

PAPEL FISIOPATOGENICO DE NADPH OXIDASA
HEPÁTICA EN PACIENTES CON HÍGADO GRASO
NO ALCOHÓLICO Y EVALUACIÓN NO INVASIVA DE
FIBROSIS HEPÁTICA EN PACIENTES CON
ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA Y
SÍNDROME METABÓLICO

Dr. David Kershenobich Stalnikowitz

Dr. Juan Antonio Rull Rodrigo

Dr. Armando Gamboa Domínguez

Alumna:

Dra. Aurora Loaeza del Castillo

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Salvador Zubirán"

Fibrosis

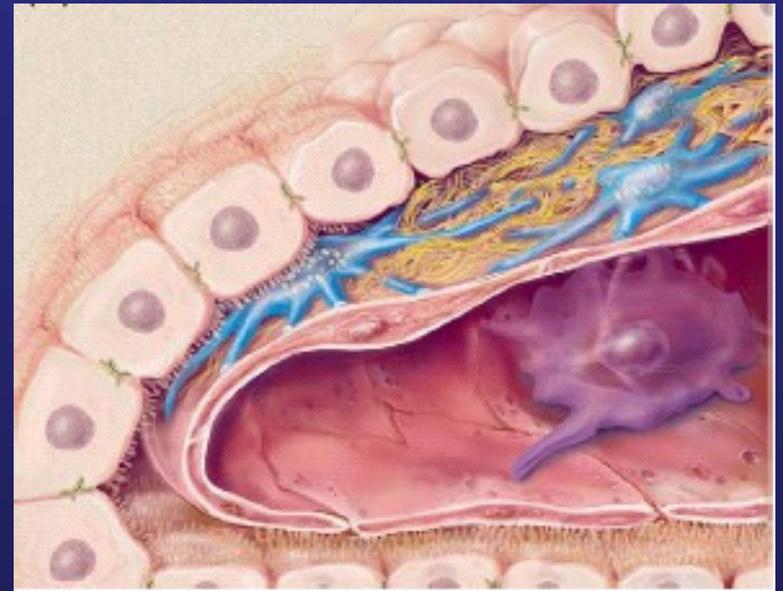
- Cambio estructural del hígado que ocurre como consecuencia del daño crónico por diversas causas
- Respuesta de reparación persistente que lleva a la acumulación progresiva de matriz extracelular
 - colágena tipos I, III y IV, proteoglicanos y glicoproteínas de matriz
- La fibrosis es causa de cambios en la estructura vascular y de alteración de la función hepática

Fibrosis

Estructura normal
del sinusoides



Cambio en la ME
Capilarización del sinusoides



- Capillarización del sinusoides
- cirrosis hepática

Mecanismos de fibrogénesis hepática

- Los mecanismos que inician y mantienen la fibrogénesis hepática son:
 - ✓ Activación de una respuesta de cicatrización crónica
 - ✓ Estrés oxidativo
 - ✓ Alteración en la interacción epitelio-mesénquima (en las colangiopatías crónicas)

Estrés oxidativo y fibrosis

- En enfermedades crónicas del hígado hay aumento en la producción de EROs y disminución de los sistemas antioxidantes
- Los radicales libres producidos en la célula estelar hepática o liberados al medio extracelular por otras células activan a la CEH
- Efectos por radicales libres producidos fuera de la CEH (CYP2E1)
 - ERO y HNE activan vías de traducción de señales y factores de transcripción (NF- κ B, c-JUN, AP-1) e inducen la expresión de genes de pro-colágena I, MCP-1 y TIMP-1
 - $O^{2\bullet}$ estimula de la migración de células estelares hepáticas humanas por activación de la vía Ras/Erk

Estrés oxidativo y fibrosis

- ▶ Síntesis de ERO en la célula estelar hepática

Angiotensina II, PDGF, leptina, cuerpos apoptóticos



Activación de **NADPH-oxidasa**



EROs



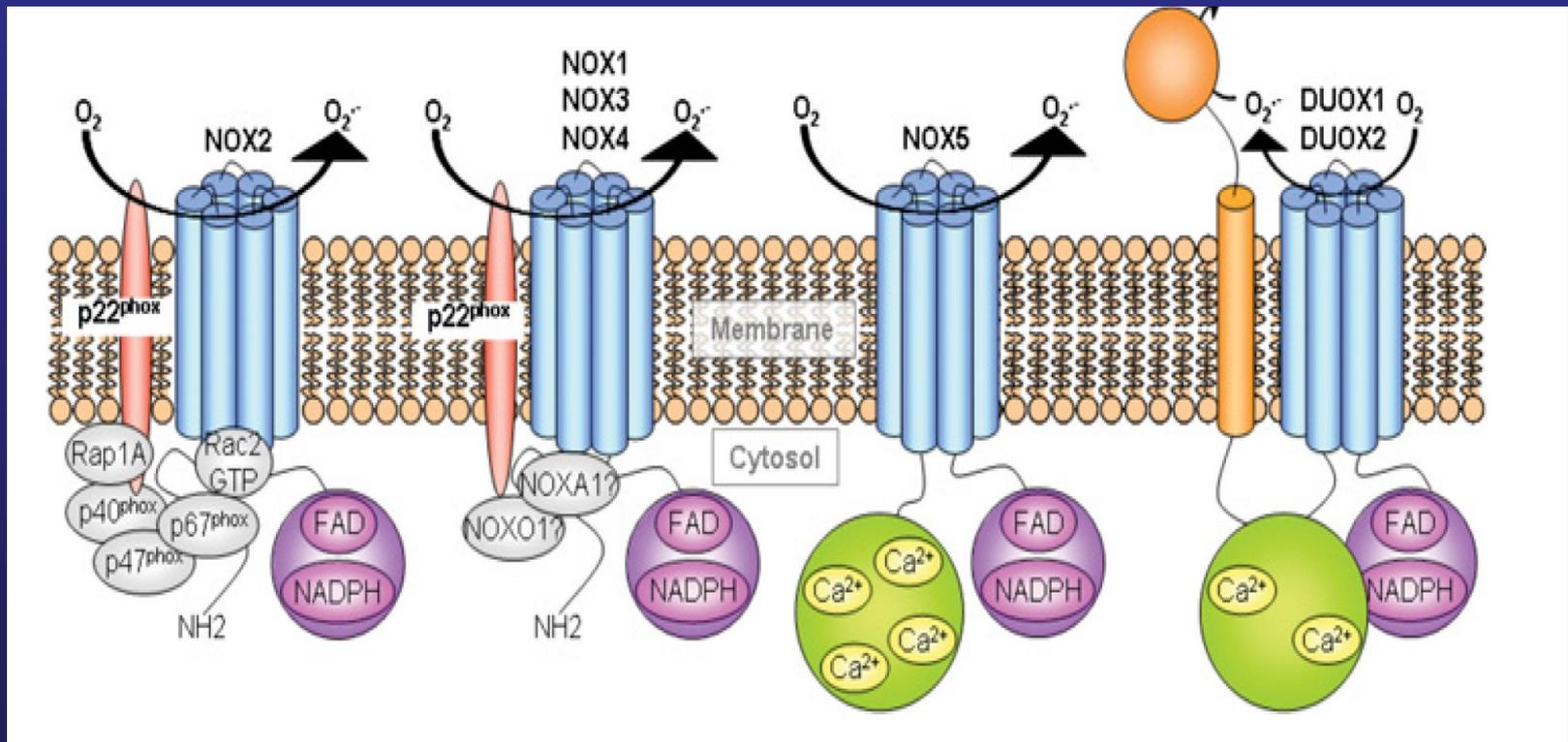
Activación de vías de señalización pro-fibrogénicas

NADPH oxidasa (NOX)

- **Enzima prototipo: NOX2 fagocítica**
- Enzima transportadora de e^- que cataliza la reducción de O_2 a $O_2^{\bullet-}$ en respuesta a una variedad de estímulos
- En células en reposo la enzima está inactiva con sus componentes dispersos entre el citosol y las membranas
 - Membrana plasmática: gp91^{phox} /NOX2 y p22^{phox} (flavocitocromo b₅₅₈)
 - Citosol: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y proteína G-Rac1/2
- La activación de fagocitos estimula la fosforilación de p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y su traslocación a la membrana donde se unen al flavocitocromo b₅₅₈

Familia NOX

- ▶ 6 miembros homólogos con la subunidad NOX2 (gp91^{phox}) de NADPH oxidasa fagocítica
- ▶ NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, dual-oxidasa 1 (DUOX1) y DUOX2

