

Mecanismos Fisiopatológicos Envolvidos no Desenvolvimento da Esteatohepatite Não Alcoólica

ARTHUR WAGNER PIMENTEL DE SOUSA¹, MARIA SALETE TRIGUEIRO DE ARAÚJO²,
MÔNICA SOUZA DE MIRANDA HENRIQUES³

¹Estudante do curso de Medicina da Universidade Federal da Paraíba (UFPB); ² Professora Adjunta de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba (FCMPB); ³ Professora Adjunta do Departamento de Medicina Interna, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

• **Autor para correspondência:**

Mônica Souza de Miranda Henriques

Email: mrsmonicca@gmail.com

Resumo

A doença hepática gordurosa não alcoólica tem sido considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular, estando associada a maiores riscos cardiovasculares e endócrino-metabólicos. Desta forma, torna-se necessário ampliar o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sua gênese e progressão. **Objetivo:** Retratar as principais vias e citocinas inflamatórias envolvidas, descrevendo o estado atual das pesquisas nesta área. **Método:** Realizou-se uma revisão sistemática com busca ativa nas bases de dados Medline, Embase, Lilacs e Pubmed, através dos seguintes descritores: esteatohepatite não alcoólica, fisiopatologia, citocinas, e mecanismos moleculares. **Resultados:** Foram encontrados 178 artigos relacionados ao tema, dos quais 55 foram selecionados, por se tratarem de artigos originais, pesquisas clínicas e experimentais e revisões sistemáticas. **Conclusões:** As citocinas mais amplamente descritas e estudadas na patogênese da esteatohepatite não alcoólica são a adiponectina, leptina, TNF- α , Il-6, visfatina, fundamentais para o desenvolvimento de novas modalidades diagnósticas e estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica, Mediadores inflamatórios, Estresse oxidativo.

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease has been considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome, may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma and is associated with increased cardiometabolic risk. Thus, it becomes necessary to understand the underlying mechanisms involved in its genesis and progression. Objective: Review the main pathways and inflammatory cytokines involved, describing the current state of clinical and experimental research in this area. Method: We conducted a systematic review with active search of Medline, Embase, Lilacs and Pubmed data basis, using descriptors related to nonalcoholic steatohepatitis, pathophysiology, cytokines and molecular mechanisms. Results: A total of 178 articles were found, but only 55 were selected, including, original articles, clinical and experimental research and systematic reviews. Conclusions: The most widely studied and described cytokines were adiponectina, leptin, TNF- α , IL-6, visfatin. This knowledge has become fundamental for the development of new diagnostic procedures and therapeutic strategies.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Inflammatory mediators, Oxidative stress.

A importância clínica da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem crescido nos últimos anos, principalmente em consequência da epidemia de obesidade, sedentarismo e dieta hipercalórica adotada por pessoas de países ocidentais, refletindo o aumento de doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas. A prevalência de DHGNA varia de 2,8% a 88 %, dependendo da população estudada e dos métodos de investigação. Os principais fatores de risco associados à síndrome metabólica são obesidade abdominal, resistência à insulina, diabetes e dislipidemia. Curiosamente, DHGNA também pode ser descrita em pacientes não obesos e não diabéticos^{3,4}.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma importante complicação da obesidade, sendo reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica. O processo ocorre em crianças e adultos e é caracterizado pela presença de quantidades aumentadas de gordura no fígado (esteatose). Com a inflamação, morte celular e fibrose, o processo pode resultar em estágio final da doença hepática, ou ser um precursor para o carcinoma hepatocelular. O excesso de gordura hepática é agora reconhecido como um marcador independente para o aumento do risco cardiovascular¹.

A DHGNA é uma doença espectral e está subdividida em dois grupos principais, de acordo com seus aspectos clínico-morfológicos básicos: esteatose hepática ou simplesmente fígado gorduroso e a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). O primeiro estado caracteriza-se pelo acúmulo lipídico nos hepatócitos. Essa gordura heterotópica desencadeia graus variáveis de fenômenos necroinflamatórios, o que corresponde à esteato-hepatite, condição associada à doença progressiva².

