

La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático

Rodrigo Andrés Carrasco Loza*

Rodrigo Luis Castillo Peñaloza*

Patricio Andrés Huerta Bustamante*

Lilian Thieleman, MD**

Resumen

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) es una entidad clínica-histológica de etiología multifactorial cuyos mecanismos aún no se conocen totalmente. Existen evidencias de aumento del estrés oxidativo hepático en pacientes con EHGNA. El objetivo del estudio fue relacionar parámetros hepáticos y plasmáticos asociados a estrés oxidativo con la histología hepática de pacientes con EHGNA. Se estudiaron 50 pacientes con EHGNA (10 hombres/40 mujeres). Se midió en muestras hepáticas: contenido de grupos carbonilos en proteínas (índice de oxidación de proteínas), actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) (índices de protección antioxidante) y capacidad reductora férrica del plasma (FRAP). Resultados: 32% tenían esteatosis, 34% esteatohepatitis y 34% esteatohepatitis con fibrosis. La oxidación de proteínas en los pacientes con esteatosis fue 147% mayor que en pacientes con esteatohepatitis, y 163% mayor que en los con esteatohepatitis y fibrosis ($p < 0,05$). La actividad de SOD y CAT fue menor en esteatohepatitis y esteatohepatitis con fibrosis que en esteatosis (29-34% y 53-56% menor respectivamente; $p < 0,05$). También fue menor FRAP en los dos primeros grupos (15-12% menor; $p < 0,05$). No hubo diferencias en actividad de GSH-PX. Conclusiones: la esteatosis se asoció a elevado estrés oxidativo y en estados más avanzados de EHGNA se observa menor actividad antioxidante, lo que indicaría que el estrés oxidativo es un evento precoz en EHGNA, que a través de la inactivación de proteínas deprimiría la capacidad antioxidante de hígado y plasma, como se ve en estados avanzados de EHGNA. [Carrasco RA, Castillo RL, Huerta PA, Thieleman L. La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. MEDUNAB 2003; 6(16): 15 - 20].

Palabras clave: Hígado, estrés oxidativo, oxidación de proteínas, capacidad antioxidante del plasma.

Introducción

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) es una entidad patológica similar a la inducida por alcohol, pero en ausencia de consumo significativo de éste.¹ Cabe mencionar que el alcohol es una hepatotoxina idiosincrática, es decir, su efecto no es predecible porque el 70% de los pacientes que ingieren 180 g/día de alcohol durante 10 años no desarrollan cirrosis, de modo que no hay una relación absoluta entre dosis y efecto; éste depende de forma muy importante del huésped.²

La cantidad de alcohol que produce enfermedad hepática, lamentablemente no se ha podido determinar en forma exacta. El límite propuesto para considerar que existe riesgo de cirrosis es una ingesta alcohólica de 40 a 60 g/día en el hombre y de 20 a 40 en la mujer, pero no hay consenso absoluto. Por otra parte, se ha demostrado que ingesta de 20 g de alcohol al día pueden producir esteatosis, por lo que probablemente la dosis segura sea de 10 g /día en la mujer y 20 g/día en el hombre, pero esto no está resuelto por completo. Por otro lado, si existe una esteatosis previa, porque el paciente tiene sobrepeso, obesidad o diabetes, seguramente la dosis tóxica de alcohol va a ser menor.³ Es por esto que se propone que la ingesta de menos de 40 g de alcohol a la semana sería el límite para definir una esteatohepatitis como no alcohólica, además de un estudio negativo de virus B, C y otras enfermedades.²

Clínicamente, la EHGNA suele cursar en forma asintomática. Las pruebas hepáticas pueden ser normales o mostrar discreta elevación de aminotransferasas, a predominio de la alanina aminotransferasa.³ Se ha asociado a condiciones como obesidad, diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia. Agrupa una serie de estadios, de acuerdo con la progresión de la enfermedad y el daño histológico. La esteatosis es la etapa más precoz y prevalente; se cree que sensibiliza al hígado a noxas, promoviendo la progresión de la enfermedad hacia esteatohepatitis y fibrosis (figuras 1 a 3). Entre los factores de progresión se han encontrado alteraciones metabólicas, liberación de citoquinas mediado por endotoxinas y el estrés oxidativo.¹

* Estudiante, Carrera de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

** Profesor Asistente, Programa de Fisiopatología y Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Correspondencia: Sr. Huerta, Manuel Montt N° 0404, Buin, Chile; E-mail: pathuerta@mixmail.com

Artículo recibido: 8 de diciembre de 2002; aceptado: 6 de febrero de 2003.

