



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMNO
SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA

TESIS

**“DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ECA, TGF-
B1 Y NIVEL SÉRICO DE TGF-B1 EN PACIENTES CON HEPATOPATÍA
CRÓNICA DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMNO”**

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA:
GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA

Presenta

Francisco José López Rodríguez

Director de Tesis:

MC Yolanda Alicia Castillo de León

Guadalajara, Jalisco; Febrero del 2019.



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.

ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Responsable del proyecto

Tesista: Francisco José López Rodríguez ¹

Director de tesis

MC Yolanda Alicia Castillo de León ¹

Asesora metodológica:

DC María del Carmen Rocío Macías Rosales ¹

Asesores asociados:

DC Caridad Aurea Leal Cortés ²

DC Ana Rebeca Jaloma Cruz ³

ME Francisco Abdías Calderón García ⁴

Adscripción:

1.-Servicio de Gastroenterología y Nutrición, Unidad Medica de Alta Especialidad (UMAE), Hospital de Pediatría, Centro Medico Nacional de Occidente (CMNO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

2.-División de Investigación Quirúrgica, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

3.-División de genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

4.-Servicio de Patología, Unidad Medica de Alta Especialidad (UMAE), Hospital de Especialidades, Centro Medico Nacional de Occidente (CMNO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

IDENTIFICACIÓN DE AUTORES:

Tesista: Dr. Francisco José López Rodríguez

Residente de segundo año de la especialidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica .

Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional de Occidente. Guadalajara Jalisco, México.

Teléfono: 3111848454

Correo electrónico: pachicol@hotmail.com

Director de tesis: Dra. Yolanda Alicia Castillo de León.

Médico Adscrito al servicio de Gastroenterología Pediátrica de la UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, Guadalajara Jalisco, México.

Profesor titular del curso de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica de la UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente,

Teléfono: 3318011377.

Correo electrónico: yolicastdeleon@hotmail.com

Asesor metodológico: Dra. María del Carmen Rocío Macías Rosales.

Médico adscrito al servicio de Gastroenterología Pediátrica de la UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, Guadalajara Jalisco, México. Profesor adjunto del curso de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica de la UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente,

Teléfono: 3331158941. Correo electrónico: rociomaciasr@hotmail.com

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO:

Área de Hospitalización y consulta externa del servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente Guadalajara Jalisco, México.

INDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	7
Marco Teórico.....	8
Antecedentes	38
Planteamiento del problema	41
Magnitud	41
Trascendencia	42
Factibilidad	42
Vulnerabilidad	42
Pregunta de Investigación	44
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
Tipo de diseño	45
Población de estudio	45
Muestreo	45
Criterios de inclusión	45
Criterios de exclusión.....	46
Grupo de Referencia	46
Definición de variables	47
Operacionalización de variables	48
Procedimiento del estudio	53

Análisis estadístico	58
Aspectos éticos	59
Recursos e infraestructuras	61
Resultados	64
Discusión	87
Conclusiones	95
Implicaciones	98
Bibliografía	99
Anexos	105
Cronograma de actividades	115
Hoja de recolección de datos	116
Hoja de registro	117

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas	Página
Principales etiologías de hepatopatía crónica pediátrica	8
Características generales del paciente pediátrico con hepatopatía	12
Clasificación CHILD-PUGH y su implicación pronostica	13
Sistemas implicados en la fibrogénesis hepática	15
Índice de Metavir	34
Antecedentes de estudios realizados	40
Operacionalización de variables	48
Tabla Procedimiento del estudio	57

Figuras	Página
Cirrosis hepática, serie de etapas progresivas	13
Mecanismos clásicos de la fibrosis hepática	14
Interacciones celulares en el desarrollo de la fibrosis hepática	17
Contribuciones de células en la fibrogénesis hepática	17
Perdida de la arquitectura en la fibrosis hepática	18
Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona en la hepatopatía crónica	21
Señalización de TGF-B1	26

ABREVIACIONES

TGF	Factor de Crecimiento Transformante
TGF-B1	Factor de Crecimiento Transformante Beta1
CEH	Célula Estrellada Hepática
CEH-a	Célula Hepática Estrellada activa
MEC	Matriz Extracelular
PDGF	Factor de Crecimiento Plaquetario
TNF-a	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IGF-1	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
ET-1	Endotelina 1
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
MMP	Metaloproteinasas
TIMP	Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ARA	Antagonista del Receptor de la Angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
ATR1	Receptor de la Angiotensina II tipo 1
PAL	Péptido Asociado a Latencia
PSN	Polimorfismo de un Solo Nucleótido
I/D	Inserción/Delección

RESUMEN

“DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ECA, TGF-B1 Y NIVEL SÉRICO DE TGF-B1 EN PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMNO”

Marco teórico: La enfermedad hepática crónica es una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de Salud, la hepatopatía crónica es una enfermedad asociada a falla hepática que se caracteriza por un proceso difuso de fibrosis y conversión de la arquitectura normal del hígado como consecuencia de un gran número de padecimientos inflamatorios crónicos. El riesgo de la progresión de la fibrosis y cirrosis hepática varía de un individuo a otro, lo que implica que hay factores genéticos personales que codifican algunas proteínas claves en su desarrollo. Los elementos del sistema renina-angiotensina-aldosterona están asociados con varios mecanismos patogénicos en la enfermedad hepática y la TGF-B1 se ha considerado como la citocina maestra más potente que promueve la fibrosis hepática.

Los polimorfismos de delección/inserción del gen de la ECA y de un solo nucleótido del gen TGFB1 aumentan la expresión sérica de la ECA y TGF-B1 en suero, interviniendo así en la fibrogénesis hepática. Por lo tanto un perfil genómico podría predecir el riesgo de progresión de la enfermedad hepática crónica, y puede brindar una oportunidad para una terapia eficaz, siendo el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la vía TGF-B1 y los polimorfismos implicados en ellas, objetivos blanco terapéuticos atractivos en el hígado.

Justificación: En el servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente, la hepatopatía crónica es una de las principales causas de atención. Las diversas complicaciones asociadas disminuyen la calidad de vida de los pacientes e incrementan la morbimortalidad. Ralentizar la fibrogénesis hepática es un objetivo actual de las investigaciones asociadas a este tema, con el objetivo de lograr la reversión de la enfermedad, disminuir las complicaciones asociadas o bien incluir una terapia puente que sea fácil y accesible al trasplante hepático. Actualmente la maniobra terapéutica más eficaz para evitar el desarrollo de la fibrogénesis hepática continúa siendo la eliminación del agente causal, sin embargo en la mayoría de las etiologías de hepatopatía crónica en niños esto no es posible y hasta la fecha no se conoce una terapia antifibrogénica eficaz. El estudio de las variaciones genéticas en vías implicadas en la fibrogénesis hepática puede aportar información novedosa, abriendo puerta a nuevos blancos terapéuticos con terapias antifibrogénicas en la hepatopatía crónica.

Pregunta de investigación: ¿Cuál es la distribución de los polimorfismos del gen de la ECA I/D y TGF-B1 codón p10 y p25 y nivel sérico de TGF-B1 en pacientes con hepatopatía crónica del Hospital de Pediatría del CMNO?

Objetivo general: Determinar la distribución de los polimorfismos del gen de la ECA I/D y TGFB1 variantes p10 y p25 y nivel sérico de TGF-B1 en pacientes con hepatopatía crónica.

Objetivos específicos:

- 1.-Determinar la distribución de los polimorfismos de los genes ECA y TGFB1: ECA I/D, TGF-B1 codón p10 y codón p25 en pacientes con y sin hepatopatía crónica.
- 2.-Determinar los niveles séricos de TGF-B1 en pacientes con y sin hepatopatía crónica.
- 3.-Describir las características nutricionales, clínicas, de laboratorio y gabinete de los pacientes con hepatopatía crónica.
- 4.-Identificar la correlación entre la distribución de los polimorfismos de los genes ECA y TGF-B1: ECA I/D, TGF-B1 codón p10 y codón p25, con el grado de fibrosis hepática evaluado por biopsia con el índice de METAVIR.
- 5.-Identificar la correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y el grado de fibrosis hepática evaluado por biopsia con el índice de METAVIR.

Material y métodos: Estudio transversal comparativo. La Población de estudio fueron los Pacientes de 1 mes a 15 años, 11 meses de edad con diagnóstico de hepatopatía crónica atendidos en el servicio de Gastroenterología y Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente. No se realizó cálculo del tamaño de la muestra. El tipo de muestreo fue no probabilístico, por conveniencia. Se invitó a participar a los pacientes de la población de estudio que fueron atendidos en el servicio de Gastroenterología y Nutrición pediátrica en el lapso de tiempo ocurrido entre el mes de Noviembre a Diciembre 2018. Para el grupo de referencia se invitó a participar a pacientes pediátricos de la consulta externa del servicio de Gastroenterología del hospital de pediatría del CMNO con antecedente de estreñimiento crónico funcional.

Criterios: De inclusión fueron pacientes de 1 mes a 15 años 11 meses de edad, de cualquier sexo con diagnóstico de hepatopatía crónica del Hospital de pediatría del CMNO, de origen étnico mexicano-mestizo, que contaran con biopsia hepática y cuyos padres estuvieron de acuerdo con la participación bajo consentimiento informado. De exclusión: Pacientes con muestra sanguínea insuficiente para la determinación de exámenes de laboratorio y polimorfismos, pacientes que hayan recibido trasplante hepático, pacientes que hayan recibido transfusión sanguínea en las últimas 4 semanas, pacientes que presentaron elevación en los niveles séricos de urea, creatinina y/o evidencia de proteinuria en el examen general de orina.

Criterios del grupo de referencia: De Inclusión fueron pacientes pediátricos con diagnóstico de estreñimiento crónico funcional con un estado nutricio adecuado para la edad y cuyos padres estuvieron de acuerdo con la participación bajo consentimiento informado. De exclusión: pacientes que contaran con comorbilidades agregadas.

Variables: Variable dependiente: Polimorfismo del gen del TGF-B1 codón p10, polimorfismo del gen del TGFB1 codón p25, polimorfismo del gen de la ECA I/D y Nivel sérico de TGF-B1. Variable independiente: Hepatopatía crónica. Otras variables: Demográficas son sexo, patología de base, edad al momento del diagnóstico, edad actual y tiempo de evolución en meses de la toma de la biopsia al momento del estudio. Clínicas: Peso, talla, circunferencia media de brazo, estado nutricional, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia, ascitis y encefalopatía. Laboratorio: Bilirrubinas totales, albumina, AST, ALT, TP, INR, Urea, Creatinina, examen general de orina. Histológicas: Índice de Metavir.

Desarrollo del estudio:

- 1-Se abordó a los pacientes que acudieron a consulta externa o área hospitalaria en nuestra unidad que cumplieran los criterios de inclusión.
- 2-Se otorgó información sobre el estudio al tutor para obtener su consentimiento por escrito para poder ingresar al protocolo y en caso de corresponder asentimiento en pacientes mayores de 7 años.
- 3.- En una hoja de captura se vaciaron datos generales y variables demográficas (sexo, patología de base, edad actual, edad al diagnóstico).
- 4.- Se realizó somatometría y exploración física así como revisión del expediente clínico: se recolectaron las variables clínicas (peso, talla, circunferencia media del brazo, estado nutricional, ascitis, encefalopatía, ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia). Se recolectó el resultado de biopsia hepática para identificar las variables histológicas: índice de METAVIR.
- 5.-Identificación de criterios de exclusión: eliminación de los pacientes que cumplieron con algún criterio de exclusión.
- 6.-Obtención de muestras sanguíneas: se tomó 1 muestra de sangre periférica por punción venosa para realizar las siguientes determinaciones: polimorfismo del del gen de la ECA I/D, TGFB1 p25, TGF-B1 en suero, TP, INR, albúmina, bilirrubinas totales, AST, ALT, urea y creatinina séricas, así como determinación de examen general de orina.
- 7.-Se realizó un grupo de referencia con pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se les tomó 1 muestra sanguínea por punción venosa para realizar la determinación de: PNS del gen TGFB1 p25, polimorfismo de I/D del gen de la ECA y niveles séricos de TGF-B1.
- 8.-Se recolectaron resultados de análisis bioquímicos y se vaciaron a hoja de captura.
- 9.-Al contar con la información, se llevó a cabo el análisis de la información.

Análisis estadístico: La estadística descriptiva se realizó de acuerdo al tipo de variable: para variables cualitativas se utilizaron frecuencias y porcentajes; para variables cuantitativas de acuerdo a la distribución de datos, se utilizaron: medias y desviación estándar para datos con curva de distribución simétrica; y medianas y rangos para datos con curva de distribución no simétrica.

La estadística inferencial se realizó de acuerdo al tipo de variable: para variables cualitativas se utilizara chi cuadrada y correlación de Spermán y para variables cuantitativas se utilizará T student , correlación de Pearson.

Se realizó una base de datos en Excel 2013. Para el análisis estadístico la base de datos se transfirió al programa estadístico SPSS versión 23.0 para Windows. Los resultados se presentaron a través de tablas y gráficos.

Consideraciones éticas: La investigación se apegó al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, II fracción, vigente (última reforma 2014); prevaleciendo en este estudio el respeto a la dignidad y protección de los derechos y bienestar de los pacientes involucrados. Se considera que de acuerdo al artículo 17 el estudio proyectado tuvo un riesgo mínimo para los pacientes, por lo que requirió del consentimiento informado tanto para el grupo de estudio como para el grupo de referencia, asegurando el asentimiento de los pacientes mayores de 7 años. Se respetaron cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki, la enmienda de Tokio, el Informe Belmont y el Código de Reglamentos Federales de México. El protocolo fue sometido a revisión por el Comité Local de Ética e Investigación de la unidad CLIES 1302 de la UMAE HP del CMNO obteniendo el número de registro: R-2018-1302-078.

Recursos: Infraestructura: se contó en la unidad con áreas adecuadas para el procesamiento de las muestras como son el Laboratorio del Hospital de Pediatría. **Recursos humanos:** se contó con personal capacitado para el procesamiento de las muestras, laboratorista y genetista, tesista e investigadores asociados. **Materiales:** la genotipificación de los polimorfismos de los genes propuestos y la cuantificación de TGF-B1, se pagó con recursos propios y apoyo de laboratorios dentro del IMSS sin fines de lucro o apropiación de los resultados. **Experiencia del grupo:** El servicio de Gastroenterología y Nutrición pediátrica cuenta con amplia experiencia en el abordaje y tratamiento de las hepatopatías crónicas. Los investigadores asociados cuentan con experiencia en haber dirigido y asesorado múltiples trabajos de investigación, siendo las enfermedades del hígado una línea de investigación.

Tiempo de desarrollo: Noviembre 2018 a Febrero 2019.

Resultados: El grupo etario y sexo más frecuente fue escolares y femenino respectivamente. Los diagnósticos de hepatopatía crónica fueron muy diversos, predominando Atresia de vías biliares en lactantes y Hepatitis autoinmune en escolares y adolescentes. En la evaluación clínica se aplicó Child Pugh siendo más común A y B, y PELD/MELD con puntuación predominante en 6 puntos. El estado nutricional evaluado por CMB/E estuvo afectado en el grupo en el 44% de los casos. En la evaluación histológica, predominaron estadios avanzados de fibrosis/cirrosis, evaluados por índice de Metavir F3 (43%) F4 (20%), con un predominio de actividad de leve a moderada (A1 A2). En la distribución de los polimorfismos de I/D del gen de la ECA tuvo una mayor distribución la presentación I/D seguida por I/I y D/D tanto en grupo de pacientes con hepatopatía crónica como en el grupo de referencia, sin encontrarse asociación significativa entre el grupo de hepatopatía crónica y grupo de referencia, ni con

el grado de fibrosis hepática. En el análisis del PSN TGFB1 p25 no se encontró su estado polimórfico. La determinación de niveles séricos de TGF-B1 se encontraron elevados en ambos grupos de estudio, sin encontrarse correlación estadísticamente significativa con la presencia de fibrosis hepática.

Conclusiones: Nuestro estudio se suma a las investigaciones existentes las cuales han mostrado resultados inconsistentes y aun limitados, esto probablemente por diferencias en los diseños de estudio. Reconociendo que nuestro grupo de estudio es pequeño aun considerando el uso de un grupo de referencia que ha permitido ampliar una visión comparativa, concluimos que en este momento los polimorfismos I/D del gen de la ECA, los PNS del gen TGFB1 p25 y su estado de producción de citocina TGF-B1 no son útiles como parte de un perfil genómico y/o como biomarcadores de fibrogénesis hepática. Se requieren más estudios con unificación de criterios metodológicos para determinar un perfil genómico y función de la TGF-B1 en la fibrogénesis hepática.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de Salud, la hepatopatía crónica es una enfermedad asociada a falla hepática que se caracteriza por un proceso difuso de fibrosis y conversión de la arquitectura normal del hígado como consecuencia de un gran número de padecimientos inflamatorios crónicos ¹.

La enfermedad hepática crónica es una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, sus aspectos epidemiológicos se caracterizan por una diferencia marcada entre la edad, género, grupos étnicos y regiones geográficas. En los Estados Unidos se estima aproximadamente 66,000 muertes anuales por esta causa en todos los grupos de edad, con una prevalencia cambiante en aumento del 12 al 15% ².

En nuestro país se ha establecido desde hace varios años entre las primeras 10 causas de morbimortalidad en todos los grupos de edad y dentro de las primeras 20 causas en el grupo de edad pediátrico; hasta el año 2014 en México ocupa la quinta causa de muerte en general ^{1, 3, 4, 5}.