Vários fatores estão provavelmente envolvidos nos mecanismos patogênicos, que, juntos, criam uma rede de interações que participam tanto no desenvolvimento quanto na progressão da doença^{6,33}.

Os mecanismos fisiopatogênicos da DHGNA continuam sob investigação, todavia o acúmulo de triglicérides no interior dos hepatócitos, resultado da resistência insulínica, é considerado o primeiro passo no modelo patogênico^{33,39}. O estresse oxidativo, resultante da oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, e a expressão de citocinas inflamatórias têm sido apontados como fatores causais secundários, que levam à agressão hepática, à fibrose e à inflamação^{5,6,33,35,36}.

O acúmulo intra-hepático de ácidos graxos está intimamente relacionado com a resistência à insulina, e aumenta a susceptibilidade

dos hepatócitos a agressões, como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, a superprodução e a liberação de citocinas pró-inflamatórias secundárias, bem como a ativação mediada por endotoxinas da resposta imune inata³⁴⁻³⁶. O aumento da suscetibilidade a esses fatores também pode explicar a progressão da DHGNA para EHNA^{6,39}.

A resistência insulínica desempenha papel central na patogênese da DHGNA. É definida como uma resposta inadequada aos efeitos fisiológicos da insulina circulante nos tecidos-alvos específicos, músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. As citocinas inflamatórias ativam várias quinases, como a serina quinase IKK β , mTOR/S6 quinase e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), como também proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCs) que interferem na via de sinalização e ação da insulina nos adipócitos e hepatócitos⁷.

Alterações moleculares na sinalização da insulina, finalmente, resultam no acúmulo de triglicerídeos hepáticos. No músculo esquelético, a resistência insulínica periférica afeta, principalmente, grande parte da captação de glicose total⁸.

No tecido adiposo, essa resistência diminui a ação lipogênica da insulina, com consequente liberação de ácidos graxos não esterificados; ou seja, a resistência insulínica aumenta a lipólise dos triglicerídeos e inibe a esterificação de ácidos graxos livres no tecido adiposo. O resultado é o aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, que são absorvidos pelo fígado⁹. Elevadas concentrações plasmáticas de glicose e de ácidos graxos resultam no aumento da captação hepática dos lipídeos. Esse aumento da oferta de ácidos graxos no fígado compromete a β -oxidação mitocondrial, por estresse no sistema enzimático. Como resultado, tais substâncias acumulam-se no hepatócito, determinando o surgimento da esteatose hepática¹⁰. Adicionalmente, a resistência insulínica também inibe o metabolismo alternativo dos ácidos graxos livres (AGLs), através da oxidação. A exportação hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) pode ser inibida com a diminuição da síntese da apolipoproteína B (Apo B) e menor conjugação desta com os triglicerídeos, pela proteína de transferência microsossomal de triglicéride (MTP)¹¹.

Em resumo, o acúmulo de gorduras no tecido hepático desenvolve-se a partir do aumento da oferta de ácido graxos livres, da redução da oxidação, do aumento da lipogênese hepática e da redução da exportação hepática dos triglicerídeos via VLDL, resultantes da resistência periférica à insulina e da hiperinsulinemia³⁸.

Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre os mecanismos fisiopatológicos da DHGNA.

Descrever as principais vias inflamatórias e citocinas envolvidas no processo evolutivo da esteatose hepática e esteato hepatite não alcoólica.

Método

Foi realizada uma busca ativa nas principais bases de dados (Medline, Embase, Lilacs, Pubmed), utilizando-se como descritores as seguintes palavras: esteatohepatite não alcoólica, fisiopatologia, citocinas e mecanismos moleculares.

Resultados

Entre os anos de 1998 a 2014, foram encontrados 178 artigos estritamente relacionados ao tema. Destes, 55 artigos originais foram selecionados para a revisão, envolvendo estudos clínicos e experimentais, bem como artigos de revisão, revisão sistemática e metanálises de maior relevância científica para o tema.

