades de insulina de los mismos. En el estudio

utilizamos para definir **insulinorresistencia** un valor del índice de $HOMA \geq 3,8$. El 24,6 % del total de los casos presentaron insulinorresistencia, mientras que grupo de NASH presentaba un *porcentaje menor de insulinorresistencia* (25,58%) que el grupo no NASH (74,42%).

A pesar de lo descrito en la literatura, en nuestra población no podemos concluir que el nivel elevado de insulinemia o el valor del HOMA tenga relación con el desarrollo de NASH, sin bien sería necesario un estudio más amplio y con análisis exhaustivo del tipo de medicación, dosis y controles glucémicos para poder realizar tal afirmación. Este hallazgo se puede explicar por la heterogeneidad en cuanto a la necesidad de tratamiento o no para el control de la diabetes y el tipo de medicación (dieta, antidiabéticos orales y/o insulina subcutánea) de los pacientes.

Sin embargo, si analizamos el daño hepático en forma de fibrosis con los distintos parámetros clínicos, el factor más relacionado con la fibrosis hepática fue la presencia de **diabetes mellitus**. Por tanto, podría decirse que en el desarrollo de fibrosis hepática jugaría un papel importante la presencia de resistencia a la insulina y los niveles de glucemia. También hemos comprobado como el *número de factores de SM* que se padecen se relacionan al igual que el NASH, de manera casi lineal con la presencia de fibrosis hepática.

Como hemos comentado previamente, NAFLD es actualmente una de las enfermedades hepáticas más frecuentes, siendo la principal causa del aumento anormal de las enzimas hepáticas.

Distintos estudios en la literatura estiman prevalencia utilizando determinaciones de **enzimas hepáticas** como indicadores no invasivos del NAFLD. En un estudio realizado en el Hospital Johns Hopkins (31) se observaron niveles elevados de enzimas hepáticas

en el 14% de los sujetos no alcohólicos que tenían al menos una prueba (determinación de ALT ó AST), y el 21% de los sujetos no alcohólicos que tenían ambas pruebas.

Además de estas cifras, la prevalencia de los niveles elevados de ALT observados en otros estudios osciló entre el 8% y el 9%. (31) Es importante destacar que los niveles de ALT elevados son asociados con NASH histológico, si bien pacientes con niveles normales de ALT presentan NAFLD fibrosis y aún más avanzada. Powell y colaboradoress (35) presentaron que el 79% de los pacientes con esteatosis muestran niveles normales de transaminasas, infraestimando este parámetro diagnóstico la verdadera prevalencia de la enfermedad.

Nuestra población a estudio ha sido de pacientes sin hepatopatía previa conocida y por tanto, con niveles de transaminasas normales. En los casos que se detectó alguna elevación de ALT, que ocurrió en 6 de nuestros pacientes, probablemente estaría en relación con algún evento biliar previo a la cirugía. Por tanto, nuestra serie de pacientes tenían las transaminasas normales. Dentro de ese rango de normalidad, observamos que los **niveles de transaminasas** (GOT, GPT y GGT), eran más bajos en los pacientes con NASH que sin NASH, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El hecho de que los pacientes seleccionados para el estudio tuviesen previamente niveles normales de transaminasas y el hallazgo de una prevalencia de NASH tan elevada, refuerza la idea generalizada en la literatura de que los niveles de transaminasas por sí sólo no son un buen parámetro diagnóstico del daño hepático.

El hallazgo de niveles de transaminasas discretamente más bajos en el grupo con más daño hepático no coincide con lo descrito en la literatura, y nos resultaba difícilmente explicable. Por este motivo, subanalizamos los niveles de transaminasas comparándolos con dos nuevos grupos, tomadores de fármacos (*estatinas*) y no tomadores de fármacos

(*estatinas*) para control de los factores de SM; y pudimos comprobar que en el grupo que tomaba fármacos los niveles de transaminasas eran más bajos. Este hecho probablemente explique la incoherencia de que las transaminasas sean más bajas en pacientes con NASH, ya que parece medir el efecto que las estatinas provocan en los niveles de transaminasas. Este dato además avalaría la seguridad de las estatinas en el tratamiento de la dislipemia en los pacientes con NAFLD, como se comprobó recientemente en un estudio. (327)

Las **estatinas** son una clase importante de fármacos para el tratamiento de la dislipemia, sin embargo no es rara la renuncia a utilizarlas en pacientes con infección crónica hepática establecida o con sospecha de enfermedad hepática, incluyendo el NAFLD y el NASH. Aunque la elevación de transaminasas no es infrecuente en los pacientes que recibieron estatinas, rara vez se observan daños hepáticos graves en la práctica clínica. Durante la última década, varios ensayos clínicos retrospectivos y prospectivos (315-319) han establecido que las estatinas son seguras en pacientes con enfermedades hepáticas y que no hay evidencia que los pacientes con enfermedad hepática crónica, incluyendo el NAFLD y NASH, tengan un mayor riesgo de sufrir graves lesiones hepáticas por el uso de estatinas que aquellos sin enfermedad hepática.

Varios estudios han sugerido que las estatinas pueden mejorar la bioquímica e histología hepáticas en los pacientes con NASH, (3192-327) aunque eran estudios de pequeño tamaño y no rigurosamente diseñados. *Creace y colaboradores* (325) observó que las estatinas mejoraban significativamente la bioquímica hepática y los resultados cardiovasculares en pacientes con enfermedad hepática y enzimas elevadas por NAFLD. Nuestro estudio viene a confirmar que el uso de estatinas es seguro en pacientes con enfermedad hepática crónica y que las mismas mejoran la bioquímica hepática, no pudiéndose aportar datos sobre el hecho de que puedan influir en la mejora

del daño histológico (en nuestro grupo no hubo diferencias en la presentación de NASH con respecto al consumo de estatinas, y al tratarse de un estudio de corte transversal no podemos observar cambios en la histología a lo largo del tiempo con el consumo de estatinas).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios longitudinales con biopsias hepáticas seriadas, cuyo principal objetivo fue evaluar la progresión de la fibrosis y los factores de riesgo asociados en cohortes de pacientes con NAFLD. Uno de los factores que parece estar implicado en la progresión de la fibrosis es la obesidad. Otro es la diabetes que se ha relacionado con un mayor riesgo de progresión de la fibrosis en pacientes con NAFLD.

Observamos en nuestro estudio que la presentación de NASH fue más frecuente en los pacientes de *menor edad y menor tiempo de evolución de la obesidad* ($p < 0,05$). Este hecho podría deberse a un mayor estado inflamatorio en los inicios de la enfermedad y menor edad, tratarse de un subgrupo de pacientes con mayor predisposición al desarrollo de NASH de probable origen genético o porque el mejor control de los distintos rasgos de SM produciría un efecto protector frente al desarrollo de NASH, siendo todas estas hipótesis a explorar en futuros estudios. En distintos estudios recogidos por *Christopher Williams y colaboradores (27)*, se describe un polimorfismo genético que se encuentra en el **gen PNPLA3** y que se ha relacionado con la esteatosis y las lesiones de los hepatocitos. También se ha demostrado el aumento de la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina con un solo nucleótido en distintos polimorfismos de la apolipoproteína C3.

También analizamos el daño hepático en forma de fibrosis con los distintos parámetros clínicos. Nosotros observamos que el rasgo que aparece más relacionado

con la fibrosis hepática es la presencia de **diabetes mellitus** ($p= 0,073$). En este apartado, la falta de concordancia con lo descrito en la literatura podría deberse a la heterogeneidad en cuanto al tipo de pacientes con diabetes mellitus de la muestra (distintos tiempos de evolución, distintos tratamientos, etc). Cuando analizamos los tiempos de evolución de los distintos rasgos de SM y la edad, observamos que la presentación de fibrosis hepática es más frecuente en los casos de *mayor tiempo de evolución de la HTA* ($p < 0,05$). Si bien la presencia de HTA no se ha reportado en los diferentes estudios como un factor que aumenta el desarrollo de fibrosis hepática, el empleo de fármacos antihipertensivos como tratamiento para mejorar el NAFLD y NASH ha sido objeto de diferentes estudios. **(332)** Nuestros hallazgos en este sentido podría ser el resultado de una mala adherencia al tratamiento antihipertensivo o por el contrario debido a que una buena adherencia al tratamiento de este grupo de pacientes supone un correcto control sobre la enfermedad vascular crónica, permitiéndose el desarrollo de un daño crónico sobre el hígado.

Los datos obtenidos en nuestro estudio con respecto a los tiempos de evolución de los distintos rasgos de SM son difícilmente interpretables, al tratarse de pacientes con distintos tratamientos frente a los distintos rasgos de SM (estatinas, antihipertensivos, antidiabéticos,...). Los tiempos de evolución de los distintos rasgos en los diferentes pacientes en el momento de la toma de la muestra histología eran distintos, así como la toma de medicación y control sobre los distintos rasgos. En definitiva, dada la heterogeneidad con respecto a los tiempos evolutivos de nuestra muestra, no podemos inferir datos concluyentes al respecto.

Así mismo, el hecho de que la mayoría de nuestros pacientes estuviesen bajo tratamiento, podría explicar el hecho de que nuestro estudio presente datos sobre variables clínicas y antecedentes relacionados con el desarrollo de NASH, mientras que no encontramos datos analíticos concordantes con lo descrito en la literatura (el hecho de estar bajo tratamiento farmacológico modificaría la evolución y hallazgos analíticos de los pacientes).

Con los datos descritos, se puede decir que al principio de la enfermedad hay mayor presencia de NASH y al final de la misma hay mayor presencia de fibrosis hepática. En este sentido, una posible explicación sería que al inicio, la enfermedad es más agresiva y hay un mayor componente inflamatorio, produciéndose más esteatohepatitis.

Conforme pasa el tiempo, la enfermedad parece estabilizarse y disminuye el componente inflamatorio, eliminándose la esteatohepatitis y produciéndose la aparición de fibrosis hepática consecuente al daño inflamatorio producido anteriormente.