Hoy en día el proceso de la fibrogénesis hepática se considera potencialmente reversible; sin embargo hasta la fecha, no existe una terapia efectiva para la fibrosis hepática a pesar de que las hepatopatías crónicas afectan a millones de personas en todo el mundo.

El riesgo de la progresión de la fibrosis y cirrosis hepática varía de un individuo a otro, lo que implica que hay factores genéticos implicados. El estudio de los genes polimórficos implicados en la fibrogénesis hepática es de gran importancia porque esta variabilidad genómica podría utilizarse para adaptar una terapia antifibrótica dada de acuerdo con el cribado de polimorfismos.

En medio de opiniones cambiantes, se ha sugerido que el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la vía TGF-B1 y los polimorfismos implicados en ellas, son objetivos blanco terapéuticos atractivos en el hígado ^{6, 7}.

MARCO TEÓRICO

Enfermedad hepática Crónica: Fibrosis –Cirrosis

La enfermedad hepática progresiva en niños difiere a la experimentada en adultos por la característica de encontrarse en un estado de crecimiento y desarrollo, donde el estado nutricional puede verse fácilmente comprometido siendo vital para la supervivencia ⁸. La progresión a la cirrosis y las complicaciones resultantes como la hipertensión portal y la pérdida de la función hepática sintética y metabólica, determinan en última instancia la necesidad de un trasplante hepático ⁹.

En la tabla No. 1 se describen las principales etiologías de hepatopatía crónica a nivel mundial y local en el Hospital de Pediatría del CMNO.

Principales Etiologías de Hepatopatía Crónica en Pediatría			
Reportes Internacionales (2014)		CMNO (2013-2018)	
Atresia de vía biliar	32%	Atresia de vía biliar	37%
Alteraciones metabólicas/Genéticas	22%	Quiste de Colédoco	6%
Tumores hepáticos	9%	Hepatitis Autoinmune	17%
Enfermedades Autoinmunes	4%	Alteraciones metabólicas	4%
Otras / Misceláneas	13%	Alteraciones genéticas	13%
		Otras: infecciosas-tumores	2%
		Sin etiología	20%

Tabla No.1: Principales etiologías de hepatopatía crónica pediátrica a nivel mundial y local en el hospital de pediatría del CMNO. Nuestra epidemiología difiere de la reportada a nivel internacional, probablemente por el mayor número de hepatopatías sin etiología identificada ¹⁰.

Fisiopatología de la Enfermedad Hepática Crónica:

El proceso de la hepatopatía crónica es complejo y multifactorial, pero se basa en los conceptos básicos de inflamación, fibrosis y regeneración ⁸; se considera un proceso en evolución, dinámico que incluye varias etapas que van desde el inicio de la fibrogénesis al desarrollo de cirrosis hepática ¹¹.

La transición de enfermedad hepática crónica a la cirrosis implica inflamación, activación de células estrelladas con fibrogénesis, angiogénesis y lesiones vasculares. Este proceso conduce a cambios microvasculares hepáticos pronunciados, caracterizados por la remodelación sinusoidal, depósito de células estrelladas activadas proliferativas, formación de derivaciones intrahepáticas y disfunción endotelial.

La disfunción endotelial hepática se caracteriza por una liberación insuficiente de vasodilatadores, de los cuales el más importante es el óxido nítrico, asociado a un aumento concomitante de vasoconstrictores, principalmente por estimulación adrenérgica y tromboxano A₂, pero también activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

El aumento de la resistencia hepática al flujo sanguíneo portal es el principal factor que aumenta la presión portal en la cirrosis. Es el resultado de la combinación de alteraciones estructurales asociadas con enfermedad hepática avanzada y de las anomalías funcionales que conducen a la disfunción endotelial y aumento del tono vascular hepático, por otro lado la vasodilatación esplácnica con el consiguiente aumento de la entrada de sangre al sistema venoso portal contribuye a agravar el aumento de la presión portal ¹¹.

La vasodilatación esplácnica es una respuesta adaptativa a los cambios en la hemodinámica intrahepática en la cirrosis. Sus mecanismos son directamente opuestos a los del aumento del tono vascular hepático.

En la cirrosis avanzada, la vasodilatación esplácnica es tan intensa que determina una circulación sistémica y esplácnica hiperdinámica, que junto con la hipertensión portal desempeña un papel importante en la patogénesis de la ascitis y el síndrome hepatorenal. La hipertensión portopulmonar se caracteriza por una vasoconstricción pulmonar, que se cree es debida a la disfunción endotelial en la circulación pulmonar. La formación y aumento de las várices en el tracto digestivo, dependen de factores anatómicos, aumento de la presión portal y del flujo sanguíneo colateral, así como de la angiogénesis dependiente del factor de crecimiento endotelial vascular. La dilatación de los vasos de la mucosa gástrica conduce a una gastropatía hipertensiva portal ¹¹.

Características clínicas:

Los niños con hepatopatía crónica dependiendo de su estadio pueden presentar una amplia gama de características clínicas, desde pacientes que son asintomáticos y que solo presentan un crecimiento deficiente, hasta aquellos que presentan los estigmas clásicos de la hepatopatía ⁸.

La sospecha se inicia con los datos clínicos, el abordaje inicial se realiza con la combinación de pruebas bioquímicas de la función hepática irregular y estudios de imagen como ultrasonido, tomografía y/o resonancia magnética; la biopsia hepática es necesaria para confirmar el diagnóstico. Los marcadores de fibrosis no invasivos se utilizan cada vez más para la evaluación de la evolución de la enfermedad con implicación pronóstica. En la tabla 2 se mencionan las características clínicas generales del paciente pediátrico con hepatopatía crónica¹¹.

Clasificación:

La enfermedad hepática crónica se puede clasificar por el estado clínico del paciente: compensado versus descompensado; esta clasificación permite estratificar a aquellos pacientes asintomáticos o estables de aquellos que no responden a las medidas de apoyo ⁸. Se ha propuesto una subclasificación clínica; estadio 1: hepatopatía compensada sin várices esofágicas; estadio 2: hepatopatía compensada con várices esofágicas; estadio 3: hepatopatía descompensada con ascitis y; estadio 4: hepatopatía descompensada con hemorragia gastrointestinal. Esta clasificación también tiene implicaciones pronósticas con tasas de mortalidad anual que va del 1% en estadio 1 a 57% en estadio 4 (Figura No.1) ^{11, 14}.

Tratamiento:

Hasta la fecha, aparte del tratamiento causal de la enfermedad hepática subyacente per se, no existen terapias específicas que se dirijan a la fibrosis hepática.

Pronóstico:

Para los pacientes con enfermedad avanzada los puntajes pronósticos se utilizan ampliamente para predecir la supervivencia y la necesidad de trasplante hepático. El puntaje MELD-PELD se basa en las concentraciones de creatinina, bilirrubina y la razón internacional normalizada. La puntuación de Child-Pugh, diseñada inicialmente por Child y Turcotte y posteriormente modificada por Pugh, se basa en las concentraciones de bilirrubina, albúmina, INR, presencia y gravedad de ascitis y encefalopatía (tabla No. 3) ¹¹.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL PACIENTE PEDIÁTRICO CON HEPATOPATÍA CRÓNICA	
EXPLORACIÓN FÍSICA	LABORATORIO-IMAGEN- PATOLOGÍA
General - Caquexia, dismorfias, ictericia conjuntival.	Biometría hemática completa: -Anemia, leucopenia, trombocitopenia.
Tórax/ Cardiopulmonar - Ginecomastia, cianosis, incremento del patrón respiratorio, desaturación de oxígeno, ingurgitación yugular.	Pruebas de funcionamiento hepático: -Alteración de AST, ALT, disminución de albúmina, elevación variable de globulinas. -Elevación de bilirrubina conjugada en cirrosis biliar y en cirrosis descompensada. -Anormalidad variable en fosfatasa alcalina y GGT.
Abdomen - Distensión abdominal, red venosa colateral, hepatomegalia, esplenomegalia, ascitis.	Perfil de coagulación: -INR prolongado sin respuesta a la administración de vitamina K, prolongación variable de TTPa.
Genitourinario - Hernia inguinal, atrofia testicular, hidrocele, hemorroides.	Imagen: -Ultrasonido hepático o TAC/RM: textura hepática anormal con nodularidad. -Ultrasonido doppler: flujo vena portal hepatofuga y/o trombosis de la vena portal.
Musculoesquelético - Atrofia muscular, grasa subcutánea disminuida, fracturas óseas.	Hallazgos histopatológicos: -Nódulos de regeneración o fibrosis. -Cirrosis biliar: colestasis en el hepatocito y canalicular, pérdida de ductos biliares o proliferación ductular.
Piel - Ictericia, eritema, eritema palmar, palidez, telangiectasias, acropaquias, hematomas, petequias, xantomas, alopecia, calvicie.	
Sistema Nervioso Central - Disminución del estado de ánimo, cambios mentales, somnolencia, comportamientos anormales, reflejos tendinosos anormales, temblores, asterixis, neuropatía periférica.	

Tabla No. 2: Características generales del paciente pediátrico con hepatopatía crónica ⁸.

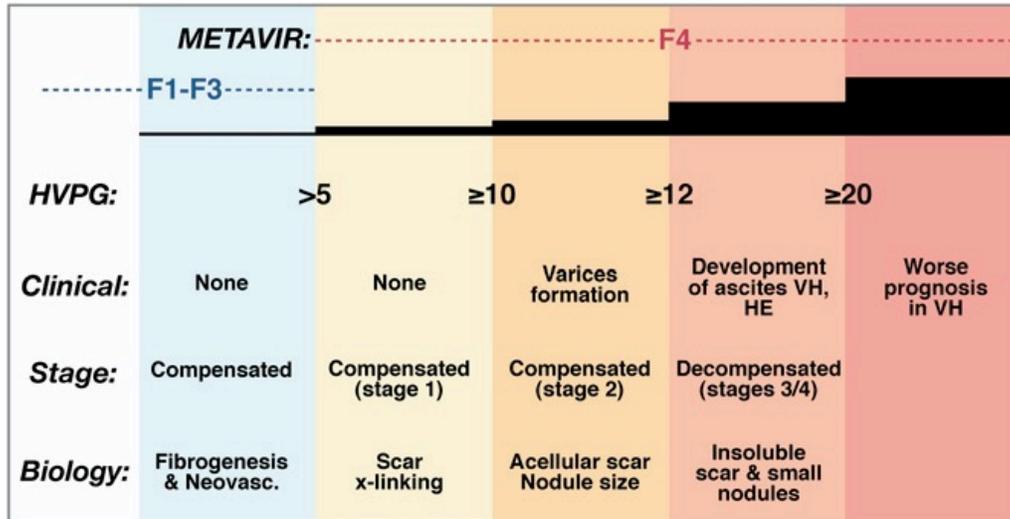


Figura No. 1: La cirrosis es una serie de etapas progresivas, no una sola etapa ¹⁴.

Grado	Puntos	Sobrevida al año (%)	Sobrevida a 2 años (%)
A: enfermedad bien compensada	5-6	100	85
B: compromiso funcional significativo	7-9	80	60
C: enfermedad descompensada	10-15	45	35

Parámetros	Puntos asignados		
	1	2	3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina, mg/dL	</= 2	2-3	>3
Albúmina, g/dL	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Tiempo de protrombina * Segundos sobre el control * INR	1-3 <1,8	4-6 1,8-2,3	>6 >2,3
Encefalopatía	No	Grado 1-2	Grado 3-4

Tabla No. 3: Clasificación CHILD-PUGH y su implicación pronóstica ¹¹.

Fisiopatología de la Fibrosis Hepática

La fibrosis hepática es un proceso dinámico, respuesta de curación de una lesión hepática que provoca una deposición excesiva de los componentes de la matriz extracelular ¹². Se caracteriza por la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular que conduce a la distorsión de la arquitectura hepática, formación de cicatrices fibrosas y el desarrollo de los nódulos de regeneración característicos que definen la cirrosis ^{13, 14}.

La fibrosis requiere algún elemento de lesión hepática, por lo tanto cualquier perturbación crónica de la homeostasis hepática puede provocar las señales necesarias para estimular la fibrogénesis ¹⁵.

Cascada Fibrogénica:

Proceso multifactorial que implica la activación de células estrelladas y células de Kupffer; migración y proliferación de las células estrelladas hepáticas activadas (CEH-a); cicatrización de la herida; y apoptosis de las células estrelladas. Los múltiples sistemas implicados se describen en la tabla 4.

La activación consta de dos fases principales, la iniciación y la perpetuación; la iniciación se refiere a los cambios tempranos en la expresión génica y del fenotipo que hacen que las células respondan a otras citocinas y estímulos. Una vez que la célula está preparada para la activación, la perpetuación resulta de los efectos de estos estímulos para el mantenimiento de un fenotipo activado y la generación de fibrosis (Figura No. 2) ¹⁵.

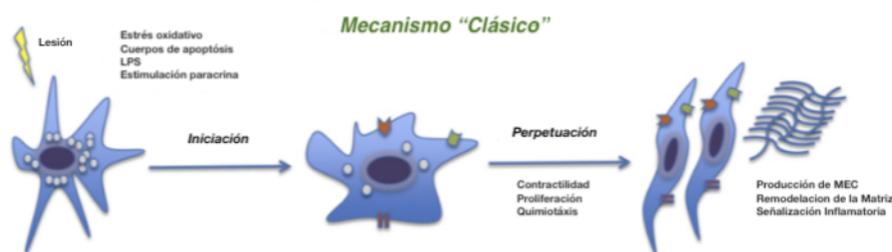


Figura No. 2: Mecanismos clásicos en la iniciación y perpetuación de la fibrosis hepática: A través del estímulo de los cuerpos de apoptosis, ROS, LPS del intestino y la estimulación paracrina, las CEH se sensibilizan a la activación a esto se le denomina iniciación. El mantenimiento de la activación de las CEH se denomina fase de perpetuación e implica la proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis y contractilidad ¹⁵.

Sistemas implicados en la Fibrogénesis Hepática	
Factores de crecimiento y Citocinas	<p>Los factores de crecimiento funcionan como vías de señalización: PDGF, TGF-B1, TNF-a, IGF-1, ET-1.</p> <p>Las CEH responden al estímulo de los factores de crecimiento pero también son una fuente de ellos.</p>
Vías de señalización Fibrogénica: TGF-B1	<p>TGF-B1 es un factor de crecimiento y también es la citocina fibrogénica más potente en el hígado que conduce a la inducción de producción de colágeno.</p> <p>Activa a las CEH de forma directa o indirecta a través de la inducción de ROS.</p> <p>TGF-B1 ejerce funciones durante el desarrollo, diferenciación y remodelación tisular.</p>
Vías de Quimiocinas	<p>Promueven la migración de células fibrogénicas al sitio de lesión, mejorando así la fibrogénesis a través del aumento del número de células e inflamación amplificada.</p>
Metaloproteinasas	<p>MMP también llamadas colagenasas, son proteinasas neutras capaces de iniciar la degradación del colágeno.</p>
ROS	<p>Las especies reactivas de oxígeno se generan a través de la peroxidación lipídica y ambas inician y perpetúan la fibrosis.</p> <p>Las ROS se pueden originar de: hepatocitos, macrófagos, CEH, colangiocitos y células inflamatorias.</p>
Interacciones inmunes	<p>Los tipos celulares del sistema inmune que regulan la progresión y resolución de la fibrosis incluyen: células de Kupffer, NK, células T, células dendríticas, macrófagos e incluso las mismas CEH y células endoteliales.</p>
Interacciones endocrinas	<p>La serotonina tiene un efecto pro-fibrótico que tiene un efecto sinérgico con la señalización de PDGF. Las hormonas tiroideas potencian la activación de las CEH acelerando el desarrollo de la fibrosis hepática.</p>

Tabla No. 4: sistemas implicados en el desarrollo de la fibrosis hepática ^{12,15,18}.

Múltiples mecanismos de señalización y varias células hepáticas están implicadas en la fisiopatología de fibrogénesis, de ellas las CEH-a se han identificado como el tipo de célula primaria responsable de la deposición del exceso de matriz extracelular en respuesta a una lesión hepática crónica ¹⁶.

Las células estrelladas hepáticas (CEH) son células perisinusoidales residentes que se encuentran en el espacio de Disse; su principal función es metabolizar la

vitamina A. Por otra parte, también producen citocinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, pero también responden a sus estímulos ¹². Normalmente se encuentran en una forma silente, sin embargo ante la lesión hepática experimentan una dramática activación fenotípica en miofibroblastos a través de diversos estímulos de citocinas y factores de crecimiento; se sabe que PDGF y TGF-B son los estímulos más potentes para la activación de las CEH con la consiguiente proliferación y fibrogénesis, reconociéndose que el TGF-B es la citocina fibrogénica clásica ¹⁷.

La patogénesis formal de la fibrosis se inicia por la apoptosis de los hepatocitos causada por la lesión, éste provoca un estímulo importante que activa a las CEH; al iniciar la apoptosis se liberan contenidos celulares de ADN, patrones moleculares asociados al daño (DAMP) y especies reactivas de oxígeno (ROS), activando así a los macrófagos residentes como las células de Kupffer (CK) las cuales liberan factores pro-inflamatorios como TNF-a, IL-1b, IL-6, y factores pro-fibrogénicos especialmente TGF-B1, provocando la activación de las CEH. Las CEH-a migran a sitios dañados, gracias a los quimioatrayentes como el PDGF y el mismo TGF-B1, donde proliferan y secretan matriz extracelular en respuesta al daño hepático crónico; Las CEH-a se estimulan continuamente para expresar y secretar proteínas de la matriz extracelular como colágeno tipo I, III y IV, elastina, laminina, glicoproteínas, proteoglicanos y ácido hialurónico que alteran la composición de la matriz, conduciendo al desarrollo de la fibrosis ¹⁶.

