



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

**INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD**

**EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE  
(IGFBP) EN EL SUERO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO  
ALCOHÓLICO DEBIDO A OBESIDAD MÓRBIDA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. IVETTE IRAIS ROMERO BELLO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DRA. CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA  
Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIÉRREZ REYES  
Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"**

**DR. MIGUEL ÁNGEL PEÑA RICO  
Universidad del Papaloapan**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



Programa de  
**MAESTRÍA y  
DOCTORADO** en  
Ciencias Médicas  
Odontológicas  
y de la Salud

OFICIO: FQUIM / JDCE / 25 / 2017

ASUNTO: JURADO DE EXAMEN,  
(Ciudad Universitaria)

**Coordinación**

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
DIRECTORA GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E

At'n: C.P. AGUSTÍN MERCADO  
Director de Certificación y Control Documental

Por medio de la presente, le informo a usted que el H. Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud, Maestría en Investigación Clínica Experimental en Salud –Bioquímica Clínica, en su sesión del 23 de junio del 2017, acordó poner a su consideración el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias, de la alumna ROMERO BELLO IVETTE IRAIS con número de cuenta 305326137, en la modalidad de "Tesis" que lleva por título "Evaluación de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) en el suero de pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico debido a obesidad mórbida.", bajo la dirección de la Dra. Carolina Guzmán Arriaga.

Presidente: Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes – Facultad de Medicina, UNAM.  
Vocal: Dra. Carolina Guzmán Arriaga – Facultad de Química, UNAM.  
Vocal: Dra. Martha Guevara Cruz – Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "SZ".  
Vocal: Dra. Aurora Elizabeth Serralde Zúñiga – Facultad de Medicina, UNAM  
Secretario: Dra. Claudia Huesca Gómez – Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de agosto de 2017

EL COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

Ciudad Universitaria, 04510  
tels. 5622-3778 y 68

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, la Dra. Carolina Guzmán Arriaga, por toda su paciencia y esfuerzo invertido en mi persona y formación académica.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes y el Dr. Miguel Ángel Peña Rico, quienes me apoyaron a lo largo del proyecto de investigación con su tiempo y críticas.

A las Dras. Elena Zambrano González y Marta Margarita Durand Carbajal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por su apoyo en la construcción de la base de datos de los pacientes.

Al Ing. Marco Gudiño por su ayuda en la captura digital de las imágenes de las tinciones histológicas.

Al personal del laboratorio HIPAM, Leticia Sánchez Gómez, Nicanor Maya Santos, José Ángel García López y Carlos Alberto Martínez Juárez por su apoyo durante todo el tiempo que he estado en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (No. de apoyo 424974) durante el desarrollo del presente trabajo para la obtención del grado de Maestra en Ciencias.

Este trabajo fue financiado por CONACYT (CB-22137).

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM) de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, en colaboración con el Dr. Carlos Aguilar Salinas, la Dra. Liliana Muñoz Hernández y la Unidad de Investigación de Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

*“El experimentador que no sabe lo que está buscando,  
no comprenderá lo que encuentra”*

*Claude Bernard*

## Índice de contenido

	Página
<b>I. Índice de abreviaturas.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Índice de figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>III. Índice de tablas.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. Resumen.....</b>	<b>11</b>
<b>V. Marco teórico</b>	
1. Generalidades de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	13
1.1. Prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	13
1.2. Prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en población con obesidad.....	13
1.3. Prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en población con obesidad mórbida.....	15
2. Características morfológicas del hígado.....	16
3. Fisiopatología de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	19
3.1. Características histológicas de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	19
3.2. Escala de actividad de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	22
3.3. Patogénesis de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	24
4. Métodos diagnósticos en la enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	27
4.1. Métodos de imagen.....	27
4.2. Marcadores séricos.....	28
5. Sistema de los factores de crecimiento insulinoide.....	29
5.1. Generalidades de las IGFBPs.....	29
5.2. IGFBPs y la enfermedad hepática por hígado graso no alcohólico.....	33
<b>VI. Planteamiento del problema.....</b>	<b>37</b>
<b>VII. Justificación.....</b>	<b>38</b>
<b>VIII. Hipótesis.....</b>	<b>39</b>
<b>IX. Objetivos</b>	
a. Objetivo general.....	40
b. Objetivos específicos.....	40
<b>X. Material y métodos</b>	
a. Sujetos.....	41

b. Estudios bioquímicos clínicos.....	41
c. Estudios histológicos.....	42
d. Clasificación de NAS.....	42
e. Sujetos Control.....	43
f. Cuantificación de IGFbps en suero.....	43
g. Análisis estadístico.....	43
h. Consideraciones éticas.....	44
<b>XI. Resultados</b>	
A. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.....	45
B. Histología.....	46
a) Tinción Hematoxilina-Eosina.....	46
b) Tinción tricrómica de Masson.....	48
C. Clasificación de los pacientes reclutados.....	49
D. Datos demográficos de los pacientes reclutados y clasificados.....	50
E. Datos bioquímicos de los pacientes reclutados y clasificados.....	53
F. Cuantificación de las IGFbps en los pacientes incluidos.....	58
<b>XII. Discusión.....</b>	64
<b>XIII. Conclusiones.....</b>	72
<b>XIV. Referencias.....</b>	73
<b>XV. Anexo I: Comparación entre puntuación de fibrosis de NAFLD y biopsia hepática.....</b>	85
<b>XVI. Anexo II: Metodología de la técnica arreglo en suspensión múltiple.....</b>	86

## I. Índice de abreviaturas

AG: Ácido graso

ALT: Alanino aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

AUDIT: Test de Identificación de Trastornos Relacionados con el Consumo de Alcohol

GLP-1: Péptido parecido al glucagón 1

H-E: Hematoxilina-eosina

HCC: Hepatocarcinoma celular

HSC: Célula estelar hepática

IGF: Factor de crecimiento insulinoide

IGFBP: Proteína de unión a IGF

IGFBP-rPs: Proteínas relacionadas con IGFBPs

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

KO: Knockout

MEC: Matriz extracelular

NAFLD: Enfermedad por hígado graso no alcohólico

NAS: Escala de actividad de NAFLD

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

PFH: Prueba de función hepática

RI: Resistencia a la insulina

SM: Síndrome metabólico

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral

## II. Índice de figuras

Figura 1. Prevalencia de NAFLD

Figura 2. Microarquitectura del acino hepático

Figura 3. Estructura del tejido hepático

Figura 4. Espectro de NAFLD

Figura 5. Imágenes representativas de las características microscópicas (esteatosis) de NAFLD.

Figura 6. Imágenes representativas de las características microscópicas (inflamación y balonamiento de hepatocitos) de NAFLD.

Figura 7. Componentes del sistema IGF

Figura 8. Diagrama de flujo de los pacientes reclutados e incluidos en el estudio

Figura 9. Imágenes representativas de las tinciones H-E de los pacientes incluidos

Figura 10. Imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson de los pacientes incluidos

Figura 11. Concentraciones séricas de las IGFBPs en los pacientes incluidos y clasificados en controles y NAFLD

Figura 12. Concentraciones séricas de las IGFBPs en los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia de la RI

Figura 13. Concentraciones séricas de las IGFBP-1 a la 6 en el espectro de NAFLD en los pacientes incluidos

Figura 14. Concentraciones séricas de IGFBP-7 en el espectro de NAFLD en los pacientes incluidos

Figura 15. Concentraciones séricas de las IGFBP-2 a la 7 en los pacientes incluidos y clasificados de acuerdo a la escala de Kleiner-Brunt

Figura 16. Concentraciones séricas de IGFBP-1 en los pacientes incluidos y clasificados de acuerdo a la escala de Kleiner-Brunt

### III. Índice de Tablas

Tabla 1. Puntuación de la escala NAS de acuerdo a los parámetros de esteatosis, infiltrado inflamatorio y balonamiento de hepatocitos

Tabla 2. Clasificación de la fibrosis en NAFLD con base en la escala NAS

Tabla 3. Métodos diagnósticos utilizados en la clínica para el detección de hígado graso no alcohólico y otras hepatopatías.

Tabla 4. Criterios utilizados para la selección de pacientes.

Tabla 5. Características demográficas de los pacientes obesos mórbidos incluidos y programados para cirugía bariátrica

Tabla 6. Número de pacientes incluidos y clasificados dentro del espectro de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD) con base en la escala de actividad de NAFLD (NAS)

Tabla 7. Número de pacientes incluidos y clasificados con base en la escala Kleiner-Brunt para determinar el grado de fibrosis

Tabla 8A. Datos demográficos de los pacientes incluidos

Tabla 8B. Datos demográficos de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS.

Tabla 9A. Química sanguínea de los pacientes incluidos

Tabla 9B. Química sanguínea de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS

Tabla 10A. Perfil de lípidos de los pacientes incluidos

Tabla 10B. Perfil de lípidos de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS

Tabla 11A. Pruebas de función hepática de los pacientes incluidos

Tabla 11B. Pruebas de función hepática de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS.

#### **IV. Resumen**

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD) se caracteriza por la acumulación de lípidos superior al 5% en el parénquima hepático en ausencia de consumo de alcohol. El espectro de la enfermedad progresa de esteatosis simple (acumulación de lípidos) a esteatohepatitis (NASH, con inflamación agregada y alteración morfológicas de los hepatocitos llamada balonamiento), la cual a su vez precede a la fibrosis y la cirrosis. Los métodos diagnósticos disponibles no son capaces de identificar la esteatosis menor a 30% ni NASH, ya que la biopsia hepática es la única herramienta capaz de identificar entre las etapas de NAFLD. En años recientes se ha propuesto una relación entre las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) y factores que pueden desencadenar NAFLD, por ejemplo, la resistencia a la insulina y síndrome metabólico. Las IGFBP-1 a la -7 son sintetizadas en el hígado y tienen como función clásica acarrear a los IGF en la circulación, sin embargo, también se ha demostrado que tienen efectos independientes a estos factores. El objetivo fue estudiar a las IGFBP como posibles biomarcadores de NAFLD, en sujetos con obesidad mórbida. Se incluyeron 46 pacientes obesos mórbidos programados para cirugía bariátrica, de entre 18 y 55 años, panel viral negativo, sin criterios de consumo riesgoso de alcohol (Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) <8) y cirrosis; estos fueron clasificados con base en la escala de actividad de NAFLD (NAS), inicialmente en grupos Control y NAFLD, y posteriormente el grupo de NAFLD se subclasificó en: Esteatosis simple, NASH limítrofe y NASH definitivo, teniendo 11 controles y 35 con NAFLD (4 con esteatosis, 20 con NASH limítrofe y 11 con NASH definitivo). Se realizaron pruebas bioquímicas; las biopsias de hígado obtenidas, se tiñeron con H-E y tricrómica de Masson para observar la severidad de NAFLD y fibrosis mediante las escalas NAS y Kleiner-Brunt, respectivamente. Los resultados obtenidos no muestran diferencias en los parámetros bioquímicos de química sanguínea y perfil de lípidos entre los diferentes grupos. Sin embargo, las pruebas de función hepática mostraron un incremento en las bilirrubinas entre los grupos NAFLD, NASH limítrofe y definitivo comparados con el grupo Control; no obstante, los datos están dentro de los valores de referencia o ligeramente por arriba del límite superior. También se observó elevación de las transaminasas en el grupo con NAFLD y NASH limítrofe comparados con el grupo Control; y en el grupo con NASH definitivo sólo hay un aumento de la

ALT comparado con el grupo Control. En las concentraciones séricas de las IGFBP1-7 no se encontraron diferencias entre los grupos Control y los sujetos con NAFLD. El análisis de IGFBP-1 a la 6 con respecto a la clasificación NAS no mostró diferencias, sin embargo, las concentraciones de IGFBP-7 estaban incrementadas en los pacientes con NASH limítrofe comparadas con los pacientes que sólo presentaban esteatosis. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de las IGFBP2-7 entre los estadios de fibrosis; no obstante, IGFBP-1 está disminuida en los pacientes con fibrosis perisinusoidal y portal comparada con aquellos pacientes que sólo presentaban fibrosis portal. Los resultados obtenidos muestran diferencias en las concentraciones séricas de IGFBP-1 entre los pacientes obesos mórbidos con F1C y aquellos que tenían F2; e IGFBP-7 entre los pacientes con esteatosis simple y los obesos mórbidos que presentaron NASH limítrofe en el espectro de NAFLD. En conclusión, IGFBP-7 puede ser un potencial biomarcador para diferenciar entre sujetos con NASH limítrofe y esteatosis simple, e IGFBP-1 entre sujetos con sólo fibrosis portal y fibrosis perisinusoidal y portal asociada a NAFLD. Este estudio podría favorecer la identificación de pacientes con NASH quienes tienen mayor riesgo de desarrollar fibrosis, cirrosis y falla hepática terminal.

## **V. Marco Teórico**

### **1. Generalidades de la enfermedad por hígado graso no alcohólico**

#### **1.1. Prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico**

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD, *por sus siglas en inglés, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) es una patología silenciosa [1] que comprende un amplio espectro de desórdenes hepáticos que incluyen esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica o NASH (por sus siglas en inglés, *non-alcoholic steatohepatitis*), fibrosis hepática relacionada a NASH, y cirrosis; los cuales son caracterizados por acumulación de grasa en el hígado en ausencia de infección o un consumo significativo de alcohol [2, 3]. Su prevalencia a nivel mundial es entre el 20 y 30% [4-6]; se ha reportado una prevalencia de 32.6% de esta enfermedad en población mexicana diagnosticada por tomografía computarizada [7].

Diversos factores pueden contribuir a su desarrollo entre los más relevantes se encuentran la obesidad, resistencia a la insulina (RI), diabetes tipo 2 (DT2), síndrome metabólico (SM), entre otros. De hecho, NAFLD se considera la manifestación hepática de éste último [8-10].

#### **1.2. Prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en población con obesidad**

En 2014, el 39% de la población adulta mundial de 18 años o más (38% hombres y 39% mujeres) tenían sobrepeso, y el 13% presentaban obesidad (11% hombres y 15% mujeres). Aunado a esto, la DT2 se encuentra a nivel mundial entre las primeras 10 causas de muerte, y ésta se ha relacionado fuertemente con la presencia de obesidad [11].

En nuestro país, aproximadamente el 63% de la población mexicana adulta sufre de sobrepeso y el 23% tiene obesidad; mientras que la prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil en México es de 19.8% y 14.6%, respectivamente [12].

En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de Medio Camino 2016 se reporta que la prevalencia de sobrepeso es de 39.2% y de obesidad de 33.3%, de este porcentaje 2.9% corresponde a obesidad mórbida. Además, la prevalencia de sobrepeso es mayor en hombres (41.7%) que en mujeres (37.0%); por el contrario, la prevalencia de obesidad es mayor en el sexo femenino (38.6%) que en el masculino (27.7%). Asimismo, la obesidad mórbida es 2.4 veces más alta en mujeres que en hombres [13].

En México, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte, seguidas por la DT2, ambas condiciones están relacionadas con la obesidad; mientras que las enfermedades hepáticas representan la quinta causa de muerte [12]

Cabe mencionar que la prevalencia de NAFLD se incrementa cuando la población presenta factores de riesgo metabólicos como obesidad, DT2 u otros componentes del SM [14, 15].

Mundialmente se ha reportado un amplio rango de prevalencias de NAFLD en sujetos con obesidad, desde 40 hasta 98% [16-19]; en relación a México, en el norte del país, se ha encontrado que el 58% de pacientes con NAFLD, confirmada por biopsia, presentan algún grado de obesidad [20].

Con respecto a la DT2, también se han reportado diversas prevalencias que van desde el 30 al 75% [6, 21-24]; y en México se tiene una incidencia de DT2 en el 26% de los pacientes diagnosticados con NAFLD confirmada por biopsia hepática [20]. Además, la DT2 incrementa la prevalencia y severidad de NAFLD [14], por ejemplo, los individuos diabéticos presentan más riesgo a desarrollar cirrosis comparado con aquellos sujetos que no tienen esta comorbilidad [9].

Asimismo, se ha reportado que al menos un 33% de los sujetos con NAFLD tienen SM [15, 25], en sujetos obesos con criterios para SM la prevalencia de NAFLD es de 67% [26], mientras que la prevalencia de esta enfermedad en población mexicana con SM, es de 83% [27].

Cabe mencionar que el SM está definido como la presencia de una combinación de al menos 3 de los siguientes criterios: obesidad central, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, disminución de HDL e hiperglicemia [8, 9, 28]; y se tiene reportado que la prevalencia de NAFLD incrementa con el número de componentes presentes del SM [15], además del 80-90% de los pacientes con NAFLD presenta al menos uno de los componentes de SM [15, 25]. Por ejemplo, se ha evidenciado una prevalencia de NAFLD del 20 hasta más del 90% en individuos con dislipidemia [16, 17, 21, 24, 29, 30]. En México, se ha reportado hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, y dislipidemia mixta en el 48, 63 y 42%, respectivamente, de pacientes con NAFLD diagnosticada por biopsia [20].

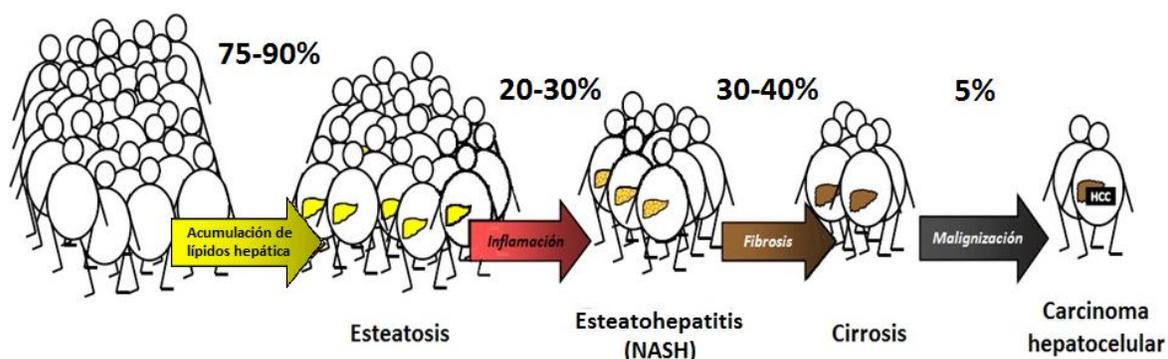
### **1.3. Prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en población con obesidad mórbida**

Como se mencionó anteriormente, la prevalencia de NAFLD incrementa con el número de componentes presentes del SM; así mismo, esto también sucede con el grado de obesidad, en donde a mayor grado de obesidad, mayor será la prevalencia de NAFLD. Por ejemplo, en la obesidad clase III u obesidad mórbida, la prevalencia de NAFLD es superior al 71% [9, 29] y puede incrementarse hasta más del 90% [9, 22, 27, 31-33] dependiendo de la población de estudio. En estadounidenses obesos mórbidos, la prevalencia de NAFLD es de 73-97%, mientras que en brasileños obesos mórbidos es de 76.6% [27].

La obesidad clase III se establece en individuos con un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 40, o mayor a 35 con comorbilidades (hipertensión arterial, DT2, dislipidemia) [32, 34-36].

Existe evidencia de la prevalencia de los estadios del espectro de NAFLD en este tipo población, como se muestra en la Figura 1. En obesos mórbidos NASH se presenta en 20 al 55% de esta población [9, 21, 26, 32]. Por otro lado, se tiene reportado que entre el 6 y 10% de los individuos con obesidad mórbida tienen fibrosis o cirrosis asociada a NASH [9, 21]; sin embargo, Losekann y colaboradores reportan que la prevalencia de fibrosis es del 12% y la de cirrosis del 2%, en sujetos obesos mórbidos que presentan NASH [32].