Discussão

O papel do tecido adiposo e das citocinas

As citocinas são moléculas solúveis que estão envolvidas na comunicação intracelular e são produzidas por uma grande variedade de células no corpo, incluindo as células hepáticas. Compreendem subfamílias diversas, incluindo interferon, interleucinas, fatores de necrose tumoral (TNF), fator transformador de crescimento (TGF), fatores estimulantes de colônia, e quimiocinas¹². As citocinas podem mediar vários processos biológicos fundamentais, incluindo o crescimento corporal, adiposidade, lactação, a hematopoiese, bem como a inflamação e imunidade. Estão implicadas em várias patologias, tais como artrite, aterosclerose, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, a psoríase, assim como na DHGNA¹³.

Sob condições fisiológicas, a geração hepática de citocinas constitutivas é ausente ou mínima no fígado. No entanto, estímulos patológicos, tais como acúmulo de lipídios, induzem as células hepáticas a produzirem essas moléculas inflamatórias. As citocinas podem desempenhar um papel ativo no desenvolvimento e progressão da DHGNA através da estimulação da inflamação hepática, da ne-

crose celular, apoptose, e indução de fibrose (Quadro 1). No entanto, elas também são essenciais para a regeneração hepática¹³.

Quadro 1: Papel de diferentes citocinas na DHGNA

Citocina	Atividade biológica em modelos experimentais	Atividade biológica em humanos
Leptina	Pró-inflamatória Ativação célula estrelada	Não se eleva na DHGNA, sem correlação com histologia
Adiponectina	Anti-inflamatória	Mais baixa na DHGNA do que em controles; relação inversa com fibrose
Resistina	Pró-inflamatória	Elevada na EHNA, possivelmente associada à fibrose
TNF- α	Pró-inflamatória	Elevada na EHNA, correlaciona-se com a fibrose
IL-6	Incerta	Estudos em andamento
Visfatina	Incerta	Estudos em andamento

Fonte: Adaptado de Tsochatzis et al., 2009.

O tecido adiposo total dos mamíferos é composto de dois tipos funcionais distintos: o tecido adiposo branco e o marrom. O primeiro é o sítio de estoque de energia e liberação de hormônios e citocinas que modulam o metabolismo corporal e a resistência insulínica. Seu acúmulo está associado à obesidade. Por outro lado, o tecido adiposo marrom, rico em mitocôndrias, é importante para o gasto energético na forma de termogênese, visto que pode modular a suscetibilidade para o ganho de peso corporal. Fisiologicamente, concentra-se mais em crianças, mas pode ser encontrado também no tecido adiposo de adultos^{14,15}.

Acredita-se que o tecido adiposo visceral desempenha um papel crucial na patogênese da esteatose hepática, uma vez que participa na produção de mais adipocitocinas, tais como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), resistina, e adiponectina, que estão envolvidas na indução de resistência à insulina e graus variáveis de inflamação. Diversas abordagens terapêuticas, como perda de peso e o uso de sensibilizadores de insulina, são usadas visando diminuir a liberação de citocinas derivadas do tecido adiposo, reduzindo, assim, o aporte de ácidos graxos livres para o fígado¹⁶.

A leptina é um peptídeo hormonal derivado dos adipócitos e relacionada com a ingestão alimentar e o gasto de energia, controlando o peso corpóreo e a saciedade através de mecanismo de *feedback* negativo hipotalâmico¹⁷⁻¹⁹.

Seus níveis séricos são elevados na obesidade²⁰, como um resultado do que tem sido caracterizado como resistência à leptina, fenômeno que pode já estar presente em crianças obesas²¹.

A adiponectina é a citocina mais abundante, sintetizada exclusivamente pelo tecido adiposo^{20,22}. Age estimulando a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), por exemplo, que bloqueia a ativação do fator nuclear kappa β (NF κ β) e inibe a liberação do TNF- α e interleucina-6²³. No fígado, atua através da MAPK, do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma-alfa (PPAR- α) e pela inibição da sinalização dos *Toll-like receptors* 4 (TLR-4). Há evidências de que a adiponectina diminui a resistência insulínica hepática e sistêmica, atenua a necroinflamação e a fibrose hepática, e é considerada um elemento indicativo de gravidade para a DHGNA²⁴⁻²⁶.