Las Células de Kupffer también juegan un papel importante en la cascada fibrogénica, son macrófagos altamente móviles que están unidos al endotelio. Fisiológicamente producen una citocina inmunosupresora, la interleucina 10 (IL-10). Al igual que las CEH, también se activan por la apoptosis de los hepatocitos; una vez activadas inducen la expresión de TGF-B1, que a su vez promueve la activación y proliferación de las CEH y/o quimiotaxis tanto de células inflamatorias como de las mismas CEH. En estas condiciones, se incrementan los niveles circulantes de citocinas y quimiocinas, como factor de

necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6, IL-1, IL-8, factor estimulante de colonias, proteína quimotáctica de monocitos y leucotrienos; estos mediadores tienen un papel clave en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el sitio de lesión y ejercen un importante efecto regulador sobre la activación de CEH y expresión de los genes de colágeno (Figura No.3) ¹².

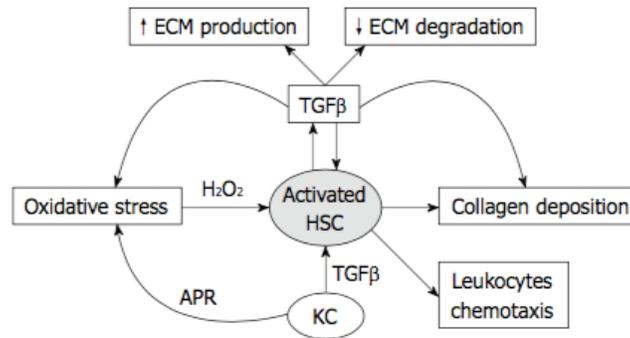


Figura No 3: Diagrama de interacciones de las CEH y CK en el desarrollo de la fibrosis hepática ¹².

Actualmente se reconoce que las células fibrogénicas no solo derivan de las CEH, sino también de fibroblastos portales, fibroblastos circulantes, células componentes de la médula ósea, células de la transición epitelio-mesénquima y colangiocitos (Figura No. 4) ¹⁴.

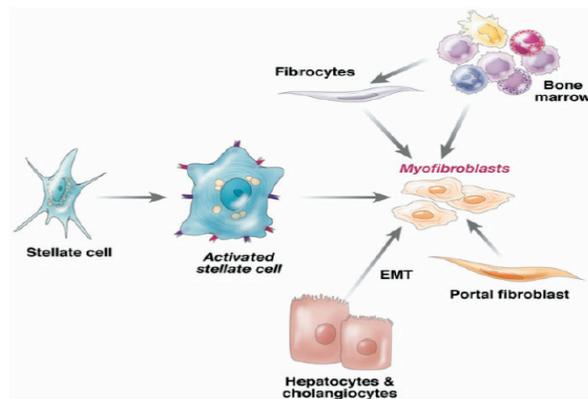


Figura No. 4: Contribuciones de las células estrelladas hepáticas activadas y otros tipos celulares en el desarrollo de la fibrosis hepática ¹⁴.

La Matriz Extracelular consiste en colágenos, glucoproteínas y proteoglicanos, principalmente colágeno tipo IV, proteoglicanos de heparán sulfato y laminina (constituyentes clásicos de una lámina basal); misma que cambia a uno rico en

colágenos formadores de fibrillas, particularmente tipos I y III así como de fibronectina (Figura No. 5)¹⁴. Estas modificaciones en la composición y contenido de matriz extracelular no solo tienen consecuencias mecánicas y físicas, sino que también contribuyen a la modulación de funciones celulares tales como crecimiento, migración y expresión génica como la del gen TGF-B1¹⁶.

Cambios vasculares en la fibrosis hepática: Los cambios vasculares clave en la fibrosis hepática comprenden capilarización de los sinusoides, pérdida de la permeabilidad vascular secundaria a la trombosis de pequeñas vénulas hepáticas y portales, así como la formación de derivaciones arterio-portales y porto-venosas.

El proceso inicial es la capilarización de los sinusoides; la deposición del exceso de proteínas de la MEC crea una especie de membrana basal para los sinusoides, perdiendo las características de sus fenestraciones endoteliales normales, esto da como resultado la formación de canales vasculares que se extienden a lo largo de los puentes septales fibrosos entre los conductos porta y las venas centrales. La sangre se deriva a lo largo de estos canales vasculares, lo que conduce a una distribución desigual del suministro de sangre del parénquima hepático.

Mientras que las derivaciones iniciales consisten en sinusoides capilares, en el curso de la enfermedad se produce neo-angiogénesis, dando como resultado nuevos vasos de derivación que conectan la vena porta y la vena hepática terminal (Figura No. 5)¹⁷.

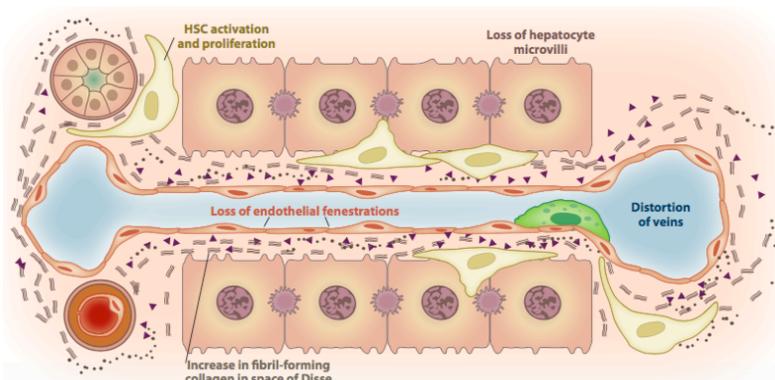


Figura No. 5: Pérdida de la arquitectura y microvellosidades del hepatocito, fenestraciones endoteliales, incremento de las fibrillas formadoras de colágeno en el espacio de Disse y distorsión de la vasculatura hepática, en la fibrosis hepática

32

La cirrosis, la etapa más avanzada de la fibrosis, connota no solo la fibrosis, sino también la distorsión del parénquima hepático con septos, formación de nódulos de regeneración, alteración del flujo sanguíneo con formación de cortocircuitos intrahepáticos que generan aumento de la presión portal ¹⁴. En resumen el proceso de remodelado del tejido hepático es muy complejo, resultado del equilibrio entre la degradación y síntesis de colágeno.

Reversibilidad de la fibrosis hepática:

Las CEH son las principales células responsables de la producción de MEC en el hígado; como ya se mencionó, en su forma activa expresan y secretan moléculas de matriz, citocinas, quimiocinas, pero también secretan metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus respectivos inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP). Las MMP degradan los colágenos intersticiales y de la membrana basal; por lo tanto el estímulo fibrogénico es un proceso que puede ser completamente reversible. Las CEH participan activamente tanto en la fibrogénesis como en la resolución de la fibrosis ¹².

La evidencia de que la fibrosis e incluso la cirrosis son reversibles han intensificado el interés en comprender la regulación de la degradación de la matriz y la resolución de la fibrosis con la esperanza de que las terapias exploten vías endógenas que reviertan la enfermedad ¹³. Los tratamientos disponibles están diseñados para sustituir el trasplante hepático o bien utilizarlos como terapia puente. Los miofibroblastos activados son el objetivo principal de la terapia antifibrótica, entre ellos se incluyen inhibidores de citocinas fibrogénicas como TGF- β , inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) y bloqueadores de la señalización del receptor Toll-Like 4 (TLR4) ²⁰.

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y Hepatopatía crónica

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) se conoce clásicamente como un sistema hormonal que se encarga principalmente del control de la presión arterial y el equilibrio hidroelectrolítico, al regular funciones cardiovasculares, renales y suprarrenales ¹².

La renina es la primera enzima del sistema SRAA clásico, se produce en las células yuxtaglomerulares, escinde el sustrato angiotensinógeno para formar el decapeptido angiotensina I, que se convierte en los capilares pulmonares por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el principal componente fisiológico activo del sistema, la angiotensina II (Ang II) ¹³. Se han identificado dos receptores para llevar a cabo las acciones biológicas de la angiotensina II, el receptor de la angiotensina II tipo 1 (ATR1) y el tipo 2 (ATR2) que tienen objetivos opuestos que contrarrestan las acciones fisiológicas de cada uno; sin embargo las principales acciones fisiológicas de la angiotensina II están mediadas por el ATR1, cuyo efecto media una serie de acciones diversas que incluyen vasoconstricción, homeostasia del sodio, inflamación, cicatrización de heridas mediante la liberación de citocinas y producción de matriz extracelular en el tejido hepático ¹⁸.

Ang II es un péptido que contiene ocho aminoácidos; tiene un grupo amino libre en un extremo (extremo N) y un grupo carboxilo libre en el otro (extremo C). Hoy en día se sabe que los efectos de Ang II son mucho más amplios y diversos que lo descrito en el concepto original, sino también tiene un papel en la inflamación, producción de citocinas, proliferación celular y activación de las CEH para desencadenar la fibrogenesis ^{13, 21}.

En los últimos años se ha descrito una vía “alterna” del SRAA que comprende, el homólogo estructural ECA-2, Angiotensina-(1-7) y el receptor Mas (MasR), los cuales tienen efectos que contrarrestan aquellos mediados por la vía clásica ¹³. La ECA-2 puede generar Ang-(1-7) de forma directa a través de la escisión de la Ang II; o bien de forma indirecta escindiendo Ang -1 en el fragmento intermedio inactivo Ang- (1-9) que luego es escindido por la ECA para producir Ang-(1-7) ²¹. La angiotensina-(1-7) es el ligando endógeno para el MasR; muchos de sus efectos contrapesan los de angiotensina II y el receptor ATR1 e incluyen vasodilatación, mejoría de la función endotelial, inhibición de la proliferación celular, efectos antiarrítmicos y efectos antitrombóticos (Figura No. 6) ^{13, 22}. A partir del conocimiento de esta vía clásica, el SRAA se puede concebir como un

sistema de doble función, en el que las acciones vasoconstrictoras / proliferativas o vasodilatadoras / antiproliferativas son impulsadas principalmente por el equilibrio ECA/ECA-2 ¹².

En presencia de inhibición de la ECA y después de la administración crónica de bloqueadores del AT1, los niveles de Ang-(1-7) se elevan varias veces, lo que sugiere que este heptapéptido contribuye a las acciones de los bloqueadores del SRAA.

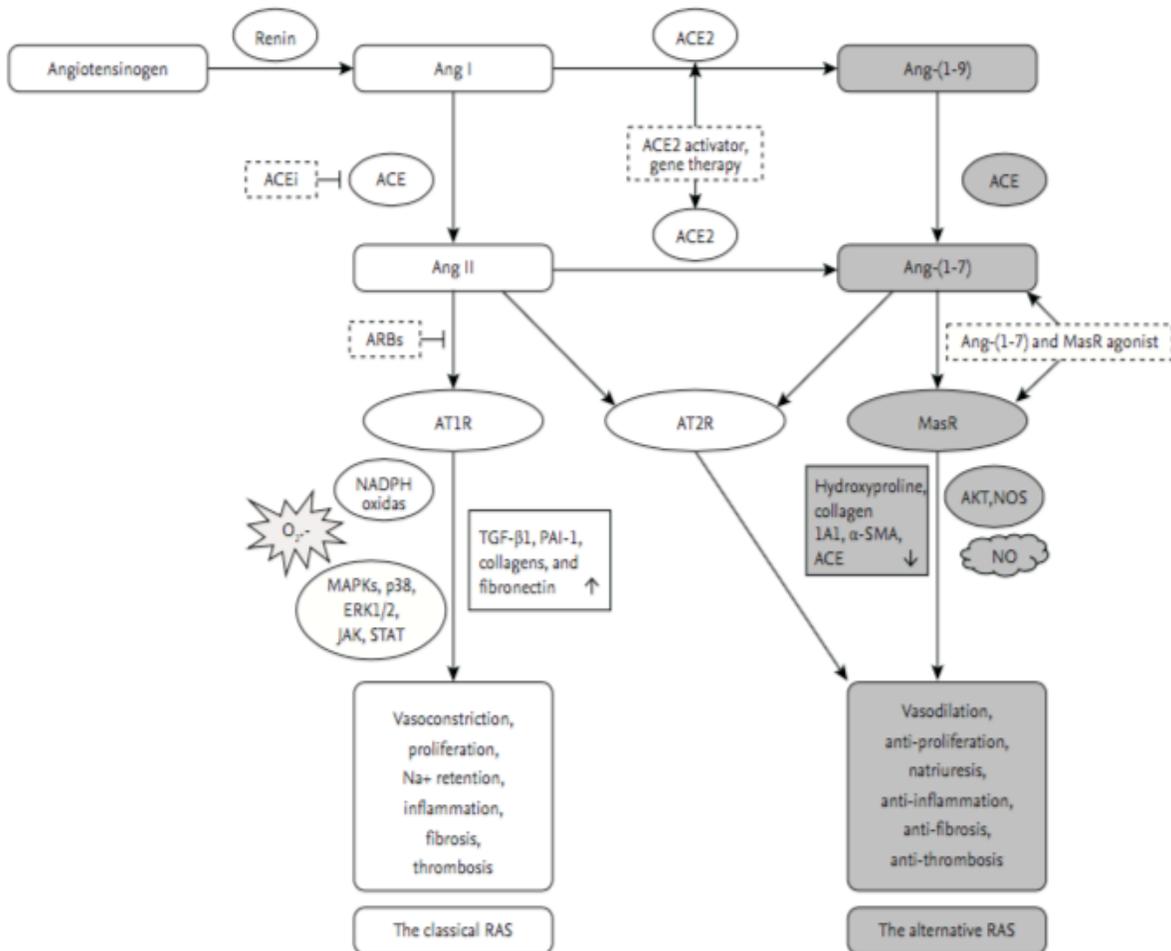


Figura No. 6: Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona en la hepatopatía crónica ⁵⁴.

El papel del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona en la fibrogénesis hepática:

Además del SRAA sistémico, en muchos tejidos existe expresión local de muchos de los componentes de este sistema. Por lo tanto existen SRAA locales

que son sistemas autónomos en órganos individuales, regulados por estímulos dentro del mismo órgano, que desempeñan un papel en la respuesta local a la enfermedad o lesión, uno de ellos es el hígado ¹³.

Cuando hay una lesión hepática hay una regulación a la alza y/o una redistribución de los componentes del SRAA que incluyen angiotensinógeno, renina, ECA, Ang II y ATR1 ^{6, 23}. La vía alterna también está regulada por el progreso de la hepatopatía crónica; los niveles sistémicos de Ang-(1-7) se elevan desde los primeros estadios de la enfermedad y aumentan a medida que progresa la fibrosis hepática ¹³.

El SRAA está asociado con varios mecanismos patogénicos en la enfermedad hepática, en particular la Ang II; el péptido efector principal del SRAA, actúa como un mediador proinflamatorio, protrombótico y profibrótico. Causa un aumento de la presión portal debido a la micro-oclusión vasoespástica. En la fibrogénesis hepática, las CEH expresan altamente ATR1 para la Ang II, la unión de estos dos es uno de los mecanismos de activación, migración y proliferación de las CEH. Las CEH-a en miofibroblastos estimula TGF-B1, lo que lleva a la síntesis de las proteínas de la MEC, e induce efectos proinflamatorios en las CEH estimulando la expresión de moléculas de adhesión celular y secreción de quimiocinas inflamatorias. Varios estudios han demostrado que Ang II estimula la secreción de TGF-B1 a través del AT1R. Localmente los componentes del SRAA se han implicado en la modulación del crecimiento y la proliferación celular, generación de ROS, apoptosis y secreción hormonal en procesos inflamatorios y proliferativos en respuesta a estímulos fisiológicos ^{6, 13, 23, 24, 25, 26}.

Las CEH-a adquieren la capacidad de sintetizar Ang II, lo que sugiere que pueden actuar de forma autocrina/paracrina, estableciendo un ciclo que va desde la activación de las CEH por la unión de la Ang II a ATR1, nueva síntesis de Ang II y activación de otras CEH. El efecto fibrogénico de Ang II también puede estar mediado por las células de Kupffer, células fagocíticas especializadas localizadas en el hígado que también contienen ATR1 ²⁷.

La vía alterna del sistema RAS también se activa en la lesión hepática; esta vía tiene una función protectora que inhibe el desarrollo de fibrosis hepática ¹³. Existe una creciente evidencia de que tanto el sistema RAA clásico como alterno están regulados positivamente en la hepatopatía crónica. El eje alterno puede considerarse como una vía compensatoria durante la lesión hepática, con efectos opuestos a la vía clásica del SRAA ²⁷. A medida que progresa la fibrosis hepática, la expresión de ECA-2 y los niveles plasmáticos de Ang-(1-7) aumentan. Ambos ejes: clásico y alterno parecen activarse simultáneamente en pacientes con hepatopatía crónica, sugiriendo que la activación del eje alterno contrarregulador es un mecanismo compensatorio de los efectos nocivos de las acciones mediadas por el ATR1 ^{21, 26}.

Existe evidencia de modelos experimentales en animales que la angiotensina-(1-7) disminuye los niveles de TGF-B1, hidroxiprolina, factor de crecimiento del tejido conectivo y endotelial, disminución de la expresión del gen de la actina del músculo liso y del gen de la ECA; todos ellos implicados en la fibrogénesis hepática ²⁶.

El SRAA también se encuentra implicado en el desarrollo de complicaciones de la cirrosis hepática como la hipertensión portal y el síndrome hepatorenal. Se activa como mecanismo compensatorio del aumento de la resistencia portal y la vasodilatación mesentérica, intentando restaurar el volumen sanguíneo funcional, dando como resultado el empeoramiento de la disfunción circulatoria, desarrollo de una circulación hiperdinámica, y disminución del flujo sanguíneo renal causando afectación en la filtración glomerular ^{12, 21, 25, 28}.