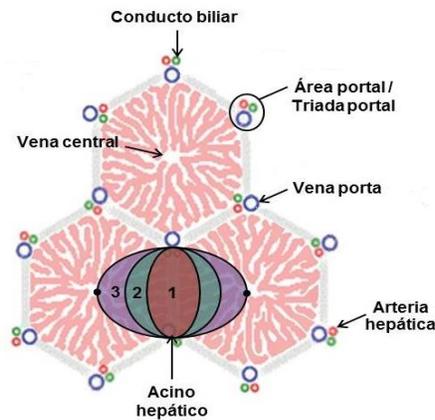
Cabe mencionar que se ha considerado que NAFLD/NASH es la principal causa de cirrosis criptogénica [1, 30].



**Figura 1. Prevalencia de NAFLD.** A partir de factores de riesgo como obesidad, RI, hipertensión y dislipidemia, se desarrolla esteatosis hepática, el progreso continúa a NASH, después a fibrosis/cirrosis y finalmente en hepatocarcinoma celular (HCC). Los porcentajes mostrados en la imagen se refieren al porcentaje de sujetos que desarrollan los diferentes estadios del espectro de NAFLD. Tomada y modificada de Dietrich y colaboradores [10].

## 2. Características morfológicas del hígado

El hígado es un órgano con una arquitectura considerablemente organizada, generalmente se reportan 3 conceptos de unidad estructural: lobulillo hepático, lobulillo portal y acino hepático; sin embargo, en la caracterización histológica en biopsias hepáticas la más utilizada es el acino hepático, éste se puede apreciar en la Figura 2.



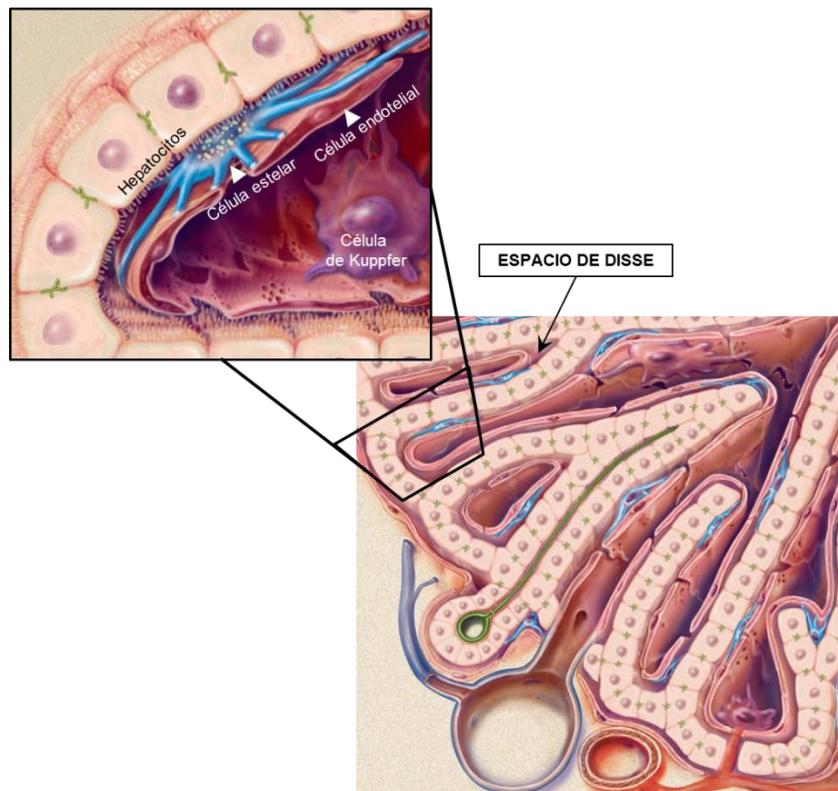
**Figura 2. Microarquitectura del acino hepático.** Triada o área portal: Vena porta (azul), conducto biliar (verde) y arteria hepática (rojo). El acino hepático con forma de elipse y abarca de una vena central a otra, se divide en 3 zonas, zona 1 (rojo), zona 2 (verde) y zona 3 (morado). Imagen tomada y modificada de Ebaid y colaboradores [37].

El acino es una unidad de forma de elipse, en su periferia se ubican espacios portales y venas hepáticas centrales. Esta unidad funcional es pequeña y se divide en tres zonas; la zona 1 representa el área alrededor de los tractos portales (también conocida como área periportal del lobulillo), la zona 3 representa el área alrededor de la vena central (también conocida como área pericentral del lobulillo) y la zona 2 es una zona en el centro del acino entre las zonas 1 y 3 [38].

En la microarquitectura hepática podemos encontrar diferentes células, y se pueden diferenciar esencialmente 2 tipos: parenquimales y no parenquimales. Las primeras son células que componen el parénquima hepático, como los hepatocitos y las células endoteliales; las segundas son básicamente células residentes del tejido hepático, dentro de las cuales están las células de Kupffer o macrófagos residentes del hígado, células dendríticas, linfocitos y linfocitos tipo NK, colangiocitos, fibroblastos y las células estelares (HSC, por sus siglas en inglés, *Hepatic Stellate Cells*) que son células que en su forma quiescente funcionan como depósitos de retinol, mientras que en su forma activada y como respuesta a agentes hepatotóxicos es la principal célula profibrogénica del hígado.

Las células parenquimales forman parte estructural de la unidad microvascular hepática, conocida como sinusoides.

El sinusoides tiene un revestimiento endotelial, distinguido por su fenestración, y está separado de los hepatocitos por el espacio subendotelial de Disse [39]. Es en este lugar donde se encuentran las HSC, como se aprecia en la Figura 3.

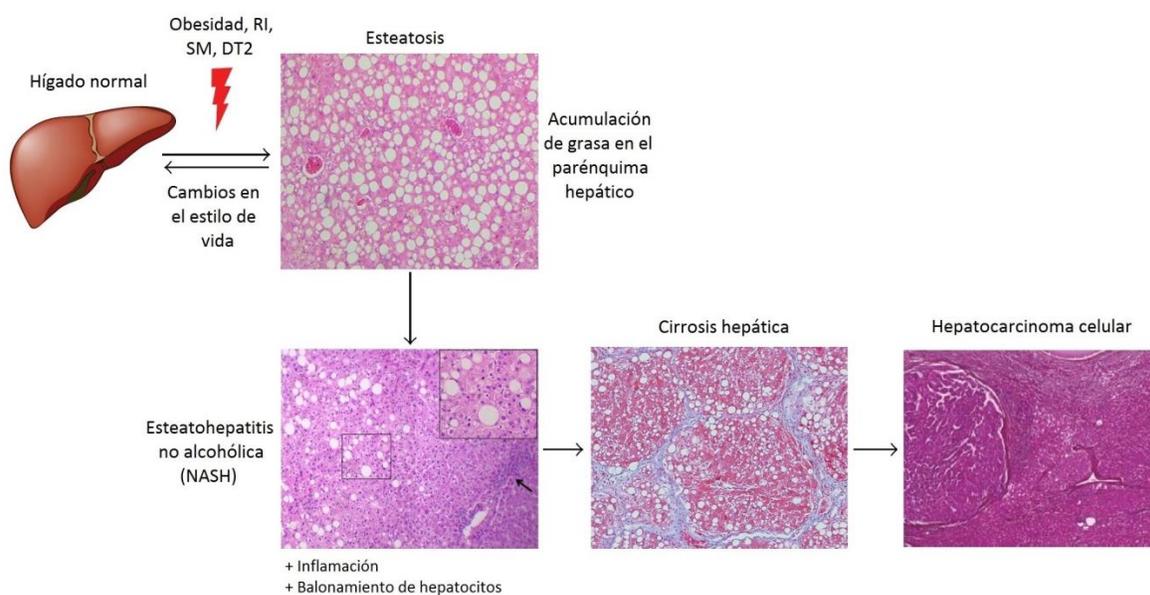


**Figura 3. Estructura del tejido hepático.** En el hígado los hepatocitos están organizados en hileras o cordones. El espacio subendotelial (espacio de Disse) se encuentra entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales, en esta zona se ubican las células estelares (azul). Las células de Kupffer (morado) se sitúan de manera intrasinusoidal. Imagen tomada de Friedman y colaboradores [40].

### 3. Fisiopatología de la enfermedad por hígado graso no alcohólico

#### 3.1. Características histológicas de la enfermedad por hígado graso no alcohólico

NAFLD es una entidad patológica que comprende un amplio espectro desde la esteatosis simple, NASH, fibrosis y cirrosis [8, 22, 41], ésta última es la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) como consecuencia final de la fibrosis e incrementa el riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma celular (HCC) [8, 28, 42, 43], como se muestra en la Figura 4.



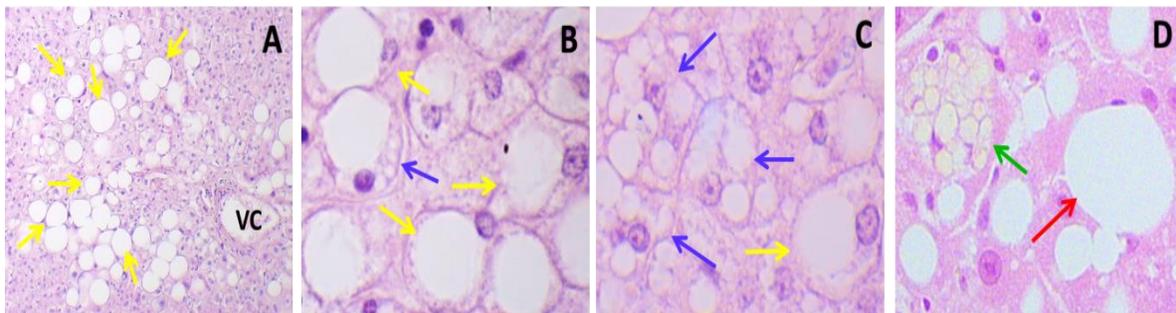
**Figura 4. Espectro de NAFLD.** La obesidad, RI, SM y DT2 pueden desarrollar esteatosis hepática si estos factores de riesgo se eliminan, este proceso puede revertirse, de lo contrario el daño se continúa hasta progresar a NASH, la cual se caracteriza por inflamación (flecha negra) y balonamiento de hepatocitos (delimitada en el cuadrado con bordes negros), posteriormente esto puede progresar a fibrosis/cirrosis y finalmente HCC. Tomada y modificada de Lavallard y colaboradores [44].

La esteatosis hepática es el resultado de la acumulación de triglicéridos en el hígado y se considera cuando el porcentaje acumulado en el parénquima hepático es superior a 5% [15, 45-47], y se presenta en la zona 3 del acino hepático [45, 48] y ocasionalmente en zona 1 (patrón característico de NAFLD pediátrico) [45]. En NAFLD, usualmente se

presenta de forma macrovesicular, aunque también puede observarse esteatosis mediovesicular o microvesicular, ésta última es poco común en esta patología [45, 47, 49].

La esteatosis macrovesicular puede observarse como gotas o vacuolas grandes de lípidos en el parénquima hepático [45, 49]; además, estas vacuolas, pueden ocupar casi por completo el interior del hepatocito y empujan su núcleo hacia la membrana [45, 47, 50, 51], como se puede observar en las Figuras 5A y 5B.

La esteatosis mediovesicular se puede observar como una mezcla de pequeñas y grandes gotas de lípidos, y estas pequeñas vacuolas pueden ser distinguidas unas de otras en el citoplasma del hepatocito, [45, 47] Figura 5B y 5C. Mientras que en la esteatosis microvesicular, el citoplasma del hepatocito es ocupado por numerosas vacuolas pequeñas, dándole a la célula una apariencia espumosa [45-47], Figura 5D. En la cirrosis, la esteatosis puede desaparecer parcial o completamente [47].



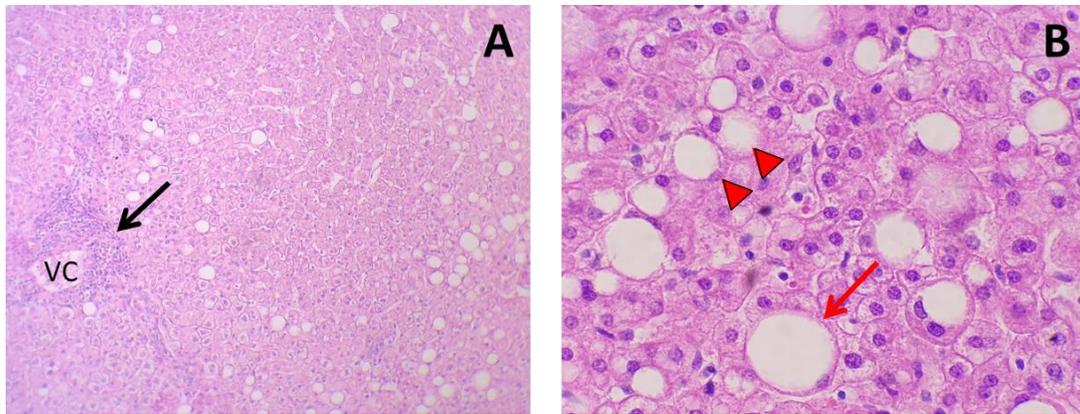
**Figura 5. Imágenes representativas de las características microscópicas (esteatosis) de NAFLD. A.** Con un aumento de 10X se observa la esteatosis macrovesicular (flechas amarillas) cerca de la vena central. **B.** Con un aumento de 40X se observa la esteatosis macrovesicular (flechas amarillas) como gotas grandes blancas dentro de los hepatocitos empujando el núcleo hacia la membrana, y mediovesicular (flecha azul) como gotas de diferentes tamaños dentro del hepatocito. **C.** Con un aumento de 40X se denota esteatosis mediovesicular (flechas azules), como gotas de diferentes tamaños dentro de los hepatocitos, y esteatosis macrovesicular (flecha amarilla). **D.** Con un aumento de 40X se visualiza un hepatocito balonado (flecha roja), donde el núcleo se encuentra comprimido contra la membrana plasmática del hepatocito, y esteatosis microvesicular (flecha verde) como pequeñas gotas blancas dentro del hepatocito, dándole a la célula apariencia de célula espumosa. VC: Vena central.

Por otro lado, NASH, presenta rasgos histológicos característicos como son la inflamación y el balonamiento o balonización de hepatocitos [45, 49], como se puede visualizar en la Figura 6, y la presencia de ambos es necesaria y suficiente para establecer el diagnóstico de NASH en el espectro de NAFLD [45].

La inflamación que se presenta en NASH está caracterizada por un infiltrado de leucocitos conformado por linfocitos, macrófagos y células de Kupffer; microgranulomas que son agregados de leucocitos, como las células de Kupffer, alrededor de hepatocitos dañados por ejemplo hepatocitos apoptóticos [46, 49] o lipogranulomas que son agregados leucocitarios alrededor de gotas de lípidos [46, 50]. El infiltrado inflamatorio puede localizarse principalmente en la zona 3 del acino hepático [45, 46], a esto también se le conoce como inflamación lobular (Figura 6A); sin embargo, puede coexistir con este tipo de inflamación, la inflamación portal que como su nombre lo indica, se localiza en las áreas portales.

El tipo de inflamación predominante en NASH es la inflamación lobular, no obstante, ocasionalmente se puede encontrar abundante inflamación portal [46], la cual ha sido sugerida como indicador de un pronóstico malo por su asociación con lesiones histológicas más severas y de fibrosis [45].

Por otra parte, el balonamiento de hepatocitos [50], presenta el citoplasma claro, no vacuolar, con una forma redonda, definida por la pérdida de la estructura cuboidal característica del hepatocito (Figura 6B), se observan frecuentemente en la zona 3 del acino hepático [45, 46, 49], donde pueden entremezclarse con fibras de colágena perisinusoidales [45]. Los desencadenantes fisiopatológicos de este proceso no se conocen bien en la actualidad, pero parecen estar relacionados con el daño a los filamentos intermedios intracelulares generado por el metabolismo de los ácidos grasos (AG) [45]; este daño al citoesqueleto ha sido demostrado por la pérdida de la expresión normal hepática de citoqueratina 8 y 18 [46, 52].



**Figura 6. Imágenes representativas de las características microscópicas (inflamación y balonamiento de hepatocitos) de NAFLD. A.** Con un aumento de 10X, se observa la presencia de infiltrado inflamatorio (flecha negra) alrededor de una vena central como acumulación de pequeños puntos morados. **B.** Con un aumento de 40X, se observa el balonamiento de hepatocitos (flecha roja) con la pérdida de su forma cuboidal, citoplasma claro y aumento considerable de su tamaño, y hepatocitos en proceso de balonamiento (puntas de fecha roja) con características de un hepatocito balonado pero sin el tamaño característico de éste. VC: Vena central.

### 3.2. Escala de actividad de la enfermedad por hígado graso no alcohólico

Existen diversas escalas para subclasificar a los pacientes con NAFLD dentro del espectro de ésta enfermedad; en 2005, Kleiner y colaboradores establecieron la escala de actividad de NAFLD [53], también conocida como NAS (por sus siglas en inglés, *NAFLD Activity Score*).

Esta escala se basa en 3 parámetros a los cuales se les asigna un puntaje de acuerdo a la severidad del parámetro en cuestión: esteatosis, inflamación y presencia de hepatocitos balonados.

Con respecto al parámetro de esteatosis, éste se puntúa de acuerdo al porcentaje presente en el parénquima hepático, menos del 5% recibe un puntaje de cero, del 5 al 33% de uno, del 33 al 66% de dos y más del 66% de tres. El parámetro de inflamación se

evalúa de acuerdo al número de focos inflamatorios evidenciados en el hígado, por cada 20 campos observados, un puntaje de cero cuando no hay ningún foco presente, un puntaje de uno cuando existen menos de 2 focos, un puntaje de dos cuando hay de 2 a 4 focos en el tejido hepático, y un puntaje de tres cuando el parénquima hepático tiene más de 4 focos inflamatorios. En cuanto al proceso de balonización de hepatocitos, la puntuación otorgada a este parámetro es de cero si no hay presencia de hepatocitos balonados, de uno si existen pocos hepatocitos balonados en el tejido hepático, y de dos cuando hay abundantes hepatocitos balonados.

Al sumar los diferentes puntajes de los parámetros se obtiene la escala NAS, como se puede observar en la Tabla 1, teniendo una puntuación de 0 para personas sin NAFLD, de 1-2 para aquellos individuos con esteatosis simple, de 3-4 con NASH limítrofe y mayor de 5 con NASH definitivo.

**Tabla 1. Puntuación de la escala NAS de acuerdo a los parámetros de esteatosis, infiltrado inflamatorio y balonamiento de hepatocitos**

Puntuación NAS	Definición
0	Sin NAFLD
1-2	Esteatosis simple
3-4	NASH limítrofe
5-8	NASH definitivo

Aunado a esta escala se debe evaluar la presencia de fibrosis y su severidad. La fibrosis es la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC), que resulta de una inflamación crónica no resuelta. Esta inflamación desencadena un proceso de reparación tisular que conduce a la formación de tejido cicatrizal [54].

La clasificación de la fibrosis en NAFLD es dividida en los siguientes estadios: F0 o sin presencia de fibrosis, F1 o con presencia de fibrosis perisinusoidal (acumulación de MEC alrededor de los sinusoides hepáticos) o portal (acumulación de MEC alrededor de las áreas portales), F2 o con presencia de fibrosis perisinusoidal y portal, F3 o fibrosis en

puente (septos fibrosos entre venas centrales, áreas portales o vena central-área portal) y F4 o cirrosis hepática, como se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2. Clasificación de la fibrosis en NAFLD con base en la escala NAS**

Estadio	Definición
F0	Sin fibrosis
F1	Fibrosis perisinusoidal o portal
F1A	Fibrosis perisinusoidal leve
F1B	Fibrosis perisinusoidal moderada
F1C	Fibrosis portal
F2	Fibrosis perisinusoidal y portal
F3	Fibrosis en puente
F4	Cirrosis

### 3.3. Patogénesis de la enfermedad por hígado graso no alcohólico

En 1998, Day y colaboradores [55] propusieron la actual hipótesis de los dos “hits” en NAFLD [4, 8, 22, 56].