El uso de fármacos para el tratamiento del NASH ha sido ampliamente estudiado, debiendo diferenciar dos tipos de fármacos: aquellos con capacidad para incrementar la sensibilidad a la insulina y aquellos fármacos hepatoprotectores y antioxidantes. En el metaanálisis realizado por *Giovanini Musso y cols*, (247) se pone de manifiesto las limitaciones de las pruebas disponibles para el tratamiento del NAFLD. Las enzimas hepáticas y la esteatosis pueden fluctuar espontáneamente en el tiempo evolutivo del NAFLD, y su mejora puede reflejar simplemente la regresión a la media en lugar de la eficacia del tratamiento, especialmente cuando los pacientes son seleccionados sobre la base de la elevación de las transaminasas. Por otra parte, las transaminasas y la esteatosis hepática a menudo no discurren de forma paralela a la necrosis inflamatoria y la fibrosis en el NASH, mejorando en el tiempo mientras que la necroinflamación y la fibrosis se mantienen estables o pueden progresar. (295-297, 316)

En nuestra cohorte de pacientes analizamos la influencia que podrían tener los distintos **fármacos** sobre la presencia o no de NASH, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Se observó que los niveles de transaminasas eran más bajos en los pacientes tomadores de estatinas, hecho este comentado anteriormente.

Los estudios disponibles sugieren que la pérdida de peso es segura y puede mejorar la actividad histológica de la enfermedad dependiendo del grado y los factores de riesgo cardiometabólicos del NASH: una pérdida de peso del 5% mejoró la esteatosis y los parámetros metabólicos asociados, pero mayores grados de pérdida de peso mejoran la necrosis inflamatoria y el exceso de la actividad de la enfermedad. **(347)** La pérdida de peso debe ser gradual (es decir, < 1,6 Kg/ semana), porque la pérdida de peso más rápida ha exacerbado el daño hepático. **(67)** Existe una evidencia creciente que sugiere que la actividad física per se reduce la grasa hepática, independientemente de sus efectos sobre la pérdida de peso, y también puede proteger a los pacientes con NAFLD contra el desarrollo de diabetes. **(66)**

Nuestro grupo utilizó para definir sobrepeso un valor del índice de $IMC \geq 25$, presentándose en el 82,2% de los casos algún grado de sobrepeso u obesidad. Se observó que el grupo con NASH presentaba un porcentaje mayor de sobrepeso que los pacientes sin NASH, pero sin llegar a la significación estadística. Probablemente con un tamaño muestral más amplio, estas diferencias podrían ser estadísticamente significativas.

En cuanto al empleo de los distintos fármacos, con la excepción de telmisartán, los tratamientos disponibles **(342)** no muestran ningún beneficio consistente en la fibrosis hepática, lo que puede atribuirse a una falta de efectividad real de los tratamientos propuestos, a una duración corta del ensayo o a la inclusión de sujetos con grados leves de fibrosis. Del análisis de nuestros datos obtuvimos que la presentación de fibrosis

hepática fue más frecuente en los casos de *mayor tiempo de evolución de la HTA*, analizado este dato con anterioridad. Ninguno de nuestros pacientes esta bajo tratamiento con telmisartán.

Las limitaciones en este tipo de estudio son reconocidas. Este no es un estudio basado en la población general y está sujeta a un posible sesgo de selección (pacientes pendientes de realización de colecistectomía programada). Sin embargo, la prevalencia de los distintos rasgos de síndrome metabólico que se encuentra en nuestra muestra podría ser superponible a la observada en la población general. La importancia de nuestro estudio se basa en que la población seleccionada presentaba un nivel previo de transaminasas normales y no presentaban hepatopatía conocida, encontrándose una prevalencia alta en nuestra cohorte de daño hepático en forma de esteatohepatitis no alcohólica y de fibrosis.

En conclusión, la prevalencia del NASH es mayor de lo estimado previamente en la población de mediana edad. Este hecho marca la importancia de tener que realizar un mayor estudio y seguimiento del daño hepático en los pacientes con rasgos de SM, aún en ausencia de datos o signos clínicos de la misma, puesto que el diagnóstico precoz de la enfermedad es crucial para evitar su evolución y el desarrollo de daños irreversibles.

Por tanto, con los datos obtenidos en nuestro trabajo podemos apoyar la hipótesis de que la esteatohepatitis no alcohólica puede ser considerado como un componente más del síndrome metabólico, y que tanto la dislipemia como la agrupación de un mayor número de rasgos de síndrome metabólico son factores predisponentes al desarrollo de NASH.

Capítulo VI: Conclusiones

- En una población seleccionada de adultos con rasgos de síndrome metabólico, sin hepatopatía previa conocida y transaminasas normales, encontramos una prevalencia del 64% de esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- Entre las variables de síndrome metabólico, la dislipemia es un factor predictor de NASH.
- Existe una asociación lineal entre el número de variables de síndrome metabólico presentados y la existencia de NASH, es decir, que a mayor número de variables mayor probabilidad de presentar NASH.
- El control del síndrome metabólico, ejerce un papel protector sobre el desarrollo de NASH y mantiene normales los niveles de transaminasas.
- La edad es un factor protector sobre el desarrollo de NASH.
- El mayor tiempo de evolución de la hipertensión arterial aumenta la probabilidad de desarrollar fibrosis hepática.
- En nuestra población no se observó relación estadísticamente significativa entre el valor del HOMA y el desarrollo de NASH, ni tampoco entre este y el sobrepeso, aunque había un mayor número de pacientes con sobrepeso en el grupo de NASH.
- En el 60% de la muestra se encontró fibrosis hepática significativa (grado 1C o mayor), en una población sin hepatopatía conocida y con transaminasas normales. No hay ninguna variable relacionada de forma estadísticamente significativa con el desarrollo de fibrosis, pero había un mayor número de pacientes con diabetes mellitus en el grupo con fibrosis significativa.

- Existe una asociación lineal entre el número de variables de síndrome metabólico con la presencia de fibrosis hepática.
- El hecho de que los pacientes seleccionados para el estudio tuviesen previamente niveles normales de transaminasas y el hallazgo de una prevalencia de NASH tan elevada, refuerza la idea generalizada en la literatura de que los niveles de transaminasas por si solos no son biomarcadores sensibles de daño hepático.
- Los resultados de este estudio pueden estar sesgados por el criterio de selección de la cohorte.

Capítulo VII: Bibliografía

1. Sheth SG, Gordon FD, Chopar S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145.
2. Matteoni C, Younossi ZM, Gramlich T et al. Nonalcoholic steatohepatitis: An spectrum of clinical pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-19.
3. Ludwig J, Viggiano RT. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55, 34-8
4. Grant GM, Chandhoke V, Younossi ZM. Specific disorders associated with NAFLD. En Farrell GC, Goerge J, Hall PM, McCullough AJ editors. *Fatty liver disease. NASH and related disorders.* Blackwell, 2005. P. 249-262.
5. Reaven GM. Banting Lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-607.
6. Bosch J, D'Amico G, García-Pagán JC. Portal hipertensión. En: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, eds. *Schiff's Diseases of The Liver.* Philadelphia: Lippincott Williams- Wilkins. 2002; 429-486.
7. Sherlock S, Dooley J. Hepatic cirrhosis. En: Sherlock S, Dooley J, editors. *Diseases of the liver and biliary system.* 11 ed. Oxford, MA: Blackwell Science 2002; 365-80.
8. S Ampurdanès i Mingall^a. Cirrosis hepática. Unitat d'Hepatologia. Institut Clínic de Malalties Digestives. IDIBAPS. Hospital Clínic. Universitat de Barcelona. Barcelona. *Gastroenterologia y Hepatologia continuada* 2000; 8: 485-492.
9. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic Cirrhosis: Clinical Characterization and Risk Factors for Underlying Disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-669.
10. Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231.
11. Caballería J. Esteatohepatitis no alcohólica. *Medicine* 2004; 9: 459-465.
12. Caballería L, Pera G, Auladell MA, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 24-32.
13. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-10.
14. Halon A, Patrzalek D, Rabczynski J. Hepatic steatosis in liver transplant donors: rare phenomenon or common feature of donor population? *Transpl Proc* 2006;38:193-195.
15. Yamamoto K, Takada Y, Fujimoto Y, et al. Nonalcoholic steatohepatitis in donors for living donor liver transplantation. *Transplantation* 2007;83:257-262.
16. Tran TT, Changsri C, Shackleton CR, et al. Living donor transplantation: histologic abnormalities found on liver biopsies of apparently healthy potential donors. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21: 381-383.
17. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006;45: 600-606.

18. Lee JY, Kim KM, Lee SG, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007; 47: 239–44.
19. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, et al. Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 2410–5.
20. Amarapurkar A, Ghansar T. Fatty liver: experience from western India. *Ann Hepatol* 2007; 6: 37–40.
21. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106–10.
22. Zois CD, Baltayiannis GH, Bekiari A, et al. Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3944–9.
23. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2007; 6: 161–3.
24. Kojima S, Watanabe N, Numata M, et al. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol* 2003; 38: 954–61.
25. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol* 2007; 6: 161–3.
26. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387–95.
27. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; 140: 124–31.
28. Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2003; 124: 71–9.
29. Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999–2002. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 76–82.
30. Patt CH, Yoo HY, Dabadj K, Flynn J, Thuluvath PJ. Prevalence of transaminase abnormalities in asymptomatic, healthy subjects participating in an executive health-screening program. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 797–801.
31. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 960–7.
32. Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, et al. Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C. *MULTIVIRC Group. Hepatology* 1998; 27: 1213–9.
33. Kariv R, Leshno M, Beth-Or A, et al. Re-evaluation of serum alanine aminotransferase upper normal limit and its modulating factors in a large-scale population study. *Liver Int* 2006; 26: 445–50.
34. Amarapurkar DN, Patel ND. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop Gastroenterol* 2004; 25: 130–4.
35. Powell EE, et al. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology* 2005; 42: 5.

36. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33.
37. Bedogni G, Kahn HS, Bellentani S, Tiribelli C. A simple index of lipid over-accumulation is a good marker of liver steatosis. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 98.
38. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008; 49 (4): 600-7.
39. Isomaa B. A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 2003; 73: 2398-411.
40. Hegele RA. Phenomics, lipodystrophy, and the metabolic syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 133-7.
41. De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: 214-223.
42. Day C, James O. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-5.
43. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance and metabolic syndrome: Further evidence of an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35: 367-72.
44. Assy N., Kaita K., Mymin D., et al. Fatty infiltration of liver in hiperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000;45:1929-34.
45. Donati G., Stagni B., Piscaglia F., et al. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes : role of insulin resistance. *Gut* 2004; 53:1020-1023.
46. Hilden S, Christoffersen P, Juhle. Liver histology in a normal population-examinations study of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12:593-7.
47. Loria P, Lonardo A, Carulli L, Verrone AM, Ricchi M, Lombardini S, Rudilosso A, Ballestri S, Carulli N. Review article: the metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 (2): 31- 36.
48. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 201-29.
49. Wahren J, Sato Y, Ostman J, Hagenfeldt L, Felig P. Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *J Clin Invest* 1984; 73: 1367-76.
50. Browning JD , Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-52.
51. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, et al. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 351-7.
52. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1: 785-9.
53. De Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non- alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002; 21: 219-23.
54. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343-51.

55. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: Possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300: 1140–2.
56. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1444–9.
57. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 1977; 60: 265–70.
58. Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 7–18.
59. Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005; 280: 1224–9.
60. Linden D, Lindberg K, Oscarsson J, Claesson C, Asp L, Li L, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo)B-100 and ApoB-48. *J Biol Chem* 2002; 277: 23044–53.
61. Chisholm JW, Hong J, Mills SA, Lawn RM. The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *J Lipid Res* 2003; 44: 2039–48.
62. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1240–54.
63. Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1255–67.
64. Hardie DG. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2003; 144: 5179–83.
65. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6409–14.
66. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003; 546: 113–20.
67. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13710–5.
68. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108: 1167–74.
69. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The antidiabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 25226–32.

70. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 580–5.
71. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001; 358: 893–4.
72. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38: 1006–17.
73. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 188–96.
74. Day CP. Natural history of NAFLD: Remarkably benign in the absence of cirrhosis. *Gastroenterology* 2005; 129: 375–8.
75. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437–43.
76. Pessayre D, Bearson A, Fromenty B, Mansour A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57–69.
77. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54: 987–93.
78. Cortez-Pinto H, Carneiro de Moura M, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006; 44: 197–208.
79. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of non alcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708–17.
80. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, González FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067–75.
81. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 38: 428–35.
82. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56–62.
83. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 663–78.
84. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1333–99.
85. Pessayre D, Fromenty B. NASH: A mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005; 42: 928–40.
86. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespdenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 430–4.

87. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999–1007.
88. Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 303–6.
89. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Lond JM, et al. IKK-b links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191–8.
90. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díaz E, et al. Gene expression of TNF alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in non-alcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158–63.
91. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin. *Hepatology* 2004; 40: 46–54.
92. Nagai H, Matsumaru K, Feng G, Kaplowitz N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 55–64.
93. Colell A, García-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, et al. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 1998; 115: 1541–51.
94. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185–94.
95. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 2002; 110: 1383–8.
96. Hidvegi T, Schmidt B, Hale P, Perlmutter DH. Accumulation of mutant α -1 ATZ in the ER activates caspases -4 and -12, NF- κ B and BAP31 but not the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2005; 280: 39002–15.
97. Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: Relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330:280–9.
98. Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, De Paoli AM, Premkumar A, et al. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005; 41: 753–60.
99. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401: 73–6.
100. Chitturi S, Farrell GC, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptinin NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403–9.
101. Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LM, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 943–9.

102. Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de Iasio R, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3498–504.
103. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117–21.
104. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito T, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acidoxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288–95.
105. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004;40:177–84.
106. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890–8.
107. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab invest* 2003; 83: 655–63.
108. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37: 206–13.
109. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383–94.
110. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, et al. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 284–92.
111. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: A potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34: 738–44.
112. Sanyal AJ. AGA technical review on non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705–25.
113. Caballeria J, Rodés J. Esteatohepatitis no alcohólica. *Med Clin (Barc)* 2003; 120: 670–5.
114. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202–19.
115. Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 48–53.
116. Arslan N, Büyükgebiz B, Öztürk Y, et al. Fatty liver in obese children: prevalence and correlation with anthropometric measurements and hyperlipidemia. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2005; 47: 23–27.
117. Lebray P, Varnous S, Charlotte F, Varaut A, Poynard T, Ratzin V. Liver stiffness is an unreliable marker of liver fibrosis in patients with cardiac insufficiency. *Hepatology* 2008; 48(6): 2089.

118. Joseph AE, Saverymuttu SH, Al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD. Comparison of liver histology and ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol* 1991; 53: 26-31.
119. Yamada H, Ebara M, Yamaguchi T, Okabe S, Fukuda H, Yoshikawa M, Kishimoto T, Et al. A pilot approach for quantitative assessment of liver fibrosis using ultrasound: preliminary results in 79 cases. *J Hepatol* 2006; 44: 68-75.
120. Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, Marcos A. One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8: 1114-1122.
121. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, Swarowsky AM, Toneto MG, Glock L, Repetto G. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004; 14: 635-637.
122. Manthiesen UL, Franzen LE, Aselius H, et al. Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrous in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 516-522.
123. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 745-750.
124. Kaser S, Moschen AR, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons Romero F, et al. Adiponectin and its receptors in nonalcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117-21.
125. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-45.
126. De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: 214-23.
127. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modelling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-95.
128. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
129. Gisondi P, Targher G, Zoppini G, Girolomoni G. Non-alcoholic fatty liver disease in patients with chronic plaque psoriasis. *J Hepatol* 2009; 51: 758-64.
130. Miele L, Vallone S, Cefalo C, La Torre G, Di Stasi C, Vecchio FM, D'Agostino M, et al. Prevalence, characteristics and severity of non-alcoholic fatty liver disease in patients with chronic plaque psoriasis. *J Hepatol* 2009; 51: 778-86.
131. Mishra P, Nugent C, Afendy A, Bai C, Bhatia P, Afendy M, et al. Apnoeic /hypopnoeic episodes during obstructive sleep apnoea are associated with histological NASH. *Liver Int* 2008; 28: 1080-6.
132. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, The Liver Meeting 2010. *Hepatology* 2010; 52 Suppl 1: 320A-1291A.
133. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al. Intrahepatic fat not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 15430-5.

134. Salamone F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease: the hepatic trigger of the metabolic syndrome. *J Hepatol* 2010; 53: 1146-7.
135. Vanini E, Bugianesi E, Kotrenen A, de Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NALFD or vice versa? *Dig Dis Sci* 2010; 42: 320-1320.
136. Fernández-Miranda C. Grupo Multidisciplinario para el estudio del riesgo cardiovascular. Nuevas perspectivas en la medición del riesgo cardiovascular: exploraciones para detectar la aterosclerosis subclínica y marcadores de inflamación. *Med Clin (Barc)* 2007; 128: 344-51.
137. Third Report on the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.
138. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, de Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24: 987-1003.
139. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Sem Liver Dis* 2004; 24: 3-20.
140. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Desing and validation of a histologic scoring system for NAFLD. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321.
141. Brunt EM., Janney CG., DiBisceglie AM., et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
142. Matteoni CA, Younossi ZM., Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-19.
143. Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 2003; 35: 244.
144. Brunt EM., Tiniakos DG. Pathology of steatophepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 691-707.
145. Schwimmer J., Behling C., Newbury R., et al. Histopathology of pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42(3): 641-649.
146. Marceau P., Biron S., Hould FS., et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-1517.
147. Bacon BR., Farahvash MJ., Janney CG., et al. Non-alcoholic steatohepatitis an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
148. Dixon JB., Bharthal PS., O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121: 91-100.
149. Ubiña E., Navarro JM., Méndez I., Pérez A., Rivera R., Fernández N., Rivas F., Perea E., Tapia L. Esteatosis hepática en población infantil obesa. XXXIII Congreso anual de la fundación y asociación española para el estudio del hígado (Madrid); 2008 Feb 20-22.
150. Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of Medicine* 2011; 43(8): 617-49.
151. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The Diagnosis and Mangement of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American

- Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55 (6): 2005-23.
152. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33.
153. Terán-Lantarón A, Crespo-García J. Cribado de la enfermedad hepática por depósito de grasa: cómo y a quién. *Gastroenterol Hepatol* 2011; 34 (4): 278- 288.
154. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008; 47: 455- 60.
155. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007; 45: 846- 54.
156. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*. 2009; 50: 1072-8.
157. Wong VWS, Wong GLH, Choi PCL, Chan AWH, Li MKP, Chan HY. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010; 59: 969-74.
158. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol*. 2007; 42: 573-82.
159. Yoneda M, Uchiyama T, Kato S, Endo H, Fujita K, Yoneda K, et al. Pentraxin3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *BMC Gastroenterol*. 2008; 8: 53.
160. Poynard T, Munteanu M, Charlotte F, Bernhardt C, Ratziu V, Moussalli J. Can biomarkers of fibrosis (FibroTest), steatosis (SteatoTest) and Nash (NashTest) be reliable surrogates for liver biopsy in NASH therapeutic trials. *Hepatology*. 2010; Suppl: A670.
161. Poynard T, Ratziu V, Naveau S, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Messous D, et al. Diagnostic value of two new biomarkers (Steatotest and Nashtests) for the prediction of steatosis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Hepatol*. 2006; 44 Suppl 2: S38.
162. Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2006; 26: 151-6.
163. Shimada M, Kawahara H, Ozaki K, Fukura M, Yano H, Tsuchishima M, et al. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102: 1931-8.
164. Campos GM, Bambha K, Vittinghoff E, Rabl C, Posselt AM, Ciofica R, et al. A clinical scoring system for predicting nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2008; 47: 1916-23.

165. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48(5): 835-847.
166. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12): 1705-1713.
167. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56(7): 968-973.
168. Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47(2): 380-384.
169. Arena U, Vizzutti F, Abraldes JG, Corti G, Stasi C, Moscarella S, et al. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut* 2008; 57(9): 1288-1293.
170. Millonig G, Reimann FM, Friedrich S, Fonouni H, Mehrabi A, Buchler MW, et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48(5): 1718-1723.
171. Lebray P, Varnous S, Charlotte F, Varaut A, Poynard T, Ratzu V. Liver stiffness is an unreliable marker of liver fibrosis in patients with cardiac insufficiency. *Hepatology* 2008; 48(6): 2089.
172. Foucher J, Castera L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2006; 18(4): 411-412.
173. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(1): 48-54.
174. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 343-350.
175. De Ledinghen V, Beaugrand M, Kelleher TB, Foucher J, Castera L, Ziol M et al. Prediction of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH): risk factors and diagnostic potential of liver elasticity using Fibroscan. *J Hepatol* 2006; 44 (suppl 2): S39.
176. Foucher J, Castera L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 411-412.
177. Talkwar JA. Shall we bury the sword? Imaging of hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1669-1671.
178. Talwalkar JA, Yin M, Grimm RC, Rossman PJ, Manduca A, Ehman RL. Validation of magnetic resonance elastography in patients with chronic liver disease. *J. Hepatol* 2007; 46 (suppl 1): S48.
179. De Lédighen V, Vergniol J. Transient elastography for the diagnosis of liver fibrosis. *Expert Rev Med Devices*. 2010; 7: 811-23.
180. Yin M, Talwalkar JA, Glaser KJ. Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *ClinGastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1207-13.

181. Wong VW, Vergniol J, Wong GL. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010; 51: 454–62.
182. Huwart L, Sempoux C, Vicaut E. Magnetic resonance elastography for the noninvasive staging of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008; 135: 32–40.
183. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285.
184. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 1; 129: 113-21.
185. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1413-9.
186. Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sørensen TI, Becker U, Bendtsen F. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut* 2004; 53(5): 750-5.
187. Ekstedt M, Franz_en LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44: 865-73.
188. W Dunn, R Xu, D Wingard, C Rogers, P Angulo, ZM Younossi, JB Schwimmer. Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mortality Risk in a Population-based Cohort Study. *Am J of Gastroenterology* 2008; 103: 2263-71.
189. N Rafiq, CH Bai, Y Fang, M Srishord, A McCullough, T Gramlich, ZM Younossi. Long-Term Follow-Up of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver. *Clinical Gastro and Hepatology* 2009; 7: 234-8.
190. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann MB, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44(10): 1236-43.
191. M Stepanova, N Rafiq, ZM. Younossi. Components of metabolic síndrome as independent predictors of mortality in chronic liver disease: A population-based study. *Gut* 2010; 59 (10): 1410-5.
192. Söderberg C, Sta¹l P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, Hultcrantz R. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010; 51: 595-602.
193. Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004; 40: 578-84.
194. Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 292-8.
195. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123: 134-40.
196. Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, Shiratori K. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009; 44 Suppl 19: 89-95.

197. Smedile A, Bugianesi E. Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 291-3.
198. Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literatura review. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1436-41.
199. Ascha MS, Hanounch IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factor of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 1972-1978.
200. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike S, Arli S, Imai Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 428-433.
201. Angulo P, Keach JC, Batts KB, Independent predictors of liver cirrhosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62
202. Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F. Survival, liver failure and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 2003; 35: 1485-1493.
203. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of crhonic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-468.
204. Angulo P. GI Epidemilogy: non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacolog & Therapeutics* 2007; 25(8): 883-889.
205. Teli MR., James OFW., Burt AD, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714-19.
206. Dam-Larsen S., Franzmann M., Anderson IB, et al. Long term prognosis of fatty liver disease and death. *GUT* 2004;53:750-55.
207. Powell EE., Cooksley WGE., Hanson RR., et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
208. Hui JM., Kench JG., Chitturi S., et al. Long term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 35: 1485-1493.
209. Hashimoto E., et al. The Characteristics and natural history of Japaneses patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 72.
210. Targher G, Day CP. Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 363 (14): 1341-50.
211. Adams LA, et al. The histological course of non-alcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42:132.
212. Sanyal AJ, et al. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 682.
213. Ekstedt M., et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; 44: 865.
214. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1579-84.

215. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54: 3541-6.
216. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 2119-21.
217. Haring R, Wallaschofski H, Nauck M, Dorr M, Baumeister SE, Volzke H. Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl-transpeptidase levels. *Hepatology* 2009; 50: 1403-11.
218. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease. *New Engl J Med* 2010; 363: 1341-50.
219. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008; 49: 608-12.
220. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 473-80.
221. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, et al. Relations between carotid artery Wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; 29: 1325-30.
222. Assy N, Djibre A, Farah R, Grosovski M, Marmor A. Presence of coronary plaques in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology* 2010; 254: 393-400.
223. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Lippi G, Franchini M, Zoppini G, et al. NASH predicts plasma inflammatory biomarkers independently of visceral fat in men. *Obesity* 2008; 16: 1394-9.
224. Kadayifci A, Tan V, Ursell PC, Merriman RB, Bass NM. Clinical and pathological risk factors for atherosclerosis in cirrhosis: A comparison between NASH-related cirrhosis and cirrhosis due to other etiologies. *J Hepatol* 2008; 49: 595-9.
225. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: A systematic Review. *J Hepatol* 2008; 49: 600-7.
226. Struben V, Hesenheide EE, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000; 108: 9-13.
227. Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with non-alcoholic steatohepatitis; insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2957-61.
228. Abdelmalek MF, Liu C, Shuster J, Nelson DR, Asal NR. Familial aggregation of insulin resistance in first-degree relatives of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1162-9.
229. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-95.

230. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 118: 1388-93.
231. Sookoian S, Pirola CJ. PNPLA3, the triacylglycerol synthesis/ hydrolysis/ storage dilemma, and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (42): 6018-6026.
232. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, Wongsirirot N, Nagy HM, Ivanova PT, Scott SA, Knittelfelder O, Rechberger GN, Birner-Gruenberger R, Eder S, Brown HA, Haemmerle G, Oberer M, Lass A, Kershaw EE, Zimmermann R, Zechner R. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab* 2012; 15: 691-702.
233. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2010; 285: 6706-6715.
234. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2011; 286: 37085-37093.
235. Coleman RA, Mashek DG. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev* 2011; 111: 6359-6386.
236. Gimeno RE, Cao J. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res* 2008; 49: 2079-2088.
237. Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* 2009; 50: 2111-2116.
238. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52: 894-903.
239. Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Hirschhorn JN. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* 2010; 52: 904-912.
240. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, Nobili V, Mozzi E, Roviario G, Vanni E, Bugianesi E, Maggioni M, Fracanzani AL, Fargion S, Day CP. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 1209-1217.
241. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 1883-1894.
242. Stickel F, Buch S, Lau K, Meyer zu Schwabedissen H, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, Schafmayer C, Braun F, Hinrichsen H, Günther R, Arlt A, Seeger M, Müller S, Seitz HK, Soyka M, Lerch M, Lammert F, Sarrazin C, Kubitz R, Häussinger D, Hellerbrand C, Bröring D, Schreiber S, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Datz C, Krawczak M, Wodarz N, Völzke H, Hampe J. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology* 2011; 53: 86-95.

243. Trépo E, Gustot T, Degré D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, Ouziel R, Quertinmont E, Vercruysse V, Amininejad L, Deltenre P, Le Moine O, Devière J, Franchimont D, Moreno C. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2011; 55: 906-912.
244. Tian C, Stokowski RP, Kershenobich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 2010; 42: 21-23.
245. Falletti E, Fabris C, Cmet S, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Fornasiere E, Bignulin S, Fumolo E, Bignulin E, Pirisi M, Toniutto P. PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int* 2011; 31: 1137-1143.
246. Nischalke HD, Berger C, Luda C, Berg T, Müller T, Grünhage F, Lammert F, Coenen M, Krämer B, Körner C, Vidovic N, Oldenburg J, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The PNPLA3 rs738409 148M/M genotype is a risk factor for liver cancer in alcoholic cirrhosis but shows no or weak association in hepatitis C cirrhosis. *PLoS One* 2011; 6: e27087.
247. Adams L., Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J* 2006; 82: 315-322.
248. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A Meta-Analysis of Randomized Trials for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *HEPATOLOGY* 2010; 52 (1): 79-104.
249. Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol.* 1991; 12: 224-229.
250. Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology.* 1990; 99: 1408-1413.
251. Park HS, Kim MW, Shin ES. Effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver. *J Korean Med Sci.* 1995; 10: 414-421.
252. 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.
253. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *HEPATOLOGY* 2003; 38: 413-419.
254. Sreenivasa Baba CS, Alexander G, Kalyani B, Pandey R, Rastogi S, Pandey A, et al. Effect of exercise and dietary modification on serum aminotransferase levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21: 191-198.
255. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut.* 2004; 53: 413-419.
256. Suzuki A, Lindor K, Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, et al. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2005; 43: 1060-1066.
257. Tiikkainen M, Bergholm R, Vehkavaara S, Rissanen A, Hakkinen AM, Tamminen M, Teramo K, Yki-Jarvinen H. Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content. *Diabetes* 2003; 52: 701-707.

258. Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M, et al. Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 3191-196.
259. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight non-diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 2804-2809.
260. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54: 603-608.
261. Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, Smith SR, Alfonso A, Ravussin E. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, β -cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 2006; 29: 1337-1344.
262. Thomas EL, Brynes AE, Hamilton G, Patel N, Spong A, Goldin RD, Frost G, Bell JD, Taylor-Robinson SD. Effect of nutritional counseling on hepatic, muscle and adipose tissue fat content and distribution in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5813-5819.
263. Thamer C, Machann J, Stefan N, Haap M, Schafer S, Brenner S, Kantartzis K, Claussen C, Schick F, Haring H, Fritsche A. High visceral fat mass and high liver fat are associated with resistance to lifestyle intervention. *Obesity* 2007; 15: 531-538.
264. Schafer S, Kantartzis K, Machann J, Venter C, Niess A, Schick F, et al. Lifestyle intervention in individuals with normal versus impaired glucose tolerance. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 535-543.
265. Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, Ash S, Ali A, Osland EJ, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE, Galloway GJ. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 2008; 28: 937-945. 90.
266. Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK, Volaufova J, Smith SR, Alfonso AJ, Lefevre M, Rood JC, Williamson DA, Ravussin E. Effect of 6-month calorie restriction and exercise on serum and liver lipids and markers of liver function. *Obesity* 2008; 16: 1355-1362.
267. Viljanen AP, Iozzo P, Borra R, Kankaanpa M, Karmi A, Lautamaki R, Jarvisalo M, Parkkola R, Ronnema T, Guiducci L, Lehtimaki T, Raitakari OT, Mari A, Nuutila P. Effect of weight loss on liver free fatty acid uptake and hepatic insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 50-55.
268. Kantartzis 2009 Kantartzis K, Thamer C, Peter A, Machann J, Schick F, Schraml C, et al. High cardiorespiratory fitness is an independent predictor of the reduction in liver fat during a lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2009; 58: 1281-1288.
269. Kirk E, Reeds DN, Finck BN, Mayurranjan SM, Patterson BW, Klein S. Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. *Gastroenterology* 2009; 136: 1552-1560.
270. Lazo M, Solga SF, Horska A, Bonekamp S, Diehl AM, Brancati FL, Wagenknecht LE, Pi-Sunyer FX, Kahn S, Clark JM, for the Fatty Liver Subgroup of the Look Ahead Research Group. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33: 2156-2163.

271. Wang R, Koretz R, Yee H. Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review. *Am J Med.* 2003; 115: 554-559.
272. Hickman IJ, Clouston AD, Macdonald GA, Purdie DM, Prins JB, Ash S, et al. Effect of weight reduction on liver histology and bio-chemistry in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2002; 51: 89-94.
273. Huang MA, Greenston JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, et al. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Amer J Gastroenterol.* 2005; 100: 1072-1081.
274. Tendler D, Lin S, Yancy WS, Jr., Mavropoulos J, Sylvestre P, Rockey DC, et al. The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Digestive Diseases & Sciences.* 2007; 52: 589-93.
275. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *HEPATOLOGY* 2010; 51: 121-129.
276. Harrison SA, Brunt EM, Fecht WJ, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a randomized prospective trial. *HEPATOLOGY* 2009; 49: 80-86.
277. Nobili V, Manco M, Devito R, Di Ciommo V, Comparcola D, Sartorelli MR, et al. Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *HEPATOLOGY* 2008;48:119-128.
278. Harrison SA, Brunt EM, Fecht WJ, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a randomized prospective trial. *HEPATOLOGY* 2009;49:80-86.
279. Shojaee-Moradie F, Baynes KC, Pentecost C, Bell JD, Thomas EL, Jackson NC, et al. Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose metabolism. *Diabetologia* 2007; 50: 404-413.
280. Bonekamp S, Barone BB, Clark J, Stewart KJ. The effects of an exercise training intervention on hepatic steatosis (Abstrac). *HEPATOLOGY* 2008; 48(Suppl.): 806A.
281. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, et al. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *HEPATOLOGY* 2009; 50: 1105-1112.
282. Van der Heijden GJ, Wang ZJ, Chu ZD, Sauer PJ, Haymond MW, Rodriguez LM, et al. A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese, Hispanic adolescents. *Obesity* 2010; 18: 384-390.
283. Uysal KT., Wiesbrock SM., Marino Nw., et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389 (6651): 610-4.
284. Promrat K., Lutchman G., Uwaifo GI., et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol* 2004; 39 (1): 188-96.
285. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet.* 2001; 358: 893-4.

286. Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 ;19: 537-44.
287. Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH, Jr., Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20: 23-8.
288. Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100: 1082-90.
289. Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D, Bektas M, Doganay B, Sayki M, et al. Clinical trial: insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 200-208.
290. Haukeland JW, Konopski Z, Eggesbø HB, et al. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 853-60.
291. Loomba, R., Lutchman, G., Kleiner, D.E., Ricks, M., Feld, J.J. et al. Clinical trial: pilot study of metformin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 172-182.
292. Omer Z, Cetinkalp S, Akyildiz M, Yilmaz F, Batur Y, Yimaz C, Akarca U. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease. *European J Gastroenterol HEPATOLOGY*. 2010; 22: 18-23.
293. Nissen S., Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N England J Med* 2007; 356: 2-15.
294. Sanyal AJ, et al. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1107-1115.
295. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2297-307.
296. Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 135:1176-1184.
297. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, et al. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 2008; 135: 100-110.
298. Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D, Bektas M, Doganay B, Sayki M, et al. Clinical trial: insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 200-208.
299. Gastaldelli A, Harrison SA, Belfort R, Hardies LJ, Balas B, Schenker S, et al. Importance of changes in adipose tissue insulin resistance to histological response during thiazolidinedione treatment of NASH patients. *HEPATOLOGY* 2009; 50: 1087-1093.
300. Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, LeNaour G, Hartemann-Heurtier A, Bruckert E and Poynard T for the LIDO Study Group. Long-term efficacy of rosiglitazone in

- nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *HEPATOLOGY* 2010; 51: 445-453.
301. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Mae Diehl, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1675-85.
302. Torres DM, Jones FJ, Williams CD, Harrison S. The effect of 48 weeks of rosiglitazone alone versus combination rosiglitazone and metformin (Avandamet) versus combination rosiglitazone and losartan in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a open-label prospective randomised clinical trial [Abstract]. *HEPATOLOGY* 2009; 50: 390A.
303. Omer Z, Cetinkalp S, Akyildiz M, Yilmaz F, Batur Y, Yilmaz C, et al. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 18-23.
304. Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Maki-mattila S, Yki-Jarvinen H, et al. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 2169-2176.
305. Dufour JF, et al. Swiss Association for the Study of the Liver. Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin E in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1537-1543.
306. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *HEPATOLOGY* 2003; 38: 413-419.
307. Rui M, Wang C, Fang J, de Sa SV, Simplicio FI, de Mello ES, et al. The clinical comparison of reduced glutathione and DaiNingPlan in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Chinese General Practice* 2001; 4: 269-270.
308. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2485-2490.
309. Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J, et al. Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: results of a randomized placebo-controlled trial. *HEPATOLOGY* 2009; 50: 1818-1826.
310. Pamuk GE, Sonsuz A. N-acetylcysteine in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1220-1221.
311. Ersoz G, Gunsar F, Karasu Z, Akay S, Batur Y, Akarca US. Management of fatty liver disease with vitamin E and C compared to ursodeoxycholic acid treatment. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16: 124-128.
312. Miglio F, Rovati LC, Santoro A, Senikar I. Efficacy and safety of oral betaine glucuronate in non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind, randomized, parallel group, placebo-controlled prospective clinical study. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 722-727.

313. Vilar Gomez E, Rodriguez DE, Miranda A, Arus Soler E, Llanio Navarro R, Calzadilla Bertot L, et al. Clinical trial: Viusid(R) in combination with diet and exercise in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 999-1009.
314. Sanyal AJ. A randomized controlled trial of pioglitazone or vitamin E for nonalcoholic steatohepatitis (PIVENS). *HEPATOLOGY* 2009; 50: 1A.
315. Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142: 37-46.
316. Ratziu V, De Ledinghen V, Oberti F, et al. A multicentric, double-blind, randomised-controlled trial (RCT) of high dose ursodeoxycholic acid in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *J Hepatol* 2009; 50 (4 Suppl): S21.
317. Santos VN, Lanzoni VP, Szejnfeld D, Shigueoka D, Parise ER. A randomized double-blind study of the short-time treatment of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease with ursodeoxycholic acid. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 723-729.
318. Mendez-Sanchez N, Gonzalez V, Chavez-Tapia N, Ramos MH, Uribe M. Weight reduction and ursodeoxycholic acid in subjects with non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Hepatol* 2004; 3: 108-112.
319. Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, Svegliati-Baroni G, Sofi F, Milani S, Abbate R, Surrenti C, Casini A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006; 23: 1143-1151.
320. Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2010; 31: 679-692.
321. Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 384.
322. De Denus S, Spinler SA, Miller K, Peterson AM. Statins and liver toxicity: a metaanalysis. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 584-591.
323. Browning JD. Statins and hepatic steatosis: perspectives from the Dallas Heart Study. *HEPATOLOGY* 2006; 44: 466-471.
324. Cohen DE, Anania FA, Chalasani N. An assessment of statin safety by hepatologists. *Am J Cardiol* 2006; 97: 77C-81C.
325. Nelson A, Torres DM, Morgan AE, Fincke C, Harrison SA. A pilot study using simvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 990-994.
326. Athyros VG, Mikhailidis DP, Didangelos TP, Giouleme OI, Liberopoulos EN, Karagiannis A, et al. Effect of multifactorial treatment on non-alcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomised study. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 873-883.

327. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: a histopathological follow-up study. *J Hepatol* 2007; 47: 135-141.
328. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour AA, et al. Probuco in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol* 2003; 38: 414-418.
329. Buranawui W, Thung-u-thaisri P, Pramoolsinsap C, et al. Pentoxifylline for treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a randomized, placebo-controlled study [Abstract s2161]. *Gastroenterology* 2006; A330.
330. Lee YM, Sutedja D, Wai CT, Dan YY, Aung MO, Zhou L, et al. A randomized controlled pilot study of pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol Int* 2008; 2: 196-201.
331. Rinella ME, Koppe S, Brunt EM, et al. Pentoxifylline improves ALT and histology in patients with NASH: a double-blind placebo controlled trial. *Gastroenterology* 2009; 136:[Supplement DDW].
332. Georgescu EF, Ionescu R, Georgescu M, Mogoanta L, Vancica L. Angiotensin-receptor blockers as therapy for mild-to-moderate hypertension-associated non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 942-954.
333. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, Pigeyre M, Verkindt H, Dharancy S, Louvet A, Romon M, Pattou F. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 532-540.
334. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygair S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastro and Hepatol* 2008; 6: 1396-1402.
335. Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientose-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 1. Art No: CD007340. DOI: 10: 1002/14641858.
336. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline-Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2004. NCCLS Document H18-A3.
337. Tagle M, Poggi L, Ferrari N, Siu H, Aguinagac M, Luna E, Scavino Y. Hallazgos Clínicos, Bioquímicos y de Histología Hepática en Adultos Peruanos con sobrepeso y obesos: Primer Estudio Prospectivo Nacional. *Rev Gastroenterol Perú* 2008; 28 (4): 323-331.

Anexos

PUBLICACIONES REALIZADAS DE ESTE TRABAJO:

1. **Aguilar Urbano VM, Pereda T, Gonzalo Marín J et al.** “**Síndrome Metabólico y Esteatohepatitis**”. *Comunicación Oral*. “*XLI Reunión Sociedad Andaluza de Patología Digestiva, Almería Octubre 2010*”.
2. **Aguilar Urbano VM, Pereda T, Gonzalo Marín J et al.** “**Esteatohepatitis No Alcohólica en pacientes con rasgos de Síndrome Metabólico**”. *Comunicación póster*. “*XXXVI Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado, Madrid Febrero 2011*”.
3. **Aguilar Urbano VM, Pereda Salguero T, Gonzalo Marín J et al.** “**Prevalencia de la Esteatohepatitis no alcohólica en pacientes con rasgos de síndrome metabólico**”. *Comunicación póster (seleccionado para exposición oral)*. “*Semana de las Enfermedades Digestivas, Sevilla 2011*”.
4. **Aguilar-Urbano VM, Pereda T, Gonzalo-Marín J et al.** “**Nonalcoholic steatohepatitis in adults with features of metabolic síndrome**”. *Comunicación Póster*. “*AASLD 2013*” (Washington, Noviembre 2013)
5. **Aguilar Urbano VM, Hortas MI, Fernández Cano F et al.** “**Rendimiento del panel ELF en la detección de fibrosis en pacientes con NASH y ALT normal**”. *Comunicación póster (seleccionado para exposición oral)*. “*Semana de las Enfermedades Digestivas, Valencia 2014*”.
6. **Aguilar Urbano VM, Pereda Salguero T, Gonzalo Marín J et al.** “**Esteatohepatitis no alcohólica en población adulta con rasgos de síndrome metabólico**”. *Comunicación póster*. “*Semana de las Enfermedades Digestivas, Valencia 2014*”.

SÍNDROME METABÓLICO Y HEPATOPATÍA

- **Nº HC:** **Edad** (al diagnóstico): **Sexo:** a) Varón b) Mujer
- **Alcohol:** a) No b) Sí (30 gr/ día, Nº unidades día)
- **Fumador:** a) No b) Sí
- **FRCV (poner tiempo de evolución):**
 1. **HTA:** a) No b) Sí (tiempo de evolución)
 2. **Dislipemia:** a) No b) Sí (tiempo de evolución)
 3. **Diabetes Mellitus (Tipo I, Tipo II):** a) No b) Sí (tiempo de evolución)
 4. **Obesidad:** a) No b) Sí (tiempo de evolución)
 5. **Hiperuricemia:** a) No b) Sí (tiempo de evolución)
- **Enfermedades importantes:**
 1. **Accidentes vasculares (Card isqu. ACV,...):** a) No b) Sí (cual)
 2. **Cáncer:** a) No b) Sí (tipo)
 3. **Enfermedades respiratorias (EPOC, Asma,...):** a) No b) Sí
 4. **Enfermedades degenerativas:** a) No b) Sí (cual)
 5. **Enfermedades autoinmunes:** a) No b) Sí (cual)
 6. **Enfermedades hereditarias:** a) No b) Sí (cual)
- **Fármacos:**
 1. **Antihipertensivos:** a) No b) Sí (cual)
 2. **Antidislipémicos:** a) No b) Sí (cual)
 3. **ADO:** a) No b) Sí (cual)
 4. **Insulina:** a) No b) Sí (cual)
 5. **Antihiperuricemiantes:** a) No b) Sí (cual)
- **Medidas antropométricas (IMC) y constantes:**
 1. Talla (en cm):
 2. Peso (en kg):
 3. Cintura (en cm):
 4. IMC:
 5. Tensión arterial (mmHg):
- **Laboratorio (valores numéricos):**
 1. **Perfil hepático:** GOT: _____, GPT: _____, GGT: _____, FA: _____, BT: _____ (B-d: _____, B-i: _____), Albúmina: _____
 2. **Bioquímica:** Glucosa: _____, Urea: _____, Creatinina: _____, Ac Úrico: _____, Na: _____, K: _____, HbA1c: _____, PCR: _____
 3. **Perfil lipídico:** TG: _____, Colesterol: _____ (HDL-c: _____, LDL-c: _____)
 4. **Metabolismo férrico:** Hierro: _____, Ferritina: _____, **Transferina:** _____
 5. **Seroteca:** a) No b) Sí
 6. **Insulina en sangre:** _____
 7. **Orina:** **Microalbuminuria:** _____, **Creatinuria:** _____, **Proteinuria:** _____
- **Indicación de la OX:** a) No b) Colelitiasis c) Otras (cual)
- **Tipo de bopsia hepática:** a) Laparoscópica b) Percutánea
- **Categoría:** _____
- **Resultados de la biopsia:**
 1. **Grado de esteatosis:** a) 0 b) 1 c) 2 d) 3
 2. **Esteatosis microvesicular:** a) No b) Sí
 3. **Estadio de fibrosis:** a) 0 b) 1A c) 1B d) 1C e) 2 f) 3 g) 4
 4. **Inflamación lobulillar:** a) 0 b) 1 c) 2 d) 3
 5. **Microgranulomas:** a) No b) Sí
 6. **Lipogranulomas largos:** a) No b) Sí
 7. **Inflamación portal:** a) 0 b) 1
 8. **Ballooning:** a) 0 b) 1 c) 2
 9. **Cuerpos acidófilos:** a) 0 b) 1
 10. **Megamitocondrias:** a) 0 b) 1
 11. **Hialina de Mallory:** a) 0 b) 1
 12. **Núcleos de glucógeno:** a) 0 b) 1
 13. **Diagnóstico:** a) No esteatosis b) Posible/ **Borderline** c) Esteatosis definida
 14. **Score:** _____

ESTUDIO "ALTERACIONES HEPÁTICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO".

Servicio de Aparato Digestivo.
Unidad de Investigación
Hospital Costa del Sol.

Las enfermedades del hígado tienen muchas causas (por ejemplo los virus de las hepatitis, el consumo de alcohol, enfermedades hereditarias y un largo etcétera) y cada vez se diagnostican más gracias a que se ha mejorado mucho en los procedimientos de diagnóstico.

Una de las causas más frecuentes de enfermedad hepática es el acúmulo de grasa en el hígado por el exceso de peso. Esta enfermedad también se está comprobando en personas que aún no teniendo un exceso de peso muy importante, tienen otros trastornos como la diabetes o la prediabetes, la hipertensión arterial, los triglicéridos o el colesterol altos y el ácido úrico elevado. En general, todas estas anomalías forman un síndrome que se denomina "síndrome metabólico".

El hígado se puede afectar cuando se produce éste síndrome, y a veces el diagnóstico se hace muy difícil porque los análisis del hígado y la ecografía pueden ser normales. Por este motivo, el impacto que éste síndrome causa en el hígado es poco conocido. En estos casos, la única manera de comprobar el trastorno es realizar una biopsia hepática.

Usted padece alguno/os de estos trastornos, en los que su hígado podría estar implicado con acúmulo de grasa e incluso con algo de inflamación. Sin embargo, no podemos constatarlo al no tener acceso al hígado

Como se le ha explicado, usted va a ser sometido a una intervención quirúrgica, que se precisa por una indicación clínica, en la que el cirujano va a tener acceso a la cavidad abdominal y podría tomar una muestra pequeña de su hígado (biopsia) para analizarlo. Éste procedimiento le resulta fácil al cirujano, y los riesgos son mínimos y se podrían tratar durante la intervención (por ejemplo, si sangrase al tomar la muestra se podría hacer hemostasia en ese momento). La toma de biopsia tampoco prolongaría su tiempo de intervención ni alargaría su estancia en el hospital.

Como ventaja para usted, le permitiría conocer alguna enfermedad hepática que puede tener oculta o en fases iniciales y que precisaría de un control médico.

Como parte del estudio, el día que acuda a la intervención quirúrgica, se le tomarían muestras de sangre para analizar el estado del hígado y otras servirían para analizar otros parámetros que son de investigación básica.

Este estudio está consensuado con el servicio de cirugía y está aprobado y avalado por el comité ético y de investigación clínica del Hospital Costa del Sol.

Le proponemos participar en nuestro estudio, conociendo que en caso afirmativo, usted podría en cualquier momento modificar su criterio si así lo considera oportuno

En caso de duda podría contactar con los Dr. José M^o Navarro Jarabo ó Dr. Víctor Manuel Aguilar Urbano en el número de teléfono.....

Yo..... DNI.....

Acepto formar parte del estudio

Empresa Pública Hospital Costa del Sol (Marbella)

.....de.....de 20.....