Drogas que aumentam os níveis de adiponectina podem ser consideradas alvos terapêuticos para DHGNA. A identificação de moléculas envolvidas nas vias de sinalização da adiponectina e o papel potencial da resistência dos seus receptores na EHNA têm sido pouco investigados e podem ser promissores no tratamento da doença^{22,26}.

A resistina é uma citocina secretada pelo tecido adiposo e pelos macrófagos, que provavelmente age como antagonista da insulina, contribuindo com o desenvolvimento da intolerância à glicose em obesos. Evidências sugerem ação pró-inflamatória dessa citocina, estimulando TNF- α e Interleucina-12 (IL-12) nos macrófagos, através do NF κ β ²⁰. Em humanos, seus níveis são elevados e podem servir para discriminar esteatose de esteatohepatite²⁷.

O TNF- α é produzido por linfócitos B, T (*Natural Killer*), macrófagos e fibroblastos e desempenha papel central na evolução da DHGNA para EHNA²⁸. Essa denominação remete à sua propriedade biológica de induzir necrose hemorrágica em certos tumores. Sintetizada sob a forma inativa, ela se torna tóxica no tecido, induzindo necrose e angiogênese. Em baixas concentrações, o TNF- α estimula o crescimento celular. Por outro lado, em concentrações elevadas, inibe o desenvolvimento celular induzido por outras citocinas, cujos níveis elevados estão associados à obesidade e à resistência insulínica em modelos animais e humanos²⁰. Essa citocina apresenta efeito lipogênico e fibrogênico, mediado por mecanismo parácrino que envolve a ativação das células de Kupffer com secreção de mediadores solúveis, que estimulam a transformação da célula de Ito em miofibroblasto, que, por sua vez, passa a sintetizar componentes da matriz extracelular, podendo ser usado no diagnóstico da DHGNA/EHNA²⁹.

O estresse oxidativo é um dos responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais se destacam: TNF- α , fator transformador de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β), interleuci-

na-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), NFκB e adiponectina. Essas citocinas são produzidas por linfócitos e células de Kupffer, através de mecanismos mediados por radicais livres, e podem agir alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial e inibindo a cadeia respiratória^{28,37}.

O polimorfismo genético tem sido descrito em pacientes com DHGNA e na EHNA. Ratos geneticamente deficientes para o receptor TNF-α mostraram-se resistentes ao desenvolvimento da EHNA²⁰.

Embora a inibição do TNF-α em modelos animais de DHGNA tenha encorajado perspectivas terapêuticas em humanos, o papel desta citocina permanece alvo de investigação²⁹. Em pacientes, os níveis de TNF-α mostraram-se mais elevados em obesos do que nos indivíduos magros, e foram correlacionados com a resistência à insulina. Além disso, uma correlação positiva foi demonstrada entre o grau de fibrose hepática e níveis circulantes de TNF-α em pacientes com EHNA⁴⁰.

Também conhecido por monóxido de nitrogênio e monóxido de azoto, o óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, altamente lipofílico, sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos e alguns neurônios cerebrais⁴¹. O NO é produto enzimático formado a partir da L-arginina, sob a ação catalítica da enzima sintase do óxido nítrico (SNO), que gera concentrações equimolares de L-citrulina e NO. É uma importante molécula de sinalização intracelular e extracelular, que atua induzindo a guanilato-ciclase e produzindo o monofosfato cíclico de guanosina (GMP), que tem como efeito, entre outros, o relaxamento do músculo liso, o que provoca, como ações biológicas, a vasodilatação e a broncodilatação⁴¹.