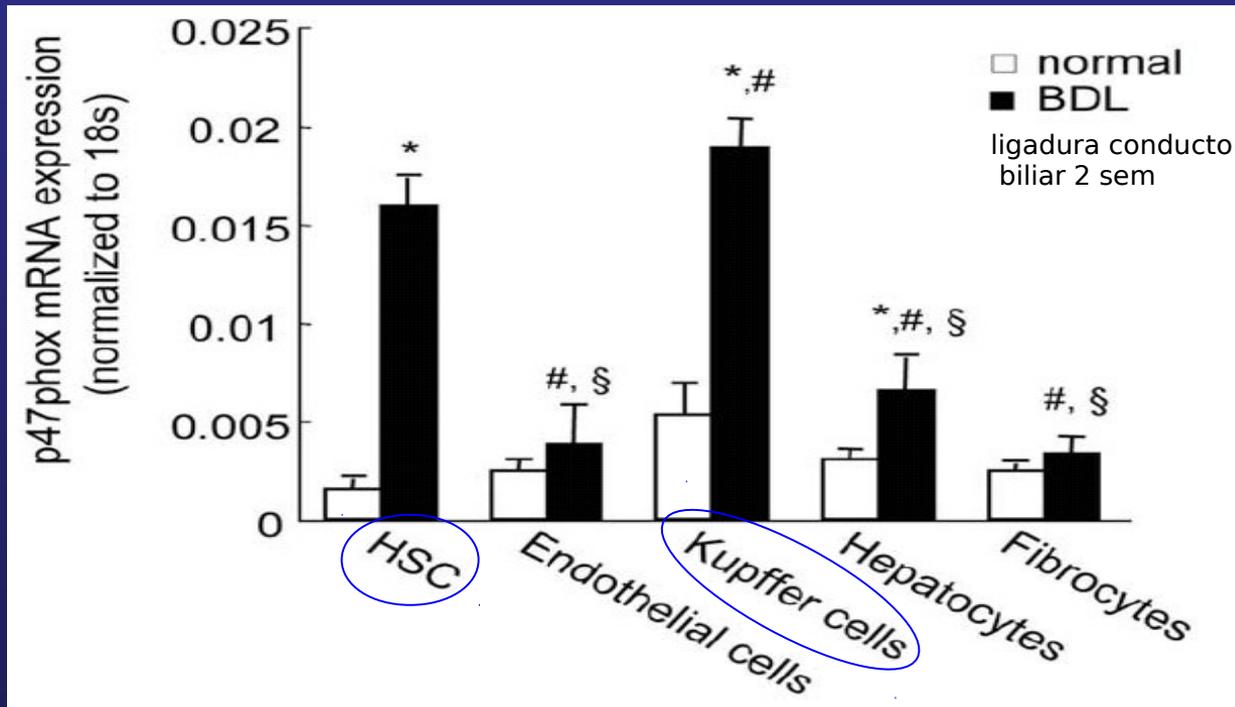


- ▶ La mayoría de las células de mamíferos expresan al menos una isoforma de NOX

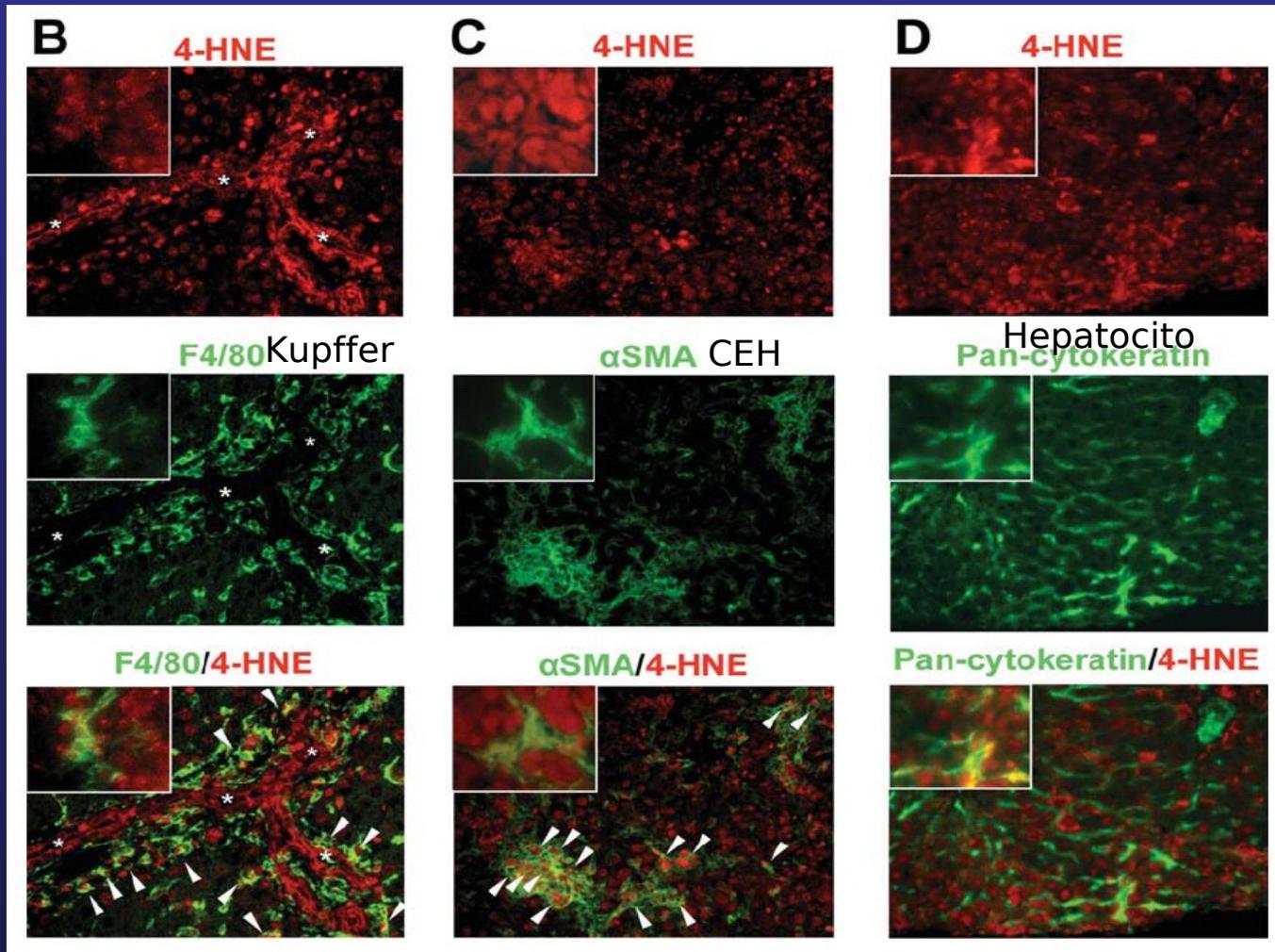
NOX en hígado

- ✓ Expresión de diferentes miembros de NOX en células parenquimatosas y no parenquimatosas:
 - . NOX1 en células endoteliales, hepatocitos y células estelares
 - . NOX2 en células de Kupffer, células endoteliales y células estelares
 - . NOX4 en hepatocitos, células de Kupffer y células estelares activadas
 - . DUOX1 y DUOX2 en hepatocitos, células de Kupffer y células estelares
- ✓ Función no bien definida
 - En células de Kupffer: defensa
 - Células no fagocíticas: regulación de vías de señalización intracelular