Item	Definition	Score/Code
Steatosis		
Grade	Low- to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3
Location	Predominant distribution pattern	
	Zone 3	0
	Zone 1	1
	Azonal	2
	Panacinar	3
Microvesicular steatosis*	Contiguous patches	
	Not present	0
	Present	1
Fibrosis		
Stage	None	0
	Perisinusoidal or periportal	1
	Mild, zone 3, perisinusoidal	1A
	Moderate, zone 3, perisinusoidal	1B
	Portal/periportal	1C
	Perisinusoidal and portal/periportal	2
	Bridging fibrosis	3
	Cirrhosis	4
Inflammation		
Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci	
	No foci	0
	<2 foci per 200× field	1
	2-4 foci per 200× field	2
	>4 foci per 200× field	3
Microgranulomas	Small aggregates of macrophages	
	Absent	0
	Present	1
Large lipogranulomas	Usually in portal areas or adjacent to central veins	
	Absent	0
	Present	1
Portal inflammation	Assessed from low magnification	
	None to minimal	0
	Greater than minimal	1
Liver cell injury		
Ballooning*	None	0
	Few balloon cells	1
	Many cells/prominent ballooning	2
Acidophil bodies	None to rare†	0
	Many	1
Pigmented macrophages	None to rare†	0
	Many	1
Megamitochondria*	None to rare†	0
	Many	1
Other findings		
Mallory's hyaline	Visible on routine stains	
	None to rare†	0
	Many	1
Glycogenated nuclei	Contiguous patches	
	None to rare†	0
	Many	1
Diagnostic classification‡		
	Not steatohepatitis	0
	Possible/borderline	1
	Definite steatohepatitis	2

Iconografía

FOTO 1: 1a.- Esteatosis de predominio macrovesicular extensa, grado 3.

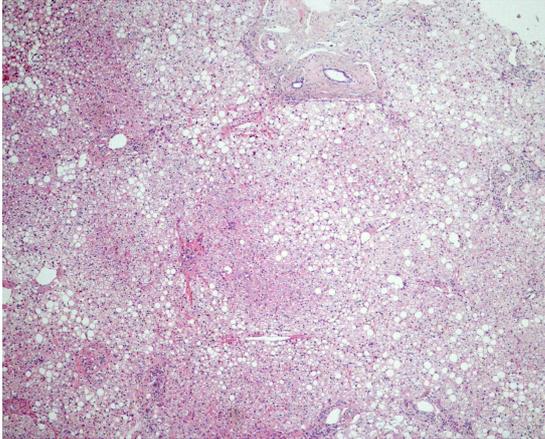
1b.- Misma imagen anterior bajo mayor aumento (4X).

1c.- A mayor aumento, esteatosis macrovesicular en mitad superior de la fotografía, con presencia de algunos núcleos glucogenados.

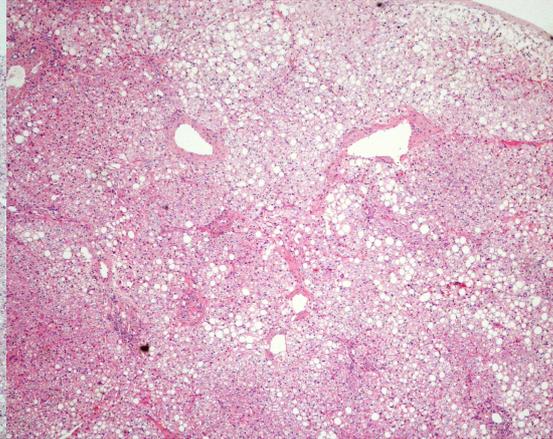
1d.- Tinción de Pearls, para la demostración de pigmento férrico que es negativa (el hierro se vería como gránulos azules)

1e.- Detalle para observar, además de la esteatosis y la balonización hepatocelular, cuerpos de Mallory-Denk (flecha larga, aunque hay algunos más en la foto): inclusiones citoplasmáticas perinucleares eosinofílicas formadas por acumulación de microfilamentos intermedios, y una megamitocondria (flecha corta): cuerpos redondeados eosinofílicos, visibles por agrandamiento de crestas

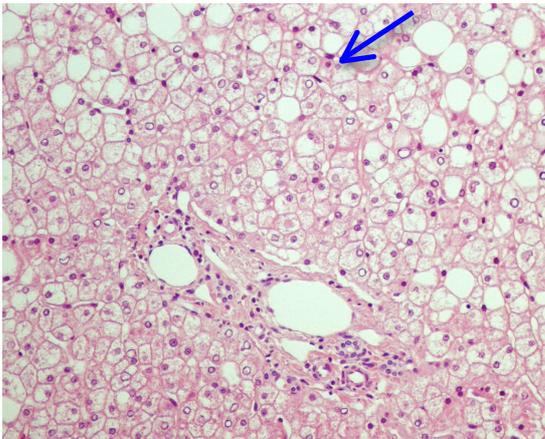
1a



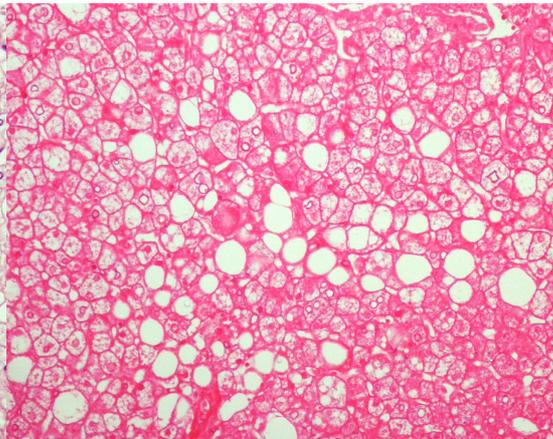
1b



1c



1d



1e

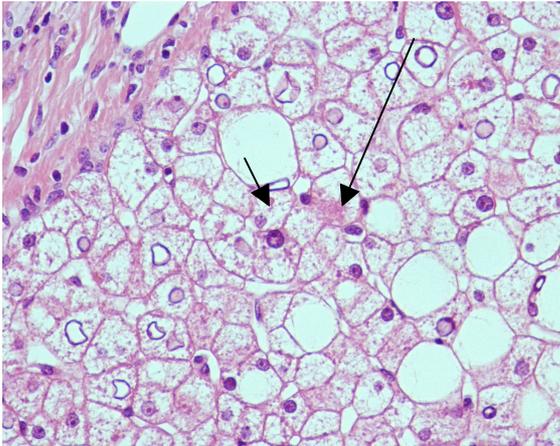


FOTO 2.- 2a.- Foto con la lupa de espécimen de biopsia hepática en cuña, en el que se observa una esteatosis difusa de grado moderado.

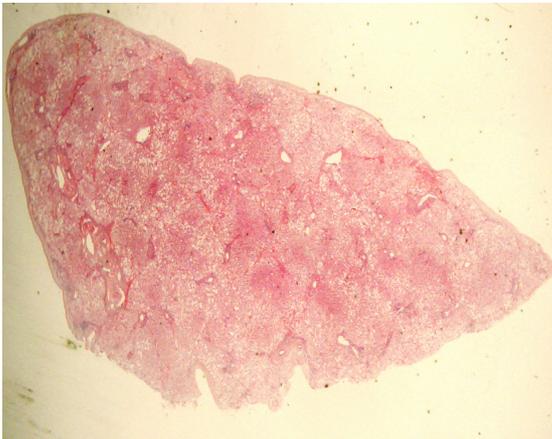
2b.- Detalle de anterior con conservación de la arquitectura hepática, sin fibrosis significativa.

2c.- Técnica de tricrómico, sin fibrosis colagénica significativa.

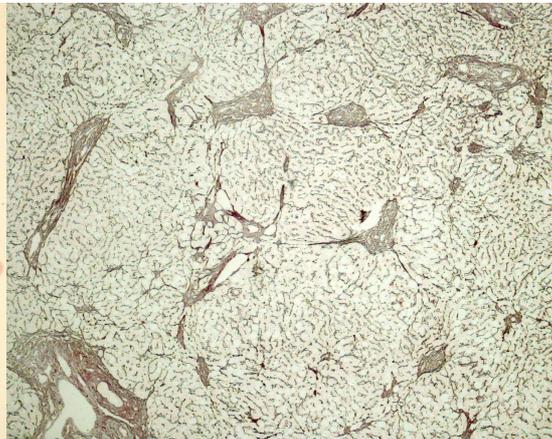
2d.- Técnica de reticulina con ausencia de fibrosis significativa en este caso.

2e.- Leve fibrosis portal con expansión focal

2a



2b



2c



2d



2e

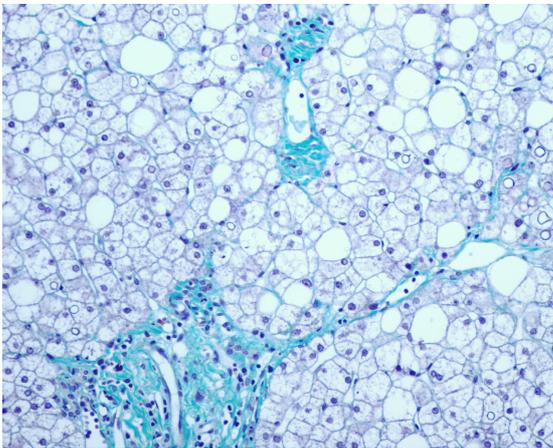
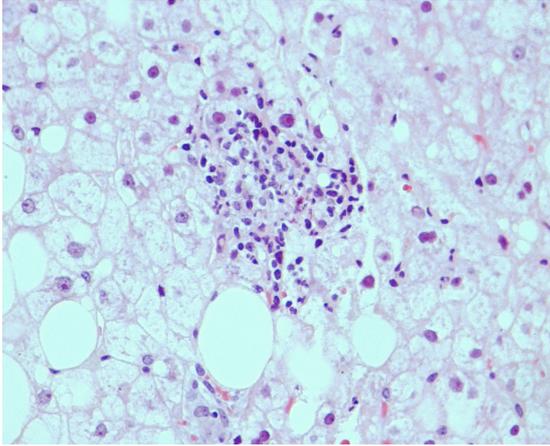


FOTO 3.- 3a.- Foco inflamatorio, aparentemente lobulillar, que incluye linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos y algún eosinófilo.