Factor de Crecimiento Transformante B:

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-B) es una citocina multifuncional que desempeña un papel significativo en varios procesos biológicos como la replicación celular, diferenciación, migración, apoptosis,

cicatrización, formación ósea, angiogénesis y la regulación del sistema inmunitario. Pertenece a una superfamilia de TGF que contiene más de 30 tipos de citocinas incluyendo activinas, inhibinas, proteína morfogénica ósea, factor de diferenciación del crecimiento, entre otros ²⁹.

El TGF-B son citocinas pleiotrópicas que regulan la proliferación celular, la migración y la diferenciación durante el desarrollo embrionario y tienen un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis tisular ³⁰. Prácticamente todas las células del cuerpo, incluidas las células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas, neuronales y células del tejido conectivo, producen TGF-B ³¹. Existen tres isoformas principales: TGF-B1, TGF-B2 y TGF-B3, son citocinas multifuncionales con implicaciones que van desde el desarrollo embrionario y la fisiología de órganos hasta la fisiopatología de las principales enfermedades, incluyendo la fibrosis de órganos ³⁰. El TGF-B1 es producido principalmente por monocitos y macrófagos y es la isoforma principal implicada en la fibrosis hepática ³².

Síntesis, activación y señalización de TGF-B1:

El TGF-B1 es producido como un precursor dimérico, secretado en forma latente que se almacena en la MEC. Se han identificado muchas moléculas como activadores de TGF-B cuya mutación conducirá a la activación aberrante de TGF-B y finalmente a fenotipos patológicos. Teniendo en cuenta la estrecha relación de TGF-B y la homeostasis de la MEC, el TGF-B es un sensor molecular que responde a las perturbaciones en la MEC a través de la liberación de un ligando activo ^{30, 33}.

TGF-B1 se sintetiza como un péptido precursor de 390 aminoácidos que comprende un péptido señal N-terminal, un péptido asociado a latencia (PAL) y una citocina activa C-terminal que corresponde al TGF-B1 maduro. En el retículo endoplásmico rugoso durante la traducción, el péptido señal N-terminal se elimina, y el PAL se dimeriza mediante enlaces disulfuro con el TGF-B1 maduro,

formando el homodímero proTGF-B1. En el aparato de Golgi el PAL y el TGF-B1 maduro son cortados por acción de la enzima furina, pero permanecen asociados por enlaces no covalentes, mismos que bloquean el sitio de unión del TGF-B1 maduro a su receptor, formándose pequeños complejos latentes conformados por la unión no covalente de PAL y TGF-B1 maduro. Posteriormente los pequeños complejos latentes se unen covalentemente a una proteína de unión de TGF-B (LTBP) conformando el “gran complejo latente”, el cual se secreta a la MEC en forma de reservorio, manteniéndose así hasta su activación por diversas moléculas^{30, 34}.

En general la activación de TGF-B requiere la liberación del complejo latente a través de proteólisis o deformación de LAP para liberar el TGF-B activo. Hasta ahora se ha informado una variedad de activadores del TGF-B. La mayoría de estos activadores también son indicadores de perturbaciones en la MEC. Como TGF-B1 tiene efectos profundos sobre la homeostasis de la matriz se ha reconocido generalmente no solo como un efector celular, sino también como un sensor potencial de perturbaciones ambientales. La acumulación de evidencia ha demostrado que el TGF-B1 puede activarse mediante plasmina, metaloproteinasas de la matriz (MMP), trombospondina-1, disminución del pH y especies reactivas de oxígeno (ROS)^{30, 34}.

Las metaloproteinasas de plasmina (MMP) activan el TGF-B1 maduro a través de la proteólisis del enlace covalente con PAL. La trombospondina-1 (TPS-1) es una glicoproteína multifuncional compleja que media las interacciones celulares y la MEC durante múltiples eventos en la fibrosis. TPS1 es esencial para la activación local de TGF-B durante la lesión y puede afectar el proceso de curación de la herida. Recientemente se ha observado que las integrinas, receptores de superficie celular diméricos juegan un papel central en la activación del TGF-B1. Las ROS puede estimular la expresión y secreción de TGF-B en un ciclo de retroalimentación positiva en muchos tipos de células, incluidas las CEH y los hepatocitos. Actualmente se cree que la oxidación

específica del sitio de PAL provoca un cambio en el complejo latente que libera el TGF-B a un estado activo. Las ROS también pueden activar indirectamente el TGF-B a través de la activación de MMP. La activación de TGF-B en respuesta al estrés oxidativo puede reflejar la necesidad del cuerpo humano de producir TGF-B para mantener la homeostasis tisular después de una perturbación como la inflamación. De hecho se ha propuesto que el complejo PAL/TGF-B1 funciona como un sensor de estrés oxidativo ³⁰.

TGF-B1 puede señalizar solo mediante su receptor y ejercer sus efectos biológicos una vez que el complejo se activó. Los ligandos TGF-B activos señalizan al unirse a sus receptores tipo I y II (TGF-BRI y TGF-BRII). Se han identificado siete receptores tipo I y cinco receptores tipo II.

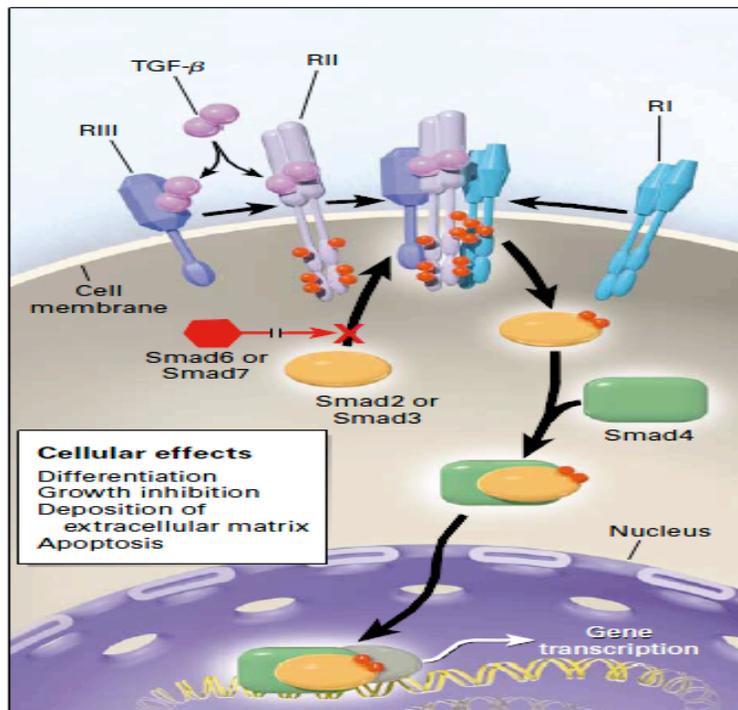


Figura No. 7: Señalización de TGF-B1 por sus receptores y transducción por proteínas Smad ³¹.

Las proteínas Smad han sido identificadas como las principales transductoras de la señalización del TGF-B, median la señalización del receptor en la superficie celular a los genes blancos en el núcleo. Existen ocho proteínas Smad en vertebrados (Smad1-8) en las que se han descrito distintas funcionalidades ³³. Una vez activado, las señales de TGF-β1 a través de sus receptores afines a las

proteínas Smad, se realiza la transcripción de los genes diana, incluidos el procolágeno I y el procolágeno III. La señalización de TGF- β 1 se inicia al unirse al receptor de tipo II (Figura No. 7) ³².

Papel de TGF-B en la fibrosis hepática:

TGF-B induce algunos componentes de la MEC, teniendo así un papel esencial durante la curación de heridas y la reparación tisular, sin embargo la sobreproducción de ella puede provocar una deposición excesiva de tejido cicatricial y causar fibrosis ³¹.

Múltiples estudios sugieren que el TGF-B está involucrado en muchos tipos de enfermedad hepática crónica. En la patogénesis de la fibrosis hepática, se cree que el TGF-B1 es la citocina maestra más potente que promueve la fibrosis hepática estimulando la síntesis y la inhibición de la degradación de un amplio espectro de la matriz extracelular a través de la activación de las CEH; actúa localmente como un regulador de la proliferación, diferenciación y muerte celular, por lo tanto los mecanismos que aumentan la fracción de TGF-B están potencialmente implicados en la modulación de la progresión de la fibrosis hepática ^{35, 36, 37, 38}.

En las muestras de biopsia hepática, la cantidad de ARNm de TGF- β 1 se correlaciona positivamente con la del ARNm de colágeno tipo I; las concentraciones de ARNm de TGF- β 1 en el hígado se correlacionan positivamente con las concentraciones séricas de fragmentos de péptido del colágeno tipo III y la actividad histológica de la enfermedad hepática. La proteína TGF- β 1 se ha detectado específicamente mediante tinción inmunohistoquímica en áreas de fibrosis ³⁰.

Interacción del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y el factor de crecimiento transformante B

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-B1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la angiotensina II son los principales agentes pro-fibróticos; se ha observado que un solo factor exhibe una actividad fibrótica

de leve a moderada ya que el proceso de la fibrogénesis es un proceso multifactorial, motivo por el que hasta la fecha las terapias antifibróticas destinadas a un solo objetivo han mostrado resultados insatisfactorios ³⁹.

Se ha demostrado que la Angiotensina II media y exagera la fibrosis hepática a través de la activación de las CEH y estimulando la secreción de TGF-B1 a través del receptor de angiotensina tipo 1. Los PSN en los genes del SRA se han reconocido en la variación interindividual de la progresión de la fibrosis.

En el proceso multifactorial de la fibrogénesis los liposacáridos bacterianos derivados del aumento de la permeabilidad intestinal y la translocación bacteriana juegan un papel importante, estos se unen a los receptores Toll-Like 4 (TLR4). Los TLR son una familia de receptores de reconocimiento transmembrana asociados a patógenos. La mayoría de las células hepáticas incluidas las CEH expresan TLR4 y responden a los LPS secretando citocinas. Además los LPS regulan negativamente el pseudo-receptor llamado BAMBI de la TGF-B1, un supresor de transmembrana de TGF-B1, promoviendo así la señalización de TGF-B1 y potenciando la fibrogénesis hepática ^{15,32}.

La TGF-B1 necesita cooperar con otros factores para inducir la fibrosis al máximo, los experimentos in vitro e in vivo han confirmado que el efecto profibrótico máximo de TGF-B1 necesita de la cooperación de Angiotensina II y LPS. Como ya se mencionó la angiotensina II juega un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática; uno de sus mecanismos pro-fibrótico es la transformación de la TGF-B1 a través de la regulación positiva del receptor Toll-Like tipo 4 (TLR4) y la regulación negativa del pseudo-receptor inhibidor de TGF-B1 BAMBI causado por LPS en las células estrelladas hepáticas ³⁹.

En estudios experimentales se ha observado el efecto sinérgico de la angiotensina II, TGF-B1 y LPS en la producción de colágeno tipo 1a. La angiotensina II, los LPS y el TGF-B1 actúan de forma sinérgica durante la fibrogénesis hepática ³⁹.

Polimorfismos asociados a la fibrogénesis hepática

Los polimorfismos genéticos son variaciones heredadas en la secuencia de ADN que ocurren en más del 1% de una población. El término polimorfismos se refiere a la presencia de diferentes genotipos/alelos de un gen en particular; puede ocurrir como un polimorfismo de un solo nucleótido (PSN), deleciones/inserciones, elementos polimórficos repetitivos y variaciones de microsatélites ³⁴.

El riesgo de la progresión de la fibrosis y cirrosis hepática varía de un individuo a otro, lo que implica que hay factores genéticos personales que codifican algunas proteínas clave en su desarrollo ⁴⁰. Se ha comprobado que los factores genéticos determinan la tasa de progresión de la fibrosis hepática. Estudios epidemiológicos han identificado posibles polimorfismos en una serie de genes candidatos que influyen en la progresión de la fibrosis hepática. Hay evidencia científica que muestra la influencia de los polimorfismos en la historia natural de la enfermedad hepática crónica y la variabilidad de la progresión de la fibrosis hepática. Aunque el riesgo atribuido a un polimorfismo individual es muy pequeño, el efecto aditivo de variantes genéticas puede explicar un mayor riesgo de enfermedad ^{35, 38, 41}.

Un perfil genómico podría predecir el riesgo de progresión de la enfermedad hepática crónica, y por lo tanto, puede brindar una oportunidad para una terapia eficaz ³⁷.

Polimorfismo del Gen de la Enzima convertidora de Angiotensina Inserción/delección en la fibrosis hepática:

Como ya previamente se describió, estudios previos han informado que SRAA juega un papel importante en la fibrosis hepática. Algunos factores del huésped son fundamentales en la progresión de la fibrosis hepática. La variabilidad en la progresión de la enfermedad está influenciada por factores genéticos. Se ha postulado que los polimorfismos funcionales de los genes del SRAA contribuyen

a la variabilidad interindividual en el resultado de varias enfermedades renales y cardiovasculares ⁴².

Se han identificado ciertos factores que afectan el desarrollo de la fibrosis hepática, sin embargo a pesar de esto, sigue siendo difícil de evaluar el riesgo de un individuo de desarrollar enfermedad fibrótica progresiva; tal incertidumbre sugiere un componente genético para la progresión de la enfermedad ⁴³. Aunque se ha demostrado que la expresión del gen ECA desempeña un papel en la fibrosis hepática en varios estudios experimentales, la mayoría de los estudios clínicos en esta área han mostrado resultados controversiales entre la asociación del polimorfismo del gen ECA y las etapas de la fibrosis en pacientes con hepatopatía crónica ⁴⁴.

Se han descrito muchos polimorfismos funcionales en el SRAA y se ha postulado que estos polimorfismos contribuyen al daño orgánico y la fibrosis en varias enfermedades ⁴². Estos polimorfismos genéticos en el SRAA explican la variación interindividual en la actividad del sistema ⁴³; por ejemplo los niveles plasmáticos de ECA permanecen constantes en un solo individuo sin embargo se ha observado que sus niveles plasmáticos difieren entre los individuos ⁴⁴.

El gen que codifica la ECA se encuentra en el cromosoma 17q35 y consta de 26 exones. El polimorfismo de delección/inserción se ubica en el intrón 16 del gen ECA y se identificaron por primera vez en 1990. Dependiendo de la presencia (inserción) o la ausencia (delección) de un dominio de ADN, la ECA existe como uno de tres genotipos diferentes: homocigotos DD – II y heterocigotos ID. La variante delección se ha asociado con niveles séricos superiores de la enzima.

En un estudio realizado con diferentes individuos sanos de la misma familia reveló que las diferencias en los niveles de la ECA entre los individuos resultan del polimorfismo I/D del gen ECA.

En estudios se ha encontrado que los niveles séricos de la ECA se encuentran aumentados aproximadamente dos veces en personas con el alelo DD del gen de la ECA ^{43, 44}.

En un estudio experimental animal realizado por Paizis et al, se demostró que la expresión del gen ECA se regulaba positivamente mediante la ligadura del conducto biliar en ratas.

Raslam et al encontró en pacientes adultos infectados por virus de hepatitis C mayor frecuencia de genotipo D/D, sin embargo el polimorfismo I/D de ECA no influyó en la progresión de la fibrosis hepática. Bloem et al reporta diferencias étnicas con mayor aumento de actividad de la ECA en polimorfismos I/D del gen en personas blancas, sin encontrar correlación en personas con descendencia africana ⁴².

Mackawy et al encontraron una asociación entre el genotipo DD y los niveles séricos de ECA en paciente adultos con infección crónica por el virus de la hepatitis C, sin embargo no se encontró asociación significativa entre este genotipo y la actividad necro-inflamatoria y la etapa de fibrosis ⁴³.

En la población mexicana se ha encontrado resultados controversiales en la frecuencia del polimorfismo de la ECA entre los grupos étnicos. En el grupo de los mestizos mexicanos se encontró mayor frecuencia del alelo D con genotipo D/D ⁴⁵. La mayor frecuencia de este genotipo confiere según lo reportado con la literatura mundial un mayor riesgo de fibrosis progresiva ante una lesión hepática.

Polimorfismos del Gen de la TGFB1 en la fibrosis hepática:

La creciente evidencia sugiere que las variaciones en los genes relacionados con la TGFB1 están asociados con el riesgo o progresión de la fibrosis hepática. Las variaciones naturales en el gen de la TGFB1 regulan su nivel de expresión en humanos; se ha visto que la expresión del ARNm de TGF-B y la producción de TGF-B sérica aumenta en pacientes con infección por el virus de la hepatitis C, hepatitis autoinmune y otras etiologías de fibrosis hepática ³¹.

Los antecedentes genéticos del huésped, particularmente los polimorfismos de

un solo nucleótido (PSN), han demostrado ser un factor crucial para la heterogeneidad clínica asociada ⁴⁶. La TGFB1 se encuentra codificado en el cromosoma 19q13.1, comprende 7 exones y 9 intrones produce un RNAm de 2.5 kb que codifica el péptido precursor.

Las variantes alélicas dan como resultado diferencias significativas en términos de expresión de TGF-B y su concentración plasmática; este hecho indica que pueden predisponer o proteger contra la cirrosis hepática ⁴⁰. Dos de los polimorfismos más comúnmente estudiados son los presentados en el codón 10 (c.+29T>C o P10L o p10 o rs1800470) y en el codón 25 (c.+74 G>C o R25P, p25 p rs1800471). Estas variaciones dan lugar a diferencias significativas con respecto a la expresión de TGF-B1 y su concentración plasmática por lo tanto puede predisponer el desarrollo de la cirrosis hepática ⁴⁷.