Vale la pena señalar además que últimamente han surgido diversos estudios que relacionan el uso de anticonceptivos orales con el desarrollo de EHGNA.⁴ Entre los factores asociados a esta patología, la obesidad y el sobrepeso se consideran los factores más importantes, presentes entre el 69 y 100% de los casos.³

A nivel latinoamericano, estudios en Chile confirman la obesidad como un factor de riesgo para esta patología.

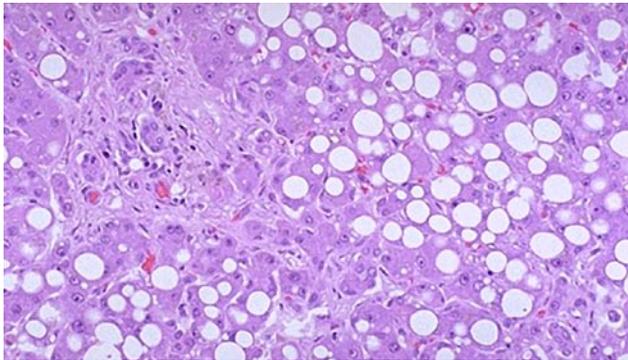


Figura 1. Esteatosis hepática: Se observan hepatocitos que contienen vacuolas llenas de lípidos (Tinción hematoxilina & eosina)

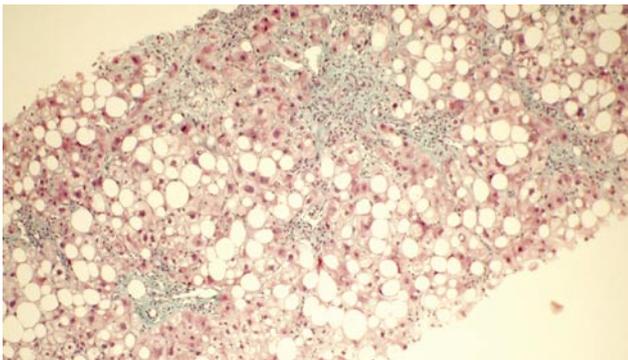


Figura 2. Esteatohepatitis con fibrosis: se observan hepatocitos ovalados y arquitectura hepática invadida por tejido colágeno que tiñe de color verde opaco (Tinción de Masson)

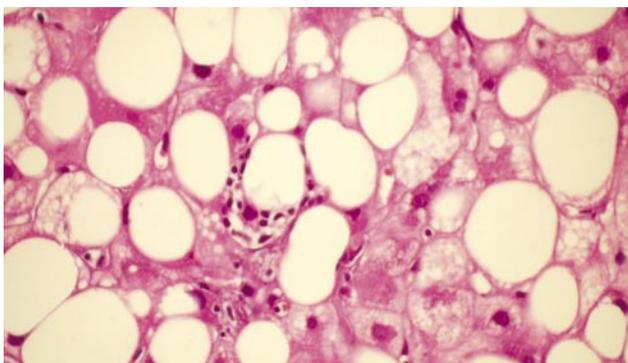


Figura 3. Esteatohepatitis: se observan hepatocitos ovalados y deformados por las inclusiones grasa vacuolares (tinción negativa). Los espacios porta parecen parcialmente conservados observándose conductillo biliar y arteria hepática (Tinción hematoxilina & eosina)

Es así como en poblaciones de estudio que incluían pacientes con obesidad severa y mórbida, sólo un pequeño porcentaje tenía histología normal (8,8%).³ Por otro lado, se debe tener presente que la obesidad es una compleja enfermedad metabólica crónica que en Chile: al igual que en otros países ha aumentado en forma alarmante. En efecto, ya en 1992 la prevalencia era 20,5% en hombres y 39,9% en mujeres.⁵

La resistencia a insulina es probablemente el primer evento en la fisiopatología de la EHGNA. Asociado a esto, el estrés oxidativo podría ser el siguiente paso en su progresión (esteatosis a esteato-hepatitis y fibrosis), donde el hierro actuaría como cofactor de reacciones pro-oxidantes (reacción de Fenton).⁶