O óxido nítrico é capaz de potencializar a citotoxicidade causada pelo estresse oxidativo através da reação entre o ânion superóxido e a formação da nitrotirosina, cujo acúmulo intra-hepático está associado à severidade da esteato-hepatite, o que sugere, fortemente, que a agressão oxidativa está implicada na patogênese dessa doença. Estudos em camundongos obesos têm demonstrado que, na esteatose grave, a lesão hepática é mediada pelo TNF-α e Interferon-γ. Isso demonstra que citocinas inflamatórias estão diretamente envolvidas na regulação positiva mediada pelo óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). A expressão de receptores para iNOS, por método de imunistoquímica, mostrou-se fortemente positiva em hepatócitos de camundongos e ratos submetidos à dieta hiperlipídica⁴¹.

Na vasculatura hepática, a resistência insulínica pode ser detectada mais precocemente do que a inflamação ou qualquer outro sinal na DHGNA. A administração de uma dieta hiperlipídica induz resistência insulínica no endotélio dos sinusóides hepáticos, que é mediada, pelo menos em parte, através da regulação positiva de iNOS⁴².

Evidências atuais têm destacado o papel do óxido nítrico como

alvo terapêutico, por sua participação no controle do metabolismo glicêmico e lipêmico, além das já conhecidas ações sobre a transmissão neuronal, o relaxamento vascular, a modulação imunológica e a citotoxicidade. O bloqueio da SNO reduziu a adiposidade e melhorou a resistência insulínica em modelo de obesidade experimental em ratos, alimentados com dieta lipídica⁴⁴.

Dentre as isoformas de NO sintase, a indutível tem sido associada a respostas de uma série de estímulos inflamatórios, como aqueles produzidos por citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas bacterianas. A iNOS modula a secreção de grandes quantidades de NO, podendo contribuir para o desenvolvimento da obesidade relacionada à intolerância à glicose^{41,43}. Um papel-chave para iNOS, na patogênese da obesidade ligada à resistência à insulina, tem sido apoiado por observações de que a interrupção do alvo de iNOS protege contra a resistência à insulina do músculo e melhora a ação sistêmica da insulina em ratos obesos⁴⁵. O bloqueio da iNOS, em camundongos, também protegeu contra os efeitos adversos associados ao alto teor de gordura, em estados de resistência à insulina⁴⁶ e em modelo de obesidade geneticamente determinada⁴⁷. Além disso, essa enzima foi induzida no músculo esquelético e tecido adiposo de pacientes diabéticos tipo 2^{48,49}, cuja expressão se correlacionou com a ocorrência de resistência à insulina⁴⁹ e à obesidade⁴⁸.

A fetuína é uma glicoproteína produzida pelo fígado e secretada no plasma. Age fisiologicamente como inibidor da deposição ectópica de cálcio. A fetuína-A tem a capacidade de se ligar e inibir o receptor e a via de sinalização da insulina no músculo esquelético e nos hepatócitos⁵⁰. Em humanos, níveis séricos elevados dessa glicoproteína foram associados à obesidade, à resistência insulínica, ao diabetes e à DHGNA. A fetuína-A e a adiponectina agem em conjunto para regular a resistência insulínica, e seus níveis séricos estão inversamente correlacionados. Estudo em cultura de adipócitos mostrou que essa glicoproteína inibe a codificação do ácido ribonucleico (RNAm) da adiponectina⁵¹.

A resistina é uma citocina secretada pelo tecido adiposo e pelos macrófagos, que provavelmente está relacionada à resistência insulínica em obesos. Evidências sugerem ação pró-inflamatória dessa citocina, estimulando TNF- α e Interleucina-12 (IL-12) nos macrófagos, através do NF κ B^{17,20}.

Outra adipocitocina, ricamente encontrada no tecido adiposo visceral, a visfatina apresenta propriedades imunomoduladoras, promove a maturação das células B e a ativação de leucócitos, síntese e adesão de moléculas, além da produção de citocinas pró-inflamatórias. É uma molécula insulino-mimética, que reduz os níveis de

glicose e regula o balanço energético⁵².

Estudo recente revelou significativa redução nos níveis de visfatina no tecido adiposo de pacientes com DHGNA, colocando em evidência a participação de mais essa adipocitocina no cenário patogênico da doença^{53,54}.