Los genotipos específicos en los codones 10 y 25 se han asociado con una progresión más rápida de la fibrosis hepática en pacientes con diversas etiologías ^{47, 48}. Se ha demostrado que un PSN en el codón 25 del gen TGFB1 que resulta en una sustitución de aminoácidos (Arg/Pro) se asocia con estadios avanzados de fibrosis en pacientes con hepatitis crónica por el VHC ³⁸.

Estudios in vitro con leucocitos humanos han mostrado diferencias en la producción de TGF-B1 en pacientes con el genotipo Arg25Arg (G/G) en comparación con individuos con el genotipo Arg25Pro (G/C). En ellos se han confirmado valores plasmáticos más elevados de TGF-B1 en sujetos con enfermedades fibróticas que son portadoras del genotipo Arg25Arg (G/G) en comparación de los genotipos G/C y C/C; Además las personas con el genotipo Arg25Arg (G/G) muestran fibrosis hepática más severa en comparación con el genotipo Arg25Pro (G/C) ³⁷. La expresión de TGF-B1 es útil para evaluar la progresión de la enfermedad fibrótica; en este contexto los marcadores de daño hepático como los polimorfismos del gen de TGFB1 serán de gran ventaja para evaluar la progresión de la enfermedad hepática y la respuesta clínica a nuevos agentes antifibrogénicos ³⁸.

Biopsia hepática

La evaluación histológica del hígado, y por lo tanto la biopsia hepática, es una piedra angular en la evaluación y el tratamiento de la enfermedad hepática y se ha considerado durante mucho tiempo como un componente integral de diagnóstico clínico. Aunque los biomarcadores pueden ser sensibles para diagnosticar la enfermedad hepática, la biopsia sigue siendo una valiosa herramienta de diagnóstico ⁴⁹.

Las características histopatológicas de la hepatitis crónica esencialmente constan de tres componentes básicos: inflamación, fibrosis o cirrosis y cambios hepatocelulares ⁵⁰.

La estadificación de la fibrosis se basa en una evaluación de varias características histológicas que incluyen la evaluación de la extensión del depósito de la matriz extracelular, la localización de los depósitos dentro del lóbulo hepático y los cambios en la arquitectura lobular que se integran en un sistema de puntuación semicuantitativo.

La estadificación refleja la evolución natural de la hepatitis crónica, predice la evolución hacia el desarrollo de cirrosis y las complicaciones hepáticas en etapa terminal; punto crucial ya que la cirrosis, el punto final de la fibrosis, es la principal causa de morbilidad y mortalidad en las enfermedades hepáticas crónicas ⁵¹.

El grupo cooperativo francés METAVIR desarrollo un algoritmo para manejar la clasificación de la fibrosis o cirrosis hepática, así como la actividad histológica definido como un sistema de estadificación ⁵⁰. El índice incluye la suma de la puntuación asignada al grado de actividad inflamatoria observada en la muestra (0-4; siendo, 0 sin actividad y 3 a 4 la actividad considerada grave), además de la proporcionada por la estadificación, que representa la cantidad de fibrosis: 0 (sin cicatrices), 1 (cicatrices mínimas), 2 (la cicatrización ha ocurrido y se extiende fuera de las áreas que contienen los vasos sanguíneos), 3 (puentes de fibrosis extendiéndose y conectándose con otras áreas que contienen fibrosis) y 4 (cirrosis). Tabla No 5. ⁵².

Si bien la biopsia hepática da la impresión más completa de la enfermedad, también tiene sus inconvenientes. Técnicamente una biopsia hepática representa alrededor de 1:50,000 de todo el hígado, dando lugar a la posibilidad de un error de muestreo a gran escala. El procedimiento es invasivo y conlleva un riesgo importante de sangrado; además en los niños la biopsia hepática generalmente requiere sedación o incluso anestesia general. Con respecto a la interpretación de las muestras de biopsia hepática, existe una considerable subjetividad y variabilidad inter-observador, especialmente en los estadios bajos y medianos de la fibrosis ¹⁷.

INDICE DE METAVIR			
FIBROSIS		ACTIVIDAD	
F0	Sin fibrosis	A0	No actividad histológica
F1	Fibrosis portal	A1	Mínima actividad
F2	Fibrosis en septos (escasos)	A2	Moderada actividad
F3	Fibrosis en septos (numerosos)	A3	Severa actividad
F4	Cirrosis		

Tabla No. 5: Índice de Metavir.

Los marcadores bioquímicos séricos y las técnicas de elastografía del hígado para medir la fibrosis hepática son otras metodologías actualmente en uso y bajo investigación como pruebas no invasivas para la inflamación y la fibrosis, sin embargo aún se prefiere la realización de la biopsia hepática para confirmar el diagnóstico clínico, estimar el pronóstico y determinar la terapia médica ^{50, 52}.

Terapia Antifibrogénica

En el pasado se consideró que la fibrosis era una enfermedad irreversible. La evidencia reciente indica que incluso la fibrosis avanzada es reversible ²³. La eficacia de las terapias actuales para la enfermedad hepática crónica es limitada

y no existen terapias efectivas actualmente disponibles para la fibrosis hepática, probablemente secundario a una falta de evidencia científica. Hasta la fecha, las terapias específicas para la enfermedad hepática se han dirigido principalmente a la etiología mediante la eliminación o la mejora del agente causante de la enfermedad hepática crónica. Los hallazgos tanto en estudios humanos como en modelos animales resaltan que la fibrosis hepática es un proceso dinámico que puede modularse al detener la progresión y/o promover la resolución; por lo tanto el esclarecimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a estos eventos es fundamental para establecer terapia antifibróticas ¹⁶.

Múltiples puntos en la cascada fibrogénica han sido objetivo de estudio para una terapia antifibrogénica, ejemplos de ellos son: la inhibición farmacológica de la cadena de PDFG, el antagonismo de la TGF-B1, bloqueo del SRAA, bloqueo de quimiocinas, bloqueo de la respuesta neuroendocrina y la reducción del estrés oxidativo como dianas terapéuticas en la fibrosis hepática ¹⁵.

Uso de los bloqueadores del sistema renina angiotensina aldosterona en la hepatopatía crónica:

Los diferentes estudios indican que el bloqueo del sistema SRAA con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o bloqueadores de los receptores de angiotensina (ARA), mejoran las aminotransferasas y el estadio fibrótico hepático, disminuye el gradiente de presión venosa hepática, disminuye la presión portal y mejora la gastropatía ²³.

En respuesta al acúmulo de evidencia sobre la relación entre el sistema RAA y fibrosis hepática, las investigaciones han comenzado a centrarse en los inhibidores del sistema de angiotensina: IECA y ARA ⁶. Múltiples estudios con modelos animales han mostrado que estos agentes atenúan la fibrosis hepática ⁴³.

Varios mecanismos de acción pueden explicar un posible efecto positivo de la inhibición del SRAA sobre la fibrogénesis hepática, pero la mayoría se han descrito en modelos experimentales de fibrosis. En primer lugar se sabe que la

angiotensina II aumenta el estrés oxidativo promoviendo así la lesión de los hepatocitos, la disfunción endotelial y la activación de macrófagos y células estrelladas; segundo, la angiotensina II es un vasoconstrictor bien conocido que estimula la contracción de las células estrelladas y aumenta la resistencia intrahepática; y en tercer lugar angiotensina II tiene papel en la expresión de TGF-B1 y mediadores inflamatorios que promueven el infiltrado de células inflamatorias del hígado ^{17,28}.

Los IECA y ARA bloquean el eje clásico del SRAA y por lo tanto se podría esperar que sean beneficiosos en la fibrosis hepática. La inhibición del sistema provoca una disminución en el factor de crecimiento de tejido conectivo y en la expresión del receptor ATR1 lo que se asocia con una disminución de la expresión de TGF-B1 en el hígado lesionado. Además la inhibición de la ECA evita la degradación de Ang-(1-7) aumentando así los niveles plasmáticos y tisulares locales ^{13, 53}. Los IECA son reguladores negativos clave del SRAA y limitan la fibrosis a través de la degradación de la angiotensina II mostrando potencial terapéutico en la fibrosis hepática ^{6, 53, 54}.

Uso de Pirfenidona como tratamiento de la fibrosis hepática:

La pirfenidona se ha propuesto como un agente antiinflamatorio y antifibrótico. Las investigaciones sugieren que puede retrasar o inhibir de forma segura el agrandamiento progresivo de las lesiones fibróticas y prevenir la formación de nuevas lesiones; sin embargo la evidencia de este tratamiento en humanos en la lesión hepática es limitada ^{55, 56, 57}.

Aunque su mecanismo de acción molecular posee una potente acción anti-TNF- α y anti-TGF-B1. Uno de los efectos antifibróticos es a través de la regulación a la baja de TGF-B1, TIMP-1 y MMP2-mRNA, causando disminución en la deposición de colágeno; además de efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de citocinas y quimiocinas ^{56, 58}.

Armendáriz-Borunda et al, mediante un ensayo clínico piloto en adultos, evaluó la seguridad y eficacia de la Pirfenidona en pacientes con hepatopatía crónica por virus de la hepatitis C, encontrando una reducción de la fibrosis en el 30% de

los pacientes al cabo de 12 meses de tratamiento; posteriormente Flores-Contreras et al mediante un ensayo clínico, no controlado y no aleatorizado evaluó también la eficacia y la seguridad de este agente a 24 meses, en un grupo similar de pacientes, demostrando mejorar la necroinflamación, la esteatosis y la regeneración hepática ^{38, 59}. Resultados que si bien son prometedores, estos deben de extenderse en el contexto de un ensayo clínico doble ciego controlado con placebo.

ANTECEDENTES

Pérez et al (2016), realizó un estudio transversal descriptivo en la UMAE Hospital de Pediatría CMNO IMSS, no publicado, en el cual evaluó el perfil de trombofilia en el paciente pediátrico con cirrosis e insuficiencia hepática, en donde se obtuvieron resultados inesperados al encontrar como principal mutación identificada el polimorfismo D/D del gen de la ECA; se considera un antecedente importante para nuestro estudio, ya que motivó a investigar la asociación de este polimorfismo entre la hepatopatía crónica y el desarrollo de fibrosis hepática.

Aunque estudios experimentales han demostrado una asociación entre la fibrosis hepática y el polimorfismo I/D del gen de la ECA, los resultados en estudios humanos han sido contradictorios; Raslan et al (2011), mediante un estudio de casos y controles determinó la frecuencia del polimorfismo ECA I/D en pacientes adultos egipcios con infección crónica por VHC y su asociación con la fibrosis hepática encontrando que el genotipo D/D es más frecuente en la cronicidad de la enfermedad pero el polimorfismo I/D no influyó en la progresión de la fibrosis hepática ⁴². En contraste Turhan et al (2015), reconoció una frecuencia más elevada del genotipo I/D en la fibrosis hepática, sin embargo no hubo una asociación estadísticamente significativa; en este mismo estudio los niveles de ECA mayormente elevados en suero se asociaron con los genotipos del gen ECA que portaban alelos D 44.

Se ha demostrado que un PNS en el codón 25 del gen TGFB1 que resulta de una sustitución de aminoácidos (Arg/Pro) se asocia con estadios avanzados de fibrosis en pacientes con hepatitis crónica. En el estudio de Armendáriz et al (2008) en donde se evaluó la correlación de los polimorfismos fibrogénicos en pacientes mexicanos adultos con hepatopatía por infección crónica del virus de la hepatitis C y alcohólica, se encontró que Independientemente del sexo, edad y las características bioquímicas, la fibrosis hepática avanzada establecida fue común en sujetos homocigotos G/G con una frecuencia del 100%, reforzando el concepto de que el polimorfismo del codón 25 TGFB1 influye en la fibrogénesis

Posteriormente en un estudio realizado por Sánchez et al (2013) también se encontró una correlación de forma significativa entre el polimorfismo del codón 25 del gen TGF-B1 G/G y la fibrosis hepática avanzada, en pacientes mexicanos adultos con infección crónica del virus de la hepatitis C; lo que hace además de este PNS un biomarcador potencial en la progresión de las enfermedades hepáticas crónicas ³⁷.

Por último Han et al (2016) estableció que el polimorfismo de TGF-B1 en el codón 10 se asoció con riesgo de cirrosis hepática en pacientes de origen asiático.

Estas observaciones sugieren un posible papel de los polimorfismos I/D del gen de la ECA y de los PNS de la TGF-B1 en el desarrollo y evolución de la fibrogénesis hepática en pacientes con diferentes tipos de enfermedad hepática crónica. Hasta donde tenemos conocimiento no se ha estudiado la asociación de ambos polimorfismos juntos en la enfermedad hepática crónica en edad pediátrica.

Nombre del estudio	Autor/ Año	Metodología	Objetivo	Resultados
Perfil de trombofilia en el paciente pediátrico con cirrosis hepática (Tesis postgrado).	Pérez MM et al 2016	Transversal descriptivo 25 pacientes	Evaluar el perfil de trombofilia en el paciente pediátrico con cirrosis hepática	La principal mutación identificada fue el polimorfismo D/D del gen de la ECA
Posible rol del polimorfismo de la ECA en la progresión de fibrosis hepática.	Raslan HM, et al. 2011	Casos y controles 90 casos 170 controles	Estudiar la frecuencia de los polimorfismos de la ECA en pacientes adultos con infección crónica de hepatitis C	Genotipo D/D es más frecuente en la cronicidad de la enfermedad pero el polimorfismo I/D no influyó en la progresión de la fibrosis hepática
Niveles de ECA, polimorfismo I/D y fibrosis hepática en pacientes Turcos	Turhan NK 2015	Transversal 418 pacientes	Evaluar la asociación entre el polimorfismo I/D del gen ECA y la fibrosis hepática	Se reconoció una frecuencia más elevada del genotipo I/D en la fibrosis hepática, sin embargo no hubo una asociación estadísticamente significativa. Los niveles de ECA en suero más altos se asociaron con los alelos D.
Asociación entre los polimorfismos TGF-B1 y cirrosis hepática: meta-análisis.	Han SL et al. 2016	Metaanálisis 7 estudios 874 casos 889 controles	Establecer la asociación entre el polimorfismo de TGF-B1 codón 10 y cirrosis hepática.	El polimorfismo se asoció con el riesgo de cirrosis hepática en esta población.
Asociación entre los polimorfismos genéticos con el grado de necroinflamación y estadio de fibrosis en pacientes mexicanos con infección crónica por hepatitis C.	Sánchez MG, et al. 2013	Casos y controles 38 casos 50 controles	Determinar los polimorfismos del gen TGF-B1 y su asociación con el estadio de la enfermedad hepática.	Existe una correlación entre la presencia del genotipo TGF-B1 codón 25 G/G con una mayor gravedad de la fibrosis hepática en pacientes con VHC.
Polimorfismos fibrogénicos en pacientes mexicanos con fibrosis hepática establecida.	Armendáriz J, et al. 2008	Casos y controles 20 casos 30 controles	Establecer la correlación entre los polimorfismos de TGF-B1 en pacientes con fibrosis hepática	El genotipo homocigoto TGF-B1 codón 25 G/G se asoció con un mayor desarrollo de la fibrosis hepática.

Tabla No. 6: Antecedentes de estudios realizados de los polimorfismos de la ECA I/D y PNS de TGF-B1 en la fibrogénesis hepática.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades crónicas del hígado se han establecido desde hace varios años entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en México. Según el último registro del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) las enfermedades del hígado de encuentran dentro de las primeras 20 causas de mortalidad en niños de 0 a 15 años de edad.

En los últimos años se ha demostrado que los factores genéticos determinan la tasa de progresión de la fibrosis hepática. Se han identificado polimorfismos en el gen la ECA (I/D, D/D, I/I) y de la TGFB1 (Leu10Pro y Arg25Pro) los cuales se encuentran en relación con la presencia de fibrosis y cirrosis hepática. Así mismo se ha comprobado que la asociación de ambos tiene un efecto sinérgico en la evolución de la enfermedad.

Hasta donde tenemos conocimiento solo hay un estudio en población mexicana pediátrica con enfermedad hepática crónica que determina el polimorfismo DD del gen de la ECA y se limitó a pacientes con cirrosis y no hay estudios sobre la asociación de la TGFB1 ni de la interacción de los polimorfismos de ambos genes en niños.

JUSTIFICACIÓN

Magnitud

En el servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente, las hepatopatías crónicas es una de las principales causas de atención, siendo las principales etiologías, la atresia de vías biliares, hepatitis autoinmune y las causas metabólicas.

Las diversas complicaciones asociadas disminuyen la calidad de vida de los pacientes e incrementan la morbimortalidad, generando así mismo un aumento en los gastos hospitalarios en la atención de estos pacientes.

Ralentizar la fibrogénesis hepática es un objetivo actual de las investigaciones asociadas a este tema, con el objetivo de lograr la reversión de la enfermedad,

la disminución de las complicaciones asociadas o bien incluir una terapia puente que sea fácil y accesible al trasplante hepático.

Trascendencia

Actualmente la maniobra terapéutica más eficaz para evitar el desarrollo de la fibrogénesis hepática continúa siendo la eliminación del agente causal, sin embargo en la mayoría de las etiologías de hepatopatía crónica en niños esto no es posible y hasta la fecha no se conoce una terapia antifibrogénica eficaz.

El estudio de las variaciones genéticas implicadas en la fibrogénesis hepática puede aportar información novedosa, abriendo puerta a nuevos blancos terapéuticos con terapias antifibrogénicas en la hepatopatía crónica.

Factibilidad

El presente estudio se realizó en el servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del CMNO, el cual es un hospital de tercer nivel, de concentración de pacientes con patologías del hígado, que cuenta con la infraestructura necesaria para su ejecución.

