



# RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO G308A DEL GEN DEL TNF-ALFA, NIVELES DE TNF-ALFA, RESISTENCIA A LA INSULINA Y BIOPSIA HEPÁTICA EN PACIENTES CON HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

R Aller<sup>1</sup>, D. A de Luis<sup>2</sup>, O Izaola<sup>2</sup>, M González Sagrado<sup>2</sup>, R Conde<sup>2</sup>, T Alvarez<sup>3</sup>, D Pacheco<sup>2</sup>, MC Velasco<sup>2</sup>, J.M González<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Gastroenterología. <sup>3</sup> Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

<sup>2</sup> Instituto de Endocrinología y Nutrición. Facultad de Medicina. Unidad de Investigación. Hospital Rio Hortega. Valladolid.

## Trabajo galardonado con la Beca ACAD 2010

### RESUMEN

**Introducción y Objetivos.** Algunos estudios han observado que el TNF-alfa podría estar implicado en la patogénesis del hígado graso no alcohólico (HGNA). El objetivo de nuestro estudio fue investigar la influencia del polimorfismo del G308A del gen del TNF-alfa en los cambios histológicos y resistencia a la insulina del HGNA así como sobre los niveles de TNF-alfa.

**Material y Métodos.** Se seleccionaron un total de 66 pacientes con HGNA en un estudio transversal. La confirmación de HGNA mediante biopsia fue un criterio de inclusión obligatorio. Se realizaron determinaciones analíticas como niveles de glucosa, insulina, resistencia a la insulina (HOMA), colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos. También se realizó un análisis antropométrico. Se estudió el gen G308A del TNF alfa así como niveles en plasma de TNF-alfa.

**Resultados.** Quince pacientes (4 mujeres/11 hombres) (22.7%) presentaron el genotipo G308A (grupo mutante) and 51 pacientes (12 mujeres/39 hombres) (77.3%) G308G (grupo salvaje). Los pacientes con el grupo mutante presentaron con mayor frecuencia inflamación portal moderada-severa en la biopsia hepática (86.7%) comparado con los pacientes del genotipo salvaje (19.7%). El grupo mutante tenía mayor fibrosis moderada-severa (73.3%) que el grupo salvaje (51.3%). El análisis multivariable ajustado por edad, sexo, IMC y genotipo con la variable dependiente (fibrosis) mostró que el HOMA permaneció en el modelo, con un incremento de la probabilidad de desarrollar fibrosis de 1,78 (CI95%:1.06-3.2) y de inflamación moderada-severa de 1,45 (CI95%:1.02-2.1) con cada incremento de una unidad de los niveles de HOMA

**Conclusión.** Los pacientes con el genotipo mutante tienen más frecuentemente inflamación portal moderada-severa y fibrosis que el grupo salvaje. La Resistencia a la insulina puede ser el nexa bioquímico, porque el HOMA permaneció en el modelo ajustado de regresión logística.

### PALABRAS CLAVE

Polimorfismo G308A del gen TNF-Alfa, biopsia, resistencia a la insulina, TNF alfa

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es una enfermedad hepática caracterizada por elevación de las transaminasas, hepatomegalia y acúmulo de grasa hepática acompañada de inflamación y necrosis semejando la hepatitis alcohólica en ausencia de consumo de alcohol<sup>(1)</sup>.

La obesidad se considera el factor de riesgo más importante. En diferentes estudios, la relación cintura-cadera se correlaciona con el grado de esteatosis en la biopsia hepática<sup>(2)</sup>. La resistencia a la insulina también se ha asociado con hígado graso y EHGNA<sup>(3)</sup>. La asociación con la resistencia a la insulina y la obesidad ha sugerido que la EHGNA debería ser considerada parte del síndrome metabólico<sup>(4)</sup>.

El tejido adiposo segrega muchas proteínas bioactivas o adipocitocinas que regulan el metabolismo hepático y periférico de glucosa y de lípidos. Estas adipocitocinas incluyen leptina, resistina, adiponectina y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) entre otras. Recientemente, Hui et al.<sup>(5)</sup> han sugerido que los niveles elevados de leptina sérica en la esteatohepatitis no alcohólica

### CORRESPONDENCIA: Dra. R Aller

Médico Adjunto del Servicio de Aparato Digestivo.