El primer “hit” consiste en la acumulación AG en el interior de los hepatocitos resultante del desbalance entre la captación y exportación de lípidos intracelulares, su oxidación y potenciada por el incremento de la lipogénesis [10]; mientras que el segundo “hit” es iniciado por el estrés oxidativo y la resultante lipoperoxidación, así como la producción de citocinas pro-inflamatorias (principalmente el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  o TNF- $\alpha$ ), ocasionando muerte de los hepatocitos e inflamación [17, 57].

Con respecto al primer “hit”, la acumulación de AG es consecuencia del desbalance entre tres aspectos del metabolismo hepático de los lípidos; 1) la captación de lípidos en los hepatocitos (incremento en la liberación de AG del tejido adiposo al hígado, también asociada a la RI del tejido adiposo), 2) la lipogénesis “*de novo*”, originada por la RI

hepática, y 3) la remoción de lípidos del tejido hepático por disminución de la exportación de triglicéridos a través de las lipoproteínas de muy baja densidad, (VLDL, por sus siglas en inglés, *very-low density lipoprotein*) [42], y por disminución en la actividad de beta-oxidación [21, 58, 59]) [59]. Asimismo, un incremento en la ingesta de lípidos también puede contribuir a este desbalance.

En relación al incremento en la liberación de AG del tejido adiposo al hígado, como se mencionó anteriormente, es originada por la RI [28]. Ésta induce acumulación de lípidos dentro del hepatocito debido a que el tejido adiposo comienza a presentar resistencia a los efectos antilipolíticos de esta hormona; conllevando a un incremento de la lipólisis del tejido adiposo y por lo tanto, un aumento de la liberación de AG al hígado [22, 59], dicha liberación origina un incremento en el contenido de AG en el hígado, como se había señalado previamente, y ésta es la principal fuente de grasa intrahepática [21, 60]. Además, esta acumulación de lípidos intrahepática puede inhibir la fosforilación del sustrato del receptor de insulina, mediante la activación de PKC $\epsilon$ , contribuyendo al desarrollo de la RI hepática [8, 10].

Por otro lado, la lipogénesis “*de novo*” o síntesis de lípidos “*de novo*”, es el proceso por el cual el hígado produce AG de manera endógena, y es provocada de igual manera, por la RI [22], ya que la hiperinsulinemia puede estimular enzimas involucradas en este proceso [21, 28], incrementando la producción y almacenamiento de triglicéridos [58]. En NAFLD, la contribución de la lipogénesis “*de novo*” en la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos se incrementa hasta un 26%, en sujetos sanos esta contribución es de menos del 5% [21, 58, 60]. La hiperinsulinemia también puede inducir una reducción en la secreción de VLDL, lo que igualmente promueve la acumulación de triglicéridos en el tejido hepático [58].

El segundo “hit” es el daño en el tejido hepático, originado por la presencia de estrés oxidativo, lipoperoxidación, disfunción mitocondrial e inflamación; lo que posteriormente conlleva al desarrollo de NASH y subsecuentemente a fibrosis hepática [4, 17, 19, 22, 56].

Cabe mencionar que el estrés oxidativo es reconocido como el principal partícipe del daño en los hepatocitos y la progresión de NAFLD [61], éste se ha descrito como un desbalance en el equilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas antioxidantes [62].

ERO y especies reactivas de nitrógeno son producidas normalmente por el metabolismo celular; sin embargo en NAFLD, la acumulación de lípidos en el tejido hepático provoca una sobreproducción de radicales libres debido a la oxidación de éstos en la mitocondria [62]; estos radicales libres no son equilibrados por los sistemas antioxidantes y generan daño en los hepatocitos [61]. La mitocondria es la mayor fuente celular de ERO [62].

Altas concentraciones de radicales libres son perjudiciales para varios componentes celulares, como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN) [62]. El estrés oxidativo puede inducir NASH [62] al generar un ambiente pro-oxidante por la inducción de citocinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *por sus siglas en inglés*) que promuevan la muerte celular de hepatocitos [17, 61]. ERO y fragmentos de la apoptosis de hepatocitos pueden estimular a los macrófagos residentes para liberar citocinas proinflamatorias y profibrogénicas [62].

Las células del sistema inmune y el aumento de citocinas proinflamatorias y profibrogénicas juegan un papel crítico en la progresión de NAFLD [10], ya que promueven la activación de las HSC, las cuales son la principales productoras de MEC en los procesos de reparación tisular en respuesta a una lesión hepática crónica [62].

#### **4. Métodos diagnósticos en la enfermedad por hígado graso no alcohólico**

Como se mencionó con anterioridad, NAFLD carece de sintomatología [1], y por lo tanto, realizar su diagnóstico dentro del espectro de NAFLD es complicado. Existen 2 tipos de métodos para realizar su diagnóstico: métodos de imagen y marcadores séricos.

##### **4.1. Métodos de imagen**

En la actualidad, se tienen diferentes métodos para realizar el diagnóstico de NAFLD, principalmente a través de imagenología, que incluso son precisos [1] y sensibles [21] para la detección de esteatosis. Por ejemplo, el ultrasonido y la tomografía computarizada son métodos con 80% y 93% de sensibilidad, respectivamente, siempre y cuando el parénquima hepático tenga al menos 30% grasa [4, 63, 64], lo cual deja a los sujetos con esteatosis de entre 5-30% fuera del rango diagnóstico por estos métodos. Por otro lado, ninguno de estos métodos puede diferenciar entre esteatosis simple y NASH [1]. El único método diagnóstico capaz de diferenciar entre esteatosis simple y NASH es la biopsia hepática, la cual se ha considerado el estándar de oro para realizar el diagnóstico de NAFLD [1, 21], no obstante, es un método invasivo [21] y puede llegar a presentar complicaciones para el paciente; además, éste método presenta la desventaja de que las características histológicas pueden no estar distribuidas uniformemente a lo largo del parénquima hepático [21].

Cabe mencionar que los métodos de imagenología utilizados para el diagnóstico de NAFLD incluyen: ultrasonido, tomografía computarizada, resonancia magnética y espectroscopia por resonancia magnética de protón [21, 64], sus sensibilidades y especificidades de estos métodos se muestran en la Tabla 3. Otro método de imagen recientemente utilizado para la medición y cuantificación no invasiva de esteatosis es la elastografía de transición (FibroScan) a través de la medición CAP (por sus siglas en inglés, controlled attenuation parameter), la cual es una medida de la atenuación del ultrasonido [65]. La atenuación del

ultrasonido evalúa la esteatosis del hígado al convertir la amplitud del ultrasonido en ondas expresadas en decibeles por metro (dB/m) [65, 66]. Además, para la medición de esteatosis mediante el uso del FibroScan, es necesario el uso de una sonda especial para sujetos con IMC>30Kg/m<sup>2</sup> [66].

Para realizar el diagnóstico de fibrosis en NAFLD se emplean técnicas como: elastografía de transición (FibroScan), radiación acústica por fuerza de impulso (ARFI, del inglés *Acoustic Radiation Force Impulse*) [1, 21, 64] y elastografía por resonancia magnética [64]. Estos métodos son precisos para la detección de cirrosis y fibrosis severa; sin embargo, para la detección de estadios intermedios carecen de exactitud [21], además de tener costos elevados. En la Tabla 3 se muestran la especificidad y sensibilidad de la elastografía de transición y ARFI.

**Tabla 3. Métodos diagnósticos utilizados en la clínica para el detección de hígado graso no alcohólico y otras hepatopatías.**

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<b>Hígado graso no alcohólico</b>		
Ultrasonido	60-94	84-95
Tomografía computarizada	72-82	91-100
Resonancia magnética	77-90	82-91
Espectroscopia por resonancia magnética de protón	80-91	80-87
<b>Cirrosis hepática</b>		
Elastografía de transición	89-100	75-100
ARFI	92	92

Tabla tomada y modificada de Almeda-Valdes y colaboradores [21].

#### 4.2. Marcadores séricos

Además de estas técnicas de imagen, para hacer el diagnóstico de NAFLD y de fibrosis inducida por ésta, se utilizan paneles de marcadores séricos como el SteatoTest, los índices de esteatosis hepática y de hígado graso (FLI, del inglés *Fatty Liver Index*) [64] para la detección de esteatosis, mientras que para la detección de fibrosis se aplican el índice de la relación entre la enzima aspartato aminotransferasa (AST) y plaquetas (APRI), la

puntuación Fibrosis-4 (FIB-4), FibroMeter NAFLD, FibroTest-FibroSURE, panel mejorado de fibrosis hepática (por sus siglas en inglés, *Enhanced Liver Fibrosis* o ELF) y la puntuación de fibrosis de NAFLD, también conocida como *NAFLD fibrosis score* [64]. Los paneles antes mencionados no pueden diferenciar entre esteatosis simple y NASH y tampoco en los estadios intermedios de la fibrogénesis.

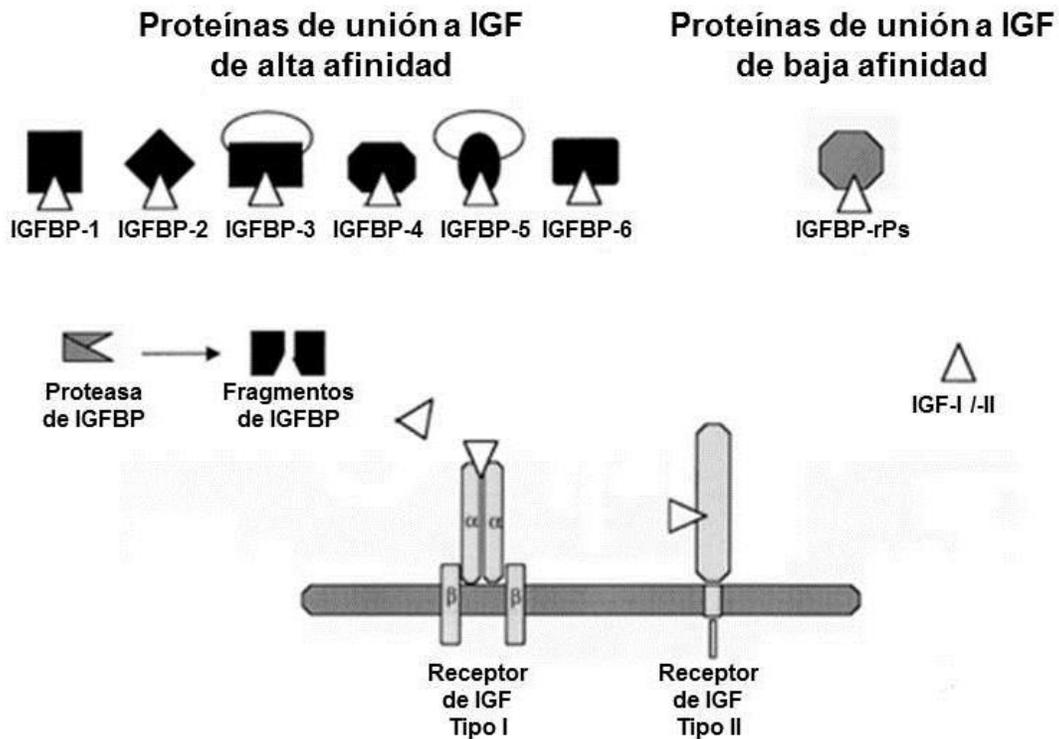
Por otra parte, las concentraciones séricas de la alanina aminotransferasa (ALT) han sido propuestas para usarse clínicamente en la detección de NASH [67], donde puede observarse elevada desde 2 a 4 veces por encima del límite superior de los valores de referencia [1, 48] en forma persistente en un periodo de seis meses sin una explicación obvia [68]; no obstante, las concentraciones de ALT también pueden observarse dentro de valores de referencia [1]. Por esto último, y su poca sensibilidad (0.30-0.63) y especificidad (0.38-0.63), comparado con ultrasonido o biopsia hepática [9], es que las concentraciones de ALT no son suficientes por sí solas para hacer el diagnóstico de NAFLD. Así mismo, en NASH, los pacientes pueden o no tener elevaciones de esta transaminasa lo mismo que pacientes con esteatosis, e incluso sujetos sanos después de la ingesta de alcohol o el consumo de paracetamol.

Se han propuesto otras moléculas para el diagnóstico de NAFLD, como citoqueratina-18 (CK18) y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) detectadas en suero [64], no obstante, los resultados que se han obtenido sobre estas moléculas son controversiales.

## **5. Sistema de los factores de crecimiento insulinoide**

### **5.1. Generalidades de las IGFs**

El sistema IGF tiene distintos componentes: IGF-I, IGF-II, receptores de IGF I y II, proteínas de unión a los IGFs (IGFBPs) y proteasas de las IGFs (Figura 7); sin embargo, las funciones de algunas de estas moléculas no han sido dilucidadas completamente.



**Figura 7. Componentes del sistema IGF.** En la figura se representan los distintos componentes del sistema IGF: IGF-I y -II (blanco), proteínas de unión a IGF de alta afinidad (negro), proteínas de unión a IGF de baja afinidad (gris), proteasas de las IGFBPs y receptores de IGF tipo I y II. Imagen tomada y modificada de Hwa y colaboradores [69].

IGF-I e IGF-II son péptidos hormonales estructuralmente similares a la insulina, de aproximadamente 7 kDa, y altamente homólogos entre sí. Los IGF son mitógenos que afectan diferentes funciones e interactúan con receptores específicos de superficie celular, IGF-IR e IGF-IIR, así como con el receptor de la insulina. En las células, IGF-I ejerce diversas acciones biológicas como: proliferación celular, diferenciación, migración, supervivencia, metabolismo, contractilidad, entre otras [69].

En fluidos biológicos, los IGF están normalmente unidos a sus IGFBPs. Estas proteínas presentan características estructurales similares entre ellas, por ejemplo, poseen un gran número de residuos de cisteína altamente conservados [69, 70].

Las IGFBPs son producidas por una variedad de tejidos incluyendo cerebro, hueso, músculo y riñón; son encontradas en varios fluidos biológicos, como líquido amniótico, cefalorraquídeo, seminal, entre otros [71]; sin embargo, la principal fuente de producción de estas proteínas, es el hígado [70].

Se han caracterizado seis IGFBPs (IGFBP1-6) que tienen afinidades altas para IGF-I, incluso mayores que las del IGF-IR con su ligando. Las IGFBPs actúan no sólo como portadores de los IGFs, prolongando su vida media, también funcionan como moduladores de la biodisponibilidad y actividad de los IGFs [69].

En cuanto a las funciones de las IGFBPs, está perfectamente establecido que algunas de estas proteínas inhiben las acciones de los IGFs, como IGFBP-4 e IGFBP-6 [72], otras las potencian, por ejemplo, IGFBP-3 [73], mientras que la IGFBP-1 puede inhibir o promover la acción de IGF-I dependiendo de su procesamiento post-traducciona [69, 74].

Las acciones de las IGFBPs son moduladas por proteasas de IGFBPs, que dependen a su vez de activadores e inhibidores de proteasas. Estas proteasas son capaces de escindir a las IGFBPs en formas que pueden o no reducir significativamente su afinidad por IGF [70, 71].

Otro componente del sistema IGF son las proteínas relacionadas a las IGFBP (IGFBP-rP), estas proteínas presentan secuencias similares de aminoácidos, ricas en cisteína y también pueden unirse a IGF, pero con baja afinidad [69, 75].

Las IGFBP-rP están implicadas en diversas funciones celulares, como crecimiento, adhesión, migración y síntesis de MEC; y en diferentes procesos biológicos incluyendo: desarrollo, diferenciación, reproducción, angiogénesis, cicatrización de heridas, inflamación, fibrosis y tumorigénesis [76].

La región estructural similar entre las IGFBP e IGFBP-rP es el dominio N-terminal, y es mediante este dominio por el cual estas proteínas relacionadas a las IGFBP pueden unirse con baja afinidad a los IGF; así como a la prolactina, péptido C de la proinsulina, e incluso a la misma insulina [69, 70].

Las IGFBP-rP tienen 100 veces menor afinidad por los IGF comparadas con las IGFBP, por lo que la regulación de la actividad de los IGF no es la principal función de estas proteínas pero pueden estar involucradas en funciones independientes de los efectos directos de estos factores de crecimiento [69].

IGFBP-rP1 (IGFBP-7) fue la primera proteína comprobada funcionalmente y relacionada con las IGFBP. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 4q12–13 [69]. IGFBP-7 puede modular las acciones de la insulina, no sólo por su habilidad de unirse a ésta sino también por su capacidad de inhibir la autofosforilación de la subunidad beta del receptor de insulina [69].

Hay evidencia que sugiere que IGFBP-7 puede actuar como un gen supresor de tumores, ya que se ha visto asociada al proceso de senescencia, es sobreexpresado en células senescentes de mama y próstata, no obstante, si el proceso de senescencia no está presente en estas estirpes celulares, IGFBP-7 no se sobreexpresa [76].

Cabe mencionar que se ha documentado la regulación a la baja de la expresión de IGFBP-7 en muestras de pacientes con hepatocarcinoma celular (HCC) y líneas celulares de HCC comparadas con tejido hepático normal y hepatocitos. También, se observó una correlación inversa entre la expresión de IGFBP-7 y los grados y estadios de HCC [77].

## 5.2. IGFbps y la enfermedad hepática por hígado graso no alcohólico

En años recientes se han relacionado a las IGFbps con el SM así como con algunos de los factores de riesgo para el desarrollo de NAFLD, e incluso una relación directamente con la patología.

En el caso de IGFBP-1, una evidencia preliminar ha descrito que esta proteína puede ser regulada por la insulina, glucosa, glucagon y el péptido parecido al glucagon 1 (GLP-1) [78]. La insulina y la glucosa suprimen la secreción de IGFBP-1, mientras que el glucagon y GLP-1 la estimulan [78]. Recientemente, se ha propuesto a IGFBP-1 como marcador de RI [78, 79], que es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de NAFLD. Un estudio demuestra una correlación positiva entre la concentración sérica de IGFBP-1 y el porcentaje de supresión de la producción hepática de glucosa, sugiriendo menor RI cuando hay mayor concentración de IGFBP-1 [79]. Borai y colaboradores propusieron como marcadores de RI, el delta de las concentraciones séricas de IGFBP-1 después de una carga de glucosa (diferencia de las concentraciones basal y a las 2 horas), y la relación del delta de las concentraciones séricas de insulina entre el delta de IGFBP-1 [80]. Aunado a esto, existe un estudio en donde se observa la disminución de las concentraciones séricas de IGFBP-1 en sujetos con hígado con esteatosis diagnosticado por ultrasonido, comparado con sujetos sin esteatosis [81].

IGFBP-1 no sólo se ha asociado a procesos metabólicos sino también en otros procesos como la regeneración hepática, ya que IGFBP-1 es uno de los genes y proteínas que se expresan más elevada y rápidamente durante este proceso [82, 83]. Así mismo, cuando existe una deficiencia de IGFBP-1, la regeneración hepática es perjudicada después de una hepatectomía parcial; sin embargo, es sobreexpresada en respuesta a una resección hepática [82, 83]. Además de estas evidencias, existe un estudio donde se ha relacionado un incremento de las concentraciones séricas de IGFBP-1 con el proceso fibrogénico en pulmón [84].

Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de IGFBP-2 está asociada con una reducción de la susceptibilidad a la obesidad, una mejora de la sensibilidad a la insulina, y confiere resistencia al desarrollo de obesidad y RI [85]. También se ha descrito que esta sobreexpresión puede proteger contra el desarrollo de obesidad y DT2, y se ha sugerido que este efecto es a través de la inhibición de la adipogénesis y modulación de la sensibilidad de la insulina mediante IGFBP-2 [78].

Además, se ha demostrado que pacientes con SM tienen bajas concentraciones de IGFBP-2, asociadas con hiperglucemia, lo que sugiere a IGFBP-2 como un posible marcador de SM [86]. En otro hallazgo reciente, se muestra que hay disminución en la expresión de IGFBP-2 en ratones susceptibles a obesidad inducida por una dieta hipercalórica, comparada con ratones resistentes a obesidad inducida con la misma dieta [87].

