



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

TÍTULO

**METADOXINA VS PLACEBO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD
HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA: ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO
DOBLE CIEGO CONTROLADO CON PLACEBO**

MODALIDAD POR INGRESO A DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA
ALUMNO
LEONARDO ALBERTO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

TUTOR DE MAESTRÍA
DR. ALDO TORRE DELGADILLO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRAN
DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGÍA

TUTOR DE DOCTORADO
DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ
FACULTAD DE MEDICINA UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRAN
DIRECTOR GENERAL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de Contenidos

Antecedentes.....	3
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación y viabilidad del proyecto.....	5
Hipótesis.....	6
Objetivos.....	6
Objetivo primario.....	7
Objetivo secundario	7
Material y métodos.....	7
Diseño del estudio.....	9
Cálculo de Muestra.....	10
Análisis estadístico.....	11
Criterios de inclusión, exclusión.....	11
Criterios de eliminación.....	12
Aspectos éticos	12
Aplicación de recursos financieros y Plan de Trabajo.....	14
Bibliografía.....	17

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Se han empleado múltiples tratamientos en la enfermedad hepática grasa no alcohólica, sin embargo ninguno de ellos ha mostrado ser más eficaz que el cambio en los estilos de vida mediante dieta y ejercicio. La resistencia a la insulina tiene un papel clave en la esteatosis hepática y está presente en la inmensa mayoría de los pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica.

La metadoxina es el ion par entre la piridoxina y el ácido pirrolidoncarboxílico. Las sales del ácido piroglutámico o pirrolidona carboxilatos, son fácilmente hidrolizadas en el organismo tornando el ácido cíclico disponible para procesos metabólicos. Se encuentra fisiológicamente presente en varios tejidos del organismo, incluyendo el tejido nervioso y se obtiene de la dieta o a partir de la ciclización del ácido glutámico. Antagoniza la peroxidación lipídica en las células hepáticas, restaurando el daño hepático resultante de la ingesta prolongada del alcohol y reduce el hígado graso en la hepatitis crónica; además, actúa específicamente sobre los sistemas neurotransmisores involucrados en la liberación del GABA y de la acetilcolina y también protege la estructura y función de la célula actuando sobre aquellos procesos bioquímicos que intervienen en el

mantenimiento óptimo y está siendo estudiada en diversas poblaciones (clinicaltrials.gov) como opción de tratamiento para la esteatosis hepática no alcohólica la cual histológicamente es indistinguible de la alcohólica, siendo el contexto clínico la punta de lanza en el diagnóstico diferencial.

Ante diversas opciones de estrategias terapéuticas que en sí no son totalmente superiores a la terapia estándar de modificaciones al estilo de vida, dieta y ejercicio para disminuir la progresión o inducir regresión de la enfermedad, es necesario el entendimiento del comportamiento de nuevos fármacos como tratamiento de la enfermedad hepática grasa no alcohólica y su relación con la hepatoprotección.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Las enfermedades hepáticas, y en particular el hígado graso, se ha convertido en un importante problema de salud pública en nuestro país, la evolución ha sido rápida y progresiva pudiendo llegar a tener un grave impacto a nivel de nuestro sistema de salud. Aproximadamente 52.2 millones de mexicanos sufren de sobrepeso y obesidad, los cuales están en riesgo de presentar hígado graso. El hígado graso se ha descrito como una enfermedad que no tiene síntomas claros, cuya problemática mayor radica en ser el padecimiento hepático con más prevalencia en occidente, el cual además está teniendo un incremento importante relacionado directamente con la pandemia de obesidad y debido al hecho de que al momento del diagnóstico de un 30 a un 50% tienen algún grado de fibrosis avanzada; lo cual constituye una prioridad en el abordaje diagnóstico de este padecimiento que más que una entidad aislada; la enfermedad hepática grasa no alcohólica, es un padecimiento que va desde la acumulación de grasa en el hígado

(esteatosis) e inflamación hepática (esteatohepatitis), hasta fibrosis y cirrosis, con todas sus complicaciones. Actualmente existen métodos no invasivos confiables y validados como predictores de fibrosis: Existen sistemas de puntaje basados en marcadores serológicos (V.G. fibromax®, NAFLD score, índice APRI, cociente ALT/AST, FIB4 y BARD) y métodos de imagen no invasivos ya validados como el Fibroscan® y ARFI®.

Se ha descrito en la literatura efectos benéficos relacionados a la combinación de la metadoxina, sobre todo utilizado como profilaxis y tratamiento para hepatitis agudas y crónicas, esteatosis no alcohólica, alcohólica, esteatohepatitis, cirrosis, etc. Lo cual abre camino a la generación de experiencia al respecto de esta opción terapéutica en nuestra población.