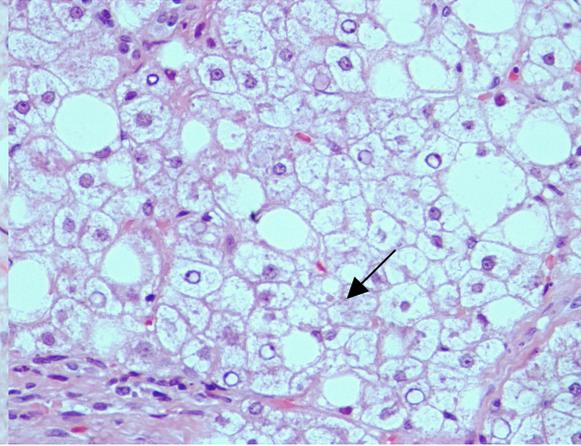
3b.- Imagen de megamitocondria en biopsia hepática.

3c.- En algunos casos puede observarse un infiltrado inflamatorio crónico portal leve.

3a



3b



3c

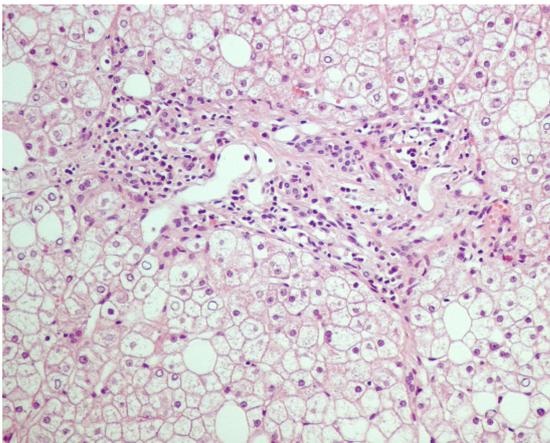


FOTO 4.- 4a.- Detalle de esteatosis macrovesicular y hepatocitos balonizados

4b.- Detalle de foto anterior, esteatosis y balonización hepatocelular sin evidencia de fibrosis pericelular (perisinusoidal) significativa.

4c.- Esteatosis en mitad superior el campo con predominio de la balonización hepatocelular en el inferior.

4d.- Con técnica de PAS diastasa a un aumento de 20x: macrófagos pigmentados en parte superior de la foto y un foco inflamatorio lobulillar en la mitad inferior.

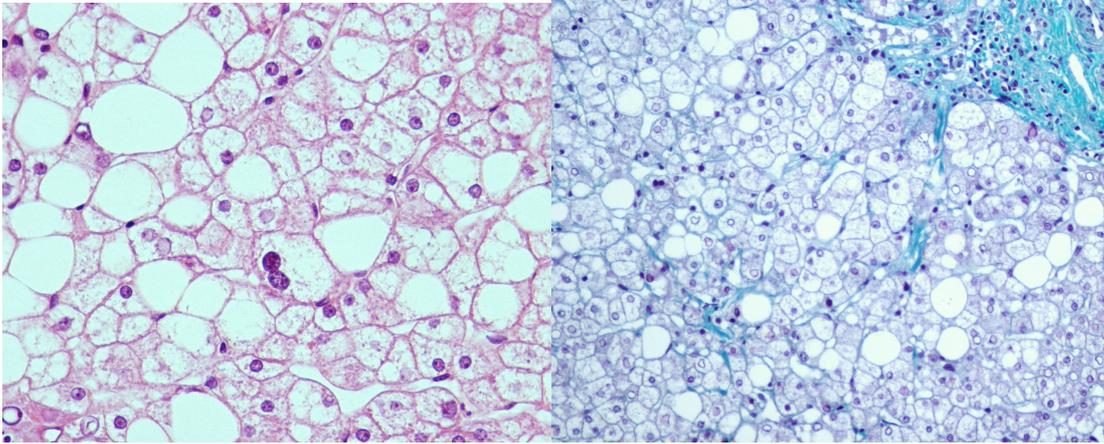
4e.- Detalle de foto anterior del foco inflamatorio intraacinar que incluye linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos y algún eosinófilo (PAS diastasa a un aumento de 40x).

4f.- Detalle de foto anterior con algunos macrófagos pigmentados, esteatosis, balonización y núcleos glucogenados. (PAS diastasa a un aumento de 40x).

4g.- Espacio portal con leve infiltrado inflamatorio que incluye linfocitos, otras células mononucleares, células plasmáticas y algún eosinófilo. Lesión de interfase focal en mitad inferior con tendencia a la nodulación (PAS diastasa a un aumento de 20x).

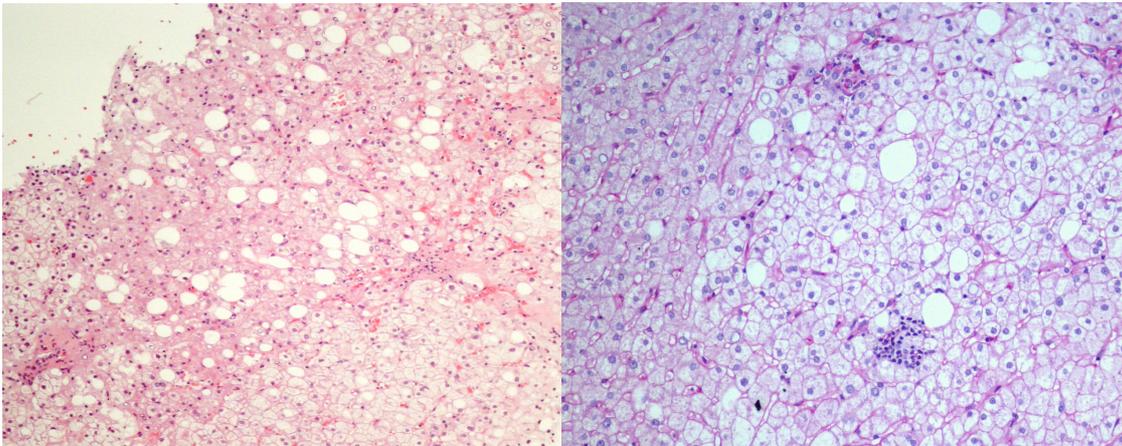
4a

4b



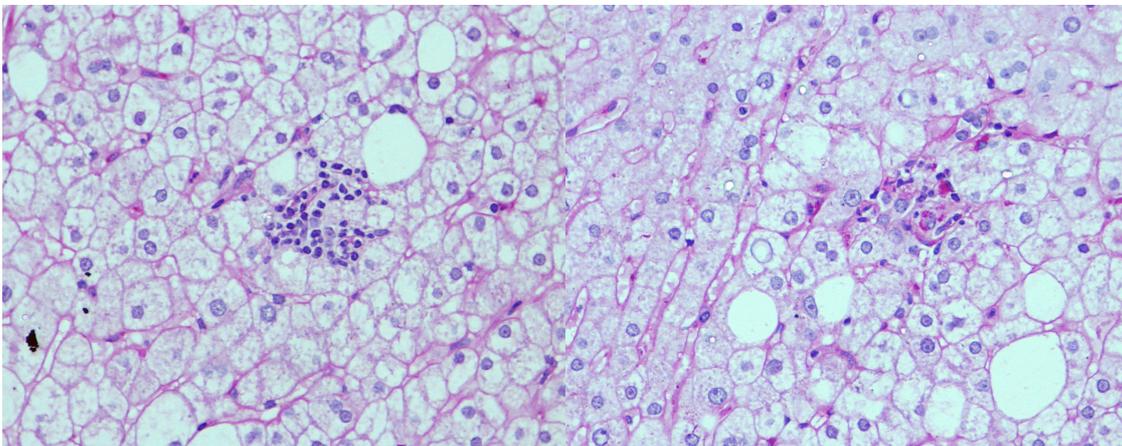
4c

4d



4e

4f



4g

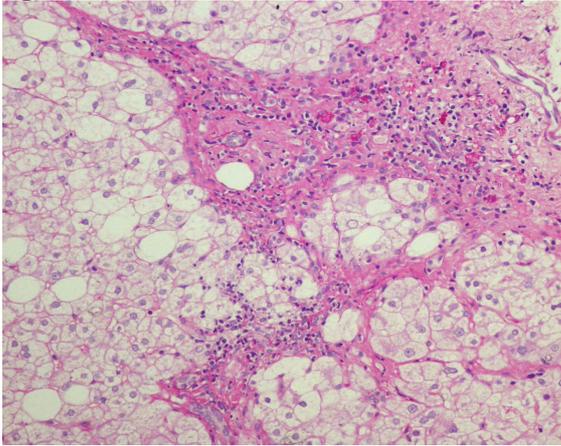
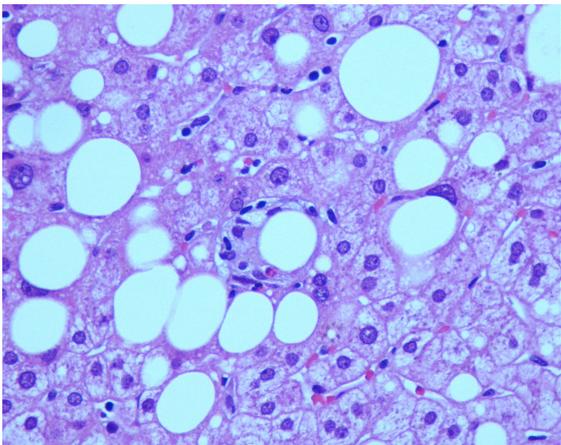


FOTO 5.- 5a.- Lipogranuloma intraacinar, centrado por gota de grasa rodeado por linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos y algún eosinófilo (Hematoxilina-eosina 40X).

5b.- Esteatosis macro y microvesicular importante, balonización hepatocelular y núcleos glucogenado.

5a



5b