El metabolismo aeróbico en el hígado implica una producción basal de especies reactivas de oxígeno (EROs) que, bajo condiciones normales, son consumidas en proporción similar por mecanismos antioxidantes. El fenómeno de estrés oxidativo constituye un desequilibrio de estos procesos en favor de los pro-oxidantes, condición que puede desencadenar una serie de eventos fisiopatológicos en el hígado. Las EROs pueden dañar en forma directa, alterando biomoléculas esenciales, con la consiguiente pérdida de su función biológica y viabilidad celular;⁷ o bien indirectamente, por activación en las células de Kúpffer y otras células no parenquimatosas, de factores de transcripción redox-sensibles, como el NF- κ B y el AP-1, los que a su vez gatillan la síntesis de mediadores proinflamatorios, citotóxicos y fibrogénicos.⁸

Existen evidencias que sugieren la participación del estrés oxidativo crónico en la progresión de la EHGNA. En pacientes con EHGNA se ha demostrado un aumento de contenido de citocromo P₄₅₀⁹ y marcadores de peroxidación de lípidos, como los reactantes de ácido tiobarbitúrico.¹⁰ Un estudio reciente en que se comparaba el estado redox sanguíneo de pacientes con EHGNA con controles normales, demostró alteraciones significativas en el primer grupo, reflejado a través de un aumento de los niveles de malondialdehído y 4-hidroxinonanal en eritrocitos, además de una disminución de la capacidad antioxidante del plasma.¹¹

En este contexto resulta importante complementar estos hallazgos con determinaciones de los parámetros relacionados con estrés oxidativo en tejido hepático de pacientes con EHGNA. El presente estudio tiene por objeto evaluar algunos de los parámetros relacionados con estrés oxidativo y capacidad antioxidante hepática, además de la capacidad antioxidante sistémica, correlacionándolos con los hallazgos histopatológicos, en un grupo de pacientes con EHGNA, como forma de acercamiento a los mecanismos involucrados en la patogenia de esta enfermedad. Por ello es razonable plantear que si el estrés oxidativo está involucrado en la patogenia y progresión de la EHGNA, podemos esperar encontrar un aumento de los parámetros relacionados con estrés oxidativo y disminución de la

capacidad antioxidante en hígado y plasma de los pacientes con mayor grado de daño histológico hepático.

Materiales y métodos

Diseño. El presente es un estudio transversal en que se estudiaron, en un grupo de pacientes con EHGNA, parámetros relacionado con estrés oxidativo y actividad antioxidante hepática, además de la capacidad antioxidante del plasma, relacionándolos con el grado de alteraciones histológicas en hígado. La investigación se desarrolló en el contexto de un proyecto mayor (Fondecyt 1011047) sobre el rol del estrés oxidativo en la patogenia de la EHGNA.

Caracterización del grupo de estudio. A partir de un gran grupo sometido a gastroplastías terapéuticas con anastomosis gastroyeyunal entre abril del 2000 y septiembre del 2001 en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se seleccionaron 50 pacientes obesos (con índice de masa corporal promedio 43 kg/m^2), con edad promedio 41 años (rango 19-55 años) y de los cuales 10 eran varones y 40 mujeres. Para cada uno se realizó historia clínica y examen físico completos. Se tomaron muestras de sangre para medir los siguientes parámetros: actividad de transaminasas plasmáticas (AST y ALT), gama-glutamyl transferasa (GGT), fosfatasas alcalinas, bilirrubina, albúmina, colesterol total, LDL y HDL, glucosa, niveles de ferritina y saturación de transferrina. Además, se buscó la presencia de anticuerpos contra Virus Hepatitis B y C y autoanticuerpos (anti-nucleares, anti-mitocondriales y anti-musculo liso). Se tomaron biopsias de tejido hepático para estudio histológico y bioquímico.

Criterios de inclusión. Fueron seleccionados para este estudio los pacientes que en su muestra de tejido hepático tuvieron alteraciones histológicas compatibles con EHGNA.

Criterios de exclusión. Se descartaron los pacientes que consumían alcohol dos o más veces por semana, o que tuvieran algún examen sanguíneo sugerente de alguna enfermedad específica.