Por otro lado, no hay evidencia que indique una asociación de IGFBP-2 con la fibrosis hepática; no obstante, hay algunos estudios que sugieren la participación de esta proteína en la fibrogénesis en otros órganos como el pulmón [84, 88], en los cuales se ha visto un incremento de IGFBP-2 en el suero [84] y lavados broncoalveolares de pacientes [88] con fibrosis pulmonar idiopática.

Con respecto a IGFBP-3, se ha observado en ratones knockout (KO) para IGFBP-3, las concentraciones de glucosa e insulina son significativamente más altas comparadas con ratones silvestres, y estos roedores presentaban un incremento en la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis, glucogenólisis) [89].

Asimismo, se han asociado altas concentraciones de IGFBP-3 con algunos componentes del SM como triglicéridos elevados, hipertensión y glucosa alterada en ayuno [90]. Se ha sugerido que una relación baja IGF-I/IGFBP-3 puede ser un marcador de progresión de

NAFLD, ya que esta relación se correlacionó negativamente con la presencia de fibrosis en sujetos con NAFLD diagnosticada por biopsia hepática [91].

Cabe mencionar que varios autores reportan una disminución de las concentraciones séricas de IGFBP-3 en pacientes con cirrosis hepática [92-94] y su relación con variables asociadas a la severidad de la enfermedad hepática [95-97], así como a un peor pronóstico a largo plazo en pacientes ambulatorios con cirrosis y a corto plazo en paciente hospitalizados con descompensación aguda debida a la cirrosis hepática [95].

En el caso particular de IGFBP-4, no existe evidencia que relacione a esta proteína con factores de riesgo para el desarrollo de NAFLD; sin embargo, se le ha asociado con la regeneración hepática. Después de 24 horas de una hepatectomía parcial, existe un incremento de IGFBP-4 a nivel de RNA mensajero y de la proteína en circulación [98].

Existe un estudio en el que se ha relacionado a la IGFBP-5 con NAFLD, sujetos con NAFLD diagnosticada por ultrasonido, niveles séricos elevados de ALT y biopsia hepática, presentan un incremento de la concentración de IGFBP-5 comparada con sujetos control. Asimismo, IGFBP-5 se encuentra elevada en circulación en sujetos que presentan NASH con un mayor grado de fibrosis, comparada con los sujetos control [99].

Además, existen estudios que asocian a la IGFBP-5 con el proceso fibrogénico, en órganos como piel [100], pulmón [101] e intestino [102]; y en hígado, se le ha relacionado con la supervivencia de las HSC activadas, que son las principales productoras de MEC durante la fibrogénesis [103].

Por otro lado, se ha reportado el aumento de la concentración sérica de IGFBP-6 en sujetos con diabetes tipo 1, comparado con sujetos control pareados en sexo y edad; y en aquellos individuos con DT2 que presentaban complicaciones (nefropatía, retinopatía, neuropatía, amputación, ceguera, entre otros), tenían incrementados significativamente

los niveles séricos de IGFBP-6 comparados con los que no presentaban complicación alguna [104]. Actualmente no existe evidencia de la participación de esta proteína en la fibrosis hepática; sin embargo, se ha evidenciado que en pacientes con HCC, IGFBP-6 está regulada a la baja, comparada con pacientes que sólo presentan hepatitis debida a diferentes etiologías [105].

Liu y colaboradores [106] reportan una elevación de los niveles séricos de IGFBP-7 en sujetos con SM y RI, comparados con los sujetos control; y también se correlacionó una mayor concentración de IGFBP-7 con parámetros asociados al SM como el radio cintura-cadera, HDL y LDL [106]. Otra evidencia relevante es el incremento de la metilación en el gen *Igfbp7* en hombres con DT2, comparada con sujetos controles no diabéticos [107].

Con relación a la fibrosis hepática, existe un estudio que demuestra que IGFBP-7 induce la producción de MEC mediante la activación de las HSC y presenta actividades profibrogénicas *in vitro* [108].

## **VI. Planteamiento del problema**

México es uno de los países con mayor prevalencia de obesidad en su población, que es un factor de riesgo ampliamente relacionado con el desarrollo de DT2, hipertensión arterial y NAFLD; las 2 primeras entidades se han asociado con SM, mientras que la última es considerada su manifestación hepática. En años recientes, NAFLD ha ido incrementando su prevalencia debido al estilo de vida moderno; y el progreso de este padecimiento puede desembocar en NASH y fibrosis hepática, inclusive en cirrosis, siendo esta última una de las principales causas de muerte en nuestro país.

El diagnóstico oportuno de NAFLD favorecerá la toma de decisiones y estrategias terapéuticas para evitar el progreso a NASH y fibrosis/cirrosis. Sin embargo, hasta ahora la carencia de herramientas bioquímicas específicas y sensibles, aunada a la falta de síntomas en la enfermedad hace muy difícil el diagnóstico oportuno.

Por esta razón es importante la identificación de nuevos biomarcadores en suero para NAFLD y sus diferentes estadios. El presente trabajo pretende contribuir en el estudio de las IGFBP como potenciales biomarcadores de NAFLD.

## **VII. Justificación**

La evidencia existente señala una participación de las IGFBPs como factores que conllevan al desarrollo de NAFLD, por ejemplo, la RI y SM, y estudios preliminares demuestran que es posible que estas proteínas puedan identificar diferentes grados de daño hepático en modelos experimentales, por lo que las IGFBPs en conjunto podrían servir como biomarcadores potenciales para el diagnóstico de NAFLD.

## **VIII. Hipótesis**

Las IGFBPs pueden ser reguladas por la insulina y modificar sus concentraciones séricas en la enfermedad hepática, mientras que la RI y obesidad contribuyen al desarrollo de NAFLD, por lo cual las concentraciones séricas de IGFBPs se modificarán en NAFLD y en fibrosis asociada a la misma, en pacientes obesos mórbidos.

## **IX. Objetivos**

### **a. Objetivo general**

Evaluar a las IGFBPs como potenciales biomarcadores de NAFLD, en pacientes con obesidad mórbida programados para cirugía bariátrica.

### **b. Objetivos específicos**

- Evaluar las concentraciones séricas de las IGFBPs (1-7) en pacientes obesos mórbidos programados para cirugía bariátrica.
- Determinar el grado de severidad de NAFLD en el que se encuentran los pacientes al momento de la cirugía bariátrica, tanto en NAFLD como en la fibrosis hepática.
- Asociar las concentraciones de IGFBPs con el grado de severidad de la enfermedad hepática de los pacientes.
- Evidenciar si los parámetros bioquímicos se relacionan con el grado de severidad de la enfermedad hepática de los pacientes.

## X. Material y Métodos

### a. Sujetos

Se reclutó un grupo de pacientes obesos mórbidos en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, programados para cirugía bariátrica, de 18 a 55 años, con IMC  $\geq 40\text{Kg/m}^2$ , panel viral negativo, sin cirrosis y con AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*, por sus siglas en inglés) menor a 8 para eliminar a los pacientes con criterios de consumo riesgoso de alcohol. El tamaño de muestra fue calculado con el software G\*Power v3.1 con un poder estadístico de 80, un error alfa de 0.2, un tamaño del efecto de 0.5, obteniendo un total de 37 casos. A todos los sujetos se les solicitó la firma de un consentimiento informado donde se explicó detalladamente la importancia del proyecto, así como en qué consistiría su participación. La participación de los pacientes radicó en donar una muestra de sangre y tejido hepático, obtenidas al momento de la cirugía bariátrica.

En la Tabla 4 se presentan los criterios utilizados para la selección de los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla 4. Criterios utilizados para la selección de pacientes.**

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pacientes obesos mórbidos programados para cirugía bariátrica</li><li>• Sin otras hepatopatías</li><li>• Edad: 18 a 55 años</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Presencia de cirrosis</li><li>• Diagnóstico positivo para hepatitis virales</li><li>• Consumo riesgoso de alcohol (AUDIT&gt;8)</li><li>• Que no se tenga firmado el consentimiento informado</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Que deseen retirarse del protocolo</li><li>• Muestra hepática insuficiente o dañada</li><li>• Que no se les haya realizado la cirugía bariátrica</li></ul>

### b. Estudios bioquímicos clínicos

Se recolectaron muestras de sangre con 12 horas de ayuno previo a la intervención quirúrgica, de las cuales se obtuvo el suero para así poder realizar las determinaciones de

los diferentes analitos. La glucosa fue cuantificada utilizando el método de glucosa oxidada, las cuantificaciones de triglicéridos y colesterol total fueron realizadas empleando un método enzimático, las concentraciones de c-HDL fueron cuantificadas usando ácido fosfotúngstico y  $Mg^{2+}$ , mientras que la insulina en plasma fue determinada por radioinmunoensayo. HOMA-IR fue calculado con las determinaciones de glucosa e insulina en ayuno. Todas las pruebas bioquímicas fueron efectuadas empleando procedimientos estandarizados en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

#### *c. Estudios histológicos*

Al momento de la cirugía se colectó una muestra de hígado, el cual fue fijado en paraformaldehído al 4% en PBS estéril y posteriormente incluido en parafina. Se obtuvieron cortes seriales de 5  $\mu$ m. Se realizaron técnicas histológicas como tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) y tricrómica de Masson para determinar el espectro de la enfermedad y la presencia de fibrosis hepática debida a NAFLD.

#### *d. Clasificación de NAS*

La clasificación de los 46 pacientes reclutados se realizó con base en la escala NAS, obteniendo 4 subgrupos: Control, Esteatosis simple, NASH limítrofe y NASH definitivo; de acuerdo a la puntuación obtenida en los 3 parámetros evaluados en la tinción H-E (porcentaje de esteatosis, número focos inflamatorios y balonamiento de hepatocitos), como se mencionó anteriormente (Tabla 1)

De igual manera, se clasificó a los pacientes por el grado de fibrosis que presentaron, a través de la tinción tricrómica de Masson, y de acuerdo a la escala de Kleiner-Brunt (Tabla 2) [53]; y se realizó la comparación con la puntuación de fibrosis de NAFLD [109], como se muestra en el Anexo I.

#### *e. Sujetos Control*

Dentro de este grupo de pacientes obesos mórbidos reclutados encontramos pacientes que no presentaron características histológicas de NAFLD, los cuales representaron al grupo control. Lo anterior es debido a la prevalencia de NAFLD en este tipo de población, ya que se ha reportado una prevalencia de esta patología del 71 al 90%, por lo cual se esperó obtener entre un 10 y 29% de pacientes incluidos en el estudio que no presentaran características histológicas de NAFLD.

Dicho grupo estuvo conformado por 11 pacientes obesos mórbidos programados para cirugía bariátrica, los cuales representaron a nuestro grupo control dentro del estudio. En resumen, en el estudio se incluyeron un total de 46 pacientes obesos mórbidos programados para cirugía bariátrica, teniendo 35 pacientes con NAFLD y 11 pacientes control.

#### *f. Cuantificación de IGFBPs en suero*

Se realizó la cuantificación de las proteínas IGFBP presentes en el suero de los pacientes mediante el kit de arreglo en suspensión (Milliplex®, HIGFBPMAG-53K, Millipore), el cual es un multianálisis cuantitativo de perfiles proteicos.

El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con previa preparación del protocolo (mapa de la placa) y curva estándar. La metodología se detalla en el Anexo II.

#### *g. Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos fueron analizados por pruebas no paramétricas, ya que las variables a analizar presentaron distribución no gaussiana. Para realizar la comparación de los parámetros bioquímicos y las concentraciones de las IGFBPs entre los pacientes

control y con NAFLD, así como con y sin RI, se utilizó la prueba estadística U de Mann Whitney.

Mientras que para comparar las concentraciones de IGFbPs y las diferentes pruebas bioquímicas entre los controles y los diferentes grupos del espectro de NAFLD (Esteatosis, NASH limítrofe y NASH definitivo) se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos demográficos y bioquímicos se muestran mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75) y las concentraciones de las IGFbPs están representadas gráficamente por mediana, mínimo y máximo. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa GraphPad Prism versión 6.01 y se consideró a  $p < 0.05$  como significativa.

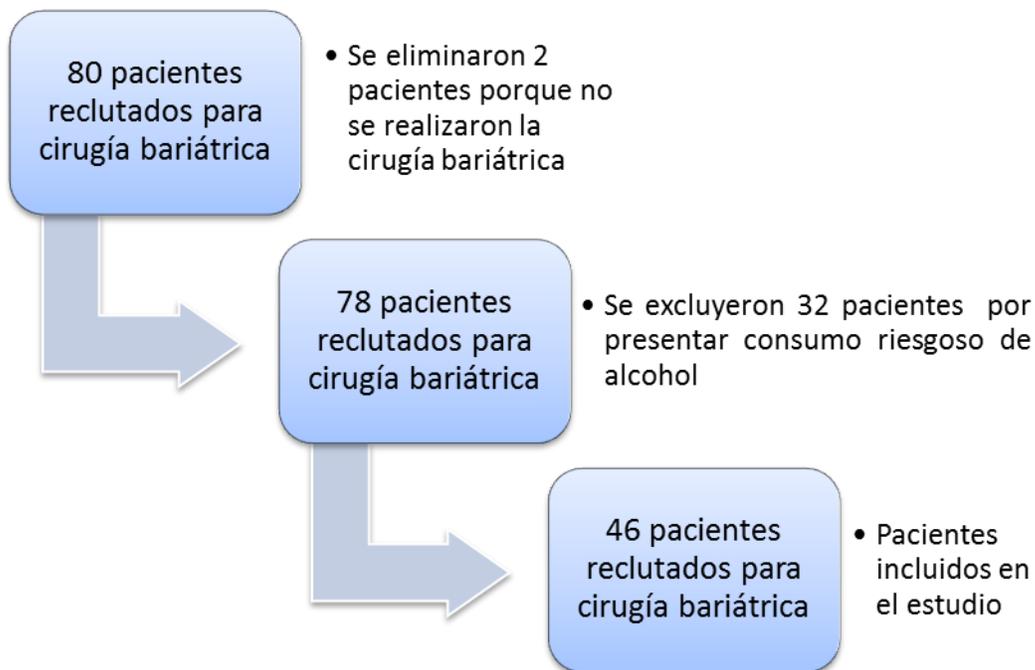
#### *h. Consideraciones éticas*

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México y por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

## XI. Resultados

### A. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio

Se reclutaron en total 80 pacientes obesos mórbidos programados para cirugía bariátrica, de los cuales se eliminaron 34 pacientes del estudio por presentar alguno de los criterios de exclusión o de eliminación, quedando incluidos sólo 46 pacientes con obesidad mórbida programados para cirugía bariátrica, como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Diagrama de flujo de los pacientes reclutados e incluidos en el estudio.**

Las características demográficas (sexo, edad, peso, talla e IMC) de los pacientes incluidos en el estudio, así como el porcentaje de pacientes con DT2, HA y SM, se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 5. Características demográficas de los pacientes obesos mórbidos incluidos y programados para cirugía bariátrica**

	Pacientes incluidos (n=46)
Sexo (M/H)	29/17
Mujeres, n (%)	29 (63.1)
Hombres, n (%)	17 (36.9)
Edad [años]	41 (34-48)
Peso [Kg]	128.9 (101.6-137.1)
Talla [m]	1.63 (1.55-1.68)
IMC [Kg/m <sup>2</sup> ]	45.5 (40.5-52.7)
DT2, n (%)	20 (43.5)
HA, n (%)	26 (56.5)
SM, n (%)	23 (50)

Los resultados se muestran en Mediana y Rango intercuartil 25-75 (RIQ25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. DT2: Diabetes Tipo 2, HA: Hipertensión Arterial, SM: Síndrome Metabólico.

### *B. Histología*

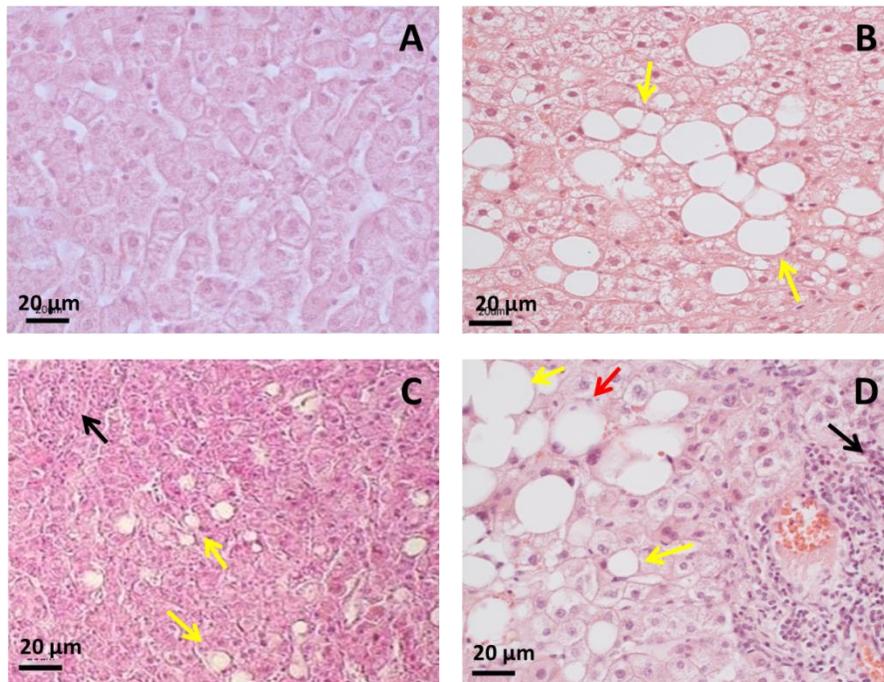
Para poder evidenciar el daño hepático en los pacientes obesos mórbidos incluidos en el estudio, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) y tricrómica de Masson a las biopsias hepáticas obtenidas al momento de la cirugía bariátrica.

#### *a) Microarquitectura hepática*

Se observó la microarquitectura hepática y se clasificó a los pacientes dentro del espectro de NAFLD a través de la escala NAS. En la Figura 9, se exhiben las imágenes representativas de las tinciones H-E de los grupos Control (A) y NAFLD: Esteatosis (B),

NASH limítrofe (C) y NASH definitivo (D). En el grupo Control (Figura 9A) no se distinguen características histológicas de NAFLD mientras que en el grupo Esteatosis (Figura 9B) se observa la presencia de esteatosis simple, indicada con flechas amarillas, como gotas blancas.

En la Figura 9C (grupo NASH limítrofe) se muestran algunas características de NASH, con flechas amarillas se denota la existencia de esteatosis y con una flecha negra la manifestación de infiltrado inflamatorio, sin embargo no se aprecia el balonamiento de hepatocitos. En la Figura 9D (grupo NASH definitivo) con las flechas amarillas se indica la presencia de esteatosis, mientras que con la flecha negra y roja se señalan el infiltrado inflamatorio y balonamiento de hepatocitos, respectivamente, siendo éstas últimas características necesarias para poder hacer la determinación de NASH.