Profesor asociado de Aparato Digestivo.

Facultad de Medicina. Valladolid.

C/Los Perales 16 • 47130-Simancas (Valladolid. España)

(EHNA) pueden ser un reflejo del fallo de la leptina para estimular el metabolismo lipídico hepático lo cual podría denominarse como situación de resistencia a la leptina. Algunas evidencias han ligado el TNF-alfa a las anomalías metabólicas de la resistencia a la insulina. El tejido adiposo ha demostrado ser un lugar para la síntesis de TNF-alfa con una correlación directa entre la obesidad, los niveles de TNF-alfa y la hiperinsulinemia<sup>(6)</sup>. El TNF-alfa es una de las más importantes adipocitocinas y sin embargo el papel de esta molécula en la patogénesis de la EHNA no ha sido estudiado ni su relación con factores genéticos como el polimorfismo genético de este gen.

El análisis de la mutación ha identificado una traslocación G-A en la región promotora del gen del TNF-alfa en la posición 308. Esta variante polimórfica ha mostrado afectar a la región promotora del gen del TNF-alfa dando lugar a una mayor transcripción comparado con el alelo salvaje<sup>(7)</sup>. Se han realizado muchos estudios de asociación sobre la variante G-308, con resultados conflictivos. Fernandez Real y cols.<sup>(8)</sup> han documentado una asociación significativa entre la variante G-308 y un incremento del IMC y de la resistencia a la insulina.

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia del polimorfismo G308A del gen del TNF-alfa en los cambios histológicos y resistencia a la insulina de la EHNA, así como los niveles de TNF-alfa en nuestra muestra de pacientes.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### • PACIENTES

Se incluyeron 66 pacientes caucásicos de forma consecutiva entre 2006 y 2009. Los criterios de exclusión fueron hepatopatía conocida por infección por el virus de la hepatitis B, hepatitis C por citomegalovirus y/o virus de Epstein Barr. Hepatitis autoinmune, diabetes mellitus, consumo de alcohol, intolerancia a la glucosa en ayunas, medicaciones (agentes antihipertensivos, y estatinas) y defectos hereditarios (enfermedad por sobrecarga de hierro, cobre y déficit de alfa-1-antitripsina).

Estos pacientes se estudiaron en una Unidad de Nutrición Clínica. El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

### Biopsias hepáticas

El diagnóstico de la EHNA se confirmó mediante biopsia hepática percutánea que se realizó a todos los pacientes con una aguja Menghini de 1,6 mm. Las muestras hepáticas se procesaron como de rutina, se seccionaron y tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Manson. Todas las biopsias fueron estudiadas por el mismo patólogo (T.A.G) La histología era analizada siguiendo la clasificación de Brunt<sup>(9)</sup>. La esteatosis se

graduó como sigue: leve (< 33% de los hepatocitos afectados); moderada-severa ( $\geq 33\%$  de los hepatocitos afectados). La clasificación de Brunt también incluye como grado: inflamación portal, balonización de los hepatocitos, inflamación lobulillar y como estadio de fibrosis: **estadio 1:** fibrosis en la zona 3 perivenular perisinusoidal, focal o extensa; **estadio 2:** como el anterior con fibrosis periportal extensa o focal; **estadio 3:** fibrosis en puentes focal o extensa y **estadio 4:** cirrosis. En nuestro estudio la fibrosis variable era dividida en ausente o presente. La inflamación (portal y lobulillar) se clasificó como leve o moderada-severa.

### Medidas antropométricas

El peso corporal se midió con una precisión de 0,5 Kg y el IMC se calculó según la fórmula peso corporal/altura en cm<sup>2</sup>. El diámetro de la cintura (diámetro más estrecho entre el apéndice xifoides y la cresta iliaca) y la medida de la cadera (diámetro más ancho entre los trocánteres) se utilizaron para calcular el índice cintura-cadera (ICC). Se utilizó una bioimpedanciometría corporal eléctrica tetrapolar para determinar la composición corporal. Se producía una corriente eléctrica de 0.8 mA y 50 kHz a través de un generador de señal calibrado (Biodynamics Modelo 310e, Seattle, WA, USA) y se aplicó sobre la piel usando electrodos adhesivos colocados en las extremidades del lado derecho. La resistencia y la reactancia se utilizaron para calcular el agua, la grasa y la masa libre de grasa corporal total.