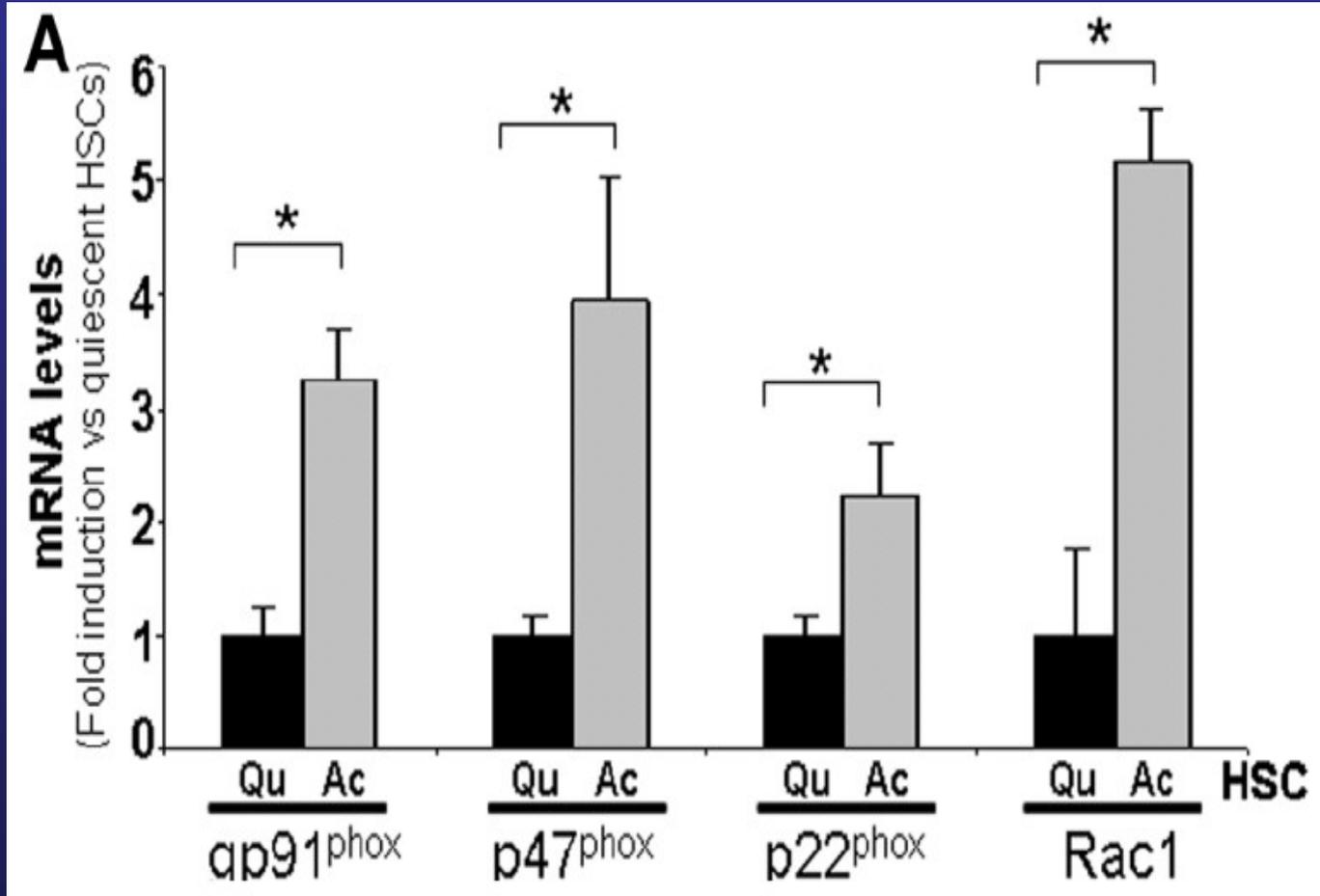
Expresión de NOX en hígado



- Doble inmunofluorescencia para 4-HNE y marcadores de tipo celular en hígado en un modelo murino de fibrosis por ligadura del conducto biliar



Expresión de NOX en CEH



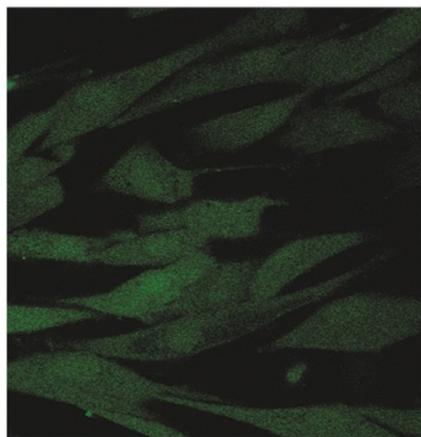
NOX y fibrosis hepática

NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis

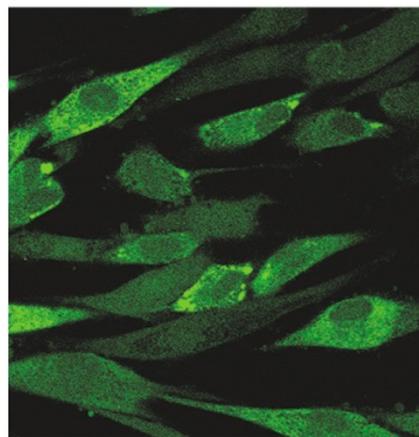
- La angiotensina II es una citocina pro-oxidante y fibrogénica
- La acción de la angiotensina II en los vasos sanguíneos está mediada por ERO producidos por NOX
- Las células estelares hepáticas humanas activadas expresan mRNAs de componentes clave de la enzima NOX no fagocítica
 - p47^{phox} , gp91^{phox} y NOX1
- La angiotensina II fosforila al componente p47^{phox} con la subsecuente activación de la enzima y síntesis de ERO
- La angiotensina II induce de manera redox-dependiente la expresión de genes involucrados en la fibrogénesis

- La angiotensina II incrementa la síntesis de ERO en células estelares humanas por inducción de NOX

Cel. estelar + DCFDA Buffer + Ang II (10^{-8} M)