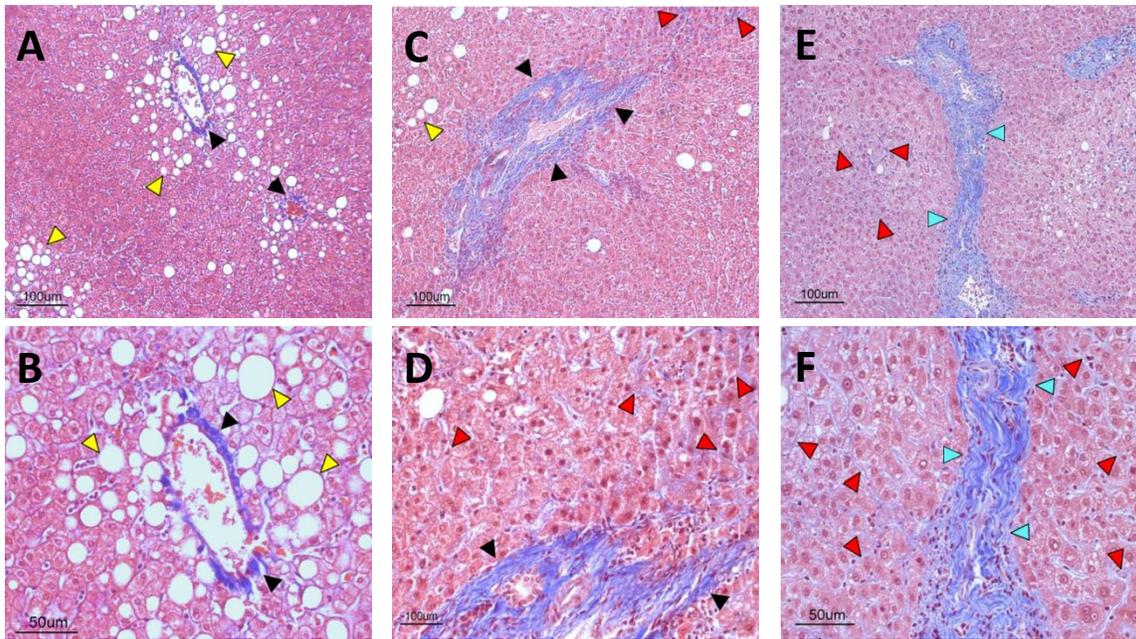


**Figura 9. Imágenes representativas de las tinciones H-E de los pacientes incluidos.** Se observan características histológicas de NAFLD, como acumulación de lípidos o esteatosis (flechas amarillas), inflamación (flechas negras) y balonamiento de hepatocitos (flecha roja). Control (A) y NAFLD: Esteatosis (B), NASH limítrofe (C) y NASH definitivo (D).

### *b) Presencia de fibrosis*

Se examinó la presencia de fibrosis a través de la tinción tricrómica de Masson y se clasificó, con la escala de Kleiner-Brunt [53], a los pacientes dependiendo del grado de severidad de la misma. En la Figura 10 se muestra este tipo de tinción de los diferentes grupos obtenidos de los pacientes reclutados: F1C, F2 y F3, en las que se hace notoria la fibrogénesis en color azul-morado.

En el grupo F1C (Figura 10A) se observa principalmente un incremento en la acumulación de matriz extracelular en las áreas portales o fibrosis portal (puntas de flechas negras) y la manifestación de esteatosis (puntas de flechas amarillas). Para el grupo F2 (Figura 10B) se denota la presencia de fibrosis portal y perisinusoidal (puntas de flechas rojas) que es la acumulación de MEC en los sinusoides hepáticos, además de un ensanchamiento de los sinusoides y esteatosis (puntas de flechas amarillas). El grupo F3 (Figura 10C) no sólo se destaca una mayor acumulación de MEC, también fibrosis en puente (puntas de flechas verde-agua) que se define como áreas portales unidas entre sí o con venas centrolobulillares, por fibras de colágena, y esteatosis (puntas de flechas amarillas).



**Figura 10. Imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson de los pacientes incluidos.** Se observan imágenes de la tinción tricrómica de Masson en los cortes histológicos de las biopsias hepáticas, el estadio F1C se muestra en las imágenes A. 8X y B. 20X, el estadio F2 en las imágenes C. 8X y D. 20X y el estadio F3 en las imágenes E. 8X y F. 20X, que evidencian los cambios microscópicos provocados en el hígado, principalmente acumulación excesiva de MEC, esteatosis y desorganización de la arquitectura hepática. Las puntas de flechas negras denotan acumulación de MEC en las áreas portales (fibrosis portal). Las puntas de flechas amarillas señalan la presencia de esteatosis. Las puntas de flechas rojas señalan la acumulación de MEC alrededor de los sinusoides hepáticos (fibrosis perisinusoidal). Las puntas de flechas verde-agua señalan la acumulación de MEC entre una vena central y un área portal.

### *C. Clasificación de los pacientes incluidos*

Los 46 pacientes incluidos se clasificaron con base en la escala NAS y se obtuvieron 11 pacientes que no presentaban características histológicas de NAFLD, y 35 pacientes con NAFLD. Estos 35 pacientes fueron clasificados dentro del espectro de NAFLD, resultando 4 pacientes con esteatosis, 20 con NASH limítrofe y 11 con NASH definitivo, como se puede apreciar en la Tabla 9.

Cabe mencionar que el tamaño de muestra calculado para este estudio fue de 37 casos, ante la diferencia entre los pacientes calculados y los incluidos en el estudio, se realizó un análisis para evaluar su sensibilidad empleando la n reclutada utilizando el software G\*Power v3.1, obteniendo que no se afectaba el tamaño del efecto.

**Tabla 6. Número de pacientes incluidos y clasificados dentro del espectro de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD) con base en la escala de actividad de NAFLD (NAS).**

Puntuación NAS	NAFLD	No. de pacientes reclutados
0	Sin NAFLD	11
1- 2	Esteatosis	4
3 - 4	NASH limítrofe	20
5 - 8	NASH definitivo	11

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

Además, en los pacientes con NAFLD se clasificó a estos pacientes con base en la escala Kleiner-Brunt [53], para determinar el grado de fibrosis que presentaban, obteniendo 4 pacientes en un estadio F1C, 19 en F2 y 12 en F3, como se observa en la Tabla 10.

**Tabla 7. Número de pacientes incluidos y clasificados con base en la escala Kleiner-Brunt para determinar el grado de fibrosis.**

Estadio	NAFLD	No. de pacientes reclutados
F0	Sin fibrosis	0
F1C	Fibrosis portal	4
F2	Fibrosis portal y perisinusoidal	19
F3	Fibrosis en puente	12

#### *D. Datos demográficos de los pacientes incluidos y clasificados*

Para visualizar las características demográficas de la población estudiada se obtuvieron datos como edad, peso, talla, sexo e índice de masa corporal (IMC). En las Tablas 8A y 8B

se muestran los datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio y se observaron diferencias entre los grupos control y NASH limítrofe en el peso y talla de los pacientes, encontrando valores más altos en aquellos pacientes pertenecientes a este último grupo.

Asimismo, se visualizaron diferencias significativas en el IMC, observando que en los pacientes con NASH definitivo el IMC es mayor que en los controles y los pacientes con NASH limítrofe.

Cabe mencionar que en los datos demográficos también se incluyó el porcentaje de pacientes que presentaban DT2, HA y SM, observando que el porcentaje de pacientes que tienen DT2 incrementa dentro del espectro de NAFLD, conforme aumenta la severidad de la enfermedad, aunque esto no se vea reflejado en el número total de pacientes con NAFLD.

Otros hallazgos interesantes en esta población de pacientes obesos mórbidos, es que hay un mayor número de pacientes con HA en el grupo control y un mayor porcentaje de pacientes con SM en el grupo de pacientes con NASH limítrofe.

**Tabla 8A. Datos demográficos de los pacientes incluidos.**

	Controles (n=11)	Pacientes con NAFLD (n=35)	p
Sexo			
Mujeres, n (%)	9 (82)	20 (57)	0.172
Hombres, n (%)	2 (18)	15 (43)	0.172
Edad [años]	42 (35-48)	41 (33-47)	0.661
Peso [Kg]	101.5 (96-132)	130.7 (112-141.7)	0.052
Talla [m]	1.62 (1.50-1.64)	1.66 (1.56-1.73)	0.167
IMC [Kg/m <sup>2</sup> ]	40.7 (37.8-47.3)	47.2 (41.2-53.1)	0.056
DT2, n (%)	6 (55)	14 (40)	0.494
HA, n (%)	8 (73)	18 (51)	0.302
SM, n (%)	5 (45)	18 (51)	>0.999

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75).

Las unidades se denotan entre corchetes. IMC: Índice de Masa Corporal, DT2:

Diabetes Tipo 2, HA: Hipertensión Arterial, SM: Síndrome Metabólico.

**Tabla 8B. Datos demográficos de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS.**

	Controles (n=11)	Espectro de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD, n=35)			p
		Esteatosis (n=4)	NASH limítrofe (n=20)	NASH definitivo (n=11)	
Sexo					
Mujeres (%)	9 (82)	4 (100)	7 (35)	9 (82)	0.064
Hombres (%)	2 (18)	0	13 (65)	2 (18)	0.064
Edad [años]	42 (35-48)	41 (28-46)	40 (34-47)	41 (26-58)	>0.999
Peso [Kg]	101.5 (96-132)	112.4 (74.4-135.8)	<b>131.2*</b> (111.3-146.7)	129.7 (119.5-159.5)	<b>*0.048</b>
Talla [m]	1.62 (1.50-1.64)	1.57 (1.45-1.62)	<b>1.68*,#</b> (1.63-1.74)	1.55 (1.52-1.68)	<b>*0.013</b> <b>#0.033</b>
IMC [Kg/m <sup>2</sup> ]	40.7 (37.8-47.3)	44.6 (35.2-53.1)	<b>45.0#</b> (40.4-51.9)	<b>53.1*</b> (49.0-57.4)	<b>*0.009</b> <b>#0.004</b>
DT2 (%)	6 (55)	1 (25)	7 (35)	6 (55)	>0.999
HA (%)	8 (73)	2 (50)	11 (55)	5 (45)	>0.999
SM (%)	5 (45)	2 (50)	11 (55)	5 (45)	>0.999

Los resultados se muestran en Mediana y Rango intercuartil 25-75 (RIQ25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. IMC: Índice de Masa Corporal, DT2: Diabetes Tipo 2, HA: Hipertensión Arterial, SM: Síndrome Metabólico. \*vs Controles, #vs NASH definitivo

#### *E. Datos bioquímicos de los pacientes incluidos*

Se estudió el estado metabólico de los pacientes cuantificando diferentes parámetros bioquímicos, por ejemplo: química sanguínea (glucosa, urea y creatinina), perfil de lípidos (colesterol total, triglicéridos, c-HDL y c-LDL) y hepático (albúmina, proteínas totales, AST, ALT, globulinas, fosfatasa alcalina y bilirrubinas). Los datos de química sanguínea y HOMA-IR de los pacientes incluidos se pueden observar en las Tablas 9A y 9B, en estos parámetros no se encontraron diferencias en los parámetros de glucosa, urea y creatinina entre los distintos grupos, a pesar de que algunos de los valores de glucemia, se encuentran fuera del valor de referencia; sin embargo, el HOMA-IR fue significativamente mayor en los pacientes con NAFLD, NASH limítrofe y definitivo comparado con los controles.

**Tabla 9A. Química sanguínea de los pacientes incluidos.**

Parámetro	Controles (n=11)	Pacientes con NAFLD (n=35)	p
Glucosa [mg/dL]	82.0 (78.0-98.0)	95.0 (84.0-116.0)	0.199
HOMA-IR	2.3 (1.4-2.7)	<b>3.2*</b> <b>(2.5-5.5)</b>	<b>*0.006</b>
Urea [mg/dL]	29.1 (22.7-35.5)	30.6 (24.4-34.0)	0.794
Creatinina mujeres [mg/dL]	0.75 (0.73-0.84)	0.73 (0.63-0.78)	0.315
Creatinina hombres [mg/dL]	0.80 (0.75-0.84)	0.91 (0.80-1.00)	0.228

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75).

Las unidades se denotan entre corchetes. \*p<0.05

**Tabla 9B. Química sanguínea de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS.**

Parámetro	Controles (n=11)	Espectro de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD, n=35)			p
		Esteatosis (n=4)	NASH limítrofe (n=20)	NASH definitivo (n=11)	
Glucosa [mg/dL]	82.0 (78.0-98.0)	104.0 (89.8-124.3)	95.5 (81.3-117.0)	93.0 (84.5-117.5)	>0.913
HOMA-IR	2.3 (1.4-2.7)	3.8 (1.6-6.6)	<b>3.2*</b> <b>(2.5-4.4)</b>	<b>3.8*</b> <b>(2.5-10.1)</b>	<b>*&lt;0.05</b>
Urea [mg/dL]	29.1 (22.7-35.5)	23.2 (22.0-28.9)	32.1 (27.5-34.1)	28.0 (24.0-43.6)	>0.299
Creatinina mujeres [mg/dL]	0.75 (0.73-0.84)	0.73 (0.66-0.77)	0.77 (0.55-0.78)	0.68 (0.60-1.12)	>0.999
Creatinina hombres [mg/dL]	0.80 (0.75-0.84)	-	0.89 (0.79-1.02)	0.94 (0.91-0.96)	0.593

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. \*vs Controles.

De igual manera, en las Tablas 10A y 10B se evidencian los datos del perfil de lípidos de los pacientes incluidos y clasificados, en estos parámetros no se encontraron diferencias

entre los distintos grupos, algunos valores bioquímicos se encontraron fuera de valores de referencia en todos los grupos.

**Tabla 10A. Perfil de lípidos de los pacientes incluidos.**

Parámetro	Controles (n=11)	Pacientes con NAFLD (n=35)	p
Triglicéridos [mg/dL]	144.0 (104.8-168.3)	166.5 (109.5-226.3)	0.320
Colesterol total [mg/dL]	196.0 (170.0-215.8)	172.0 (156.8-189.8)	0.119
c-HDL [mg/dL]	46.0 (35.8-53.5)	40.5 (33.8-46.3)	0.230
c-LDL [mg/dL]	142.0 (107.0-148.3)	116.0 (89.0-124.5)	0.133

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. HDL: lipoproteína de alta densidad, por sus siglas en inglés, *High Density Lipoprotein*. LDL: lipoproteína de baja densidad, por sus siglas en inglés, *Low Density Lipoprotein*.

**Tabla 10B. Perfil de lípidos de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS.**

Parámetro	Controles (n=11)	Espectro de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD, n=35)			p
		Esteatosis (n=4)	NASH limítrofe (n=20)	NASH definitivo (n=11)	
Triglicéridos [mg/dL]	144.0 (104.8-168.3)	219.0 (129.0-319.0)	164.5 (111.8-263.3)	158.0 (105.0-185.0)	>0.999
Colesterol total [mg/dL]	196.0 (170.0-215.8)	192.0 (148.0-203.0)	171.5 (158.3-184.8)	169.0 (144.0-189.0)	>0.852
c-HDL [mg/dL]	46.0 (35.8-53.5)	46.0 (37.0-48.0)	37.0 (31.8-46.0)	43.0 (33.0-47.0)	>0.757
c-LDL [mg/dL]	142.0 (107.0-148.3)	111.0 (85.0-112.0)	118.0 (93.0-123.0)	118.0 (80.0-129.0)	>0.729

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. HDL: lipoproteína de alta densidad, por sus siglas en inglés, *High Density Lipoprotein*. LDL: lipoproteína de baja densidad, por sus siglas en inglés, *Low Density Lipoprotein*.

Por otro lado, los datos del perfil hepático de los pacientes incluidos y clasificados se muestran en las Tablas 11A y 11B. Interesantemente, se encontraron diferencias significativas en las bilirrubinas (indirecta, directa y total) entre los pacientes con NAFLD y el grupo control, estando incrementadas en los pacientes obesos mórbidos con NAFLD; de igual manera, todas las bilirrubinas aumentaron en los pacientes con NASH limítrofe y definitivo comparadas con aquellos pacientes que no presentaban características histológicas de NAFLD. Estas elevaciones se observaron a pesar de que algunas de estas bilirrubinas, por ejemplo, la bilirrubina indirecta se encuentra dentro de valores de referencia, o como es el caso de las bilirrubinas directa y total, ligeramente por arriba del límite superior de los valores de referencia.

También se encontraron diferencias significativas en las transaminasas entre el grupo de NAFLD y control hallándose elevadas en los pacientes obesos mórbidos que presentaban la enfermedad; de manera similar, los pacientes con NASH limítrofe presentan elevaciones de estas enzimas comparado con los controles. Así mismo, en el grupo de NASH definitivo se advirtió un incremento de la ALT comparado con el grupo control. Estas diferencias fueron observadas a pesar de la amplia dispersión de las determinaciones de estas transaminasas en los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla 11A. Pruebas de función hepática de los pacientes incluidos.**

Parámetro	Controles (n=11)	Pacientes con NAFLD (n=35)	p
Albúmina [g/dL]	4.4 (4.1-4.5)	4.4 (4.0-4.6)	0.952
AST [UI/L]	19.0 (16.0-29.0)	<b>26.0*</b> (19.0-57.0)	<b>*0.032</b>
ALT [UI/L]	21.0 (17.0-32.0)	<b>35.0*</b> (25.0-65.5)	<b>*0.003</b>
Bilirrubina Indirecta [mg/dL]	0.30 (0.23-0.38)	<b>0.49*</b> (0.33-0.60)	<b>*&lt;0.001</b>
Bilirrubina Directa [mg/dL]	0.08 (0.04-0.09)	<b>0.15*</b> (0.09-0.24)	<b>*0.001</b>
Bilirrubina Total [mg/dL]	0.36 (0.26-0.46)	<b>0.65*</b> (0.41-0.92)	<b>*&lt;0.001</b>
Proteínas totales [g/dL]	7.4 (7.1-7.7)	7.3 (7.0-7.8)	0.696
Globulinas [g/dL]	3.2 (2.7-3.3)	3.1 (2.8-3.3)	0.973
Fosfatasa alcalina [UI/L]	72.0 (57.0-83.0)	73.0 (58.0-88.5)	0.889

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. AST: Aspartato aminotransferasa. ALT: Alanino aminotransferasa. \*p<0.05

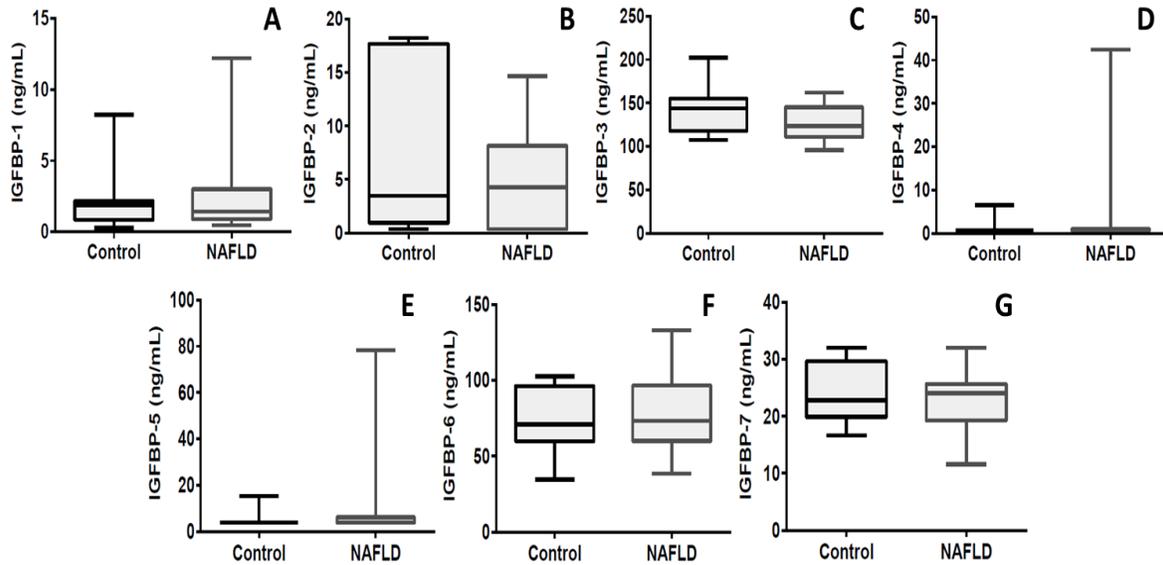
**Tabla 11B. Pruebas de función hepática de los pacientes incluidos y clasificados con base en la escala NAS.**

Parámetro	Controles (n=11)	Espectro de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD, n=35)			p
		Esteatosis (n=4)	NASH limítrofe (n=20)	NASH definitivo (n=11)	
Albúmina [g/dL]	4.4 (4.1-4.5)	4.2 (3.7-4.4)	4.4 (4.2-4.6)	4.4 (3.7-5.0)	>0.999
AST [UI/L]	19.0 (16.0-29.0)	19.5 (14.0-175.0)	<b>28.5*</b> (20.2-57.5)	27.0 (18.0-60.5)	<b>*0.016</b>
ALT [UI/L]	21.0 (17.0-32.0)	20.5 (13.5-89.0)	<b>38.5*</b> (28.5- 70.3)	<b>35.0*</b> (22.5-61.0)	<b>*&lt;0.05</b>
Bilirrubina Indirecta [mg/dL]	0.30 (0.23-0.38)	0.37 (0.33-0.46)	<b>0.53*</b> (0.39-0.76)	<b>0.40*</b> (0.29-0.49)	<b>*&lt;0.05</b>
Bilirrubina Directa [mg/dL]	0.08 (0.04-0.09)	0.16 (0.07-0.23)	<b>0.17*</b> (0.09-0.25)	<b>0.14*</b> (0.09-0.28)	<b>*&lt;0.05</b>
Bilirrubina Total [mg/dL]	0.36 (0.26-0.46)	0.52 (0.41-0.67)	<b>0.70*</b> (0.55-0.97)	<b>0.56*</b> (0.39-0.87)	<b>*&lt;0.05</b>
Proteínas totales [g/dL]	7.4 (7.1-7.7)	7.4 (6.8-8.0)	7.2 (7.0-7.8)	7.7 (7.0-8.0)	>0.999
Globulinas [g/dL]	3.2 (2.7-3.3)	3.3 (3.1-3.6)	3.1 (2.7-3.2)	3.2 (2.8-3.7)	>0.963
Fosfatasa alcalina [UI/L]	72.0 (57.0-83.0)	65.0 (54.3-80.3)	73.5 (50.3-87.3)	83.0 (72.0-92.0)	>0.559

Los resultados se muestran en Mediana y rango intercuartil 25-75 (RIQ 25-75). Las unidades se denotan entre corchetes. AST: Aspartato aminotransferasa. ALT: Alanino aminotransferasa.\*vs Controles.