JUSTIFICACIÓN:

El tratamiento de esta entidad clínica no está bien establecido y de los abordajes terapéuticos actuales la mayoría de ellos no ofrecen mejoría a nivel ultra estructural que pudiese ser corroborado histológicamente dadas las implicaciones éticas que implica la realización de una biopsia hepática basal y post tratamiento. Hoy día existen diversos ensayos clínicos explorando diversas terapias, incluyendo la que nos ocupa, hoy día existen métodos no invasivos validados para enfermedad hepática grasa no alcohólica que permiten con certeza definir el estadio de fibrosis. En este contexto el obtener nuevos conocimientos de la fisiopatología, historia natural y posibles terapéuticas encaminadas a abatir este problema tienen una prioridad en los servicios de salud no solamente a nivel nacional sino mundial.

VIABILIDAD DEL PROBLEMA A RESOLVER:

Hoy día en el mundo continúa generándose evidencia sobre diferentes terapias para la enfermedad hepática grasa no alcohólica, la que nosotros planteamos es innovadora y tiene su sustrato científico en la fisiopatología de la enfermedad. Deseamos incorporar mediante evidencia una nueva herramienta terapéutica al alcance de nuestro medio con objeto de reducir las tasas de prevalencia de la enfermedad y sus complicaciones.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS VERDADERA:

En pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica la administración de METADOXINA al tratamiento convencional mejorará el patrón basal ecosonográfico de esteatosis así como el NAFLD fibrosis score, FIB4 y el índice APRI en 70% o más de los pacientes.

HIPÓTESIS NULA:

En pacientes con esteatohepatitis no alcohólica o esteatosis hepática la administración de METADOXINA NO mejorará el patrón basal ecosonográfico de esteatosis ni el NAFLD fibrosis score, FIB4 y el índice APRI en 70% de los pacientes

OBJETIVOS

A) PRIMARIO:

Determinar si en pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica, la adición de METADOXINA 500mg cada 12 horas al tratamiento convencional mejora el patrón de esteatosis determinado por ecosonografía y métodos no invasivos de determinación de fibrosis y esteatosis validados en población mexicana (APRI, FIB4 y NAFLD SCORE).

B) SECUNDARIOS:

- 1.- Determinar magnitud de cambios en la mejoría bioquímica de las pruebas de función hepáticas y el tiempo de cambio en ella con el tratamiento instaurado.
- 2.- Determinar magnitud del cambio en los parámetros de clasificación del síndrome metabólico como son peso, IMC, glucemia, concentración sérica de lípidos (TG, colesterol total y colesterolos HDL y LDL), presión arterial sistémica, perímetro abdominal, albuminuria.
- 3.- Determinar el estado de oxidación/anti oxidación plasmáticos que prevalece en este grupo de pacientes en tiempo basal y final.
- 4.- Determinar si la adición de METADOXINA mejora marcadores de lipoperoxidación (Malondealdehido)
- 5.- Determinar si la adición de METADOXINA disminuye las concentraciones de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α .
- 6.- Determinar si la adición de METADOXINA modifica las concentraciones de leptina y adiponectina.

METODOLOGÍA:

Infraestructura para el desarrollo de la investigación.

Se efectuará en pacientes reclutados en la consulta externa de Gastroenterología, endocrinología, medicina interna y clínica de Obesidad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

106 pacientes serán reclutados de la consulta externa de medicina interna, endocrinología, obesidad, gastroenterología o preconsulta del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Dr. Salvador Zubirán”, todos los pacientes contarán

con el diagnóstico establecido por médico tratante y sustentado por ultrasonido y biopsia hepática realizados con fines de su abordaje diagnóstico y nunca como medio para ingreso al presente estudio; los pacientes serán seleccionados de acuerdo a:

1.- La presencia de alteración de las pruebas de funcionamiento hepático y/o hallazgos por estudios e imagen que sugieran **esteatosis hepática no alcohólica** y reporte histopatológico de biopsia hepática solicitada por médico tratante siempre con motivo de su abordaje diagnóstico ajeno a este estudio e indicado por su facultativo y nunca como maniobra para inclusión explícita a este protocolo de investigación.

2.- Diagnóstico de esteatohepatitis establecido por estudio histopatológico y estadiado acorde a la clasificación de Brunt y Kleiner

3.- Síndrome metabólico por definición consenso publicada en Circulation 2009.