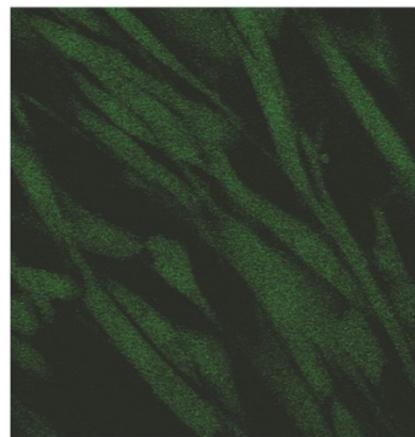


0 min

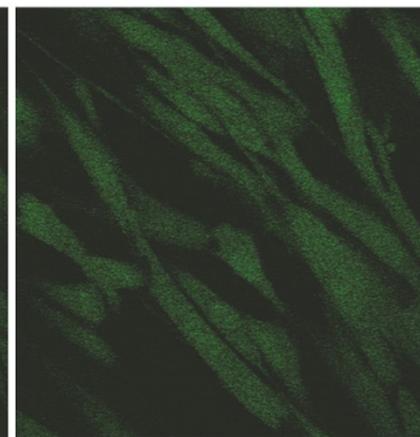


10 min

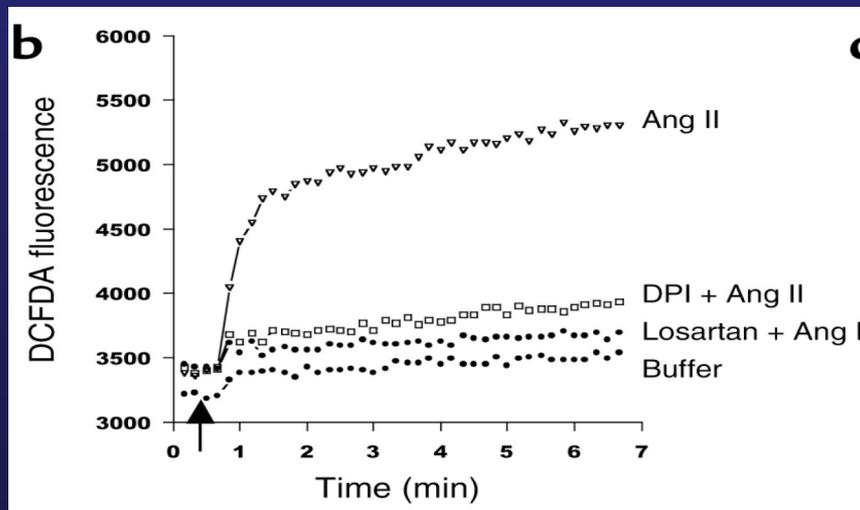
Inhibidor de NOX: DPI + Ang II



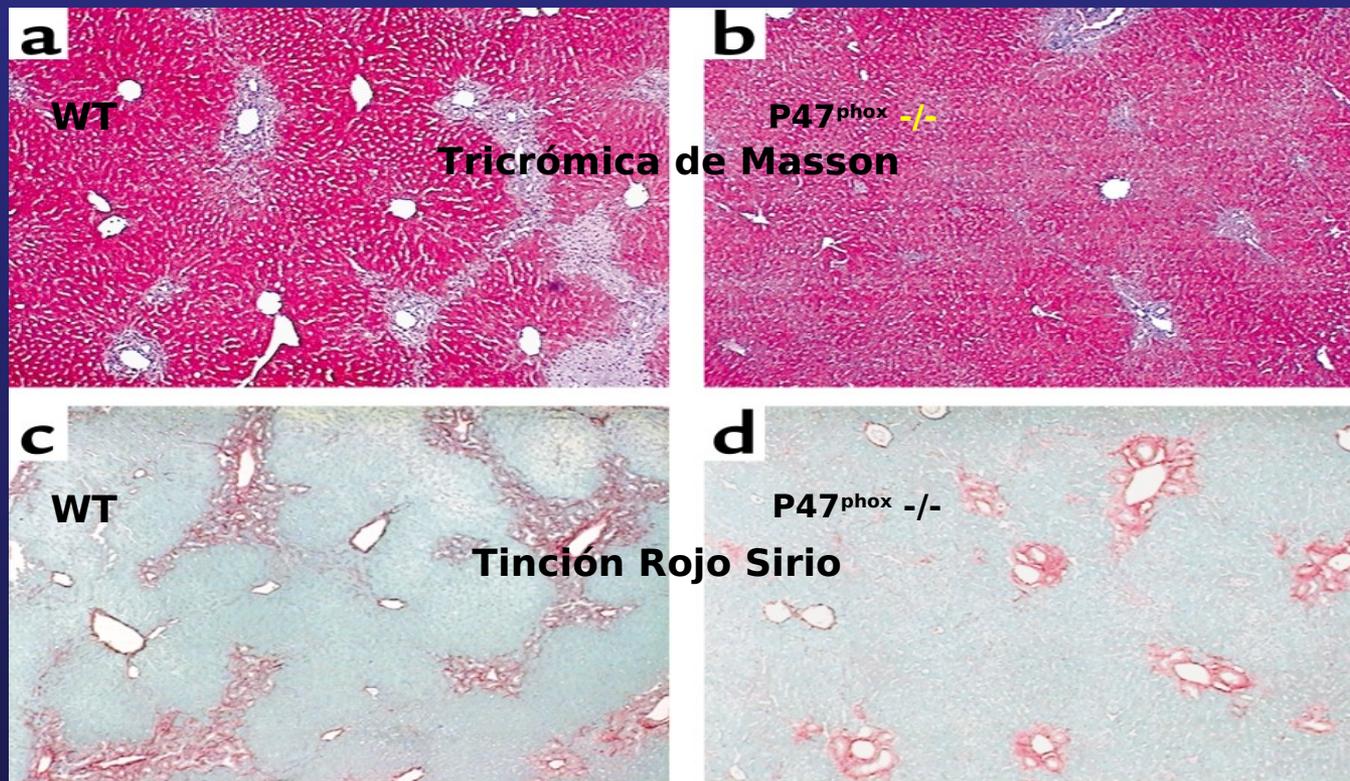
0 min



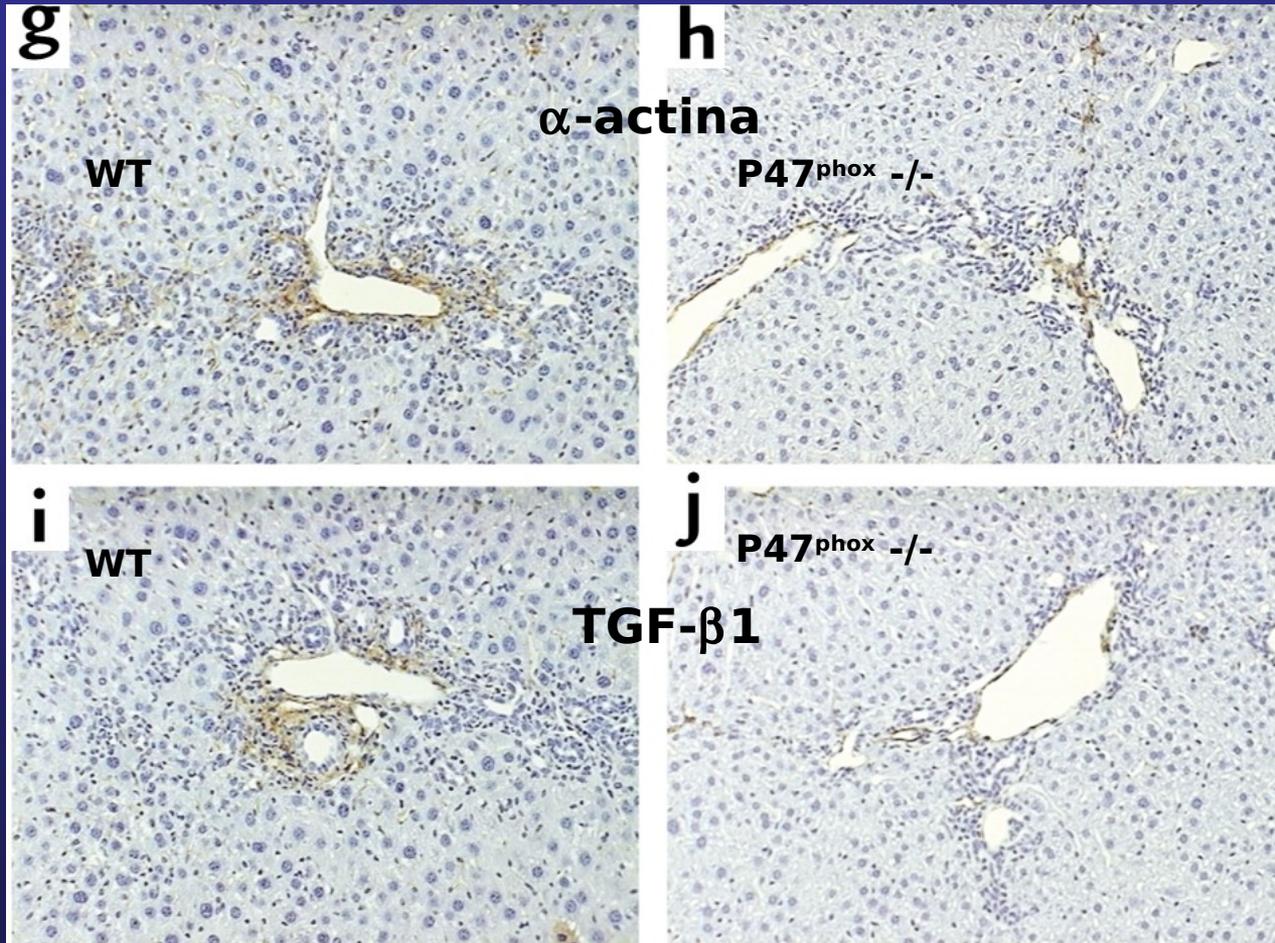
10 min

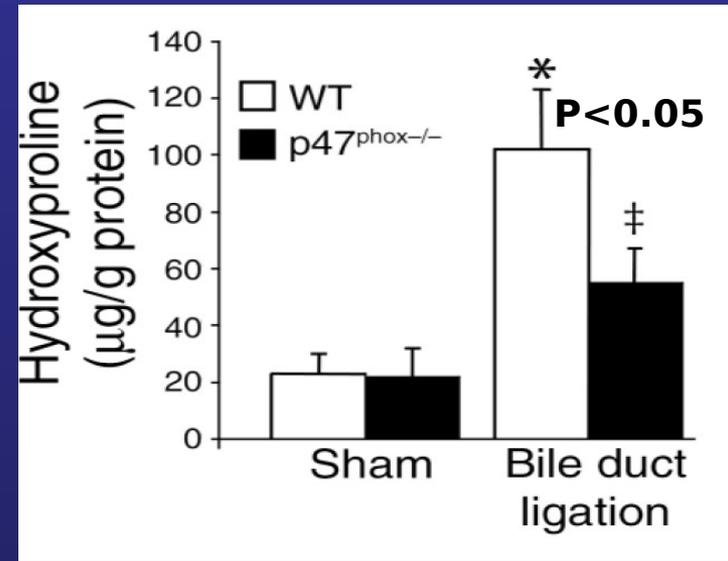
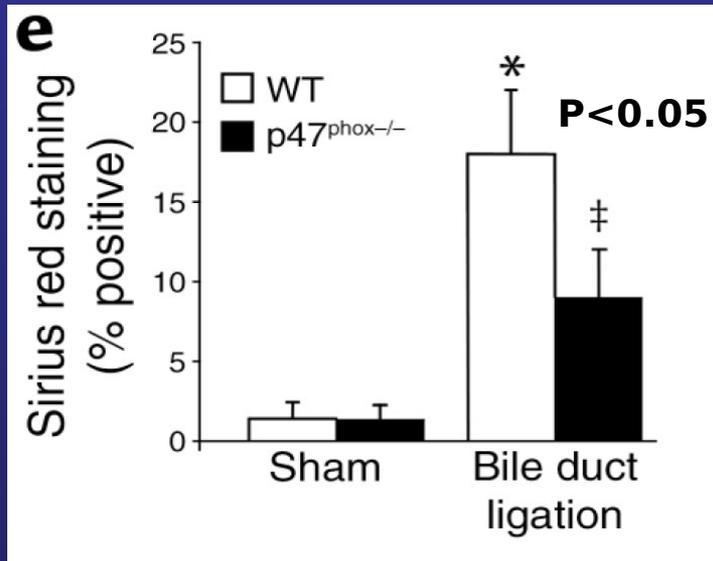