A apelina é uma adipocitocina cuja concentração plasmática encontra-se aumentada na obesidade, e se relaciona com a resistência insulínica e hiperinsulinemia. No sistema cardiovascular, induz relaxamento endotelial mediado pelo óxido nítrico, reduzindo a pressão arterial, associada a uma atividade inotrópica positiva⁵⁵.

Papel da microbiota intestinal

A transição da DHGNA para EHNA é regida, em parte, por fatores sistêmicos, produtos de origem bacteriana, ligantes TLR e produtos metabólicos que chegam ao fígado através da veia porta. A DHGNA está associada com aumento da permeabilidade do epitélio intestinal às bactérias e seus componentes, podendo ser detectados na veia porta e na circulação sistêmica^{31,32}.

Na obesidade, a comunicação afinada entre o epitélio intestinal e a microbiota intestinal torna-se desequilibrada, consequência dos desequilíbrios na composição da microbiana intestinal.

A microbiota intestinal comunica-se com as células epiteliais através de moléculas de superfície (TLR4, CD14, TLR5) e também por moléculas intracelulares (TLR9, NLRP3/6-ASC-caspase 1 inflammasome) através de receptores/ligantes específicos³⁰.

Evidências recentes sugerem que a microbiota e/ou seus produtos não apenas afetam o fígado através de veia porta, mas também órgãos periféricos como tecido adiposo, levando à chamada infecção metabólica, importante fator da DHGNA/EHNA³².

Conclusões

A patogênese da DHGNA é multifatorial, e o desenvolvimento de EHNA representa um processo complexo que não está completamente compreendido. Tem sido sugerido que seu desenvolvimento ocorre em múltiplas etapas paralelas. As citocinas mais amplamente descritas e estudadas na patogênese da esteatohepatite não alcoólica são a adiponectina, leptina, TNF- α , Il-6, visfatina. O conhecimento desses mediadores inflamatórios é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas modalidades diagnósticas e estratégias terapêuticas. A patogênese da DHGA é multivariada, entretanto, estudos atuais têm destacado o papel da microbiota intestinal da patogênese da esteatohepatite não alcoólica. Polimorfismos genéticos têm sido descritos como fatores determinantes para o desenvolvimento da doença.

1. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;13:195-203.
2. Brunt E. M. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2009;13(4):533-544.
3. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 2013 Jul 1;178(1):38-45.
4. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011 Jan-Mar;10(1):33-7.
5. Day CP, James OF. Steatohepatitis: tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998 Apr;114(4):842-5.
6. Day CP. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):255-260.
7. Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Jan 8;3:181.
8. Leavens KF, Birnbaum MJ. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2011 Jun;46(3):200-15.
9. Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 2010 Apr 28;9:42.
10. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 May;19(4):291-302.
11. Higuchi N, Kato M, Tanaka M, Miyazaki M, Takao S, Kohjima M. et al. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med*. 2011 Nov;2(6):1077-1081.

12. Tilg H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):179-85.
13. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology.* 2009 Sep;50(3):957-69.
14. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1509-17.
15. Cypess AM, Kahn CR. The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis. *Curr Opin Pediatr.* 2010 Aug;22(4):478-84.
16. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatr.* 2013;13:40.
17. Singh A, Wirtz M, Parker N, Hogan M, Strahler J, Michailidis G. et al. Leptin- mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Aug 4;106(31):13100-5.
18. Minokoshi Y, Toda C, Okamoto S. Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012 Dec;16(Suppl 3):S562-8.
19. Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2009;13:980S-984S.
20. Tsochatzis, EA, Papatheodoridis, GV, Archimandritis, AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators of inflammation* 2009:8.
21. Stringer DM, Sellers EA, Burr LL, Taylor CG. Altered plasma adipokines and markers of oxidative stress suggest increased risk of cardiovascular disease in First Nation youth with obesity or type 2 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2009;13:269-277.
22. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2011 Jun 21;17(23):2801-11.