Muestras de hígado. Se obtuvieron biopsias hepáticas de aproximadamente 2 cm^3 para evaluación histológica y medición de parámetros relacionados con estrés oxidativo. Las muestras fueron fijadas con una solución de formaldehído al 10%, embebidas en parafina, cortadas y teñidas (Hematoxilina-Eosina y van Gieson). Se observaron al microscopio de luz, evaluando la presencia de alteraciones histológicas, incluyendo esteatosis, inflamación y fibrosis. De acuerdo con un código previamente definido ⁽¹²⁾, las muestras fueron separadas en tres grupos: (a) esteatosis, (b) esteatohepatitis y (c) esteatohepatitis con fibrosis.

Medición de enzimas antioxidantes. Las muestras fueron depositadas en papel filtro, pesadas y trozadas en hielo. La

actividad de SOD fue determinada en un homogeneizado hepático (10% p/v) preparado en 0,25M de sucrosa, midiendo en una solución alcalina la producción de un cromóforo con máxima absorbancia a 525 nm, que refleja el aumento del nivel de auto-oxidación de 5,6,6 a 11, b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxibezo(c)fluorano mediado por SOD ⁽¹³⁾. Los resultados fueron expresados como U/mg de proteínas, considerando que una unidad es definida como la actividad enzimática que duplica la auto-oxidación basal. Las actividades de CAT y GSH-Px fueron medidas en homogeneizados hepáticos 10% p/v preparadas en un buffer al 1,15% p/v de KCl 0,010M Tris a pH 7,4 y centrifugadas. La actividad de CAT fue establecida en el sobrenadante de 2400g, a través de la cinética de degradación del peróxido de hidrógeno a 240 nm y expresada en función de la velocidad de la constante de reacción de primer orden (k)/mg de proteínas. ¹⁴ La actividad de la GSH-Px fue medida en la fracción citosólica (100.000g) por un método espectrofotométrico basado en la reducción de glutatión disulfuro acoplada a la oxidación del NADPH por la glutatión reductasa. ¹⁵ La actividad de GSH-Px fue expresada como U/mg de proteínas (U= actividad enzimática que oxida un μmol de NADPH/minuto). La oxidación proteica del hígado fue medida por la oxidación de 2,4-dinitrofenilhidrazina con proteínas carbonilo y los resultados fueron expresados como nmol de carbonilo/mg de proteínas. ¹⁶

Medición de actividad antioxidante sistémica. Se evaluó a través de la capacidad plasmática reductora de hierro (Ferric Reducing Ability of Plasma; FRAP). ¹⁷

Reactivos. Fueron proporcionados por la Sigma-Aldrich (USA), Merck (Alemania) y Riedel-de Haen (Alemania), siendo de la más alta calidad.

Análisis estadístico. Los resultados fueron expresados como promedios \pm SEM. Para comparar los valores promedio se aplicaron el test de ANOVA y la prueba de comprobación múltiple de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un $p < 0,05$.

Aspectos éticos. El Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile aprobó el estudio de acuerdo con los criterios de Helsinki, versión de 2000. Se obtuvo un consentimiento informado de los pacientes para realizar los análisis.

Resultados

La mayoría de los pacientes seleccionados fueron asintomáticos, con perfil hepático y lipídico normal o levemente alterado. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros medidos entre los pacientes de los tres grupos.

El índice de oxidación de proteínas, la actividad de SOD, CAT y GSH-Px medida en hígado y FRAP de los pacientes

Tabla 1: Parámetros relacionados con estrés oxidativo en pacientes con EHGNA: Índice de oxidación de proteínas, actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, en hígado y capacidad antioxidante del plasma de los pacientes con EHGNA, según grado de daño histológico. Los valores están expresados como el promedio \pm SEM, para ocho pacientes por grupo

| Parámetro | Esteatosis | Esteatohepatitis | Esteatohepatitis y fibrosis |
|---|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| Índice de oxidación de proteínas (mmol carbonilos/mg proteínas) | 3.95 \pm 0.84 | 1.6 \pm 0.26* | 1.5 \pm 0.6* |
| Actividad SOD (U/mg proteínas) | 12.35 \pm 1.32 | 8.82 \pm 0.73* | 8.08 \pm 1.03* |
| Actividad CAT (U/mg proteínas) | 0.54 \pm 0.07 | 0.255 \pm 0.050* | 0.238 \pm 0.066* |
| Actividad GSH-Px (U/mg proteínas) | 0.081 \pm 0.010 | 0.064 \pm 0.009 | 0.053 \pm 0.007 |
| FRAP (μ M) | 608.6 \pm 16.4 | 516.5 \pm 19.7* | 537.5 \pm 11.2* |

SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GSH-Px: glutatión peroxidasa; FRAP: capacidad reductora férrica del plasma.