- En un modelo murino de fibrosis hepática por ligadura del conducto biliar se investigó el efecto de bloquear NOX
- Ratones $p47^{\text{phox}}^{-/-}$ mostraron menos fibrosis al compararlos con ratones WT



- Cuantificación por inmunohistoquímica para α -actina y TGF- β 1 menor en hígado de ratones p47^{phox} -/- vs controles





- ✓ La deficiencia de P47^{phox} protege contra el desarrollo de fibrosis
- ✓ El efecto fibrogénico de la angiotensina II en el hígado está mediado por EROs producidas por la enzima NOX

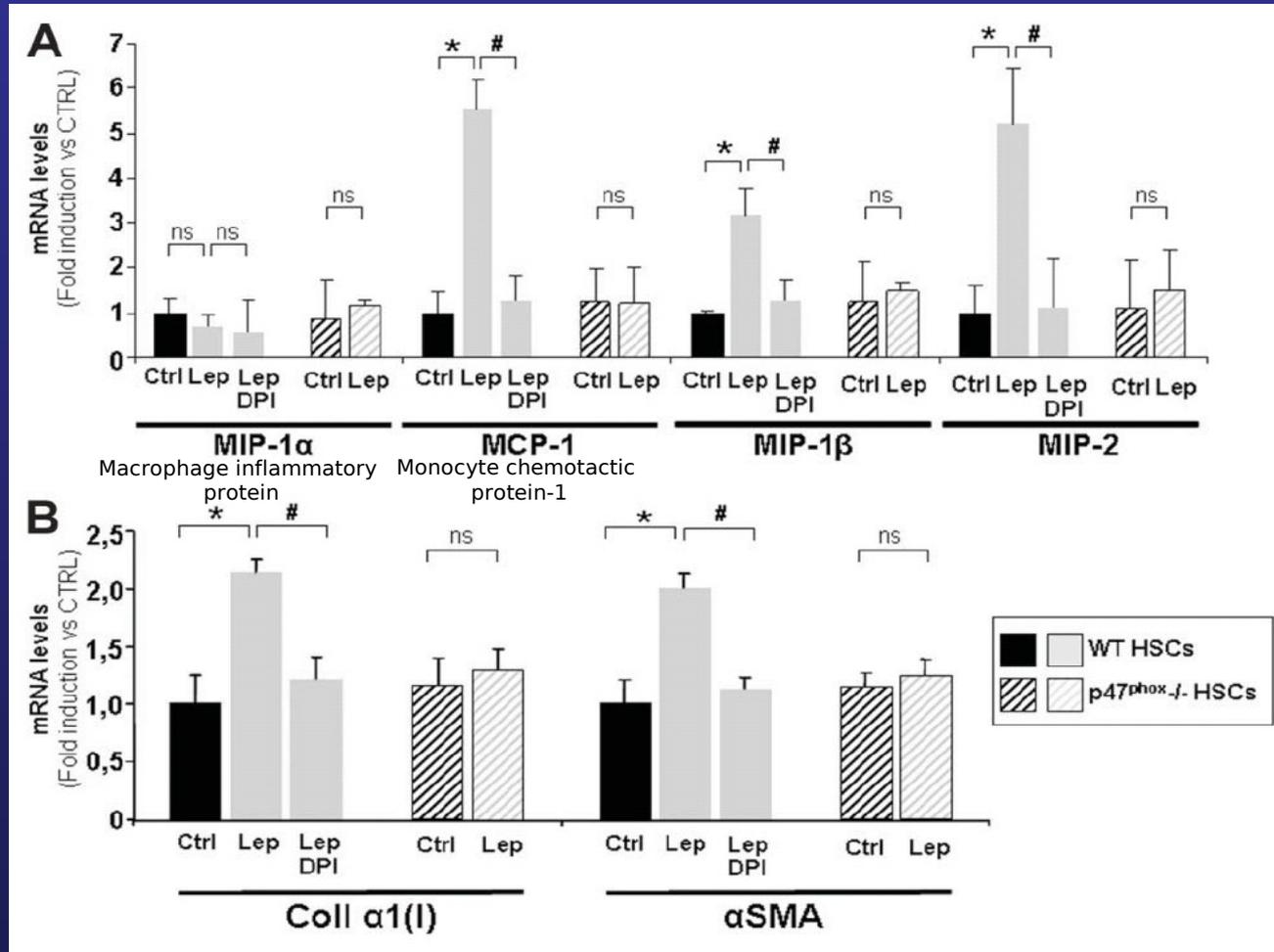
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y NOX

- PDGF mitógeno más potente para CEH
- En una línea celular y en CEH en cultivo se demostró:
- Expresión de 4 subunidades de NOX no fagocítica en CEH p22^{phox}, gp91^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}
 - - mRNA (rt-PCR)
 - - proteínas (western blotting)
 - - Inmunohistoquímica
- PDGF induce la proliferación de CEH a través de la producción intracelular de ERO
- DPI suprime la producción de ERO mediada por PDGF y la proliferación de CEH que se reanuda al incubar con H₂O₂ o PDGF
- ERO producidos por NOX inducen la proliferación de CEH a través de la fosforilación de p38 MAPK
- La vía que regula la proliferación de la célula estelar hepática es:
 - PDGF □ NOX □ ERO □ p38 MAPK

Leptina y NOX

- Leptina activa a la célula estelar hepática
- Péptido producido en los adipocitos
- Actúa en el hipotálamo, regula el apetito y el balance energético
- Elevada en suero en pacientes con hígado graso
- Ratones deficientes de leptina (ob-/ob-) son resistentes a la fibrosis hepática

Estimulación de CEH con leptina



- Menor expresión de genes de inflamación y de fibrosis en CEH estimuladas con leptina de ratones deficientes de NOX

Effects of Losartan on Hepatic Expression of Non-phagocytic NADPH Oxidase and Fibrogenic Genes in patients with Chronic Hepatitis C

- n=14 hepatitis crónica por VHC/fibrosis hepática
- Losartan 50 mg/día por 18 meses
- Biopsia hepática antes y después del Tx
- Expresión de 31 genes evaluada con PCR cuantitativa (componentes de NOX, fibrosis, inflamación)
- Disminución significativa en la expresión de procolágena I y IV, metaloproteinasa 2, activador del plasminógeno, Rac-1, activador 1 de NADPH oxidasa (NOXA-1) y organizador-1 de NOX (NOXO-1)
- Disminución de estadio de fibrosis en 7 pacientes

NOX y fibrosis hepática

- NOX se expresa en el hígado en su forma fagocítica y no fagocítica
- La CEH expresa NOX no fagocítica
- NOX activa vías de señalización fibrogénicas en la CEH
- NOX produce ERO-fibrogénicos en la CEH por la activación de AT-II, PDGF, leptina y cuerpos apoptóticos
- NOX induce la proliferación de la CEH
- Inhibición selectiva de NOX no-fagocítica es blanco terapéutico de fibrosis hepática

Hígado graso no alcohólico (HGNA)

- Acumulación de triglicéridos en los hepatocitos $> 5\%$ en ausencia de consumo excesivo de alcohol (> 20 g/d)
- El HGNA es la causa más común de hepatopatía crónica
- Componente hepático del síndrome metabólico (SM)
 - . $\sim 30 - 47\%$ de la población adulta padece síndrome metabólico
 - . $\sim 30\%$ de los pacientes con síndrome metabólico tienen HGNA
- Prevalencia por grupos étnicos
 - . hispanicos 45%
 - . caucásicos 33%
 - . afroamericanos 21%