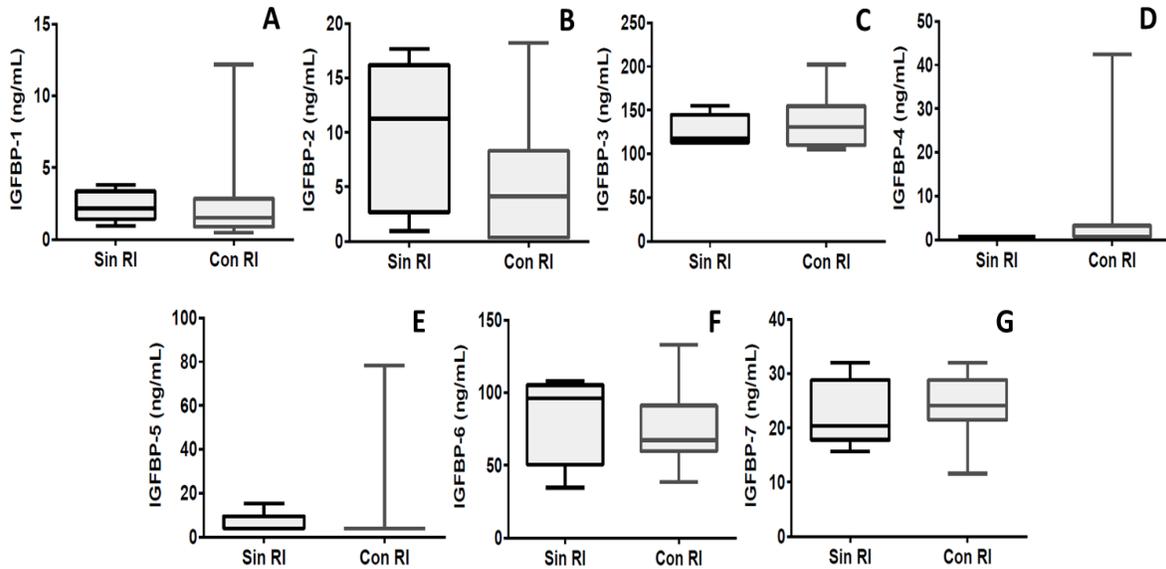
#### *F. Cuantificación de las IGFBPs en los pacientes incluidos*

Para observar el comportamiento de estas proteínas en NAFLD, se cuantificaron las concentraciones séricas de las IGFBPs de la 1 a la 7 en los pacientes obesos mórbidos clasificados inicialmente por la presencia (NAFLD) o ausencia (grupo control) de características histológicas de la enfermedad, como se mencionó antes. Esto lo podemos apreciar en la Figura 11, donde no se vieron diferencias significativas en ninguna de las IGFBPs, entre los pacientes sin NAFLD y aquellos que presentan la patología.



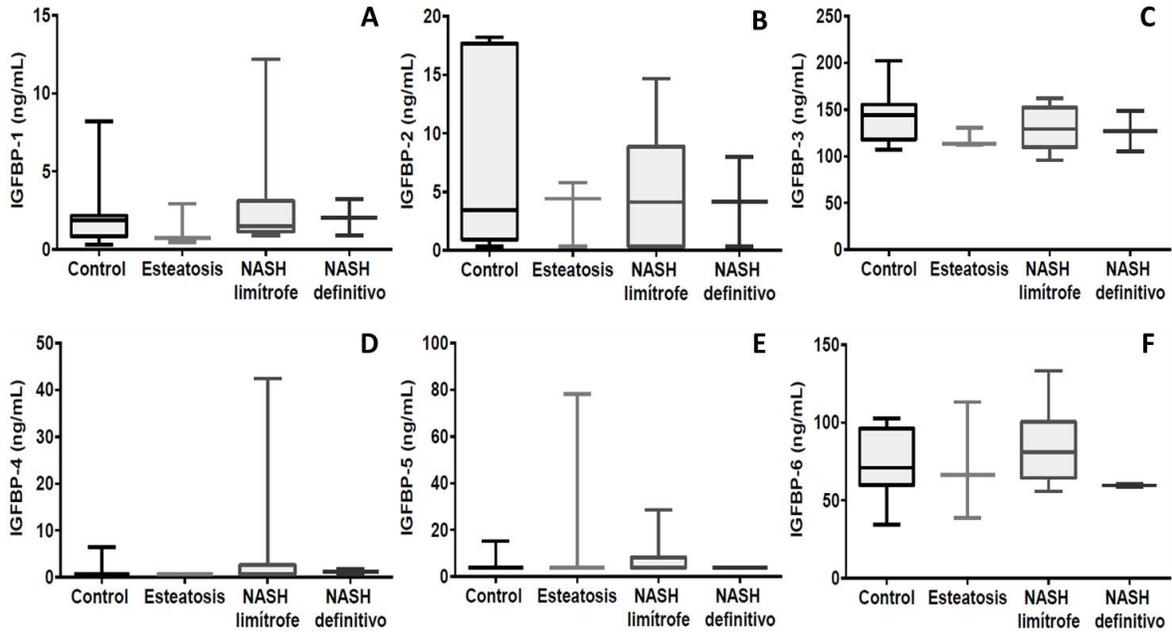
**Figura 11. Concentraciones séricas de las IGFBPs en los pacientes incluidos y clasificados en controles y NAFLD.** Se clasificaron a los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia de características histológicas de NAFLD. El grupo control está conformado por aquellos pacientes incluidos que no presentan características histológicas de NAFLD. **A.** IGFBP-1. **B.** IGFBP-2. **C.** IGFBP-3. **D.** IGFBP-4. **E.** IGFBP-5. **F.** IGFBP-6. **G.** IGFBP-7. Los resultados se analizaron con U de Mann Whitney.

Además de la clasificación inicial, se realizaron otras clasificaciones de los pacientes incluidos, una de ellas fue de acuerdo a la presencia o ausencia de RI. Esto se determinó a través del índice HOMA-IR, tomando como punto de corte  $HOMA-IR > 2.4$ . En la Figura 12 se muestran las concentraciones séricas de las IGFBP-1-7 de los pacientes incluidos en el estudio y clasificados de acuerdo al criterio anterior, y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

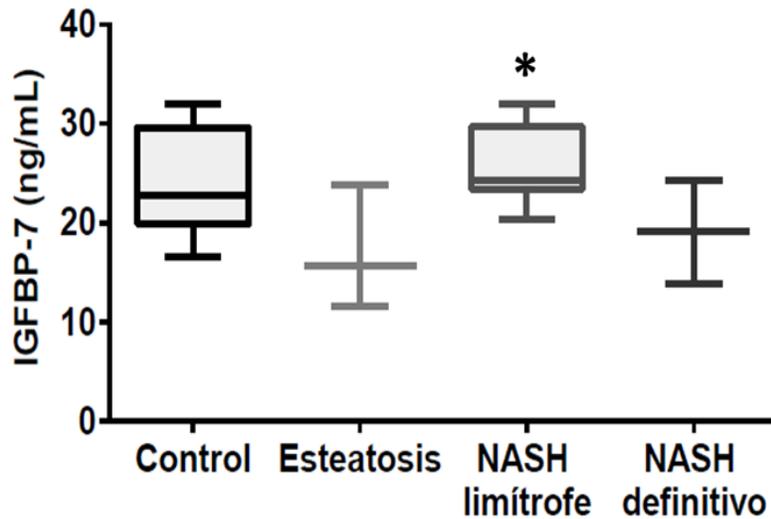


**Figura 12. Concentraciones séricas de las IGFBPs en los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia de la RI.** Se clasificaron a los pacientes con base en la RI, considerando un HOMA-IR>2.4 como punto de corte. **A.** IGFBP-1. **B.** IGFBP-2. **C.** IGFBP-3. **D.** IGFBP-4. **E.** IGFBP-5. **F.** IGFBP-6. **G.** IGFBP-7. Los resultados se analizaron con U de Mann Whitney.

Otra clasificación utilizada fue, con base en la escala NAS, en la cual los pacientes con NAFLD fueron clasificados dentro del espectro de la enfermedad como esteatosis, NASH limítrofe o NASH definitivo. En la Figura 13 se visualizan las concentraciones séricas de las IGFBP-1 a la -6 de los pacientes incluidos y clasificados de acuerdo a lo anterior; en estas proteínas no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, al cuantificar a la proteína IGFBP-7 en el suero de los pacientes obesos mórbidos (Figura 14), se observó que se encontraba incrementada en los pacientes con NASH limítrofe comparada con aquellos pacientes que sólo presentaban esteatosis.

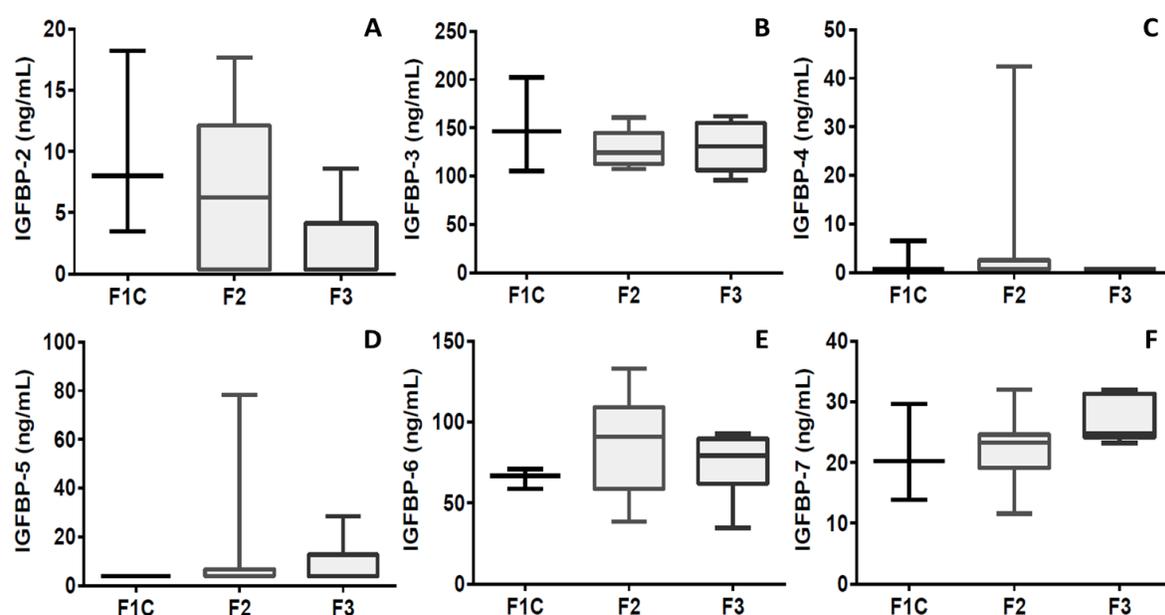


**Figura 13. Concentraciones séricas de las IGFBP-1 a la 6 en el espectro de NAFLD en los pacientes incluidos.** El grupo control está conformado por aquellos pacientes reclutados que no presentan características histológicas de NAFLD. **A.** IGFBP-1. **B.** IGFBP-2. **C.** IGFBP-3. **D.** IGFBP-4. **E.** IGFBP-5. **F.** IGFBP-6. Los resultados se analizaron con Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn.



**Figura 14. Concentraciones séricas de IGFBP-7 en el espectro de NAFLD en los pacientes incluidos.** El grupo control está conformado por aquellos pacientes reclutados que no presentan características histológicas de NAFLD. Los resultados se analizaron con Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn, \* $p < 0.05$  vs esteatosis.

También se clasificó a los pacientes de acuerdo al estadio de la fibrosis hepática con base en la escala de Kleiner-Brunt. En la Figura 15 podemos observar las concentraciones séricas de las IGFBPs de la 2 a la 7 en los pacientes obesos mórbidos incluidos y clasificados, donde no se vieron diferencias significativas en ninguna de las IGFBPs, entre los grupos, a pesar de la evidencia existente donde se demuestra que algunas de estas proteínas se han visto implicadas en el proceso fibrogénico o con moléculas esenciales para éste.



**Figura 15. Concentraciones séricas de las IGFBP-2 a la 7 en los pacientes incluidos y clasificados de acuerdo a la escala de Kleiner-Brunt.** Se clasificó a los pacientes de acuerdo a la severidad del proceso fibrogénico con la escala de Kleiner-Brunt. **A.** IGFBP-2. **B.** IGFBP-3. **C.** IGFBP-4. **D.** IGFBP-5. **E.** IGFBP-6. **F.** IGFBP-7. Los resultados se analizaron con Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn.

Por otro lado, en la Figura 16 se visualiza una disminución de las concentraciones séricas de IGFBP-1 en los pacientes obesos mórbidos que tienen fibrosis perisinusoidal y portal comparadas con aquellos pacientes que presentan sólo fibrosis portal.

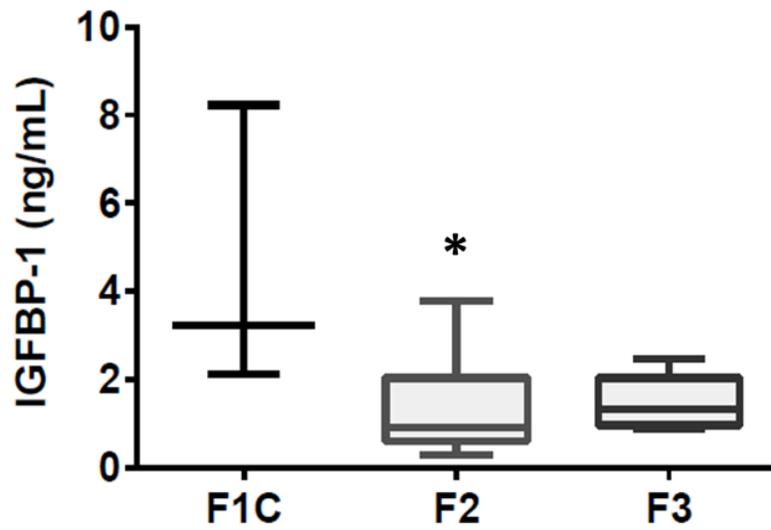


Figura 16. Concentraciones séricas de IGFBP-1 en los pacientes incluidos y clasificados de acuerdo a la escala de Kleiner-Brunt. Se clasificó a los pacientes de acuerdo a la severidad de la fibrosis con la escala de Kleiner-Brunt. Los resultados se analizaron con Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn, \* $p < 0.05$  vs F1C

## **XII. Discusión**

El estudio de la familia de proteínas IGFBP en el curso de NAFLD en obesos mórbidos mostró por una parte que IGFBP-7 se incrementa en los pacientes con NASH limítrofe comparada con los pacientes que tienen sólo esteatosis, mientras que IGFBP-1 disminuye en la etapa F2 de fibrosis respecto a la F1.

La prevalencia de NAFLD, encontrada en este estudio, en población mexicana con obesidad mórbida es de aproximadamente 76.1%, la cual se encuentra dentro de las prevalencias reportadas en este tipo de población (obesidad mórbida), que va del 70 a más del 90% [7, 20, 25, 27, 29-31].

Cabe mencionar que de estos 46 pacientes incluidos, la mayoría eran mujeres, lo cual concuerda con lo reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de Medio Camino 2016, que indica que la obesidad mórbida es 2.4 veces más alta en el sexo femenino que en el masculino [13].

El análisis histológico hepático evidenció las características microscópicas que deben de ser observadas en cada uno de los estadios del espectro de NAFLD, así como la presencia de fibrosis en estos pacientes, lo que permitió clasificarlos dentro del espectro de la enfermedad y por el progreso de la fibrosis.

La primera clasificación realizada fue con base en la presencia de las características histológicas de NAFLD, generando los grupos control y NAFLD, los cuales fueron representados por el 23.9 % y 76.1% de la población incluida en el estudio, respectivamente. Lo anterior concuerda con algunas publicaciones realizadas en población similar a la examinada en este estudio, las cuales reportan la presencia de NAFLD del 64.6 al 77.8% en sujetos con obesidad mórbida programados para cirugía bariátrica [36, 110-112]

Posteriormente, aquellos pacientes que tenían NAFLD se subclasificaron en 3 grupos: Esteatosis, NASH limítrofe y NASH definitivo, de acuerdo al espectro de éste, y se encontró que el 11.4% de estos pacientes con NAFLD presentaban esteatosis simple, lo cual concuerda con lo evidenciado en la literatura, ya que se ha reportado la presencia de esteatosis simple, diagnosticada por biopsia hepática, en 7.7 y 20.8% en población con obesidad mórbida [112, 113]. Así mismo, el 31.4% de los pacientes con NAFLD incluidos en el estudio, tenían NASH, coincidiendo con lo observando en estudios preliminares, donde obtuvieron que el 27 [113] y 34% [112] de sujetos obesos mórbidos presentaban NASH, diagnosticada por biopsia hepática.

En la subclasificación se observaron diferencias significativas entre grupos en algunas características demográficas, encontrando que los pacientes con NASH limítrofe tienen mayor peso corporal que los pacientes del grupo control, no obstante, su IMC no es estadísticamente diferente del IMC del grupo control pero si fue significativamente menor que el de los pacientes con NASH definitivo.

Otra diferencia significativa encontrada entre los grupos es el aumento del IMC en los pacientes con NASH definitivo comparado con los sujetos del grupo control, algunos estudios muestran resultados similares a éste, donde los sujetos obesos mórbidos con NAFLD diagnosticada por biopsia, incluyendo sujetos con esteatosis simple y NASH, presentan un mayor IMC comparado con los individuos obesos mórbidos sin NAFLD [36, 112]; sin embargo, hasta el momento no existe evidencia que señale una asociación directa entre el IMC y la severidad de NAFLD pero sí con su prevalencia.

Con respecto a las comorbilidades, la prevalencia de DT2 encontrada en este estudio fue de 40% en los pacientes con NAFLD y con obesidad mórbida, lo cual coincide con lo reportado en diferentes estudios realizados en pacientes programados para cirugía bariátrica que documentan un amplio rango de prevalencia de DT2 que va desde 20 al

75% en sujetos con NAFLD [21, 23]. Por otra parte se observó que esta prevalencia es superior a la observada en un estudio realizado al norte del país en población que incluía sobrepeso y obesidad en la que se encontró que 26% de los pacientes con NAFLD presentaba DT2 [114].