(*): diferencia estadísticamente significativa con respecto a esteatosis ($p < 0,05$).

con EHGNA se presenta en la tabla 1. La oxidación total de proteínas, establecido por el contenido de proteínas-carbonilo, en los pacientes con esteatosis fue un 147% más alta que en aquellos con esteatohepatitis, y un 163% mayor que en los con esteatohepatitis y fibrosis ($p < 0,05$).

La actividad específica de SOD y CAT fue un 29% y 53% más baja en el hígado de pacientes con esteatohepatitis, y en un 34% y 56% más baja en pacientes con esteatohepatitis y fibrosis, respectivamente, en comparación con aquellos con esteatosis ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la actividad de GSH-Px, aún cuando se observa una tendencia similar a las anteriores.

La capacidad antioxidante total del plasma, evaluada a través del FRAP, fue 15% menor en el subgrupo de pacientes con esteatohepatitis y 12% menor en aquellos con esteatohepatitis y fibrosis, en relación con los que tenían esteatosis.

Discusión

En este estudio se encontraron diferencias significativas en los parámetros relacionados con estrés oxidativo en hígado y plasma entre los grupos de pacientes con EHGNA con distinta severidad de cambios histológicos hepáticos.

En las muestras de hígado de pacientes con esteatosis se demostró una condición pro-oxidante significativamente mayor que en los otros grupos, reflejada a través de un mayor contenido de grupos carbonilo en proteínas. Este hallazgo contrasta con la mayor actividad de enzimas antioxidantes hepáticas, como son la SOD y CAT, que se encontró en este grupo, al compararlos con aquellos que se encontraban en estadios más avanzados de la enfermedad. De ello se puede desprender que la progresión desde esteatosis a esteatohepatitis con fibrosis se asocia a una marcada disminución de la capacidad antioxidante. Esta condición puede atribuirse al esta-

blecimiento de un estado pro-oxidante en la etapa de esteatosis que implica un aumento de la actividad de radicales libres, la que podría llevar a la inactivación de enzimas, favoreciendo la progresión de la enfermedad. Estudios *in vitro* han demostrado que tanto SOD como CAT¹⁸ pueden ser inactivadas por radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlet. Por otra parte, también podría contribuir a esta disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, el progresivo déficit funcional que se asocia al daño hepático, que afecta de manera especial la síntesis de proteínas.

Además, se objetivó una disminución de la actividad antioxidante sistémica, reflejada por una menor FRAP en pacientes con esteatohepatitis y esteatohepatitis con fibrosis, al compararlos con aquellos con esteatosis. Este hallazgo también puede ser consecuencia del ambiente oxidante que se desarrolla en los pacientes con esteatosis, que exige de manera excesiva a los mecanismos protectores y probablemente implica un consumo exagerado de antioxidantes a nivel celular y sanguíneo. La disminución de la actividad antioxidante sistémica que se observa en etapas avanzadas de la EHGNA podría ser tanto una consecuencia del consumo de antioxidantes en etapas precoces de la enfermedad, como de una menor producción de factores protectores asociados a la disfunción hepática en estadios más severos de la EHGNA.

En el contexto de un ambiente pro-oxidante, el hierro actúa como catalizador de la producción de radicales libres; además, se une a las proteínas permitiendo su interacción con EROs, lo que lleva finalmente a la formación de grupos carbonilo¹⁹ Por lo tanto, la sobrecarga de hierro, condición con frecuencia encontrada en pacientes con EHGNA,²⁰ podría exacerbar el fenómeno de oxidación de proteínas, con la consiguiente pérdida funcional. Esto se puede relacionar tanto con la mayor proporción de proteínas oxidadas, a pesar de una elevada actividad antioxidante encontrada

en los pacientes con esteatosis, como con la menor actividad de SOD y CAT y menor capacidad plasmática para reducir hierro que se observa en esteatohepatitis y esteatohepatitis con fibrosis. En pacientes con EHGNA no relacionada con hemocromatosis se ha observado una tendencia a la normalización de los niveles de ALT sérica, luego de la depleción de hierro inducida por flebotomía;²¹ estos hallazgos dan sustento a la participación de este metal oxidante en la patogénesis de la EHGNA.