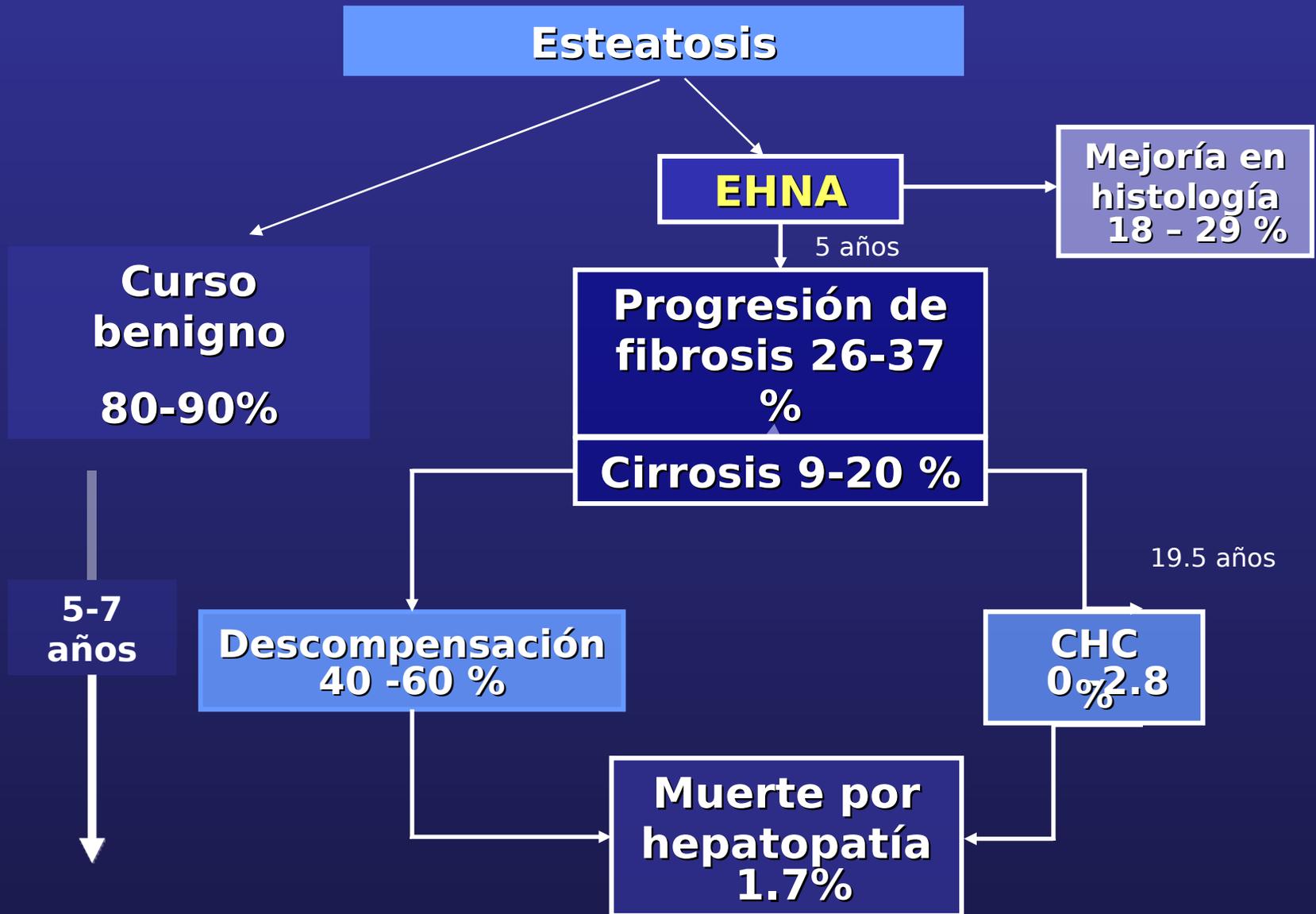
Frecuencia en población general

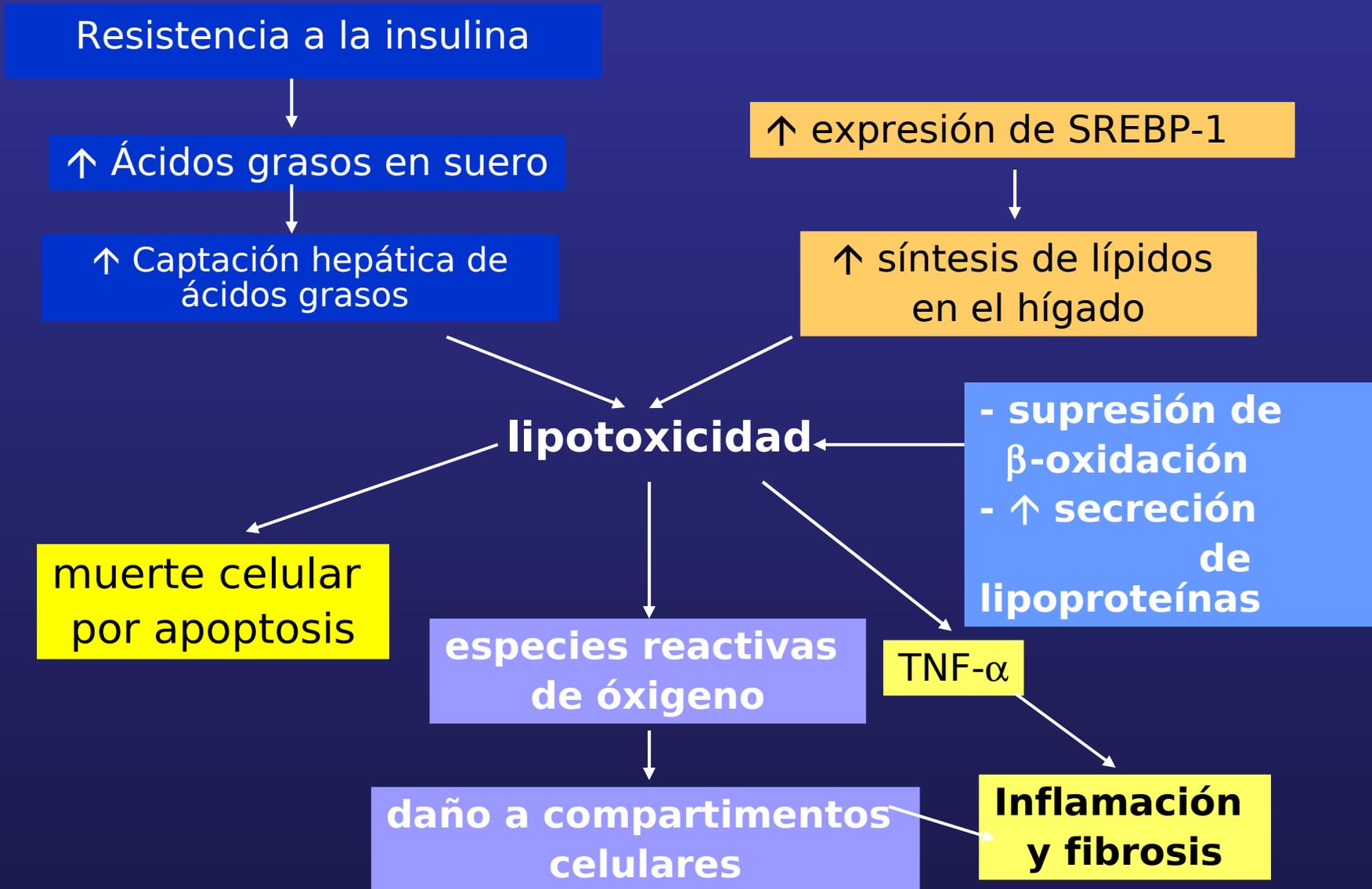
- ▣ Incidencia anual 10%

- ▣ Hígado graso no asociado a alcoholismo
 - . 9- 46 % (~ 30 %)
 - . Niños 3 %
 - . Obesos mórbidos 90 %

- ▣ Esteatohepatitis no alcohólica
 - . 6 -13 %
 - . 34 – 40 % de pacientes con transaminasas elevadas

Historia Natural





Fibrosis e Hígado graso

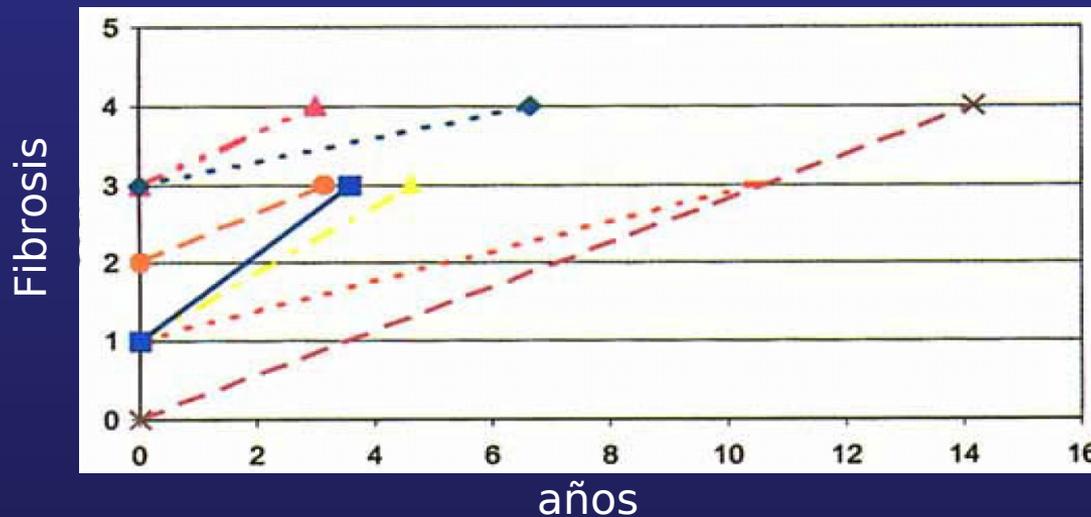
- ✓ La fibrosis hepática es el principal predictor de progresión de la enfermedad en pacientes con HGNA
- ✓ Los mecanismos de fibrogénesis en el HGNA no se han esclarecido