### • MÉTODOS

Se determinaron la glucosa, insulina, resistencia a la insulina (HOMA), colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y niveles en sangre de TNF-alfa. La concentración de colesterol total y de triglicéridos se determinaron por ensayo enzimático colorimétrico (Technicon Instruments, Ltd., New York, N.Y., USA), mientras que el HDL colesterol se determinó enzimáticamente en el sobrenadante después de la precipitación de otras lipoproteínas con dextrano de sulfato de magnesio. La fracción LDL colesterol se calculó utilizando la fórmula de Friedewald.

Se determinaron los niveles de glucosa plasmáticos utilizando un método automatizado glucosa oxidasa (Analizador de glucosa 2, Beckman Instruments, Fullerton, California). La insulina se determinó por RIA (RIA Diagnostic Corporation, Los Angeles, CA) con una sensibilidad de 0.5mUI/L (rango normal 0.5-30 mUI/L)<sup>(10)</sup> y el *homeostasis model assessment* para la sensibilidad de la insulina (HOMA) se calculó utilizando estos valores<sup>(11)</sup>.

El TNF alfa se determinó por ELISA (R&D systems, Inc., Mineapolis, USA) con una sensibilidad de 0.7 pg/ml and 0.5 pg/ml, respectivamente. Los valores normales de TNF alfa fueron (0.5-15.6 pg/ml)<sup>(12)</sup>.

### Genotipado del polimorfismo del gen G308A

Los primers de oligonucleótidos y las sondas se diseñaron con el Beacon Designer 4.0 (Premier Biosoft International, LA, CA). La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se realizó con 50 ng de DNA genómico, 0.5 uL de cada primer de oligonucleótido (secuencia del primer: 5'-CTG TCT GGA AGT TAG AAG GAA AC-3'; primer reverso: 5'-TGT GTG TAG GAC CCT GGA G-3'), y 0.25 uL de cada sonda (sonda salvaje : 5'-Fam-AAC CCC GTC CTC ATG CCC-Tamra-3') y (sonda mutante: 5'-Hex-ACC CCG TCT TCA TGC CCC- Tamra -3') en un volumen final de 25 uL (Termociclador iCycler IQ (Bio-Rad®), Hercules, CA). El DNA se desnaturizó a 95°C durante 3 min; esto se continuó por 50 ciclos de desnaturización a 95°C durante 15 s, y se volvió a calentar a 59,3 ° durante 45 s. La RCP se midió en un volumen de 25 uL final que contiene 12,5 uL de IQTM Supermix (Bio-Rad®, Hercules, CA) y la Taq polimerasa de ADN.

### Análisis estadístico

El tamaño de la muestra fue calculado para detectar diferencias en torno a 1,5 unidades del HOMA con el 90% de potencia y de significación del 5% (n= 60). El análisis estadístico se realizó para el grupo combinado G308A y A308A como un grupo mutante y el G308G como grupo con genotipo salvaje (Modelo dominante). Los resultados se expresaron como media +/- desviación estándar. La distribución de las variables se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas con distribución normal se analizaron con la t de Student de dos colas para muestras pareadas. Las variables no paramétricas fueron analizadas con la prueba de U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se analizaron con la prueba de chi-cuadrado, con corrección de Yates cuando sea necesario, y el test de Fisher. Mediante regresión logística (paso a paso) se estudiaron las variables histológicas como variable dependiente y su relación con otras variables independientes asociadas en el análisis univariado, todos los modelos ajustados por edad, sexo, índice de masa corporal y el genotipo. Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg. Un valor de p inferior a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

### RESULTADOS

66 pacientes dieron su consentimiento informado y fueron incluidos en el estudio. La edad media fue de 43,6 ± 12,2 años y el IMC medio 34,5 ± 6,5 con 50 varones (75,5%) y 16 mujeres (24,5%). 15 pacientes (4 varones y 11 mujeres) (22,7%) tenían el genotipo G308A (grupo tipo mutante) y 51 pacientes (12 varones/39 mujeres) (77,3%) G308G (grupo tipo salvaje). No se detectó el genotipo AA.

La **Tabla I** muestra las variables antropométricas en el grupo salvaje y mutante. No se detectaron diferencias en la masa grasa u otros parámetros antropométricos.