Vulnerabilidad

Nuestro hospital es un centro de referencia de la región occidente del país por lo que cuenta con un grupo grande de pacientes con diagnóstico de hepatopatía crónica de diversas etiologías que nos permitió obtener una muestra adecuada para realizar la determinación de los polimorfismos del gen de la ECA y TGFB1 p10 –p25, sin embargo los resultados pueden variar de acuerdo a la causa subyacente de la hepatopatía crónica y el tiempo de evolución de la enfermedad.

Nuestro estudio implica una asociación genética por lo que los resultados se ven afectados por el componente étnico ya que la prevalencia de un polimorfismo en particular varía de una población a otra. En este sentido la población actual mexicana se considera mestiza y homogénea en todas las zonas conurbadas, lo

cual incluye al grupo de pacientes con hepatopatía crónica, del servicio de Gastroenterología pediátrica.

Como debilidad de este estudio es que no se realizó la cuantificación de la ECA y con ello la falta de asociación del polimorfismo del gen de la ECA I/D con los niveles séricos de ECA por cuestiones de factibilidad; sin embargo si podremos estudiar la asociación del polimorfismo del gen TGFB1 con su expresión de TGF-B1 en suero.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la distribución de los polimorfismos del gen de la ECA I/D y TGFB1 codón p10 y p25 y nivel sérico de TGF-B1 en pacientes con hepatopatía crónica del Hospital de Pediatría del CMNO?

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la distribución de los polimorfismos del gen de la ECA I/D y TGFB1 variantes p10 y p25 y nivel sérico de TGF-B1 en pacientes con hepatopatía crónica.

Objetivos específicos

- 1.-Determinar la distribución de los polimorfismos de los genes ECA y TGFB1: ECA I/D, TGFB1 codón p10 y codón p25 en pacientes con y sin hepatopatía crónica.
- 2.-Determinar los niveles séricos de TGF-B1 en pacientes con y sin hepatopatía crónica.
- 3.-Describir las características nutricionales, clínicas, de laboratorio y gabinete de los pacientes con hepatopatía crónica.
- 4.-Identificar la correlación entre la distribución de los polimorfismos de los genes ECA y TGF-B1: ECA I/D, TGFB1 codón p10 y codón p25, con el grado de fibrosis hepática evaluado por biopsia con el índice de METAVIR.
- 5.-Identificar la correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y el grado de fibrosis hepática evaluado por biopsia con el índice de METAVIR.

MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio

Transversal comparativo.

Entorno

Pacientes atendidos en el servicio de Gastroenterología y Nutrición del hospital de pediatría del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente.

Población de estudio

Pacientes de 1 mes a 15 años, 11 meses de edad con diagnóstico de hepatopatía crónica atendidos en el servicio de Gastroenterología y Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente.

Tipo de muestreo

No probabilístico, por conveniencia. Se invitó a participar a los pacientes de la población de estudio que fueron atendidos en el servicio de Gastroenterología y Nutrición pediátrica en el lapso establecido en el cronograma de actividades para realizar la captación de pacientes (Noviembre a Diciembre 2018).

Tamaño de la muestra

No se realizó cálculo de tamaño de muestra.

Criterios de inclusión

- 1.-Pacientes de 1 mes a 15 años 11 meses de edad, de cualquier sexo con diagnóstico de hepatopatía crónica del Hospital de pediatría del CMNO.
- 2.-Pacientes de origen étnico mexicano-mestizo.
- 3.-Pacientes que cuenten con biopsia hepática.
- 4.-Pacientes cuyos padres estén de acuerdo con la participación bajo consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- 1.-Pacientes en que la muestra sanguínea sea insuficiente para la determinación de exámenes de laboratorio y polimorfismos.
- 2.-Pacientes que hayan recibido trasplante hepático.
- 3.-Pacientes que hayan recibido transfusión sanguínea en las últimas 4 semanas.
- 4.-Pacientes que presenten elevación en los niveles séricos de urea, creatinina y/o evidencia de proteinuria en el examen general de orina.

Grupo de referencia

Se invitó a participar a pacientes pediátricos de la consulta externa del servicio de Gastroenterología del hospital de pediatría del CMNO sin hepatopatía crónica u otro trastorno orgánico de fondo; de ellos el servicio cuenta con un gran número de pacientes con diagnóstico de estreñimiento funcional, mismos que por definición de la enfermedad no es de tipo orgánico sino funcional. Al grupo de referencia solo se realizó la determinación de los polimorfismos del gen ECA I/D, TGFB1 codón p25 y nivel sérico de TGF-B1.

Criterios de inclusión grupo de referencia

- 1.-Pacientes pediátricos con diagnóstico de estreñimiento funcional.
- 2.-Pacientes con origen étnico mexicano-mestizo.
- 3.-Estado nutricional adecuado para la edad.
- 4.-Pacientes cuyos padres estén de acuerdo con la participación bajo consentimiento informado.

Criterios de exclusión grupo de referencia

- 1.-Pacientes que cuenten con comorbilidades agregadas.

Variables

Variable dependiente

- 1.-Polimorfismo del gen del TGF-B1 codón p10
- 2.-Polimorfismo del gen del TGF-B1 codón p25
- 3.-Polimorfismo del gen de la ECA I/D
- 4.-Nivel sérico de TGF-B1

Variable independiente

- 1.-Hepatopatía crónica

Otras variables:

-Demográficas: sexo, patología de base, edad al momento del diagnóstico, edad actual, tiempo de evolución en meses de la toma de la biopsia al momento del estudio.

-Clínicas: Peso, talla, circunferencia media de brazo, estado nutricional, ascitis, encefalopatía, ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia.

-Laboratorio: Bilirrubinas totales (BT), Bilirrubina directa (BD), Albúmina, Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), Tiempo de protrombina (TP), Ratio internacional normalizado (INR), Urea, Creatinina, Proteinuria.

-Histológicas: Índice de Metavir: Nivel de fibrosis medido de F1 a F4. Índice de actividad medido de A1 a A3.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES				
Variable	Tipo	Concepto operacional	Unidad	Estadística
Polimorfismo ECA ID	Cualitativa	Polimorfismo del gen de la ECA de tipo inserción/delección. Dependiendo de la presencia (inserción) o la ausencia (delección) de un dominio de ADN, la ECA existe como uno de tres genotipos diferentes: homocigotos DD – II y heterocigotos ID	1-Ausencia 2-Homocigoto D/D 3-Homocigoto I/I 4-Heterocigoto I/D	Frecuencias , porcentajes X2 Correlación Sperman
Polimorfismo del gen TGF-B1 p10	Cualitativa	Presencia del polimorfismo de un solo nucleótido del gen TGF-B1 codón 10, que da como resultado variantes alélicas en la expresión del gen	1-Ausencia 2-Presencia	Frecuencias , porcentajes X2 Correlación de Sperman
Polimorfismo del gen TGF-B p25	Cualitativa	Presencia del polimorfismo de un solo nucleótido del gen TGF-B1 codón 25, que da como resultado variantes alélicas en la expresión del gen	1-Ausencia 2-Presencia	Frecuencias , porcentajes X2 Correlación de Sperman
Nivel sérico de TGF-B1	Cuantitativa	La TGF-B1 es una citocina multifuncional que desempeña un papel significativo en procesos biológicos como cicatrización.	Pg/ml	Frecuencia Promedio Desviación estándar (DE) T student
Hepatopatía crónica	Cualitativa	Estado patológico del hígado con afectación en la función hepática caracterizada por alteraciones clínicas y bioquímicas.	1-Si 2-No	Frecuencias , porcentajes X2 Correlación Sperman
Sexo	Cualitativa	Características biológicas que definen a un ser humano como hombre o mujer	1-Hombre 2-Mujer	Frecuencias , Porcentajes X2
Edad actual	Cuantitativa	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha del estudio	Años	Frecuencias , porcentajes X2
Patología de base	Cualitativa	Se refiere a la enfermedad que llevo a la hepatopatía crónica	Nombre de la enfermedad	Frecuencias Porcentajes
Edad al momento del diagnóstico	Cuantitativa	Tiempo transcurrido desde su nacimiento al momento de establecer el diagnóstico.	Años	Frecuencias Porcentajes DE T student Correlación de Pearson

Talla	Cuantitativa Continua	Se refiere a la longitud de una persona de la cabeza a los pies determinada con estadímetro.	Centímetros	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Peso	Cuantitativa Continua	Se refiere a la masa de una persona medida en báscula.	Kilogramos	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Circunferencia media de brazo	Cuantitativa Continua	Expresa la reserva actual de tejido adiposo. Se determina localizando el punto medio de la longitud medida del vértice superior del acromion hasta el olécranon, haciendo en ese punto la medición de la circunferencia con una cinta métrica.	Centímetros	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Estado nutricional	Cualitativa Ordinal	Se refiere a la relación que existe entre la talla, peso y circunferencia media de brazo, con las medias para cada grupo de edad.	Puntuación Z 1. Eutrófico (P/T y CMB/E, -1.99 a +1.99 DS) 2. Desnutrición moderada (P/T y CMB/E, -2 a -2.99 DS) 3. Desnutrición severa (P/T y CMB/E, -3 DS) 4. Malnutrición (P/T y CMB/E, +2 DS)	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman
Ictericia	Cualitativa	Coloración amarilla de la piel y mucosas que se produce por un aumento en la bilirrubina en la sangre como resultado de la hepatopatía crónica.	1.Ausente 2.Presente	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman
Ascitis	Cualitativa	Acumulación de líquido seroso en la cavidad peritoneal.	1.Ausente 2.Leve 3.Moderada	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman
Hepatomegalia	Cualitativa	Aumento de tamaño del hígado mayor a 2 cm por debajo del borde costal, determinado por exploración física	1.Ausente 2.Presente	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman

Esplenomegalia	Cualitativa	Aumento del tamaño del bazo por debajo del borde costal, determinado por exploración física.	1.Ausente 2.Presente	Frecuencias Porcentajes X ² Correlación de Sperman
Encefalopatía	Cualitativa	Deterioro de la función cerebral por sustancias tóxicas acumuladas por el deterioro de la función hepática	1.Ausente 2.Presente leve-moderada 3.Presente Severa	Frecuencias Porcentajes X ² Correlación de Sperman
Bilirrubina total	Cuantitativa	Suma de la bilirrubina directa e indirecta en sangre.	1.>2.0 mg/dl 2.entre 2.1 y 3.0 mg/dl 3.>3.1 mg/dl	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Bilirrubina directa	Cuantitativa	La bilirrubina directa es la forma conjugada e hidrosoluble que representa hasta un 30% de la bilirrubina total. Su elevación es consecuencia de una menor excreción hepática de bilirrubina hacia el sistema biliar.	1.<1.0 mg/dl 2.>1.0 mg/dl	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
AST	Cuantitativa	Se encuentra en altas concentraciones en las células hepáticas donde catalizan la transferencia de grupos aminos para producir ácido oxalacético. Cuando se presenta un daño en la membrana celular del hepatocito, estas enzimas que se encuentran en el citoplasma pasan al plasma, aumentando su concentración sérica.	1.<59 U/l 2.->59 U/l	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
ALT	Cuantitativa	Se encuentra en altas concentraciones en las células hepáticas donde catalizan la transferencia de grupos aminos para producir ácido Pirúvico. Cuando se presenta un daño en la membrana celular del hepatocito, esta enzimas que se encuentran en el citoplasma pasan al plasma, aumentando su concentración	1.<72 U/l 2.>72 U/l	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Albumina	Cuantitativa	Proteína sintetizada en hígado que sirve de	1.<2.0 mg/dl 2.-Entre 2.1 y 3.0	Frecuencias Promedio

		parámetro de la capacidad del metabolismo hepático.	mg/dl 3.>3.1 mg/dl	DE T student Correlación de Pearson
Tiempo de protrombina (TP)	Cuantitativa	Tiempo que tarda la porción líquida de la sangre en coagularse	Segundos	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Índice internacional normalizado (INR)	Cuantitativa Continua	Es una forma de estandarizar los valores obtenidos a través del tiempo de protrombina. Prolongado mayor de 1.5	1.<1.8 2.Entre 1.8-2.3 3.>2.4	Frecuencias Promedio DE T student Correlación de Pearson
Urea	Cualitativa	Sustancia orgánica tóxica, resultante de la degradación de sustancias nitrogenadas en el organismo y que se puede cuantificar en plasma sanguíneo.	1.-Normal: menor a: 18 mg/dl 2.-Elevada mayor a 18 mg/dl	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman
Creatinina	Cualitativa	Producto de desecho de la creatina, formado en su mayoría en el músculo a través de la eliminación no enzimática de agua del fosfato de creatina. Se excreta en la orina a través del glomérulo renal.	1.-Normal: menor a 0-3 años: 0.3 mg/dl 4 a 7 años: 0.5 mg/dl 8 a 10 años: 0.8 mg/dl >11 años: 0.9 mg/dl 2.-Elevada mayor a 0-3 años: 0.3 mg/dl 4 a 7 años: 0.5 mg/dl 8 a 10 años: 0.8 mg/dl >11 años: 0.9 mg/dl	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman
Proteinuria	Cualitativa	Presencia en la orina de proteínas en una cantidad superior a la normal.	1.-Ausencia 2.->30 mg/dl.	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman
Índice de Metavir	Cualitativa	Se refiere al grado de fibrosis o cirrosis hepática y al grado de actividad histológica.	Actividad histológica A0-Ausente A1-Leve A2-Moderada A3-Grave Grado de fibrosis F0-Ausente F1-Fibrosis portal en septos F2-Fibrosis portal F3-Numerosis septos sin cirrosis F4-Cirrosis.	Frecuencias Porcentajes X2 Correlación de Sperman

Fecha de la biopsia hepática	Cuantitativa	Tiempo en que se tomó la biopsia hepática.	Meses	Frecuencias Porcentajes DE T student Correlación de Pearson
------------------------------	--------------	--	-------	--

Tabla 7. Operacionalización de variables.

Procedimiento del estudio:

- 1) Se abordó a los pacientes con diagnóstico de hepatopatía crónica y estreñimiento crónico funcional que acudieron a consulta externa o área hospitalaria de nuestra unidad (que cumplieran los criterios de inclusión).
- 2) Se otorgó información sobre el estudio al tutor para obtener su consentimiento por escrito para poder ingresar al protocolo.
- 3) En una hoja de captura se vaciaron datos generales y variables demográficas (sexo, patología de base, edad actual, edad al diagnóstico).
- 4) Revisión del expediente clínico: se recolectaron las variables clínicas (peso, talla, circunferencia media del brazo, estado nutricional, ascitis, encefalopatía, ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia). Se recolectó el resultado de biopsia hepática para identificar las variables histológicas: índice de METAVIR.
- 5) Identificación de criterios de exclusión: se eliminaron los pacientes que cumplieron con algún criterio de exclusión.
- 6) Obtención de muestras sanguíneas: se tomó 1 muestra de sangre periférica por punción venosa para realizar los siguientes análisis bioquímicos:
 - Determinación polimorfismo de I/D del gen ECA, PNS del gen TGF-B1 p25: se recolectaron 5 ml de la muestra sanguínea en un tubo con sistema de vacío y EDTA al 10%, que se procesó para la extracción del DNA genómico por método estandarizado que se describe brevemente:

a) Obtención de ADN

De cada muestra de sangre periférica se realizó la separación de leucocitos para lo cual se colocó inicialmente en refrigeración aproximadamente una hora. Se agregaron 30 ml de solución de lisis de eritrocitos (10:1 de NH_4Cl 0.144 M y NH_4HCO_3 0.01 M), se mezcló por inversión y se dejó reposar durante una hora a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se descartó

el sobrenadante y se agregaron 20 ml de la solución de lisis 9:1 para resuspender el paquete de leucocitos, se colocó en refrigeración durante media hora y se realizó nuevamente la centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos. El procedimiento de lavado anterior se repitió según fue necesario hasta que el paquete de leucocitos quedó libre de eritrocitos.

El paquete de leucocitos se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis de leucocitos (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, y Na₂EDTA 2 mM pH 8.2) posteriormente se agregaron 200 µl de SDS 10% y 125 µl de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en SDS al 10% y Na₂EDTA 2 mM pH 8.2). La muestra se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó 1 ml de una solución saturada de NaCl 6M agitando vigorosamente durante 15 segundos. Se centrifugó durante 20 minutos a 4800 rpm y el sobrenadante (que debía estar translúcido y sin grumos) se pasó a otro tubo de plástico de 50 ml, donde se agregaron lentamente dos volúmenes de etanol absoluto frío. Para ayudar a la precipitación del DNA se colocó el tubo aproximadamente 10 minutos en el congelador (0 °C). El DNA precipitado se tomó con una punta estéril y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril conteniendo 1 mL de etanol absoluto. Se agitó hasta abrir la hebra de DNA y se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos. Se repitió el lavado con etanol al 70% realizando la centrifugación final a 5000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el botón completamente en una cámara seca. Una vez seco, se resuspendió el botón en Buffer TE 300 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, y Na₂EDTA 2mM pH 7.5), se colocó a 37°C durante dos horas aproximadamente, hasta resuspenderse por completo el DNA.

Enseguida se realizó la cuantificación de las muestras por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8% utilizando buffer TEB 1X para determinar la integridad del ADN.

b) Genotipificación de los polimorfismos propuestos

Para la determinación del polimorfismo del gen TGFB1 p25 se realizó genotipificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo

real en equipo LightCycler 96 (Roche) utilizando sondas taqman de fabricación comercial (C_22272997_10 y C_11464118_30 de Applied BioSystems) siguiendo las recomendaciones y metodología ya validada por el mismo fabricante.

En el caso del gen ECA (I/D) se realizó tipificación por PCR convencional utilizando los oligonucleótidos específicos. Las condiciones de reacción y secuencia de las sondas Taqman y los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en el cuadro “Anexo de análisis bioquímicos”.