Factores predictores de fibrosis en EHNA

- ✓ **105 pacientes obesos**
 - Biopsia hepática durante cirugía bariátrica laparoscópica
 - 26 pacientes con EHNA
 - . 11 con fibrosis avanzada ($F \geq 3$)
 - Factores predictores de fibrosis avanzada:
 - . Hipertensión (RM=8.7, 95% IC 1.7 - 42 , P=0.002)
 - . Género masculino (RM=8.5, 95% IC 2.2-32 , P<0.001)
 - . Diabetes tipo 2 (RM=4.4, 95% IC 1.2-16.2 , P=0.018)
- ✓ Aumento de peso o fibrosis portal en la biopsia inicial predictores significativos de progresión de la fibrosis

Progresión de Fibrosis en EHNA

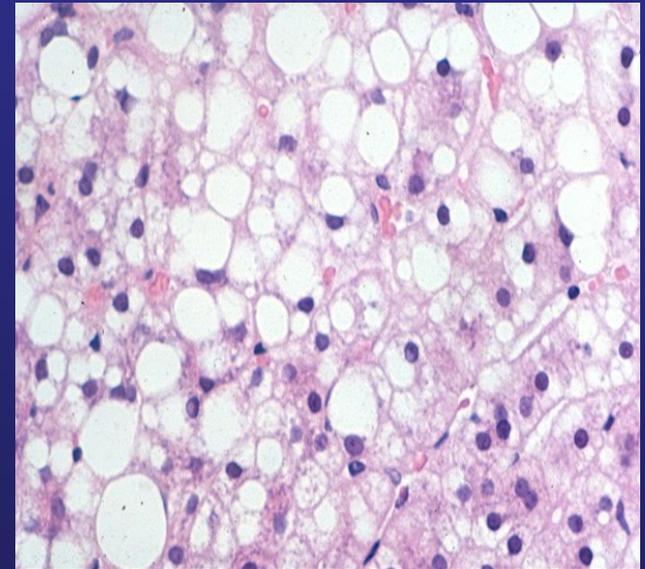
- 106 pacientes con diagnóstico de EHNA por biopsia hepática
- Toma de 2ª biopsia hepática 4.3 años (3-14.3) después de la inicial
- 7 pacientes con progresión de fibrosis



- Obesidad único factor asociado con estadio más avanzado de fibrosis en la 2ª biopsia (86 vs 27 %, $P=0.01$)

Biopsia hepática

- Único método para confirmar la presencia de ENHA
- Estándar de oro para diagnóstico de fibrosis
- Controversia sobre toma de biopsia para diagnóstico



Pruebas no invasivas para Dx de fibrosis en EHNA

Prueba	Escala de Fibrosis	n	AUROC para fibrosis avanzada F _{≥3} (IC 95%)	Componentes
Puntaje BAAT ¹	Metavir	93	0.84	Edad, IMC, ALT, triglicéridos
<i>FibroTest</i> ²	Brunt modificada	26 7	0.86 (0.77 - 0.91)	α2-macroglobulina, apolipoproteína A1, GGT, haptoglobulina, bilirrubina total
NAFLD fibrosis score ³	Brunt modificada	73 3	0.88 (0.85 - 0.92)	Edad, IMC, cuenta de plaquetas, albúmina, razón AST/ALT, glucemia elevada en ayuno/diabetes
Grupo europeo para estudio de fibrosis hepática ⁴	Scheuer	61	0.87 (0.66 - 1)	Combinación de múltiples proteínas de matriz extracelular y proteinasas

1. Ratziu V. *Gastroenterol* 2000; 11: 1117-23.
2. Ratziu V. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 6.
3. Angulo P. *Hepatology* 2007; 45:846-54.
4. Rosenberg WM. *Gastroenterology* 2004; 127: 1704 - 13.

NAFLD fibrosis score

- 733 pacientes con HGNA
Grupo 1 n= 480
Grupo de validación n=253
- $\text{NAFLD score} = -1.675 + 0.037 \times \text{edad (años)} + 0.094 \times \text{IMC} + 1.13 \times \text{diabetes (si=1, no=0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{plaquetas} - 0.66 \times \text{albúmina}$
- AUROC $F \geq 3 = 0.88 (0.85-.92)$ y 0.82 en el grupo de validación
- Puntos de corte
 ≥ 0.676 fibrosis avanzada
 ≤ -1.455 descarta fibrosis avanzada

Justificación

- ✓ El síndrome metabólico es un problema de salud pública en México
- ✓ El 30% de los pacientes con síndrome metabólico padecen HGNA
- ✓ La fisiopatogenia del HGNA no se ha esclarecido completamente y no existe un tratamiento farmacológico efectivo
- ✓ El estrés oxidativo parece ser importante en el desarrollo de esteatohepatitis y en el proceso de fibrogénesis en pacientes con hígado graso
- ✓ En modelos experimentales se ha demostrado que NOX es una enzima funcionalmente activa en la célula estelar humana y que es mediador de la acción de citocinas profibrogénicas a través de la producción de especies reactivas de oxígeno

Justificación

- ✓ No se ha estudiado la expresión hepática de NOX en humanos con diferentes etapas de HGNA
- ✓ La identificación de los mecanismos fisiopatogénicos que llevan al desarrollo de esteatohepatitis y fibrosis en pacientes con HGNA es importante para definir nuevas dianas terapéuticas

Objetivos

1. Comparar la expresión hepática de NADPH oxidasa (NOX) en pacientes con diferentes etapas del hígado graso no asociado a alcoholismo, es decir esteatosis simple, esteatohepatitis sin fibrosis o con fibrosis mínima y esteatohepatitis con fibrosis avanzada o cirrosis
2. Diseñar un modelo con variables clínicas y serológicas rutinarias para predecir la presencia de fibrosis avanzada en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y síndrome metabólico

Hipótesis

- Existe una expresión hepática incrementada de NOX en pacientes con síndrome metabólico y esteatohepatitis no alcohólica con fibrosis avanzada o cirrosis al compararlos con pacientes con síndrome metabólico y esteatosis simple o esteatohepatitis sin fibrosis o con fibrosis mínima

Hipótesis nula

- No existen diferencias en la expresión hepática de NOX en pacientes con síndrome metabólico y diferentes etapas histopatológicas de hígado graso no alcohólico

- **Diseño**

Estudio transversal, comparativo, retrolectivo

- **Población**

Pacientes adultos con síndrome metabólico y diagnóstico histopatológico de hígado graso no asociado a alcoholismo en sus diferentes etapas atendidos en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” desde enero de 2000 a diciembre de 2009

- **Tipo de muestreo**

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos

Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de hígado graso no asociado a alcoholismo establecido por biopsia hepática de acuerdo a los criterios de Kleiner-Blunt
2. Síndrome Metabólico

Sistema de Puntaje Histológico para Hígado Graso no Alcohólico

Parámetros	Definición	Puntaje
Esteatosis Grado	<5% 5 - 33 % >33 - 66 % > 66 %	0 1 2 3
Fibrosis Estadio	Sin fibrosis Perisinusoidal o periportal Leve, perisinusoidal, zona 3 Moderada, perisinusoidal, zona 3 Portal/Periportal Perisinusoidal y portal/periportal Septal Cirrosis	0 1 1A 1B 1C 2 3 4
Inflamación Lobulillar Portal Microgranulomas Lipogranulomas	Sin focos inflamatorios <2 focos por campo 200x 2-4 focos por campo 200x >4 focos por campo 200x Ausente o mínima/Mayor a mínima Ausentes/Presentes Ausentes/Presentes	0 1 2 3 0/1 0/1 0/1
Lesión hepatocelular <i>Ballooning</i> <i>Cuerpos acidófilos</i> <i>Macrófagos pigmentados</i> <i>Megamitocondrias</i> <i>Hialina de Mallory</i> <i>Núcleos glicogenados</i>	Ausente Escasas células Abundantes células Ninguno o escasos/Abundantes Ninguno o escasos/Abundantes Ninguna o escasas/Abundantes Ausente o mínima /Abundante Ninguno o escasos/Abundantes	0 1 2 0/1 0/1 0/1 0/1 0/1