Es menester señalar que al ser la enfermedad hepática grasa no alcohólica un diagnóstico de exclusión, los pacientes elegibles al protocolo deberán ya contar con el abordaje correspondiente para la posible hepatopatía y ser definido su diagnóstico por el facultativo tratante por lo que los valores de las determinación de estos estudios bioquímicos serán tomados como valores basales: glucemias basales, curvas de tolerancia, AST, ALT, bilirrubina total, directa e indirecta, así como albúmina sérica, fosfatasa alcalina y gammaglutamiltransferasa. Así toda vez que el paciente cuente con diagnóstico establecido de ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA: ESTEATOSIS HEPÁTICA (NAFLD) Ó ESTEATOHEPATITIS (abordaje ya realizado), podrá ser elegible y seleccionado para nuestra base de datos, por lo cual tomaremos lo valores bioquímicos al

momento del diagnóstico, incluyendo los necesarios para descartar la existencia de otras enfermedades hepáticas: ANA, AMA, ASMA, perfil de hepatitis crónica (Virus B y C de hepatitis), cifras de hierro sérico y capacidad de fijación, VSG. La determinación de malondealdehído, leptina, adiponectina, factor de necrosis tisular, interleucinas, fibrotest y steatotest correrán a cargo del laboratorio del departamento de gastroenterología del INCMNSZ con KITS obtenidos con antelación por el investigador principal. Dado sea el caso: El análisis histopatológico correrá a cargo de patólogos certificados y cegados al cuadro clínico del paciente.

El análisis imagenológico correrá a cargo de radiólogos certificados y cegado al cuadro clínico del paciente quienes cuentan con una concordancia κ 0.82 para el diagnóstico de esteatosis por ultrasonido, estudio validado con antelación en investigaciones previas de la línea del tutor y co-tutor del presente estudio.

El análisis e interpretación de los scores no invasivos correrá a cargo de hepatólogo experto con más de 10 años de experiencia en el manejo del tema de esteatosis hepática, ajeno al presente estudio y cegado a los demás resultados de los pacientes. Y para el análisis se contará con el software LiverCalc©.

El estudio está aceptado por el comité de ética institucional y será registrado en [clinical trials.gov](http://clinicaltrials.gov)

DISEÑO

Estudio clínico abierto, aleatorizado doble ciego, controlado con placebo

Existirán 2 grupos de pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica, los cuales serán distribuidos de la siguiente manera según el tratamiento asignado: 58 pacientes por grupo (tratamiento activo / placebo)

A); METADOXINA 500 mg cada 12 hrs + dieta establecida por nutrióloga certificada + 1 hora de ejercicio aeróbico 3 veces por semana.

B) PLACEBO + dieta establecida por nutrióloga certificada + 1 hora de ejercicio aeróbico 3 veces por semana.

Se realizaran determinación de variables basales y a los 6 meses post tratamiento, pero se realizará evaluación médica y apoyo nutricional mensual durante el seguimiento y hasta 6 meses posterior al mismo.

CÁLCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA

Deseamos evaluar si el Tratamiento adicionado con metadoxina es mejor que el tratamiento convencional (dieta+ejercicico) para la mejoría de esteatosis para lo que se diseñó el presente ensayo clínico. Sabemos por datos previos que la eficacia de la terapia convencional habitual está alrededor del 65% y consideramos clínicamente relevante si metadoxina lograra mejoría de esteatosis por arriba de este porcentaje 70. Nuestro nivel de riesgo lo fijamos en 0.05 y deseamos un poder estadístico de un 80%.

$$n = \frac{\left[Z_{\alpha} * \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} * \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

$$p = \frac{0.7 + 0.9}{2} = 0.8$$

$$n = \frac{\left[1.645 * \sqrt{2 * 0.8(1-0.8)} + 0.842 * \sqrt{0.7(1-0.7) + 0.9(1-0.9)} \right]^2}{(0.7 - 0.9)^2}$$

n = 48 pacientes. En cada grupo precisamos 48 pacientes.

+ 10 (considerando pérdidas)= 58 pacientes por brazo de estudio (2) para un total de 106. La duración del seguimiento en cada individuo estudiado será de 6 meses.