A pesar de la menor actividad antioxidante en hígado y plasma encontrada en pacientes con esteatohepatitis y esteatohepatitis con fibrosis, el índice hepático de oxidación de proteínas fue significativamente menor en este grupo comparado con los que tenían esteatosis. Estudios previos han reportado que la oxidación de proteínas mediada por EROs, aumenta su susceptibilidad a proteólisis.¹⁹ Este fenómeno podría tener un comportamiento bifásico, aumentando en etapas precoces la proporción de proteínas oxidadas, en función del aumento de actividad pro-oxidante y luego disminuyendo, probablemente por un aumento de la actividad proteolítica.

El desarrollo de estrés oxidativo en el hígado de pacientes con esteatosis puede activar, en las células de Küpffer y células estrelladas, factores de transcripción, los que a su vez inducen la síntesis de mediadores proinflamatorios y fibrogénicos, favoreciendo la progresión de la EHGNA.⁸ Un estudio en pacientes con EHGNA tratados con α -tocoferol, demostró una mejoría significativa de los niveles séricos de AST, GGT, fosfatasas alcalinas, TGF- β_1 (secretado por células de Küpffer y células estrelladas) y del grado histológico de inflamación y fibrosis luego del tratamiento con este antioxidante.²² Este último apoya la participación del estrés oxidativo como mecanismo patogénico indirecto en la EHGNA. En pacientes y modelos animales de esteatohepatitis no alcohólica se ha demostrado un aumento del número y actividad de las células de Küpffer²³ y que el estrés oxidativo crónico precede la activación de células estrelladas y la expresión de genes profibrogénicos,²⁴ fenómenos que pueden ser inhibidos con el uso de α -tocoferol, pero no por precursores del glutatión.²⁵

En lo que respecta al tratamiento, no existe actualmente una medicación efectiva, por lo que las medidas de reducción paulatina de peso, control de la glicemia y abstinencia alcohólica son las que por ahora han demostrado mayor eficacia en el control de la entidad, al menos con mejoría de los parámetros biológicos. Sin embargo, últimamente se ha demostrado el beneficio de ciertas sustancias antioxidantes en la atenuación de la progresión de esta enfermedad. Ejemplo de esto, el probucol, un reconocido agente antioxidante, que disminuiría, a dosis bajas, los niveles de transaminasas en pacientes con EHGNA.²⁶

Una de las limitaciones del estudio es la falta de controles, sin alteraciones histológicas hepáticas, para comparar los niveles de estrés oxidativo y capacidad antioxidante. Este hecho resulta de la dificultad para conseguir las muestras,

dado que requeriría realizar procedimientos invasivos, con potenciales riesgos, en sujetos sin enfermedad hepática. Podemos concluir que los parámetros relacionados con estrés oxidativo están alterados en el hígado de pacientes con EHGNA, a pesar de tener sólo leves anormalidades en las pruebas hepáticas. Los cambios en la condición redox de estos pacientes incluyen el desarrollo de una significativa condición pro-oxidante en etapas tempranas de la EHGNA y alteración en algunos de los principales mecanismos enzimáticos antioxidantes hepáticos y disminución de la capacidad antioxidante sistémica en etapas avanzadas de la enfermedad. Estos datos sugieren, al igual que estudios previos^{17, 20} que el soporte nutricional con antioxidantes podría ser útil en la prevención del daño hepático y/o progresión de la EHGNA. En el futuro sería necesaria la realización de nuevos estudios en relación a la patogenia de la EHGNA para complementar los hallazgos de este estudio.

Agradecimientos

A los técnicos del Laboratorio de Fisiopatología renal de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, señores Diego Soto y Claudio Vilches. A nuestros asesores por su orientación y valiosos comentarios. A la Dra. Laura Carreño por su colaboración en la interpretación histológica.