Dentro del espectro de NAFLD, se encontró que el grupo que presentaba más pacientes con DT2 era el de NASH definitivo, esto podría asociarse con un mayor deterioro del metabolismo de glucosa y lípidos, y por lo tanto una mayor severidad de NAFLD.

Con relación a la hipertensión arterial, el grupo control fue el que presentó la mayor cantidad de pacientes con esta alteración cardiovascular, sin embargo, esto no se visualizó en la proporción de pacientes que presentaron SM, siendo la hipertensión arterial uno de sus componentes; mientras que el grupo con NAFLD tiene una menor cantidad de pacientes con hipertensión arterial pero un mayor porcentaje de pacientes con SM, esto nos podría sugerir que estos pacientes obesos mórbidos con NAFLD son más afectados por el componente metabólico que por el cardiovascular; no obstante, no se puede descartar que puedan presentar a mediano o largo plazo, alguna otra enfermedad cardiovascular como insuficiencia cardíaca, arritmias, entre otras.

Asimismo, se ha reportado que un tercio de los pacientes con NAFLD presentan SM [15, 25]; sin embargo, en este estudio se observó que el 51% de los pacientes con NAFLD con obesidad mórbida presentaban SM. Este incremento de la población que presenta SM posiblemente sea debido a las características de los pacientes estudiados, porque tienen un mayor grado de obesidad que los estudios mencionados [15, 25], y presentan al menos 2 componentes del SM.

Por otro lado, los parámetros bioquímicos de química sanguínea y perfil de lípidos, no mostraron diferencias entre los pacientes obesos mórbidos que presentan NAFLD de aquellos que no, ni tampoco entre los diferentes estadios del espectro de la enfermedad;

no obstante, hay pacientes que presentan algunas de estas pruebas bioquímicas fuera de valores de referencia, estas elevaciones pueden ser asociadas al grado de obesidad que presentan los pacientes como se ha visto en otros estudios con pacientes obesos mórbidos [32-34, 111, 115]. Por ejemplo, en este estudio se observó que la mediana de triglicéridos de todos los grupos, con excepción del grupo control, se encuentra fuera de valores de referencia.

Se observó un incremento de las transaminasas (AST, ALT) en el grupo NAFLD comparado con el grupo control, a pesar del amplio rango evidenciado; sin embargo, la mediana de ambas enzimas en el grupo NAFLD se encuentra dentro de los valores de referencia, esto puede ser debido a la presencia de pacientes que no tienen incrementadas estas enzimas, como se ha documentado anteriormente [1, 48], resultando que la mediana de estas transaminasas quede dentro de valores de referencia. Esta diferencia entre en los pacientes con y sin NAFLD nos podría sugerir la presencia de la enfermedad, no obstante, en la práctica clínica es necesaria la elevación de ALT más de 2 veces el valor superior del rango de referencia y en forma persistente por al menos 6 meses (sin explicación aparente), para que se pueda realizar el diagnóstico de NASH [1, 48, 67, 68]; por lo cual, estas transaminasas no son suficientes para realizar el diagnóstico de la patología, ya que no todos los pacientes presentan dicha alteración.

Dentro del espectro de NAFLD, se observó un incremento de AST y ALT en los pacientes con NASH limítrofe comparadas con los pacientes del grupo control estas diferencias observadas se encuentran dentro de valores de referencia; esto como se mencionó anteriormente, podría indicar la presencia de NAFLD, sin embargo, el rango intercuartil evidencia que no todos los pacientes de este grupo presentan dicha alteración y por lo tanto, estas transaminasas no son capaces de identificar la presencia de NASH eficazmente comparadas con la biopsia hepática, la cual se considera el estándar de oro para realizar el diagnóstico de NAFLD [1, 21].

De manera similar, se encontró elevación de las concentraciones de ALT en pacientes con NASH definitivo comparados con el grupo control, aunque esta diferencia no se observó en los niveles de AST. ALT es la enzima que se ha considerado como uno de los principales hallazgos clínicos para realizar el diagnóstico de NAFLD/NASH [48, 116, 117], y se propone que la elevación en más de 2 veces el valor de referencia pueden ser un signo de NASH. Sin embargo, los pacientes que presentan NASH pueden o no tener elevación significativa de esta enzima asociada a la enfermedad [1, 10, 26, 110], lo que hace difícil el diagnóstico no sólo de NASH sino también de NAFLD.

Las alteraciones observadas en las transaminasas en los grupos de NASH limítrofe y definitivo probablemente sean por un mayor daño hepático debido a la presencia de infiltrado inflamatorio en el hígado.

Por otra parte, se encontraron incrementadas las bilirrubinas (indirecta, directa y total) en los obesos mórbidos con NAFLD, y dentro del espectro de NAFLD, en los pacientes con NASH limítrofe y definitivo, comparados con el grupo control; sin embargo, este incremento se mantiene dentro de valores de referencia o ligeramente por arriba de éstos. Este incremento en las bilirrubinas en los sujetos con NASH limítrofe y definitivo, puede ser debido a la esteatohepatitis (inflamación en el parénquima hepático) presente en estos pacientes y que conlleva a un mayor daño hepático.

Por todo lo anteriormente mencionado, podemos sugerir que los parámetros bioquímicos, por ejemplo las transaminasas y bilirrubinas, no son suficientes para realizar el diagnóstico de NAFLD ni para asegurar la severidad de la enfermedad, ya que pueden o no presentar alteraciones fuera de los valores de referencia [1, 10, 26, 110].

El número de sujetos obesos mórbidos en los diferentes estadios de la enfermedad es variado, y el grupo con menos sujetos es el de esteatosis, esta cantidad de pacientes en este grupo concuerda con lo evidenciado por otros autores, donde el número de sujetos

en este grupo es menor comparado con los grupos de NASH limítrofe y definitivo [99, 118]. Estos autores también evidencian que dentro del espectro de NAFLD la mayor prevalencia se encuentra en NASH definitivo [99, 118], sin embargo, en este estudio el grupo con más pacientes es el de NASH limítrofe; esto podría deberse a que previo a la cirugía bariátrica y toma de muestra, los pacientes son sometidos a una dieta balanceada y actividad física para bajar cierto porcentaje de su peso corporal, lo que podría revertir la severidad de NAFLD, dando como resultado que los pacientes pasen de un estadio de NASH definitivo a su estadio inmediato anterior como es NASH limítrofe.

Los resultados obtenidos de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide de la 1 a la 7 (IGFBP1-7) no muestran diferencias entre los pacientes obesos mórbidos con y sin NAFLD, esto contrasta con la evidencia reportada, donde se han visto alteraciones de estas moléculas en NAFLD en sujetos con sobrepeso y obesidad grado I, y podría deberse a que la población estudiada es metabólicamente muy diferente a otras poblaciones reportadas en la literatura [81, 91, 99].

Las concentraciones de IGFBPs de la 1 a la 7 no cambian entre aquellos sujetos obesos mórbidos que no presentan RI de los que sí tienen esta alteración metabólica, a pesar de que algunas de estas proteínas, por ejemplo, IGFBP-1 puede ser regulada por la insulina [78] y ha sido asociada a su sensibilidad o resistencia [79, 80], mientras que IGFBP-7 se ha relacionado con la regulación de esta hormona [69] y con algunos componentes del SM [106].

Los resultados de las concentraciones séricas de IGFBP1-6 muestran que estas proteínas no diferencian entre los estadios del espectro de NAFLD. IGFBP7, por su parte, está incrementada en los pacientes que presentan NASH limítrofe comparada con aquellos que tienen esteatosis simple. Cabe mencionar que este es el primer indicio que se tiene con respecto a la capacidad que puede tener una molécula, en este caso IGFBP7, para poder

diferenciar entre sujetos con NASH y esteatosis simple, lo anterior sugiere que IGFBP-7 podría ser un posible biomarcador para esta patología.

Se ha documentado el papel de IGFBP-7 en diversos procesos celulares, por ejemplo, en el proceso de senescencia celular o como gen supresor de tumores [76, 77]; en este estudio encontramos un incremento de las concentraciones de esta proteína en los sujetos con NASH limítrofe comparadas con las de los sujetos que sólo tenían esteatosis, esto es presumiblemente debido al desarrollo de senescencia celular en estos pacientes, ya que los pacientes obesos mórbidos con NASH limítrofe presentan producción de ERO y por lo tanto, estrés oxidativo, lo que conlleva a un mayor daño en los hepatocitos [57, 119]. El incremento del estrés oxidativo en los pacientes con NASH limítrofe, comparados con los pacientes con esteatosis simple, podría favorecer el desarrollo del proceso de senescencia, ya que se conocen que algunas de sus causas son: estrés oxidativo, daño irreparable al DNA, acortamiento de los telómeros debido a una replicación exhaustiva, entre otros [120].

Asimismo, existen algunos estudios que han asociado el proceso de senescencia celular con NAFLD [121, 122], y dentro de éstos se encuentra un estudio realizado en Inglaterra en pacientes con NAFLD, donde muestran un incremento de la fosforilación de la histona H<sub>2</sub>AX ( $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX) y de p21 en hepatocitos de pacientes con la patología [121, 123]. Estas moléculas se han visto involucradas con un daño irreparable al DNA y acortamiento de los telómeros, respectivamente; no obstante, esta posible asociación entre el proceso de senescencia celular y NAFLD no se ha estudiado en los diferentes estadios del espectro de la enfermedad.

En la fibrosis hepática, las concentraciones séricas de la IGFBP-2 a la 7 no permitieron diferenciar entre los 3 estadios de fibrosis que se estudiaron, a pesar de que algunas de estas proteínas se han visto alteradas en la cirrosis hepática [92-94] o en fibrosis asociadas a otros órganos [84, 88, 100-102]. No obstante, no podemos confirmar o negar su posible

participación en la fibrogénesis relacionada a NAFLD debido a que no se tienen todos los estadios del proceso fibrogénico en esta patología, y estas moléculas podrían verse incrementadas o disminuidas en F1A o F1B.

Por otro lado, las concentraciones de IGFBP-1 se encontraron disminuidas en el suero de pacientes con un grado F2 o fibrosis portal y perisinusoidal, comparadas con aquellos pacientes que sólo tenían fibrosis portal (F1C), esto es similar a lo encontrado en un estudio reportado en el 2015 por nuestro grupo de trabajo, donde observamos que la expresión de esta proteína disminuía en el estadio F2 de la fibrogénesis hepática inducida por tetracloruro de carbono en un modelo murino, comparada con un estadio F1, estos estadios se caracterizan por la manifestación de fibrosis portal con presencia de escasos septos y sólo fibrosis portal, respectivamente [124]; esto nos puede sugerir que IGFBP-1 podría diferenciar un estadio temprano en la fibrogénesis hepática, como lo es la fibrosis portal, de un estadio con más daño como lo es la fibrosis portal con fibrosis perisinusoidal o con escasos septos.

Es importante mencionar que actualmente, no hay métodos diagnósticos no invasivos disponibles que nos permitan diferenciar entre esteatosis simple y NASH, ni tampoco entre los diferentes estadios de la fibrosis asociada a NAFLD; por lo cual, IGFBP-7 e IGFBP-1 podría ser consideradas como candidatos de biomarcadores de NAFLD y la fibrosis asociada a ésta, sin embargo, se requieren más estudios de estas proteínas en otro tipo de poblaciones como obesidad grado I y II con NAFLD, incluso con sobrepeso y normopeso, para confirmarlas como posible biomarcadores de NAFLD.

De igual forma, en futuros estudios se debe de considerar no sólo el tipo de población sino también el tamaño de muestra para cada uno de los estadios dentro del espectro de NAFLD y en la fibrogénesis relacionada a ésta.

### **XIII. Conclusiones**

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas nos indican que éstas son poco eficientes para realizar el diagnóstico de NAFLD y de sus diferentes estadios dentro del espectro, ya que no todos los sujetos con la patología, incluyendo aquellos pacientes de los estadios más avanzados de la enfermedad, presentan elevaciones fuera de valores de referencia ni tampoco el incremento significativo de algunas pruebas del perfil hepático, que se utilizan en la clínica para el diagnóstico de NAFLD.

Las concentraciones obtenidas de IGFBP1-7 no mostraron diferencias entre los pacientes obesos mórbidos con y sin NAFLD, ni denotaron una asociación entre los pacientes obesos mórbidos con y sin RI. Tampoco se mostraron diferencias en las concentraciones de las IGFBPs de la 1 a la 6 en suero, en los diferentes estadios del espectro de NAFLD, ni en las concentraciones de las IGFBP-2 a la 7 en la fibrosis hepática relacionada a NAFLD, por lo cual podemos decir que estas proteínas no son capaces de diferenciar a los sujetos obesos mórbidos con y sin RI o NAFLD, ni entre sus estadios de ésta última.

Los resultados obtenidos muestran diferencias en las concentraciones séricas de IGFBP-7 entre los pacientes obesos mórbidos con esteatosis simple y los que presentan NASH limítrofe; también se observaron diferencias en las concentraciones de IGFBP-1 en el suero de pacientes que tenían fibrosis portal y perisinusoidal, de aquellos pacientes con sólo fibrosis portal, por lo anterior podríamos proponer a IGFBP-7 e IGFBP-1 como posibles biomarcadores para el diagnóstico de NAFLD y fibrosis relacionada a NAFLD, respectivamente.

#### XIV. Referencias

1. Milic, S., D. Lulic, and D. Stimac, *Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9330-7.
2. Bian, Z. and X. Ma, *Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 248.
3. Reccia, I., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease*. Metabolism, 2017. **72**: p. 94-108.
4. Del Ben M, P.L., Baratta F, Pastori D, Loffredo L, Angelico F, *Modern approach to the clinical management of non-alcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(26): p. 8341-8350.
5. Adams, L.A., et al., *The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 113-121.
6. Pappachan, J.M., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease: a diabetologist's perspective*. Endocrine, 2014. **45**(3): p. 344-53.
7. González-Salazar MC, M.-U.A., Juárez-Rojas JG, Cardoso-Saldaña GC, Posadas-Sánchez R, Martínez-Alvarado R, Jorge-Galarza E, Posadas-Romero C, *[Dietary patterns and physical activity in the mexican population; association with fatty liver]*. Gac Med Mex, 2014. **150**(Suppl 1): p. 39-47.
8. Asrih, M. and F.R. Jornayvaz, *Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link?* Mol Cell Endocrinol, 2015. **418 Pt 1**: p. 55-65.
9. Tuyama, A.C. and C.Y. Chang, *Non-alcoholic fatty liver disease*. J Diabetes, 2012. **4**(3): p. 266-80.
10. Dietrich, P. and C. Hellerbrand, *Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014. **28**(4): p. 637-53.
11. WHO. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/apps.who.int/gho/data/no.de.main.A896?lang=en>.

12. INEGI. Available from: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/Proyectos/>.
13. Salud, S.d., *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino*. 2016.
14. Angulo, P., Lindor KD, *Non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(Suppl): p. S186-S190.
15. Machado, M.V. and H. Cortez-Pinto, *Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(36): p. 12956-80.
16. Bugianesi, E., et al., *Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship?* Dig Liver Dis, 2004. **36**(3): p. 165-73.
17. Pallayova, M. and S. Taheri, *Non-alcoholic fatty liver disease in obese adults: clinical aspects and current management strategies*. Clin Obes, 2014. **4**(5): p. 243-53.
18. Cordeiro, A., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease Relationship with Metabolic Syndrome in Class III Obesity Individuals*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 839253.
19. Than, N.N., Newsome P. N., *Non-alcoholic fatty liver disease: when to intervene and what what*. Clin Med (Lond), 2015. **15**(2): p. 186-190.
20. Muñoz-Espinosa, L.E., *[Non-alcoholic Steatohepatitis]*. Rev Gastroenterol Mex, 2008. **73**(Supl. 2): p. S26-S28.
21. Almeda-Valdes, P., Aguilar-Olivos N, Uribe M, Méndez-Sánchez N, *Common Features of the Metabolic Syndrome and Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Rev Recent Clin Trials, 2014. **9**(3): p. 148-158.
22. Than, N.N. and P.N. Newsome, *A concise review of non-alcoholic fatty liver disease*. Atherosclerosis, 2015. **239**(1): p. 192-202.
23. Byrne, C.D. and G. Targher, *NAFLD: a multisystem disease*. J Hepatol, 2015. **62**(1 Suppl): p. S47-64.
24. Milic, S. and D. Stimac, *Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment*. Dig Dis, 2012. **30**(2): p. 158-62.
25. Varela-Rey, M., et al., *Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 969-76.

26. de Alwis, N.M. and C.P. Day, *Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears*. J Hepatol, 2008. **48 Suppl 1**: p. S104-12.
27. Masarone, M., Federico, A., Abenavoli, L., Loguercio, C. and Persico, M., *Non Alcoholic Fatty Liver: Epidemiology and Natural History*. Reviews on Recent Clinical Trials, 2014. **9**(3): p. 126-133.
28. Carr, R.M., A. Oranu, and V. Khungar, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management*. Gastroenterol Clin North Am, 2016. **45**(4): p. 639-652.
29. Cave, M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(3): p. 184-95.
30. Martín-Domínguez, V., González-Casas, R, Mendoza-Jiménez-Ridruejo, J, García-Buey, L, Moreno-Otero, R, *Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease*. Rev Esp Enferm Dig, 2013. **105**(7): p. 409-420.
31. Adams, L.A. and K.D. Lindor, *Nonalcoholic fatty liver disease*. Ann Epidemiol, 2007. **17**(11): p. 863-9.
32. Losekann, A., et al., *Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH): Risk Factors in Morbidly Obese Patients*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 25552-9.
33. Morita, S., et al., *Prevalence of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis Risk Factors in Patients Undergoing Bariatric Surgery*. Obes Surg, 2015. **25**(12): p. 2335-43.
34. Lassailly, G., et al., *Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients*. Gastroenterology, 2015. **149**(2): p. 379-88; quiz e15-6.
35. Karlas, T., et al., *Evaluation of Transient Elastography, Acoustic Radiation Force Impulse Imaging (ARFI), and Enhanced Liver Function (ELF) Score for Detection of Fibrosis in Morbidly Obese Patients*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0141649.
36. Bedossa, P., Tordjman, J, Aron-Wisniewsky, J, Poitou, C, Oppert, JM, Torcivia, A, Bouillot, JL, Paradis, V, Ratziu, V, Clément, K, *Systematic review of bariatric surgery*

- liver biopsies clarifies the natural history of liver disease in patients with severe obesity.* Gut, 2016. **0**: p. 1-9.
37. Ebaid, A., *Analytical solutions for the mathematical model describing the formation of liver zones via Adomian's method.* Comput Math Methods Med, 2013. **2013**: p. 547954.
  38. Beath, S.V., *Hepatic function and physiology in the newborn.* Seminars in Neonatology, 2003. **8**(5): p. 337-346.
  39. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis.* Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 425-56.
  40. Friedman, S.L.A., M.J.P., *Reversing Hepatic Fibrosis.* Science & Medicine, 2002. **8**: p. 194-205.
  41. Nascimbeni, F., P. Loria, and V. Ratziu, *Non-alcoholic fatty liver disease: diagnosis and investigation.* Dig Dis, 2014. **32**(5): p. 586-96.
  42. Bhatt, H.B. and R.J. Smith, *Fatty liver disease in diabetes mellitus.* Hepatobiliary Surg Nutr, 2015. **4**(2): p. 101-8.
  43. Yeh, M.M. and E.M. Brunt, *Pathological features of fatty liver disease.* Gastroenterology, 2014. **147**(4): p. 754-64.
  44. Lavallard, V.J. and P. Gual, *Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 120179.
  45. Bedossa, P., *Histological Assessment of NAFLD.* Dig Dis Sci, 2016. **61**(5): p. 1348-55.
  46. Brunt, E.M., *Non-alcoholic fatty liver disease: what's new under the microscope?* Gut, 2011. **60**(8): p. 1152-8.
  47. Bedossa, P., *Pathology of non-alcoholic fatty liver disease.* Liver Int, 2017. **37 Suppl 1**: p. 85-89.
  48. Neuman MG, C.L., Nanau RM, *Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease.* Can J Gastroenterol Hepatol, 2014. **28**(11): p. 607-618.
  49. Bedossa, P. and K. Patel, *Biopsy and Noninvasive Methods to Assess Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.* Gastroenterology, 2016. **150**(8): p. 1811-1822 e4.