TABLA I.-

### CAMBIOS EN LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

PARÁMETROS	G308G (N=51)	G308A (N=15)	P
IMC	34.1±9.4	35.5±2.5	0.45
Peso (kg)	95.8±27.7	92.1±27.7	0.34
Masa grasa (kg)	25.7±8.9	23.6±6.5	0.27
Circunferencia cintura (cm)	101.6±13	104.2±3.5	0.56
Índice cintura-cadera	0.95±0.1	0.96±0.1	0.71

(NS)  $p > 0.05$ , entre grupos.

La **Tabla II** muestra las diferencias en los factores de riesgo cardiovascular. Los niveles de glucosa, TNF-alfa y HOMA fueron más altos en el grupo mutante que en el salvaje. No se detectaron diferencias en otros parámetros.

TABLA II.-

### FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR CLÁSICOS

PARÁMETROS	G308G (N=51)	G308A (N=15)	P
Glucosa (mg/dl)	107.4±25	131.6±31.1*	0.01
Colest Total (mg/dl)	196.1±51.4	206.7±51.3	0.65
LDL-colest (mg/dl)	121.2±45.3	132.3±39.4	0.47
HDL-colest (mg/dl)	50.1±13.63	52.8±20.7	0.24
TG (mg/dl)	145.6±96	130.8±59.8	0.29
Insulina (mUI/L)	14.8±10.2	15.5±9.2	0.11
HOMA	3.9±2.7	5.9±2.8*	0.02
TNF-alpha (ng/mL)	4.7±3.2	7.4±3.6*	0.01

Colest.: Colesterol. TG: Triglicéridos.

HOMA: Homeostasis model assessment. (\*)  $p < 0.05$ , entre grupos.

La **Tabla III** muestra la relación de lesiones histológicas en ambos genotipos. Los pacientes del grupo mutante presentaron con mayor frecuencia inflamación portal moderada-severa (86.7%) en la biopsia hepática comparado con los pacientes del genotipo salvaje (19.7%). El grupo del genotipo mutante presentó fibrosis con mayor frecuencia (73,3%) que el grupo salvaje (51.3%).

TABLA III.-

**PARÁMETROS HISTOLÓGICOS**

PARÁMETROS	G308G (N=51)	G308A (N=15)	P
<b>ESTEATOSIS</b>			
Leve	21(41.2%)	6(40.0%)	ns
Moderada-Severa	30(58.8%)	9(60.0%)	ns
<b>INFLAMACIÓN LOBULILLAR</b>			
Leve	20(39.3%)	5(33.4%)	ns
Moderada-severa	31(60.7%)	10(66.6%)	ns
<b>INFLAMACIÓN PORTAL</b>			
Leve	41(80.3%)	2(13.3%)*	<0.05
Moderada-severa	10(19.7%)	13(86.7%)*	<0.05
<b>FIBROSIS</b>			
Ausente	25(49.0%)	4(26.7%)*	<0.05
Presente	26(51.0%)	11(73.3%)*	<0.05

Test de Chi square, diferencias en cada estadio

(\*) $p < 0.05$ . (%) frecuencias en cada grupo genotípico.

Los pacientes con inflamación portal moderada-severa tuvieron niveles más altos de TNF-alfa ( $7.4 \pm 4.1$  pg/ml vs  $4.9 \pm 3.1$  pg/ml;  $p < 0.05$ ), HOMA ( $6.2 \pm 3.1$  vs  $3.8 \pm 2.4$ ;  $p < 0.05$ ), masa grasa ( $30.5 \pm 8.2$  Kg vs  $22.6 \pm 7.9$  kg;  $p < 0.05$ ), IMC ( $39.8 \pm 11.1$  kg/m<sup>2</sup> vs  $30.1 \pm 6.1$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0.05$ ) que los pacientes con inflamación portal leve. Después del análisis univariante, se realizó el análisis multivariante. En el análisis multivariante se analizó como variable dependiente la inflamación portal y se ajustó para la edad, sexo, IMC y genotipo. Este análisis mostró que el HOMA permanecía en el modelo con un incremento de probabilidad de desarrollar inflamación moderada-severa de 1.45 (CI95%: 1.02-2.1) con cada incremento de una unidad en los niveles de HOMA.