La distribución de los individuos a cada grupo será determinada según la letra que se obtenga de un sobre numerado según el número de paciente y que será determinada por un programa de computadora que emitirá una lista al azar. (www.randomization.com). *Los investigadores y los pacientes estarán cegados al tipo tratamiento asignado, la presentación de placebo y sustancia activa será idéntica. Los sobres estarán bajo resguardo de hepatólogo experto ajeno al estudio y se abrirán previa notificación al comité de ética, si y solo si existiese evidencia de reacción adversa o efecto dañino a la salud del paciente.*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizará el software de SPSS Versión 20. Se utilizará estadística descriptiva para la presentación de variables, se valorará con pruebas de “normalidad” el comportamiento de las variables y con base al resultado; las variables continuas serán expresadas en medias y desviación estándar o medianas y percentiles. Las variables categóricas serán expresadas con frecuencias y porcentajes. Se usará T de student para comparación de medias, χ^2 o prueba exacta de Fisher para categóricas. se considerará $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El modelo de evaluación de los resultados y correlación se efectuará con regresión logística acorde a los resultados del análisis univariado. Se realizará análisis por intención a tratar.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

INCLUSIÓN: Pacientes que cumplan criterios hígado graso acorde a las guías de mayo 2012, síndrome metabólico definición consenso del 2009, entre 18 y 65 años de edad; que no se encuentren recibiendo vitaminas o medicina herbolaria; con reporte ultrasonográfico e histológico compatible, que no se encuentren participando en otra investigación; no embarazadas.

EXCLUSIÓN: Pacientes con esteatosis secundaria, ingesta reciente de alcohol mayor a 50 gramos por semana o duda diagnóstica, alcoholismo crónico o estigmas de tal enfermedad. Mujeres en edad fértil sin un método anticonceptivo eficaz o embarazadas; pacientes que en el mes previo hayan recibido multivitamínicos, anomalías de la coagulación o anatómicas en la zona hepática. Alergia conocida en algún momento de la vida a los activos en estudio, pacientes que hayan cursado con cambios de peso mayor a 10% durante las últimas 5 semanas, ya sea aumento o disminución del mismo y/o retiro voluntario.

ELIMINACIÓN: Pacientes que no ingieran en forma adecuada su medicamento (verificado por conteo directo y recordatorio de ingesta del fármaco en cada cita); los que presenten efectos adversos; que no terminen el periodo de observación establecido; que no se posean todos los datos al final del estudio, aquellos que requieran internamiento que modifique sustancialmente su manejo. También se eliminarán a aquellos pacientes que motu proprio no cumplan con más de 90% de asistencia a las citas de control y seguimiento.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

A cada paciente se le invitará a participar en el estudio y se le explicarán ampliamente los resultados que se esperan obtener de este estudio, los posibles riesgos y los compromisos que adquiere al ingresar al estudio.

Se le explicará que en todo momento el grupo de investigadores estará dispuesto a resolver las posibles dudas que surjan a lo largo del desarrollo del protocolo.

Luego de esto se le dará un consentimiento informado en el que se explica el nombre del protocolo y se autoriza al personal de investigación para que realicen lo pertinente al estudio y se pedirá que se firme por el paciente y 2 personas que no pertenezcan al grupo de investigadores.

Los estudios de laboratorio especiales (interleucinas, actividad antioxidante total del plasma, malonilaldehído) no causarán costo al paciente. El resto de los estudios solicitados corresponde al abordaje habitual de un paciente con enfermedad hepática grasa no alcohólica. Los resultados derivados de cada paciente serán acumulados en una base de datos en Office Excel realizada Exprofeso para este estudio y analizados con ayuda del paquete estadístico SPSS 20 acorde a metodología.

Riesgos. Los fenómenos idiosincrásicos con los compuestos en estudio son raros, en general tienen una buena tolerabilidad y un índice bajo de eventos adversos. Entre estos y en mayor frecuencia se encuentran: náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, sudoración, debilidad y urticaria, reacciones de hipersensibilidad, cefalea tensional y bradipnea. Al día de hoy no se han reportado casos de muerte relacionados con uso a las dosis estandarizadas para el proyecto de metadoxina. El excipiente del placebo será inodoro e insípido con una base inerte de disacárido. Ningún procedimiento invasivo ha de realizarse con objeto del estudio PER SEy su requisición depende exclusivamente del clínico tratante del paciente. Dado que no existen estudios a largo plazo, no se recomienda ingesta

de metadoxina durante la gestación. Interacciones: En los enfermos de Parkinson tratados con L-dopa, la metadoxina puede antagonizar el efecto de ese fármaco.

APLICACIÓN DE RECURSOS FINANCIEROS Y PLAN DE TRABAJO:

Este estudio incluirá pacientes cuya hepatopatía en estudio hayan sido abordada por su médico tratante por lo que los estudios de laboratorio basales y de seguimiento serán los solicitados por el facultativo. El departamento de gastroenterología sufragará los gastos del medicamento durante toda la fase del estudio para los pacientes seleccionados, el medicamento tiene un costo comercial de \$220.00 m.n., no implicará costo alguno para el paciente. El tutor cubrirán el costo de los ultrasonidos basales y finales. El costo de de cada USG de hígado y vía biliar es de \$300.00 m.n. Los scores clínicos pueden ser calculados en línea o vía software LiverCalc™

<http://www.scymed.com/en/smnxpc/pcdcc770.htm>

<http://nafldscore.com>

ambos con disponibilidad abierta sin restricción. Esta investigación no recibirá aportación económica de ningún laboratorio farmacéutico. Los autores no declaran conflicto de interés alguno. La adquisición del producto METADOXINA será gestionado y cubierto por el Dr. Aldo Torre Delgadillo y será donado sin costo o cuota de recuperación alguna a los pacientes de este brazo de estudio durante todo el periodo de seguimiento.