-Determinación de TGF-B1 en suero: A partir de una cantidad mínima de muestra de sangre recolectada en tubo con activado de coagulación se realizó la cuantificación de la citocina en suero mediante inmunoensayo con perlas magnéticas (ELISA) en placa de 96 pozos, el cual utiliza un anticuerpo monoclonal para TGF-B1 específico de humano. La lectura de la placa al final de su incubación con el anticuerpo se realizará en el equipo Invitrogen. Se utilizó kit comercial que incluye estándares y controles del fabricante Invitrogen TGF-beta1 Human ProcartaPlex simplex Kit catálogo EPX01A-10249-901).

-Determinación de TP e INR: se recolectó en un tubo con sistema de vacío, con tapón de seguridad azul, con Citrato Sódico con doble siliconado interno de 2.7 ml, el cual fue procesado en el laboratorio del hospital de pediatría del CMNO por métodos estandarizados y validados por dicho laboratorio.

-Determinación de albúmina, bilirrubina total, bilirrubina directa, AST, ALT, urea y creatinina: se recolectaron 2.3 ml de sangre en un tubo con activador de coagulación con tapón rojo o amarillo para su determinación. Se recolectó una muestra de orina para la realización de examen general de orina; los cuales fueron procesados en el laboratorio del hospital de pediatría del CMNO por métodos estandarizados y validados por dicho laboratorio.

- 7) Se realizó un grupo de referencia con pacientes pediátricos que cumplieron con los criterios de inclusión, previa aceptación de los padres para participar en el estudio mediante el uso de consentimiento informado y en caso de corresponder asentimiento informado del niño. Se les tomó 1 muestra sanguínea por punción venosa para realizar la determinación de: PNS del gen TGFB1 codón p25, polimorfismo de I/D del gen de la ECA y niveles séricos de TGF-B1 mediante el procesamiento previamente descrito.
- 8) Recolección de resultados de los análisis bioquímicos, los cuales se recolectaron en hoja de captura.
- 9) Al contar con la información, se llevó a cabo el análisis de la información.

Paso	Procedimiento	Descripción del procedimiento	Realizado por:
1	Captación de pacientes: -Grupo de estudio -Grupo de referencia.	Identificación de los pacientes en área de consulta externa y/o hospitalización que cumplieron los criterios de inclusión.	Dr. Francisco José López Rodríguez. Dra. Yolanda Alicia Castillo de León.
2	Consentimiento informado.	Información al tutor sobre el estudio para obtener el consentimiento informado por escrito.	Dr. Francisco José López Rodríguez. Dra. Yolanda Alicia Castillo de León.
3	Recolección de datos iniciales	En una hoja de captura se recolectaron datos generales y variables demográficas.	Dr. Francisco José López Rodríguez.
4	Exploración física, somatometría y revisión del expediente clínico	Se recolectaron las variables clínicas e histológicas.	Dr. Francisco José López Rodríguez.
5	Obtención de muestras sanguíneas.	Se tomó una muestra de sangre periférica por punción venosa.	Dr. Francisco José López Rodríguez.
5a	Procesamiento de las muestras sanguíneas	Se realizó: -Determinación del polimorfismo del gen ECA I/D y TGF-B1 p25. -Determinación de TGF-B1 sérica -Determinación de BT, albúmina sérica, TP, TPT e INR.	Químico/Laboratorista que apoyaron el proyecto.
7	Grupo de referencia.	Se realizó grupo de referencia durante la captación de pacientes en los que solo se determinó: -Polimorfismo del gen ECA I/D y TGF-B1 p25. -Determinación de TGF-B1 sérica	Dr. Francisco José López Rodríguez. (Captación) Químico/Laboratorista que apoyaron el proyecto. (procesamiento de muestras)
8	Análisis de la información	Recolección de resultados y análisis de la información.	Dr. Francisco José López Rodríguez. Dra. Yolanda Alicia Castillo de León. Dra. Rocío Macías Rosales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estadística descriptiva se realizó de acuerdo al tipo de variable

- Para variables cualitativas se utilizaron frecuencias y porcentajes.
- Para variables cuantitativas de acuerdo a la distribución de datos, se utilizó:

-Para datos con curva de distribución simétrica medias y desviación estándar.

-Para datos con curva de distribución no simétrica medianas y rangos.

La estadística inferencial se realizó de acuerdo al tipo de variable

- Para variables cualitativas se utilizó chi cuadrada y correlación de Spearman.
- Para variables cuantitativas se utilizó T student , correlación de Pearson.

Se realizó una base de datos en Excel 2013.

Para el análisis la base de datos se transfirió al programa estadístico *SPSS* versión 23.0 para Windows.

Los resultados se presentaron a través de tablas y gráficos.

ASPECTOS ÉTICOS

La investigación se apegó al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, II fracción, vigente (última reforma 2014); prevaleciendo en este estudio el respeto a la dignidad y la protección de los derechos y bienestar de los pacientes involucrados. Se considera que de acuerdo al artículo 17 el estudio proyectado tuvo un riesgo mínimo para los pacientes, por lo que requirió del consentimiento informado tanto para el grupo de estudio como para el grupo de referencia, asegurando el asentimiento de los pacientes mayores de 7 años. Se realizó el ejercicio de comprensión simple para lo cual se entregó a tres personas diferentes de la población del área de consulta externa para corroborar la comprensión del mismo.

El realizar un grupo de referencia, otorgó mayor validez a nuestra investigación para determinar que los polimorfismos genéticos que se estudiaron solo se encontraran asociados a la enfermedad hepática y no así en la población general. El beneficio que obtuvieron los pacientes tanto del grupo de estudio como de referencia fue conocer los resultados del estudio, identificando a aquel que presentó una predisposición genética para la expresión elevada de TGF-B1 y ECA, con el subsecuente riesgo del desarrollo de diversas patologías; así mismo, en caso de ser necesario, obtendrán el beneficio de recibir asesoría y manejo médico de forma oportuna, que se proporcione en el Hospital de Pediatría del CMNO.

Nuestro hospital es de tercer nivel por lo que las personas que acuden a el son personas que presentan alguna enfermedad que requiere atención médica de alta especialidad, de ellos, el grupo de pacientes con estreñimiento crónico funcional del servicio de Gastroenterología pediátrica, por definición no cuentan con una patología orgánica de fondo, sino funcional gastrointestinal y por lo tanto no habría sesgo en la determinación de los polimorfismos.

En esta investigación se respetó cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki, la enmienda de Tokio, el Informe Belmont y el Código de Reglamentos Federales de México. El protocolo

fue sometido a revisión por los Comités locales de Ética e Investigación de la unidad CLIES 1302 de la UMAE HP del CMNO, obteniendo numero de registro: **R-2018-1302-078.**

RECURSOS E INFRAESTRUCTURA

Infraestructura: se cuenta en la unidad áreas adecuadas para el procesamiento de las muestras como son el Laboratorio del Hospital de Pediatría y área de consulta externa.

Recursos humanos:

NOMBRE	CARGO	FUNCIÓN
Dr. Francisco José López Rodríguez. Residente de Gastroenterología Pediátrica. UMAE HP CMNO.	Investigador principal.	Captación de pacientes, realizó la toma de muestras, revisión de los resultados de laboratorio, recopilación de la información del expediente clínico. Recopilación y análisis de los resultados y elaboración del informe final.
Dra. Yolanda Alicia Castillo de León. Gastroenterólogo Pediatra. UMAE HP CMNO	Director de Tesis.	Apoyo a la captación de los pacientes, supervisión de la realización de la investigación en su contenido temático. Asesoría en la creación del reporte final, interpretación de resultados, discusión y conclusiones.
Dra. Rocio Macías Rosales. Gastroenterólogo Pediatra. UMAE HP CMNO.	Investigador Asociado y asesor metodológico.	Asesoría al investigador principal con respecto al diseño y metodología del estudio, así como con el procesamiento de la información y la presentación de los resultados.

Materiales: La genotipificación de los polimorfismos de los genes propuestos y la cuantificación de TGFB, se pagaron con recursos propios y apoyo de laboratorios dentro del IMSS sin fines de lucro o apropiación de los resultados.

Equipos y reactivos de análisis bioquímicos (mayor detalle en Anexos: Tabla de análisis bioquímicos):

Solución de lisis de eritrocitos	Gel de Acrilamida bis-acrilamida
Buffer de lisis de leucocitos	Gel agarosa al 1.5%
SDS 10%	Sondas Taqman Applied Biosystems
Proteinasa K	Microslides
Buffer TE	Equipo Luminex 200 system X MAP
Buffer TEB IX	Equipo LightCycler 96
Anticuerpo de detección	Equipo Vitros microslide
Buffer de lavado universal	Termociclador MJ Reseach
Streptavidina –PE	Cámaras de electroforesis Owl
Buffer de lectura	Fuente de poder BioRad

Otros materiales requeridos para llevar a cabo la investigación y que los investigadores financiaron son:

-Material de papelería: hojas, bolígrafos.

-Equipo de cómputo, impresora, escáner, programas para el análisis de la información.

-Tubos con sistema de vacío y EDTA 10% con tapón morado, tubos con sistema de vacío con Citrato Sódico con doble siliconado interno de 2.7 ml con tapón azul, tubos con activador de coagulación con tapón rojo o amarillo.

Experiencia del grupo: El servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica cuenta con amplia experiencia en el abordaje y tratamiento de las hepatopatías crónicas. Los investigadores asociados cuentan con experiencia en haber dirigido y asesorado múltiples trabajos de investigación, siendo las enfermedades del hígado una línea de investigación.

Dr. Francisco José López Rodríguez. Investigador principal: Médico Pediatra, estudiante de la sub-especialidad en Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.

Dra. Yolanda Alicia Castillo de León. Director de Tesis: Médico Pediatra, Sub-especialista en Gastroenterología Pediátrica y Maestra en Ciencias, es profesor titular del curso de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del HP CMNO IMSS. Ha desempeñado actividades de investigación y docencia, cuenta con diversas publicaciones de artículos científicos en el área de Gastroenterología Pediátrica y ha dirigido diversas tesis de la especialidad y sub-especialidad, algunas de ellas merecedoras de premios nacionales e internacionales.

Dra. Roció Macías Rosales. Investigador asociado y asesor metodológico: Médico Pediatra, Sub-especialista en Gastroenterología Pediátrica, Maestra en Nutrición y Doctora en Ciencias, ex profesor adjunto del curso de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del HP CMNO IMSS. De igual forma ha desempeñado actividades de investigación y docencia, con publicaciones de artículos científicos de su área de especialidad y ha realizado la dirección de diversas tesis de especialidad y sub-especialidad, algunas de ellas merecedoras de premios nacionales e internacionales.

RESULTADOS

Variables demográficas

Se incluyeron en este estudio 55 pacientes de los cuales 30 tienen diagnóstico de hepatopatía crónica y 25 pacientes sin enfermedad hepática con antecedente de estreñimiento crónico funcional el cual se utilizó como grupo de referencia.

En el grupo global 25 pacientes (45.5%) fueron del sexo femenino y 30 (54.5%) del sexo masculino, el promedio de la edad fue de 107.7 meses con una desviación estándar (DE) ± 53 con un mínimo de 3 y máximo de 191 meses, al comparar la media de la edad por sexos no se demostró diferencia estadística significativa (tabla 1). El grupo etario más frecuente fue el de escolares con 23 pacientes (42%), seguido de adolescentes 19 (34%), preescolares 8 (15%) y lactantes 5 (9%), al comparar la media de los grupos etarios por sexo no se demostró diferencia estadística significativa (Tabla 2).

Tabla 1. Comparación de la media de la edad por sexo en 55 pacientes pediátricos con y sin enfermedad hepática crónica (t de student, $p=0.77$).

Sexo	n (%)	Media edad (meses)	DE
Femenino	25 (45.5)	105	47.6
Masculino	30 (54.5)	109	53
Total	55 (100)	107	53

Tabla 2. Comparación del promedio grupos etarios por sexo en 55 pacientes pediátricos con y sin enfermedad hepática crónica (t de student, p= 0.32). Los porcentajes se refieren a la frecuencia por sexo.

Sexo	Femenino		Masculino		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Lactantes	3	(12)	2	(7)	5	(9)
Preescolares	2	(8)	6	(20)	8	(15)
Escolares	15	(60)	8	(26)	23	(42)
Adolescentes	5	(20)	14	(47)	19	(34)
Total	25	(100)	30	(100)	22	(100)

Del grupo con hepatopatía crónica 16 pacientes (53%) fueron mujeres y 14 (47%) hombres, el promedio de la edad fue de 86.07 meses con una DE \pm 53 un mínimo de 3 y máximo de 180 meses, al comparar la media de edad por sexo no se demostró diferencia estadística significativa (tabla 3). El grupo etario más frecuente fue el escolar con 12 pacientes (40%), seguido del preescolar 7 (23%), adolescentes 6 (20%) y lactantes 5 (17%), al comparar la media de los grupos etarios por sexo no hubo diferencia significativa (tabla 4).

Tabla 3. Comparación de la media de la edad por sexo en 30 pacientes pediátricos con enfermedad hepática crónica (t de student, p=0.56).

Sexo	n (%)	Media edad (meses)	DE \pm
Femenino	16 (53)	91	50
Masculino	14 (47)	80	56
Total	30 (100)	86	53

Tabla 4. Comparación de la media de grupos etarios por sexo en 30 pacientes pediátricos con enfermedad hepática crónica (t de student = 0.96). Los porcentajes se refieren a la frecuencia por sexo.

Sexo	Femenino		Masculino		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Lactantes	3	(10)	2	(7)	5	(17)
Prescolares	2	(7)	5	(16)	7	(23)
Escolares	9	(30)	3	(10)	12	(40)
Adolescentes	2	(7)	4	(13)	6	(20)
Total	16	(53)	14	(47)	30	(100)

Del grupo de referencia sin enfermedad hepática 9 pacientes (36%) fueron femeninos y 16 (64%) masculinos, el promedio de la edad fue de 133 meses con una DE \pm 40.4 con un mínimo de 36 y máximo de 192 meses. El grupo etario más frecuente fue el de adolescentes con 13 pacientes (52%), escolares 11 (44%) y preescolares 1 (4%). La comparación del promedio de la edad por sexo y de los grupos etarios por sexo no mostró diferencia estadística significativa.

En relación al lugar de origen del grupo global (n=55), 35 (64%) fueron del estado de Jalisco, 6 de Nayarit (11%), 5 de Guanajuato (9%), 5 de Michoacán (9%), 3 de Colima (6%) y 1 (1.8%) de Sinaloa.

Del grupo con hepatopatía crónica (n=30), 12 (40%) fueron del estado de Jalisco, 5 (17%) de Nayarit, 5 de Guanajuato (17%), 3 de Colima (10%), 4 de Michoacán (13%), 1 de Sinaloa (3%).

Del grupo de referencia sin hepatopatía crónica (n=25), 23 (92%) fueron del estado de Jalisco, 1 de Nayarit (4%), 1 de Michoacán (4%).

Variables clínicas

a) Etiología

De los pacientes incluidos en este proyecto, en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica (n=30), la etiología de la enfermedad fue la siguiente en orden decreciente: hepatitis autoinmune 8 (27%), atresia de vías biliares 6 (20%), indeterminada 5 (17%), infección por virus de hepatitis C 3 (10%), quiste de colédoco 2 (7%), fibrosis hepática congénita 2 (7%), tumoral 2 (7%), colestasis intrahepática familiar 1 (3%) y deficiencia de alfa 1 antitripsina 1 paciente (3%) (tabla 5).

Tabla 5. Frecuencias de etiología del grupo de pacientes con hepatopatía crónica (n=30).

Etiología	n (%)
Hepatitis autoinmune	8 (27)
Atresia de vías biliares	6 (20)
Indeterminada	5 (17)
Infección por virus de hepatitis C	3 (10)
Quiste de colédoco	2 (7)
Fibrosis hepática congénita	2 (7)
Tumoral	2 (7)
Colestasis intrahepática familiar	1 (3)
Deficiencia de alfa 1 antitripsina	1 (3)

b) Antropometría.

Al realizar la comparación de la media entre las mediciones antropométricas del grupo global (n=55), peso, talla, circunferencia media del brazo (CMB) por sexo no se demostró diferencia significativa (tabla 6).

Tabla 6. Comparación de mediciones antropométrica por sexo en 55 pacientes pediátricos con y sin enfermedad hepática crónica.

Medición Antropométrica	Femenino		Masculino		Total		p
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Peso (kg)	27.39	15.0	33.77	18.70	31.86	16.70	0.357
Talla (cm)	104.69	40.0	129.66	29.69	121.32	36.78	0.055
CMB (cm)	18.38	6.42	21.54	7.26	20.76	6.81	0.355

La clasificación de la puntuación z en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica con el criterio de normalidad de -2 a +2 DE se presenta en la tabla 7. En total 7 pacientes se encontraron por debajo de puntuación $z < -2$ DE en el indicador peso para la edad, 7 en talla para la edad, 2 en peso para la talla, 9 en circunferencia media del brazo para la edad y 1 en IMC para la edad.

Tabla 7. Clasificación del estado nutricional de acuerdo a la puntuación Z de indicadores antropométricos en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica (n=30).

Indicador nutricional	<-2 DE	n (%)	>+2 DE	n (%)
Peso para la edad	7	23	3	10
Talla para la edad	7	23	1	3
Peso para la talla	2	7	6	20
CMB para la edad	9	30	3	10
IMC para la edad	1	3	2	7

c) *Clínica:*

En las características clínicas en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica definidas por ictericia, ascitis, hepatomegalia, esplenomegalia y encefalopatía, la ascitis se presentó con mayor frecuencia en 19 pacientes (63%), seguida por ictericia y esplenomegalia 13 pacientes (43%), hepatomegalia 12 (40%) y la menos frecuente fue la encefalopatía en 1 paciente (3%), los datos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación de las características clínicas por grupos etarios en 30 pacientes pediátricos con enfermedad hepática crónica. Los porcentajes se refieren a la frecuencia por grupo etario.