Síndrome metabólico

Componentes	Organización Mundial de la Salud	National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel III)	Federación Internacional de Diabetes	American Heart Association	Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la insulina
Resistencia a la insulina	X				x
Glucosa alterada en ayuno o tolerancia a la glucosa oral alterada 2 hr (mg/dl)	>110 > 200 o DM 2	≥ 110	≥ 100 o Tx	≥ 100 o Tx	≥ 110
Circunferencia cintura (cm) o Relación Cintura Cadera (RCC)	RCC >0.9 en hombres y >0.85 en mujeres	>102 en hombres o > 88 em mujeres	≥ 94 en hombres y ≥ 80 en mujeres	> 120 en hombres o > 88 en mujeres	≥ 94 en hombres y ≥80 en mujeres
Índice de masa corporal Kg/m ²	> 30				
Tensión arterial (mmHg)	≥ 140/90	≥ 130/85	≥ 130/85 o recibe Tx	≥ 130/85 o recibe Tx	≥ 140/90 o recibe Tx
Triglicéridos (mg/dl) (MG/dl) (mg/dl)	≥ 150	≥ 150	≥ 150 o Tx	≥ 150 o Tx	≥ 160
Colesterol HDL	< 35 en hombres < 39 en mujeres	< 40 en hombres < 50 en mujeres	< 40 mg/dL en hombres < 50 mg/dL en mujeres o Tx	≤ 35 en hombres ≤ 40 en mujeres	< 40 o Tx
Definición	Resistencia a la insulina o GAA o TAGO y ≥ 2 componentes	≥ 3 componentes	Obesidad central + 2 componentes	≥ 3	Resistencia a la insulina y ≥ 2

Criterios de exclusión

1. Alcoholismo

Ingestión de alcohol > 21 unidades/semana (210 g/sem) en hombres o > 14 unidades/semana (140 g/sem) en mujeres

2. Otra causa de hepatopatía crónica o esteatosis hepática: Hepatitis vírica B o C, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa-1-antitripsina, sobrecarga de hierro

3. Uso en los 6 meses anteriores o concomitante a la toma de biopsia hepática de un fármaco que provoque esteatosis: corticosteroides, amiodarona, tamoxifeno, ácido valproico, quimioterapia

4. Muestra obtenida de la biopsia hepática inadecuada para el diagnóstico histopatológico o no contar con bloque de parafina

Método

▣ Se colectarán variables clínicas, antropométricas y bioquímicas medidas al momento de la toma de biopsia hepática o \pm 1 mes:

- Edad
- Índice de masa corporal (kg/m²)
- Tensión arterial sistólica y diastólica (mmHg)
- Glucemia en ayuno (mg/dl)
- Colesterol total (mg/dl)
- Triglicéridos (mg/dl)
- Colesterol HDL (mg/dl)
- Colesterol LDL mg/dl
- Aspartato aminotransferasa (IU/L)
- Alanina aminotransferasa (IU/L)
- Bilirrubina total (mg/dl)
- Razón AST/ALT
- Cuenta de plaquetas ($\times 10^9/l$)
- γ -glutamil transpeptidasa (mg/dl)
- Fosfatasa alcalina (UI/L)
- Género
- Diabetes
- Glucosa anormal en ayuno
- Intolerancia a la glucosa
- HDL bajo
- LDL alto
- Hipertrigliceridemia
- Hipertensión arterial
- Sobrepeso
- Obesidad

Método

- Mediante un análisis multivariado se identificarán los predictores independientes de fibrosis avanzada
- Se determinará cuáles de los predictores identificados tienen una correlación mayor con la presencia de fibrosis avanzada
- Con base en estos resultados se diseñará un índice que permita predecir fibrosis en pacientes con EHNA
- Con base en los valores del área bajo la curva ROC se comprobará la utilidad del índice para el diagnóstico de:
 - 1) fibrosis significativa (estadio \geq F2)
 - 2) fibrosis avanzada (estadio \geq F3)
 - 3) cirrosis (F4)
- Los valores con la mejor sensibilidad y especificidad se considerarán como el punto de corte óptimo para el diagnóstico de fibrosis significativa, fibrosis avanzada y cirrosis

Expresión de NOX

- Se extraerá el RNA total de muestras de hígado fijadas en formol e incluidas en parafina (High Pure FFPE RNA Micro Kit, Roche)
- Se analizará mediante PCR a tiempo real la expresión de la subunidad P47^{phox}, gp91^{phox}, p22^{phox} y rac1.
- Se comprobará mediante inmunohistoquímica la expresión de P47^{phox} en tejido hepático
- Se comparará la expresión de estas subunidades entre grupos de pacientes con diferentes etapas de hígado graso: esteatosis simple, esteatohepatitis sin fibrosis o con fibrosis mínima y esteatohepatitis con fibrosis avanzada (\geq F3) o cirrosis
- Las diferencias en la expresión de la subunidad P47^{phox} se analizarán mediante T de student

Resultados

- Búsqueda en libros del archivo del departamento de Anatomía Patológica de pacientes con diagnóstico de HGNA o cirrosis
- **n=503**

Variable	Esteatosis n=197	Esteatohepatitis n=106	Cirrosis n=200
Edad (años)	50.7 \pm 13.4 (16-80)	39.5 \pm 11.7 (17-75)	50.7 \pm 13.4 (17-81)
Género			
Femenino	119 (60)	74 (70)	129 (65)
Masculino	78 (40)	32 (30)	71 (35)
Tamaño biopsia hepática			
Longitud (cm)	1.19 \pm 0.65 (0.2-6)	1.34 \pm (0.4-3.3)	1.14 (0.1-4)
No. espacios porta	2 (1-4)	4.5 (3 - 7)	NR
Fibrosis	n=43	n=41 portal=35 septal=6 s/fibrosis=7	n=200
	grado esteatosis I= 80 II=38 III=18		

R e s u l t a d o s

Variable	Media \pm DE (mínimo-máximo) o n (%)
Edad	
Sexo femenino	
Peso	45 \pm 15 (17 - 80)
Índice de masa corporal	85 (65)
Peso final	83.9 \pm 26.5 (36.5 - 194)
IMC final	32.2 \pm 8.6 (18.4 - 62.4)
TA sistólica	78 \pm 20.7 (32 - 135)
TA diastólica	29.9 \pm 6.4 (16.3 - 50.9)
Alanina-aminotransferasa	122.5 \pm 16.2 (80-170)
Aspartato aminotransferasa	77 \pm 10 (60-100)
Bilirrubina total	81.2 \pm 84 (9 - 536)
Bilirrubina indirecta	73.6 \pm 77.5 (16 - 565)
Bilirrubina directa	0.95 \pm .7 (0.25 - 6)
Fosfatasa alcalina	0.72 \pm .37 (0.01 - 2.3)
γ-glutamil transferasa	0.23 \pm .45 (0 - 3.7)
Plaquetas	120 \pm 87 (29 - 693)
Glucosa en ayuno	90.9 \pm 78.6 (14 - 373)
Glucosa 2 hr postprandial	248000 \pm 103000 (45000 - 656000)
Triglicéridos	119.2 \pm 37 (75 - 304)
Colesterol total	185.6 \pm 92 (53 - 483)
Colesterol LDL	193.7 \pm 108.5 (57 - 737)
Colesterol HDL	184.4 \pm 45 (85 - 309)
Síndrome metabólico	121 \pm 40.7 (46.2 - 233)
Diabetes tipo 2	37 \pm 20 (12 - 64)
Glucosa alterada en ayuno	15 (19)
Hipertensión arterial	56 (43)
Hipertrigliceridemia	41 (31)
Colesterol LDL elevado	31 (24)
Colesterol HDL bajo	69 (53)
Sobrepeso	72 (55)
Obesidad	68 (52)
	43 (33)
	64 (49)

Resultados

- Tiempo de seguimiento 47.4 ± 32.4 meses (0.03 - 117)
- Muerte n=12
 - 4 por hepatopatía (HepatoCA 2, SHR 1, hemorragia variceal 1)
- Cirrosis n=25
- Ascitis n=3
- Encefalopatía n=4
- Hipertensión portal n=16
- Hemorragia variceal n=2
- HepatoCA n=3

Fibrogénesis

- Evento central en el proceso de fibrosis: **activación de la célula estelar hepática**
- Conversión de una célula en reposo rica en vitamina A a un miofibroblasto contráctil, fibrogénico y que prolifera
- Inducción de genes por estimulación parácrina por células vecinas y por cambios tempranos en la matriz extracelular
- Principales estímulos: TGF- β y especies reactivas de oxígeno