Los pacientes con fibrosis presentaron niveles más altos de HOMA ( $4.1 \pm 2.3$  vs  $2.9 \pm 1.7$ ;  $p < 0.05$ ), masa grasa ( $28.2 \pm 8.4$  Kg vs  $23.4 \pm 8.6$  kg;  $p < 0.05$ ) y de IMC ( $35.3 \pm 10.8$  kg/m<sup>2</sup> vs  $29.8 \pm 5.2$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0.05$ ) que los pacientes sin fibrosis. El análisis multivariante ajustado por edad, sexo, IMC, y genotipo con la fibrosis como variable dependiente mostró que el HOMA permanecía en el modelo, con un incremento de la probabilidad de desarrollar fibrosis de 1.78 (CI95%: 1.06-3.2) con cada incremento de una unidad de los niveles de HOMA.

**DISCUSIÓN**

El presente estudio demuestra que el polimorfismo G308A del TNF-alfa se asocia con resistencia a la insulina, niveles más altos de TNF-alfa, inflamación portal y la fibrosis hepática en pacientes con EHGNA. En el análisis

de regresión logística, sólo la resistencia a la insulina se asocia con inflamación portal y fibrosis. El polimorfismo en la posición -308 (-308 TNF-G> A) conduce a una mayor tasa de transcripción del gen del TNF-alfa, seguido por incrementos en las concentraciones de TNF alfa y disminución de la sensibilidad a la insulina<sup>(13)</sup>. El mecanismo de resistencia a la insulina implica regulación a la baja de PPARgamma y C/EBPalpha, que han demostrado ser los propagadores de la diferenciación de adipocitos<sup>(14)</sup>.

Otro mecanismo es la baja regulación de GLUT-4 u otros componentes celulares que median los efectos metabólicos de la insulina<sup>(15)</sup>. Marchesini et al<sup>(15)</sup> también demostraron una correlación estrecha entre la resistencia a la insulina (HOMA) y EHGNA. Otros autores han detectado esta relación mediante la técnica de la abrazadera<sup>(16-18)</sup> con resultados que apoyan nuestras conclusiones. La naturaleza de la relación entre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática no está clara<sup>(19)</sup>. En los pacientes obesos, la anomalía primaria puede ser la resistencia a la insulina inducida genéticamente, con un incremento secundario de los niveles de triglicéridos en suero necesarias para mejorar la lipólisis periférica. La oferta resultante hepática de ácidos grasos y la insulina puede aumentar el depósito de triglicéridos en el hígado<sup>(20-21)</sup>.

El TNF alfa también tiene un papel central en el desarrollo de la esteatosis hepática y EHNA posteriormente. Niveles elevados de TNF alfa circulantes se asocian con la obesidad y resistencia a la insulina en los seres humanos<sup>(22)</sup>. Se sugirió que la acción profibrótica del TNF alfa está mediada por la activación de las células de Kupffer<sup>(23)</sup>. El tratamiento de ratones deficientes en leptina con anticuerpos TNF alfa aumenta la resistencia a la insulina hepática y el hígado graso<sup>(24)</sup>. Sin embargo, los resultados son contradictorios en el caso de TNF alfa en los seres humanos, que podría reflejar las diferentes poblaciones de estudio o la falta de ajuste por varios factores que pueden influir en su relación, por ejemplo los antecedentes genéticos de la población estudiada. Hui et al<sup>(5)</sup> mostraron que aunque los niveles de TNF alfa muestran importantes diferencias en pacientes con EHGNA y controles, no hay tal diferencia entre EHNA y esteatosis simple.

En un estudio de 23 pacientes con EHNA, 21 de ellos con esteatosis simple y comparado con 18 controles, mostró que los niveles séricos de TNF alfa y el receptor 1 de TNF eran significativamente más altos en la EHNA en comparación con los controles y los paciente con esteatosis simple<sup>(25)</sup>. Sin embargo, no hubo diferencia significativa de los niveles de TNF alfa en suero entre una población de pacientes con EHNA no obesos, no diabéticos y controles pareados<sup>(26)</sup>. Tal vez, estos resultados diferentes podría explicarse por los criterios de inclusión y la heterogeneidad de los sujetos (edad, índice de



masa corporal basal, la presencia de diabetes mellitus, antecedentes genéticos) en los diversos estudios de la literatura y nuestro estudio.