23. Moschen AR, Wieser V, Tilg H. Adiponectin: key player in the adipose tissue-liver crosstalk. *Curr Med Chem.* 2012;19(32):5467-73.
24. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2011 Mar;60(3):313-26.
25. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab.* 2010 May;12(5):365-83.
26. Finelli C, Tarantino G. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol.* 2013 Feb 14;19(6):802-12.
27. Senates E, Colak Y, Yeşil A, Coşkunpinar E, Sahin O, Kahraman OT. et al. Circulating resistin is elevated in patients with non-alcoholic fatty liver disease and is associated with steatosis, portal inflammation, insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis scores. *Minerva Med.* 2012 Oct;103(5):369-76.
28. Hijona E, Hijona L, Arenas JI, Bujanda L. Inflammatory mediators of hepatic steatosis. *Mediators Inflamm.* 2010:837419.
29. Zahran WE, Salah El-Dien KA, Kamel PG, El-Sawaby AS. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Indian J Clin Biochem.* 2013 Apr;28(2):141-6.
30. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Nov; 24(11):537-45.
31. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K. et al. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Res.* 2013 Jul 9;44(8): 920-34.
32. Schnabl B, Brenner DA. Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology* 2014 Jan 15;146(6):1513-1524.
33. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative

- stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci.* 2013 Oct 15;14(10):20704-28.
34. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acids and endotoxin activate inflammasome in hepatocytes which release danger signals to activate immune cells in steatohepatitis. *Hepatology* 2011 July;54(1):133-144.
35. Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of Free Radicals and Oxidative Stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res.* 2013 Sep 5;47(11):869-880.
36. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58(4):1497-507.
37. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2013 Aug 29;65:952-968.
38. Shifflet A, Wu GY. Non-alcoholic steatohepatitis: an overview. *J Formos Med Assoc.* 2009 Jan;108(1):4-12.
39. Podrini C, Borghesan M, Greco A, Paziienza V, Mazzoccoli G, Vinciguerra M. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Pharm Des.* 2013;19(15):2737-46.
40. Lesmana CR, Hasan I, Budihusodo U, Gani RA, Krisnuhoni E, Akbar N, Lesmana LA. Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis.* 2009 Aug;10(3):201-6.
41. Ha SK, Chae C. Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. *Exp Anim.* 2010;59(5):595-604.
42. Pasarín M, Abraldes JG, Rodríguez-Vilarrupla A, La Mura V, García-Pagán JC, Bosch J. Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD. *J Hepatol.* 2011 Nov;55(5):1095-102.
43. Dallaire P, Bellmann K, Laplante M, Gélinas S, Centeno-Baez C, Penfornis P. et al. Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-

-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes* 2008 Aug;57(8):1999-2011.

37

44. Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, Iwashima F, Yoshimoto T, Shichiri M. et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):4548-56.

45. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Sep;291(3):E476-82.

46. Noronha BT, Li JM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes* 2005 Apr;54(4):1082-9.

47. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 2005 May;54(5):1340-8.

48. Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, Böhnke J, Ghose N, Lindschau C. et al. Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res*. 2004 Sep;45(9):1640-8.

49. Torres SH, De Sanctis JB, de L Briceño M, Hernández N, Finol HJ. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol*. 2004 Jun;181(3):419-27.

50. Memoli B, De Bartolo L, Favia P, Morelli S, Lopez LC, Procino A. et al. Fetuin-A gene expression, synthesis and release in primary human hepatocytes cultured in a galactosylated membrane bioreactor. *Biomaterials* 2007 Nov;28(32):4836-44.

51. Ix JH, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Mar;21(3):406-12.

52. Kukla M, Mazur W, Bułdak RJ, Zwirska-Korczala K. Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines-visfatin, chemerin and vaspin in chronic hepatitis. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1397-410.

53. Gaddipati R, Sasikala M, Padaki N, Mukherjee RM, Sekaran A, Ja-

yaraj-Mansard M. et al. Visceral adipose tissue visfatin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2010 Jul-Sep;9(3):266-70.

54. Auguet T, Terra X, Porras JA, Orellana-Gavaldà JM, Martinez S, Aguilar C. et al. Plasma visfatin levels and gene expression in morbidly obese women with associated fatty liver disease. *Clin Biochem.* 2013 Feb;46(3):202-8.

55. Aktas B, Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO. et al. Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011 Apr;60(4):544-9.