El financiamiento del análisis, redacción y preparación del escrito final correrá a cargo del investigador principal y en ningún momento se incluirá la participación de laboratorio farmacéutico alguno.

La adquisición de las interleucinas, factor de necrosis tumoral, malondealdehído, leptina, adiponectina serán cubiertos por el investigador principal a través de los kits basales con los que cuenta, aunado a los kits de requisición anual del departamento, con los cuales ya se cuenta.

PLAN DE TRABAJO:

Entrega de propuesta a comité de evaluación UNAM	Marzo 2014	A	Abril 2014
Reclutamiento de pacientes (pesquisa), Entrevistas con candidatos (explicación y firma de consentimiento)	Mayo 2014	A	Octubre 2015
Valoraciones clínicas y toma de muestras	Octubre 2014	A	Febrero 2015
Programación de estudios de imagen y determinación de scores	Octubre 2014	A	Febrero 2015
Ordenamiento, captura y preparación de información	MARZO 2015		
Primer reporte en extenso	Marzo 2015		

ANÁLISIS CRÍTICO Y PREPARACIÓN DEL ESCRITO FINAL	Mayo a junio 2015
PRESENTACION DEL TRABAJO EN EL LIVER MEETING 2016	
Estancia doctoral en la universidad de Kentucky bajo la tutoria del Dr. Paul Angulo: hepatología/ NASH / NAFLD 1 AÑO 2017	

ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo será sometido a revisión para su aprobación por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto para su registro.

Previo inclusión y asignación, todo candidato será informado sobre los objetivos, desarrollo, riesgos y beneficios del estudio, y se solicitará la firma de consentimiento informado. La forma de consentimiento informado se estructuró acorde con la Declaración de Helsinki, las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos y los requerimientos del Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto.

Es considerado de riesgo mínimo según la Ley General de Salud en materia de investigación en humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Naga Chalasani , MD, et al. Practice guidelines, *Am J Gastroenterol advance online publication*, 29 May 2012; doi: 10.1038/ajg. 2012.128
2. Angulo P. NAFLD and obesity *Gastroenterology* 2006; 130: 1848-1852.
3. Pérez-Gutiérrez OZ, et al. Validation study of systems for noninvasive diagnosis of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease in Latin population. *Annals of hepatology* 2013; 12 (3): 416-424
4. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC et al. The NAFLD fibrosis score: a non-invasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846-854.
5. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society;

- and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640.
6. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Mar;33(5):525-40.
 7. Adams LA, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease; *Postgrad Med J* 2006; 82: 315-322.
 8. Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis; *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(Suppl. 2): 71-73.
 9. Marchesini G, Natale S, Manini R, Agostini F. The treatment of fatty liver disease associated with the metabolic syndrome; *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(Suppl. 2): 37-39.
 10. Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M et al. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease; *Liver International* 2005; 25: 946-953.
 11. Bookman ID, Pham J, Guindi M, Heathcote EJ. Distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from fatty liver: serum-free fatty acids, insulin resistance, and serum lipoproteins (2006). *Liver international* 26: 566-571.
 12. Haynes P, Lianpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease in individuals with severe obesity (2004). *Clin Liver Dis* 8: 535-547.
 13. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease (2004). *Clin Liver Dis* 8: 521-533.

14. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis (2004). Clin Liver Dis 8: 639-671.
15. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases (2002). Journal of Hepatology 37: 56-62.
16. Neuschwander-Tetri B, Brunt EM, Wehmeir KR, Oliver D et al. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- γ ligand rosiglitazone (2003). Hepatology 38: 1008-1017.
17. Cortez-Pinto H, Carneiro de Moura M, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice (2005). Journal of Hepatology 1-12.
18. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis; Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis (2001). Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281: G1333-G1339.
19. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease (2005). CMAJ 172(7): 899-905.
20. American Gastroenterological Association Medical guidelines: nonalcoholic fatty liver disease (2012). Gastroenterology 123: 1702-1704.
21. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease (2004). Free Radical Biology & Medicine 37(9): 1499-1507.