Summary

The non-alcoholic fatty liver disease's progression is associated to obesity and hepatic oxidative stress. The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a clinical and histological entity whose etiology seems to be multifactorial, and its contributory mechanisms are poorly understood. Evidence suggests that oxidative stress is developed in the liver of NAFLD patients. The aim of this study was to assess hepatic and plasma parameters related to oxidative stress as a function of histological findings of NAFLD. Fifty patients with NAFLD were studied (male/female, 10/40; average age, 41 years). We measured in liver samples, the following: Protein carbonyl content (as index of protein oxidation), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and the ferric reducing ability of plasma (FRAP). We found livers with 32% steatosis, 34% steatohepatitis, and 34% steatohepatitis and fibrosis. In patients with steatosis there was a 147% more protein oxidation than in those with steatohepatitis and 163% higher than in those with steatohepatitis and fibrosis ($p < 0.05$). Liver SOD (29-34% reduction), CAT (53-56% reduction), and FRAP (15-12% reduction) were each significantly lower ($p < 0.05$) in patients with steatohepatitis and fibrosis than in those with steatosis, without changes in hepatic GSH-Px. Conclusions: Higher oxidative stress status is an early event in NAFLD, developed in the liver of patients with steatosis, which may lead, by proteolysis of the modified proteins, to subsequent depression of the antioxidant capacity of the liver and plasma and diminished protein oxidation, as we can see in advanced stages of NAFLD.

Key words: Liver, oxidative stress, proteins oxidation, antioxidant capacity of serum

Referencias

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-31.
2. Ponichik J. Esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica. *Gastr Latinoam* 2002; 13:-12 , 55-8.
3. Ponichik J, Mancilla C, Contreras J. Obesidad: factor de riesgo para esteatohepatitis y fibrosis hepática. *Rev Méd Chile* Julio 2002; 130: 731-736.
4. Estévez Muñoz JC, Carreño Freire P. Anticonceptivos orales y esteatosis hepática no alcohólica. *Aten Primaria* 2002; 29: 195-9.
5. Vío F, Albala C. Obesidad en Chile: una mirada epidemiológica. En: Albala C, Kain J, Burrows R, Díaz E. Obesidad: un desafío pendiente. Santiago: Editorial Universitaria, 2000; 31-43.
6. Chitturi S, George J. Interaction of iron, insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol Rep* 2003;5: 18-25.
7. Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000;32: 39-47.
8. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *New Engl J Med* 2000;343:1467-76.
9. Weltman MD, Farrel GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998;27:128-33.
10. Cortez-Pinto H, Filipe P, Camilo ME, Baptista A, Fernandes A et al. A peroxidação dos lípidos na esteatohepatite não alcoólica: relação com a esteatose. *J Português Gastroenterol* 1999;6: 234-40.
11. Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, Tuccillo C, Ascione A et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol* 2001;35:568-74.
12. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-tetri BA. Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-9.
13. Nebot C, Moutet M, Huet P, Xu JZ, Chaudiere J. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem* 1993; 214:442-51.
14. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. Volume 2, 2nd ed. New York: Academic Press, Inc., 1974: 673-8.
15. Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
16. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-36.
17. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-6.
18. Escobar JA, Rubio M, Lissi EA. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* 1996;20:285-90.
19. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990;9:315-25.
20. George DK, Goldwurm S, Macdonald GA, Cowley LL, Walker NI et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:311-318.
21. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:931-939.
22. Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor- β 1 level and efficacy of α -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Alimen Pharmacol Ther* 2001;15:1667-1672.
23. Fan J, Zhong L, Wang G, Wu X, Li M et al. The role of Kupffer cells in non-alcoholic steatohepatitis of rats chronically fed with high-fat diet. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001;9:16-18.
24. Pera N, Phung N, Leclercq I, Farrell GC, George J. The role of oxidative stress in the evolution of hepatic fibrogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001;34:455A.
25. Phung N, Farrell GC, Robertson G, George J. Vitamin E but not glutathione precursors inhibits hepatic fibrosis in experimental NASH exhibiting oxidative stress and mitochondrial abnormalities. *Hepatology* 2001;34:361A.
26. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Hormazdi M, Naserimoghadam S, Mikaeli J, Farahvash MJ, Ansari R, Sotoudehmanesh R, Khatibian M. Probucon in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: an open-labeled study. *J Clin Gastroenterol* 2003 Mar;36(3):266-8.