Por otra parte algunos efectos genotípicos deberían ser específicos de poblaciones. Además, el polimorfismo 238 del TNF alfa se encontró con una frecuencia significativamente mayor en pacientes con hígado graso que los controles sanos<sup>(27)</sup> y los polimorfismos 1031 y 863A en la EHNA que en la esteatosis simple<sup>(28)</sup>.

En varones españoles alcohólicos, el polimorfismo 238GA de TNF alfa se asoció con cirrosis hepática alcohólica<sup>(29)</sup>. Carulli et al<sup>(30)</sup> han demostrado una asociación entre el polimorfismo de la interleucina-6-174G/C y la EHGNA.

En conclusión, el genotipo G308A se asocia con mayor resistencia a la insulina y niveles más altos de TNF-alfa que el genotipo G308G. Los pacientes con genotipo mutante tienen con mayor frecuencia inflamación portal moderada-grave así como fibrosis con respecto al genotipo salvaje. La resistencia a la insulina puede ser el nexo bioquímico, ya que el HOMA permaneció en el modelo de regresión logística ajustado. Por lo tanto de este estudio se desprende que los polimorfismos genéticos del TNF alfa, que participan en la inflamación y resistencia a la insulina, están asociados con la EHGNA, y esta asociación podría ayudar en la comprensión de la susceptibilidad genética a la EHGNA.

## REFERENCIAS

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proc* 1980;55:434-8.
2. Kral JG, Schaffner F, Pierson RN, Wang J: Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism* 1993;42:548-51.
3. Aller R, de Luis DA, Fernández L, Caller F, Velayos B, Olcoz JL, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, González JM. Influence of insulin resistance and adipokines in the grade of steatosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2008;53:1088-92.
4. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG: Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1513-7.
5. 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.
6. Qi C, Pekala PH. Tumor necrosis factor alpha induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:128-5.
7. Wilson AG, Simons JA, McDowell TL, McDevitt HO. Effects of polymorphism of TNF alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
8. Fernández Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, Casamitjan R, Fernández Castaner. The TNF alpha gene NCO I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 1997;46:1468-71.
9. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16.
10. Duart MJ, Arroyo CO, Moreno JL. Validation of a insulin model for the reactions in RIA. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1161-7.
11. Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Pedersen O. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-4.
12. Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufactures. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;61:35-9.
13. Bayley JP, de Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF alpha promoter. *Cytokine* 2001;14:316-33.
14. Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkoski D. Negative regulation of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor alpha. *Mol Endocrinol* 1996;10:1457-66.
15. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional representation of the glut 4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 1991;266:21839-45.
16. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate A, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ: Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J of Medicine* 1999;107:450-4.
17. Sanyal AJ, Campbell Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-92.
18. Rashid M, Roberts EA: Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:48-53.
19. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell G, Holmes-Walker J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;73:373-8.
20. Venturi C, Zoppini G, Zamboni C, Muggeo M. Insulin sensitivity and hepatic steatosis in obese subjects with normal glucose tolerance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004;14:200-4.
21. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The J of Clin Invest* 2004;114:147-152.
22. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The J of Lin Investig* 2003;112:1785-8.
23. Tomita K, Tamiya S, Ando S. TNF alpha signalling through activation Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006;55:415-24.
24. Li Z, Yang S, Lin H. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve NAFLD. *Hepatology* 2003;37:343-50.
25. Abiru S, Migita K, Maeda Y. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver International* 2006;26:39-45.
26. Musso G, Gambino M, Durazzo M. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005;42:1175-83.

27. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122: 274-80.
28. Tokushige K, Takakura M, Tsuchiya Matsushita M, Tanai M, Hashimoto E, Shiratori K. Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis. *J of Hepatology* 2007;1104-10.
29. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, Gonzalez Sarmiento R. 238 GA polymorphism of TNF alpha is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men. *Alcohol CLin Exp Res* 2005;29:1928-31.
30. Carulli L, Canedi I, Rondinella S, Lombardini S, Ganazi D, Fargion S. Genetic polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease interleukin-6-174G/C polymorphism is associated with non alcoholic steatohepatitis, *Dig Liver Dis* 2009;41:823-8.