50. Brunt, E.M., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pros and Cons of Histologic Systems of Evaluation*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
51. Kobyliak N, A.L., *The Role of Liver Biopsy to Assess Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Rev Recent Clin Trials, 2014. **9**(3): p. 159-169.
52. Lackner, C., et al., *Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis*. J Hepatol, 2008. **48**(5): p. 821-8.
53. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
54. Schuppan, D.a.K., Y, O., *Evolving therapies for liver fibrosis*. J Clin Invest, 2013. **123**(5): p. 1887-1901.
55. Day, C., James, OF, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-845.
56. Peverill, W., L.W. Powell, and R. Skoien, *Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 8591-638.
57. Magee, N., A. Zou, and Y. Zhang, *Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 5170402.
58. Schwenger, K.J. and J.P. Allard, *Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1712-23.
59. Berlanga, A., et al., *Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Exp Gastroenterol, 2014. **7**: p. 221-39.
60. Marchesini, G., S. Petta, and R. Dalle Grave, *Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice*. Hepatology, 2016. **63**(6): p. 2032-43.
61. Bellanti, F., et al., *Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Free Radic Biol Med, 2017.
62. Sanches, S.C., et al., *Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 574832.

63. Grandison, G.A. and P. Angulo, *Can NASH be diagnosed, graded, and staged noninvasively?* Clin Liver Dis, 2012. **16**(3): p. 567-85.
64. Papagianni, M., A. Sofogianni, and K. Tziomalos, *Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease.* World J Hepatol, 2015. **7**(4): p. 638-48.
65. FibroScan, I. France: Echosens. 2015 2015; Available from: <http://www.fibroscan.com/en/expertise>.
66. Brener, S., *Transient Elastography for Assessment of Liver Fibrosis and Steatosis: An Evidence-Based Analysis.* Ont Health Technol Assess Ser, 2015. **15**(18): p. 1-45.
67. Popov, V.B. and J.K. Lim, *Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Medical, Surgical, and Endoscopic Weight Loss.* J Clin Transl Hepatol, 2015. **3**(3): p. 230-8.
68. Bosques-Padilla, F.e.a., *Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de hepatopatía grasa no alcohólica.* Rev Gastroenterol Mex, 2008. **73**(2): p. 129-133.
69. Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R.G., *The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily.* Endocrine Reviews, 1999. **20**(6): p. 761-787.
70. Mohan, S., Baylink, DJ, *IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms.* J Endocrinol, 2002. **175**(1): p. 19-31.
71. Rajaram, S., Baylink, DJ, and Mohan, S, *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions.* Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 801-831.
72. Duan, C. and Q. Xu, *Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions.* Gen Comp Endocrinol, 2005. **142**(1-2): p. 44-52.
73. Ferry, R.J.J., Cerri, R.W., Cohen, P., *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins: New Proteins, New Functions.* Horm Res., 1999. **51**(2): p. 53-67.
74. Kelley, K., Oh, Y, Gargosky, SE, Gucev, Z, Matsumoto, T, Hwa, V, Ng, L, Simpson, DM, Rosenfeld, RG, *Insulin-like Growth Factor-binding Proteins (IGFBPs) and Their Regulatory Dynamics.* Int J Biochem Cell Biol, 1996. **28**(6): p. 619-637.

75. Rosen, C.J., *Serum Insulin-like Growth Factors and Insulin-like Growth Factor-binding Proteins: Clinical Implications*. Clinical Chemistry, 1999. **45**(8(B)): p. 1384–1390.
76. Lopez-Bermejo, A., et al., *Generation of anti-insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1/MAC25) monoclonal antibodies and immunoassay: quantification of IGFBP-rP1 in human serum and distribution in human fluids and tissues*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3401-8.
77. Akiel, M., et al., *Emerging role of insulin-like growth factor-binding protein 7 in hepatocellular carcinoma*. J Hepatocell Carcinoma, 2014. **1**: p. 9-19.
78. Hoeflich, A. and V.C. Russo, *Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2 - consensus and dissent on metabolic control and malignant potential*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015. **29**(5): p. 685-700.
79. Kotronen, A., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 1 as a novel specific marker of hepatic insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(12): p. 4867-72.
80. Borai, A., et al., *Delta insulin-like growth factor binding protein-1 (DeltaIGFBP-1): a marker of hepatic insulin resistance?* Ann Clin Biochem, 2014. **51**(Pt 2): p. 269-76.
81. Graffigna, M., Belli, SH, de Larrañaga, G, Fainboim, H, Estepo, C, Peres, S, García, N, Levalle, O, *[Insulin-like growth factor-binding protein-1: a new biochemical marker of nonalcoholic fatty liver disease?]*. Acta Gastroenterol Latinoam, 2009. **39**(1): p. 30-37.
82. Leu, J.I., et al., *Impaired Hepatocyte DNA Synthetic Response Posthepatectomy in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1-Deficient Mice with Defects in C/EBP and Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Regulation*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(4): p. 1251-1259.
83. Kocabayoglu, P., Zhang, DY, Kojima, K, Hoshida, Y, Friedman SL, *Induction and contribution of beta platelet-derived growth factor signalling by hepatic stellate cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice*. Liver Int., 2016. **36**(6): p. 874–882.

84. Guiot, J., et al., *Raised serum levels of IGFBP-1 and IGFBP-2 in idiopathic pulmonary fibrosis*. BMC Pulm Med, 2016. **16**(1): p. 86.
85. Wheatcroft, S.B., et al., *IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(2): p. 285-94.
86. Heald, A., Kaushal, K, Siddals, KW, Rudenski, AS, Anderson, SG and Gibson, JM, *Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) is a marker for the metabolic syndrome*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006. **114**(7): p. 371-376.
87. Kammel, A., et al., *Early hypermethylation of hepatic Igfbp2 results in its reduced expression preceding fatty liver in mice*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(12): p. 2588-2599.
88. Chadelat, K., Boule, M., Corroyer, S., Fauroux, B., Delaisi, B., Tournier, G. and Clement, A., *Expression of insulin-like growth factors and their binding proteins by bronchoalveolar cells from children with and without interstitial lung disease*. Eur Respir J, 1998. **11**(6): p. 1329-1336.
89. Yamada, P.M., et al., *Evidence of a role for insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in metabolic regulation*. Endocrinology, 2010. **151**(12): p. 5741-50.
90. Yeap, B.B., et al., *IGF1 and its binding proteins 3 and 1 are differentially associated with metabolic syndrome in older men*. European Journal of Endocrinology, 2009. **162**(2): p. 249-257.
91. Ichikawa, T., et al., *Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease*. Hepatol Int, 2007. **1**(2): p. 287-94.
92. Sídlová, K., Pechová, M., Kotasha K. and Průša, R., *Insulin-like growth factor binding protein-3 in patients with liver cirrhosis*. Physiol Res, 2002. **51**(6): p. 587-590.
93. Shaarawy, M., Fikry, M. A., Massoud, B. A. and Lotfy, S., *Insulin-like growth factor binding protein-3: a novel biomarker for the assessment of the synthetic capacity of hepatocytes in liver cirrhosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3316-3319.

94. Dehghani, S.M., et al., *Serum Insulinlike Growth Factor-1 and Its Binding Protein-3 Levels in Children With Cirrhosis Waiting for a Liver Transplant*. *Experimental and Clinical Transplantation*, 2012. **10**(3): p. 252-257.
95. Correa, C.G., et al., *Circulating insulin-like growth factor-binding protein 3 as prognostic biomarker in liver cirrhosis*. *World J Hepatol*, 2016. **8**(17): p. 739-48.
96. Ronsoni, M.F., Lazzarotto, C., Fayad, L., Silva, M. C., Nogueira, C. L., Bazzo, M. L., Narciso-Schiavon, J. L., Dantas-Corrêa, E. B. and Schiavon, L. de L., *IGF-I and IGFBP-3 serum levels in patients hospitalized for complications of liver cirrhosis*. *Ann Hepatol*, 2013. **12**(3): p. 456-463.
97. Colakoğlu, O., Taşkıran, B., Colakoğlu, G., Kizildağ, S., Ari Ozcan, F. and Unsal, B., *Serum insulin like growth factor-1 (IGF-1) and insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) levels in liver cirrhosis*. *Turk J Gastroenterol*, 2007. **18**(4): p. 245-249.
98. Demori, I., Balocco, S, Voci, A, Fugass, E, *Increased insulin-like growth factor binding protein-4 expression after partial hepatectomy in the rat*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **278**(3): p. G384-G389.
99. Colak, Y., et al., *Serum concentrations of human insulin-like growth factor-1 and levels of insulin-like growth factor-binding protein-5 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2012. **24**(3): p. 255-61.
100. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 induces skin fibrosis: A novel murine model for dermal fibrosis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(9): p. 3001-10.
101. Pilewski, J.M., et al., *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3 and 5 Are Overexpressed in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Contribute to Extracellular Matrix Deposition*. *The American Journal of Pathology*, 2005. **166**(2): p. 399-407.
102. Zimmermann, E., Li,L, Hou, YT, Cannon, M, Christman, GM, Bitar, KN, *IGF-I induces collagen and IGFBP-5 mRNA in rat intestinal smooth muscle*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(4 Pt 1): p. G875-882.

103. Sokolovic, A., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 enhances survival of LX2 human hepatic stellate cells*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010. **3**: p. 3.
104. Lu, S., Purohit, S, Sharma, A, Zhi, W, He, M, Wang, Y, Li, CJ, She, JX, *Serum insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6) is increased in patients with type 1 diabetes and its complications*. *Int J Clin Exp Med*, 2012. **5**(3): p. 229-237.
105. Sun, H., Chua, MS, Yang, D, Tsalenko, A, Peter, BJ, So, S, *Antibody Arrays Identify Potential Diagnostic Markers of Hepatocellular Carcinoma*. *Biomark Insights*, 2008. **21**(3): p. 1-18.
106. Liu, Y., et al., *Serum IGFBP7 levels associate with insulin resistance and the risk of metabolic syndrome in a Chinese population*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10227.
107. Gu, H.F., et al., *Evaluation of IGFBP-7 DNA methylation changes and serum protein variation in Swedish subjects with and without type 2 diabetes*. *Clin Epigenetics*, 2013. **5**(1): p. 1-7.
108. Liu, L.-X., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-7 induces activation and transdifferentiation of hepatic stellate cells in vitro*. *World Journal of Gastroenterology*, 2009. **15**(26): p. 3246.
109. Angulo, P., et al., *The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD*. *Hepatology*, 2007. **45**(4): p. 846-54.
110. Baxter, R.C. and S.M. Twigg, *Actions of IGF binding proteins and related proteins in adipose tissue*. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. **20**(10): p. 499-505.
111. Barros, F., Setúbal, S., Martinho, J.M., Ferraz, L., Gaudêncio, A., *Correlation of non-alcoholic fatty liver disease and features of metabolic syndrome in morbidly obese patients in the preoperative assessment for bariatric surgery*. *Arq Bras Cir Dig*, 2016. **29**(4): p. 260-263.
112. Bedossa, P., et al., *Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients*. *Hepatology*, 2012. **56**(5): p. 1751-9.
113. Taitano, A.A., et al., *Bariatric surgery improves histological features of nonalcoholic fatty liver disease and liver fibrosis*. *J Gastrointest Surg*, 2015. **19**(3): p. 429-36; discussion 436-7.

114. Lizardi-Cervera J, L.D., Chávez-Tapia NC, Ostos ME, Esquivel MU, [Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects]. *Rev Gastroenterol Mex*, 2006. **71**(4): p. 453-459.
115. Zelber-Sagi, S., et al., *Predictors for advanced fibrosis in morbidly obese non-alcoholic fatty liver patients*. *World J Hepatol*, 2017. **9**(2): p. 91-98.
116. Reid, A.E., *Nonalcoholic steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(3): p. 710-723.
117. Walenbergh, S.M., et al., *Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins*. *J Hepatol*, 2013. **58**(4): p. 801-10.
118. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings*. *Hepatology*, 2011. **53**(3): p. 810-20.
119. Cortez-Pinto, H., M.C. de Moura, and C.P. Day, *Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice*. *J Hepatol*, 2006. **44**(1): p. 197-208.
120. Aravinthan, A.D. and G.J. Alexander, *Senescence in chronic liver disease: Is the future in aging?* *J Hepatol*, 2016. **65**(4): p. 825-34.
121. Aravinthan, A., Scarpini, C., Tachtatzis, P., Verma, S., Penrhyn-Lowe, S., Harvey, R., Davies, S.E., Allison, M., Coleman, N., Alexander, G., *Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease*. *J Hepatol*, 2013. **58**(3): p. 549-556.
122. Laish, I., et al., *Telomere Dysfunction in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cryptogenic Cirrhosis*. *Cytogenet Genome Res*, 2016. **150**(2): p. 93-99.
123. Schafer, M.J., J.D. Miller, and N.K. LeBrasseur, *Cellular senescence: Implications for metabolic disease*. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. **455**: p. 93-102.
124. Sánchez-Jerónimo, O., *Participación de la proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide (igfbp-1) en el desarrollo de la fibrosis hepática en un modelo murino*, 2015, Universidad Nacional Autónoma de México: Hospital General de México "Dr Eduardo Liceaga", Departamento de Medicina Experimental, Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM). p. 69.

125. Angulo, P. *NAFLD Fibrosis Score. Online Calculator*. 2007; Available from:  
<http://nafldscore.com/index.php>.

## XV. Anexo I: Comparación entre puntuación de fibrosis de NAFLD y biopsia hepática.

Comparación del grado de fibrosis en los pacientes incluidos; obtenido mediante la escala de Kleiner-Brunt, a través de la biopsia hepática y calculado con la puntuación de fibrosis de NAFLD en línea [125] por medio de parámetros bioquímicos como edad, IMC, albúmina, AST, ALT, plaquetas y presencia de diabetes/glucosa alterada en ayuno.

ID Paciente	Escala de fibrosis de Kleiner-Brunt	Puntuación de fibrosis de NAFLD. Calculadora en línea.		ID Paciente	Escala de fibrosis de Kleiner-Brunt	Puntuación de fibrosis de NAFLD. Calculadora en línea.	
		Puntaje	Significado			Puntaje	Significado
1	F3	-1.332	Puntaje indeterminado	44	F2	-0.013	Puntaje indeterminado
2	F2	-2.50	F0-F2	45	F3	1.721	F3-F4
6	F1C	-2.50	F0-F2	47	F2	-2.466	F0-F2
9	F3	-0.645	Puntaje indeterminado	49	F2	-0.139	Puntaje indeterminado
10	F2	0.245	Puntaje indeterminado	52	F3	-0.152	Puntaje indeterminado
12	F3	-0.585	Puntaje indeterminado	53	F3	0.773	F3-F4
13	F3	1.044	F3-F4	56	F3	0.481	Puntaje indeterminado
14	F3	2.00	F3-F4	58	F1C	2.00	F3-F4
15	F1C	-1.646	F0-F2	60	F2	-0.260	Puntaje indeterminado
17	F1C	-2.50	F0-F2	61	F2	-1.694	F0-F2
21	F2	-0.687	Puntaje indeterminado	64	F2	1.479	F3-F4
23	F2	0.445	Puntaje indeterminado	66	F2	-2.317	F0-F2
24	F2	-0.205	Puntaje indeterminado	67	F1C	0.273	Puntaje indeterminado
25	F3	-1.218	Puntaje indeterminado	69	F3	2.00	F3-F4
28	F3	-1.959	F0-F2	71	F2	-1.250	Puntaje indeterminado
29	F3	1.232	F3-F4	72	F2	0.520	Puntaje indeterminado
30	F3	-0.242	Puntaje indeterminado	73	F2	2.00	F3-F4
31	F2	-0.053	Puntaje indeterminado	74	F2	0.413	Puntaje indeterminado
39	F1C	-0.986	Puntaje indeterminado	75	F2	-1.776	F0-F2
40	F2	-1.676	F0-F2	78	F2	2.00	F3-F4
41	F2	2.00	F3-F4				
42	F2	-1.838	F0-F2				
43	F3	1.131	F3-F4				

## XVI. Anexo II: Metodología de la técnica arreglo en suspensión múltiple.

El ensayo se realizó con previa preparación del protocolo (mapa de la placa) y curva estándar, como se detalla a continuación: primero se preparó la placa agregando 200  $\mu$ L de Assay Buffer en cada pozo, agitándola por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente decantándola, después se añadieron 25  $\mu$ L de Assay Buffer a los pozos del blanco y las muestras de suero, 25  $\mu$ L de los estándares o controles a los pozos establecidos para éstos, 25  $\mu$ L de Serum Matrix a los pozos del blanco, estándares y controles, 25  $\mu$ L de las muestras a los pozos de las muestras y 25  $\mu$ L de la mezcla de esferas a cada pozo, a continuación se incubó en agitación toda la noche a 4°C.

Al término de la incubación, se realizaron lavados. Después de los lavados, se agregaron 50  $\mu$ L del anticuerpo de detección en cada pozo y la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron 50  $\mu$ L de estreptavidina-ficoeritrina en cada pozo y se volvió a incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se realizaron 3 lavados, se agregaron 100  $\mu$ L de Sheath Fluid en cada pozo y se realizó la lectura de la placa en el equipo Luminex 200® (Bioplex 200, Bio-Rad).

En la Tabla T1 se muestran las concentraciones de las curvas estándar realizadas para este ensayo.

**T1. Concentraciones de las IGFBPs en la curva estándar.**

Estándar	IGFBP-1 (ng/mL)	IGFBP-2, IGFBP-3 (ng/mL)	IGFBP-4 (ng/mL)	IGFBP-5 (ng/mL)	IGFBP-6 (ng/mL)	IGFBP-7 (ng/mL)
Estándar 1	0.03	0.34	0.69	1.37	0.14	0.07
Estándar 2	0.10	1.03	2.06	4.12	0.41	0.21
Estándar 3	0.31	3.09	6.17	12.35	1.23	0.62
Estándar 4	0.93	9.26	18.52	37.04	3.70	1.85
Estándar 5	2.78	27.78	55.56	111.11	11.11	5.56
Estándar 6	8.33	83.33	166.67	333.33	33.33	16.67
Estándar 7	25	250	500	1000	100	50

Para garantizar la fiabilidad del ensayo se utilizaron controles de calidad (Tabla T2) y los valores obtenidos para las IGFBPs estuvieron dentro del rango esperado; además, la sensibilidad para cada proteína se presenta en la Tabla T3.

**T2. Rango de los valores esperados de los controles de calidad y valor obtenido.**

Analito	Control	Límite inferior (ng/mL)	Límite superior (ng/mL)	Valor obtenido
IGFBP-1	I	0.47	0.97	0.55
	II	1.9	3.9	2.49
IGFBP-2	I	3.3	6.8	9.88
	II	17	35	31.27
IGFBP-3	I	4.6	9.5	5.41
	II	24	50	23.23
IGFBP-4	I	9.7	20	11.13
	II	42	87	58.79
IGFBP5	I	14	28	26.43
	II	77	160	236.02
IGFBP-6	I	2.1	4.3	3.14
	II	8.6	18	12.15
IGFBP-7	I	1.2	2.4	1.55
	II	4.8	9.9	7.86

**T3. Sensibilidad del ensayo para cada IGFBP**

Analito	Sensibilidad (ng/mL)
IGFBP-1	0.01
IGFBP-2	1.09
IGFBP-3	0.15
IGFBP-4	0.96
IGFBP-5	9.87
IGFBP-6	0.12
IGFBP-7	0.07