Parámetro clínico	Lactantes		Preescolares		Escolares		Adolescentes		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Ictericia	3	(60)	3	(43)	4	(33)	3	(50)	13	(43)
Ascitis	2	(40)	4	(57)	8	(67)	5	(83)	19	(63)
Hepatomegalia	3	(40)	4	(57)	4	(33)	1	(17)	12	(40)
Esplenomegalia	3	(40)	5	(71)	4	(33)	1	(17)	13	(43)
Encefalopatía	0	(0)	0	(0)	1	(8)	0	(0)	1	(3)

Al realizar asociación de las características clínicas con los grupos etarios no se encontró diferencia estadística significativa, los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Asociación de las características clínicas por grupos etarios en pacientes con hepatopatía crónica. (n=30) (χ^2).

Parámetro clínico		Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
Ictericia	Si	3 (10)	3 (19)	4 (13)	3 (10)	0.762
	No	2 (7)	4 (13)	8 (27)	3 (10)	
Ascitis	Si	2 (7)	4 (13)	8 (27)	5 (17)	0.498
	No	3 (10)	3 (10)	4 (13)	1 (3)	
Hepatomegalia	Si	3 (10)	4 (13)	4 (13)	1 (3)	0.351
	No	2 (7)	3 (10)	8 (27)	5 (17)	
Esplenomegalia	Si	3 (10)	5 (17)	4 (13)	1 (3)	0.169
	No	2 (7)	2 (7)	8 (27)	5 (17)	
Encefalopatía	Si	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0.670
	No	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

d) Variables de laboratorio:

En el grupo de pacientes con hepatopatía crónica se realizó asociación de interpretación de las variables hematológicas, de coagulación y bioquímicas por grupos etarios en el grupo de pacientes con enfermedad hepática crónica sin encontrar en ninguna de ellas diferencia estadística significativa. Los resultados se muestran en las tablas 10, 11 y 12 respectivamente.

Tabla 10. Asociación de variables hematológicas por grupos etarios en pacientes con enfermedad hepática crónica (n=30) (χ^2).

Variable		Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
Anemia	Si	3	2	4	1	0.490
	No	2	5	8	5	
Trombocitopenia	Si	1	4	8	5	0.176
	No	4	3	4	1	
Leucopenia	Si	0	3	5	5	0.052
	No	5	4	7	1	
Neutropenia	Si	0	0	1	1	0.599
	No	5	7	11	5	
Linfopenia	Si	0	2	7	4	0.076
	No	5	5	5	2	

Tabla 11. Asociación de variables de coagulación por grupos etarios en pacientes con enfermedad hepática crónica (n=30) (χ^2).

Variable		Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
TP	Si	2	0	1	1	0.215
	No	3	7	11	5	
TPT	Si	2	0	2	0	0.158
	No	3	7	10	6	
INR	Si	2	2	3	1	0.852
	No	3	5	9	5	

Tabla 12. Asociación de variables bioquímicas por grupos etarios en pacientes con enfermedad hepática crónica (n=30) (χ^2).

		Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
Transaminasemia TGO	Si	3	5	9	3	0.730
	No	2	2	3	3	
Transaminasemia TGP	Si	3	5	9	4	0.936
	No	2	2	3	2	
GGT elevada	Si	3	4	4	4	0.504
	No	2	3	8	2	
BT elevada	Si	3	2	4	3	0.640
	No	2	5	8	3	
BD elevada	Si	3	3	5	3	0.909
	No	2	4	7	3	
Hipoalbuminemia	Si	3	2	5	1	0.469
	No	2	5	7	5	

e) Escalas Pronosticas

Se realizó determinación de la escala pronostica de Child-Pugh que incluye determinaciones clínicas y bioquímicas: ascitis, encefalopatía, tiempos de coagulación, albúmina y bilirrubinas totales, encontrando una mayor frecuencia en la escala A en 20 pacientes (66%), B en 4 (13%) y C en 6 (20%); el grupo etario más afectado con una escala C (peor pronóstico) fue el grupo de lactantes, sin embargo al realizarse asociación de esta escala pronóstica por

grupos etarios, no se encontró diferencia estadística significativa, los resultado se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Asociación de la escala pronóstica de Child-Pugh por grupos etarios en pacientes con hepatopatía crónica (n=30) (χ^2). Los porcentajes se refieren a la frecuencia por grupo etario.

CHILD	Lactantes		Preescolares		Escolares		Adolescentes		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
	p = 0.715									
A	2	(40)	5	(71)	8	(67)	5	(83)	20	(66)
B	1	(20)	1	(14)	1	(8)	1	(17)	4	(13)
C	2	(40)	1	(14)	3	(25)	0	(0)	6	(20)

Así mismo se realizó determinación de la escala pronóstica de PELD (<12 años) o MELD (>12 años) según correspondía la edad del paciente. La escala PELD incluye: edad, nivel sérico de bilirrubinas totales, albúmina, INR e historia de falla en el crecimiento. La escala MELD incluye niveles séricos de creatinina, bilirrubina, INR, sodio sérico y necesidad de diálisis. Se comparó la puntuación obtenida por grupo etario encontrando que los lactantes es el grupo etario con mayor puntuación con una media de 15.10 puntos (± 18). La media general de todos los grupos etarios fue de 6 puntos (± 20). Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Comparación de medias de la escala pronóstica de PELD o MELD y grupos etarios en pacientes con hepatopatía crónica (n=30).

PELD / MELD	Lactantes		Preescolares		Escolares		Adolescentes		Total	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Puntuación	15.10	18.01	4.84	12.81	7.97	7.97	9.50	5.92	6	(20)

e) *Variables de estudios de gabinete*

Del grupo de pacientes con hepatopatía crónica (n=30), en los estudios de gabinete recolectamos ultrasonido doppler en 25 pacientes e identificamos los cambios secundarios de hipertensión portal. Comparamos por grupo etario la asociación de hipertensión portal demostrada por este estudio de imagen sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa, los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Presencia de cambios sugestivos de Hipertensión portal en el ultrasonido doppler hepático en pacientes con hepatopatía crónica. Comparación por grupos etarios (n=25) (χ^2).

Parámetro de Gabinete		Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
USG doppler: Hipertensión portal	Si	5	4	6	3	0.430
	No	0	2	4	1	

f) Variables Histopatológicas:

En el grupo de pacientes con hepatopatía crónica se evaluó el grado de fibrosis y actividad necro-inflamatoria hepática mediante la histopatología utilizando índice de Metavir. De los 30 pacientes con hepatopatía crónica incluidos en nuestro estudio, en tres de ellos la muestra de biopsia hepática fue no valorable. Se observó que el grado de actividad en orden decreciente fue el siguiente: leve en 13 pacientes (43%), moderada en 9 (30%), ausente en 3 (10%) y severa en 2 (7%). En cuanto al grado de fibrosis hepática la presencia de fibrosis en puente (F3) fue la más frecuente en 13 pacientes (43%), seguido de cirrosis (F4) en 6 (20%), fibrosis portal sin septos (F3) en 4 (13%), fibrosis portal con septos (F2) en 2 (7%) y sin fibrosis (F0) en 1 paciente (3%); los resultados se muestran en la tabla 16. Realizamos comparación del índice de actividad e índice de fibrosis por grupo etario sin encontrar asociación estadísticamente significativa; datos mostrados en la tabla 17 y 18.

Tabla 16. Frecuencia de los grados de actividad y fibrosis evaluados por índice de Metavir en 30 pacientes con hepatopatía crónica.

Actividad	n (%)	Fibrosis	n (%)
A0	3 (10)	F0	1 (3)
A1	13 (43)	F1	4 (13)
A2	9 (30)	F2	2 (7)
A3	2 (7)	F3	13 (43)
		F4	6 (20)
No valorable	3 (10)	No valorable	3 (10)

Tabla 17. Asociación del grado de actividad evaluado por el índice de Metavir con los diferentes grupos etarios (n=27) (χ^2).

Índice de Metavir: Actividad	Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
A0: Sin actividad	0	0	2	1	0.068
A1: actividad leve	3	5	4	1	
A2: Actividad moderada	1	1	6	1	
A3: Actividad severa	0	0	0	2	

Tabla 18. Asociación del grado de fibrosis evaluado por el índice de Metavir con los diferentes grupos etarios (n=27) (χ^2).

Índice de Metavir: Fibrosis	Lactantes	Preescolares	Escolares	Adolescentes	p
F0: sin fibrosis	0	0	0	1	0.291
F1: fibrosis portal	0	1	3	0	
F2: fibrosis portal con septos	1	1	0	1	
F3: fibrosis en puente	2	1	7	3	
F4: cirrosis	1	3	2	0	

Variables Genéticas

a) Polimorfismos del gen ECA

En la determinación del polimorfismo del gen de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) Inserción/Delección del grupo global con y sin hepatopatía crónica (n=55) se encontró la forma silvestre del gen (sin mutación)

Inserción/inserción en 21 pacientes (38%), de los polimorfismos el más frecuente fue la presencia de inserción/delección (I/D) en 25 pacientes (46%), seguido de delección/delección (D/D) en 9 (18%). Se realizó asociación de estos genotipos por sexo, encontrando de forma estadísticamente significativa mayor asociación de I/I en los hombres y del polimorfismo I/D en mujeres (tabla 19).

En la determinación de este polimorfismo en el grupo con hepatopatía crónica (n=30) se encontró de igual manera mayor frecuencia del polimorfismo I/D en 15 pacientes (50%), D/D en 3 (10%) y su forma silvestre I/I en 12 (40%). Al realizar asociación por sexo, se encontró asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo I/D con el sexo femenino, datos observados de igual forma en el grupo global; al contrario en este grupo no se observó la asociación estadísticamente significativa encontrada en el grupo global con la presentación silvestre I/I y el sexo masculino (tabla 20).

Tabla 19. Asociación de la forma silvestre y polimorfismos del gen de la ECA con el sexo en el grupo global con y sin hepatopatía crónica (n=55) (χ^2).

ECA		Femenino		Masculino		Total		p
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	
		Inserción/ Inserción	Si	6	(11)	15	(27)	
No	19	(35)	15	(27)	30	(62)		
Inserción/ Delección	Si	16	(29)	9	(16)	25	(46)	0.01
No	9	(16)	21	(39)	30	(55)		
Delección/ Delección	Si	3	(5)	6	(11)	9	(16)	0.487
No	22	(40)	24	(44)	46	(84)		

Tabla 20. Asociación de la forma silvestre y polimorfismos del gen de la ECA con el sexo en el grupo con hepatopatía crónica (n=30) (χ^2).

ECA		Femenino		Masculino		Total		p
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Inserción/ Inserción	Si	4	(13)	8	(27)	12	(40)	0.073
	No	12	(40)	6	(20)	18	(60)	
Inserción/ Deleción	Si	11	(37)	4	(13)	15	(50)	0.028
	No	5	(17)	10	(33)	15	(50)	
Deleción/ Deleción	Si	1	(3)	2	(6)	3	(16)	0.464
	No	15	(50)	12	(40)	27	(84)	

Al comparar la presentación silvestre (I/I) y de los polimorfismos (I/D, D/D) del gen de la ECA entre el grupo de pacientes con hepatopatía crónica y el grupo de referencia con estreñimiento crónico funcional, no se encontró una asociación estadísticamente significativa de alguno de ellos a favor del grupo de hepatopatía crónica, datos mostrados en la tabla 21.

Tabla 21. Asociación de la presentación silvestre y de los polimorfismos del gen ECA entre el grupo con hepatopatía crónica y el grupo comparativo (n=55) (χ^2).

ECA	Hepatopatía crónica		Estreñimiento funcional		Total		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Inserción/ Inserción	12	(22)	9	(16)	21	(38)	0.761
Inserción/ Deleción	15	(28)	10	(18)	25	(46)	0.458
Deleción/ Deleción	3	(5)	6	(11)	9	(16)	0.162

b) Polimorfismo del gen TGFB1

Se realizó análisis del gen TGFB1 en búsqueda del polimorfismo de un solo nucleótido del codón 25 obteniendo una distribución del 100% de la presentación silvestre homocigoto G/G (tabla 22).

Tabla 22. Distribución del gen TGFB1 codón 25 en el grupo con hepatopatía crónica y el grupo de estreñimiento crónico funcional (n=55).

TGFB1 codón 25	Hepatopatía Crónica		Estreñimiento funcional		total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Arg/Arg (G/G)	30	100	25	100	55	100
Arg/Pro (G/C)	0	0	0	0	0	0
Pro/Pro (C/C)	0	0	0	0	0	0

Determinación de TGF-B1 sérico:

Se realizó determinación de los niveles séricos de TGF-B1 en el grupo de hepatopatía crónica (n=30) y en el grupo de referencia con estreñimiento crónico funcional (n=25). Se encontraron niveles séricos elevados en ambos grupos de estudio, siendo mayormente elevados en el grupo sin hepatopatía crónica con una media de 3807.01 pcg/ml (\pm 3806.80 pcg/ml) en comparación con el grupo de hepatopatía crónica con una media de 2431.66 pcg/ml (\pm 2931.98 pcg/ml), los resultados se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Comparación de promedios de los niveles de TGF-B1 sérico entre el grupo de pacientes con hepatopatía crónica (n=30) y el grupo sin hepatopatía crónica (n=25) (τ student).

Nivel sérico TGFB1	Pacientes con Hepatopatía		Pacientes sin Hepatopatía		p
	Media	DE	Media	DE	
Nivel sérico	2431.66	2931.98	3807.01	3808.60	p= 0.136

Se compararon los niveles séricos de TGF-B1 con el grado de fibrosis hepática en 27 pacientes con hepatopatía crónica en los que fue valorable la biopsia hepática encontrando el valor más alto en F0 (sin fibrosis) sin embargo solo se obtuvo 1 paciente con esta puntuación de fibrosis. Entre los estadios que incluyen la presencia de fibrosis, se encontró que F2 (fibrosis portal sin septos) presentó el mayor nivel sérico de TGF-B1 con una mediana de 2584.45 pcg/ml (\pm 2921.14 pcg/ml). La mediana general de todos los grados con fibrosis fue de 2431.66 pcg/ml (\pm 2931.98), datos mostrados en la tabla 24.

Tabla 24. Comparación de los Niveles séricos de TGF-B1 por grado de fibrosis evaluado por índice de Metavir (n=27).

Fibrosis por Índice de Metavir	n / (%)	Mediana Nivel sérico TGF-B1	DE
F0: Sin fibrosis	1 / (4)	4715.50	
F1: Fibrosis portal sin septos	4 / (15)	2584.45	2921.14
F2: Fibrosis portal con septos	3 / (11)	462.10	674.55
F3: Fibrosis en puente	13 / (48)	2153.32	2847.08
F4: Cirrosis	6 / (22)	16136.51	2119.15
Total	27 / (100)	2431.66	2931.98

De igual forma se realizó la comparación del nivel sérico de TGF-B1 con el grado de actividad, encontrando que el grado A2 (actividad moderada) presentó el mayor nivel sérico de TGF-B1 con una mediana de 2768.72 pcg/ ml (\pm 3242.13). La mediana general de todos los grados de actividad fue de 2431.66 pcg/ml (\pm 2931.98 pcg/ml), datos mostrados en la tabla 25.

Tabla 25. Comparación de los Niveles séricos de TGF-B1 por grado de actividad evaluado por índice de Metavir (n=27).

Actividad por Índice de Metavir	n / (%)	Mediana Nivel sérico TGF-B1	DE
A0: Sin actividad	3 / (11)	1931.90	3018.58
A1: Actividad leve	13 / (48)	1802.17	1987.77
A2: Actividad moderada	9 / (33)	2768.72	3242.13
A3: Actividad grave	2 / (8)	53.2	23.47
Total	27 / (100)	2431.66	2931.98

Al realizarse la asociación de los niveles séricos de TGF-B1 entre la actividad leve y moderada con la actividad moderada y severa, se encontró una asociación estadísticamente significativa con valores más altos de TGF-B1 en la actividad severa, datos mostrados en la tabla 26. De igual forma se realizó esta misma asociación entre cada grado de fibrosis evaluado por índice de Metavir sin encontrar asociación estadísticamente significativa.

Tabla 26. Comparación de los niveles séricos de TGF-B1 entre el grado de actividad leve y moderada con actividad moderada y severa (n=27) (U de Mann Withney).

Nivel sérico de TGF-B1	Actividad moderada	Actividad severa
	p	
Actividad leve	0.896	0.038
Actividad moderada	--	0.239

Correlación entre polimorfismos del gen ECA I/D y TGFB1 p25 y grado de fibrosis – actividad hepática:

Se realizó correlación entre los polimorfismos de la gen de la ECA I/D y la presencia global de un alelo deleción con el grado de fibrosis y actividad evaluado mediante índice de Metavir en 27 pacientes con hepatopatía crónica en los que fue valorable la biopsia hepática sin establecer una correlación estadísticamente significativa, datos mostrados en la tabla 27.

Tabla 27. Correlación entre los polimorfismos del gen ECA con el grado de fibrosis y actividad evaluado por índice de Metavir (n=27) Coeficiente de correlación de Spearman.

Parámetro de Metavir	Alelo Deleción		Inserción/Deleción		Deleción/Deleción	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
Grado de Fibrosis	-0.226	0.229	-0.183	0.334	-0.065	0.732
Grado de Actividad	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.00

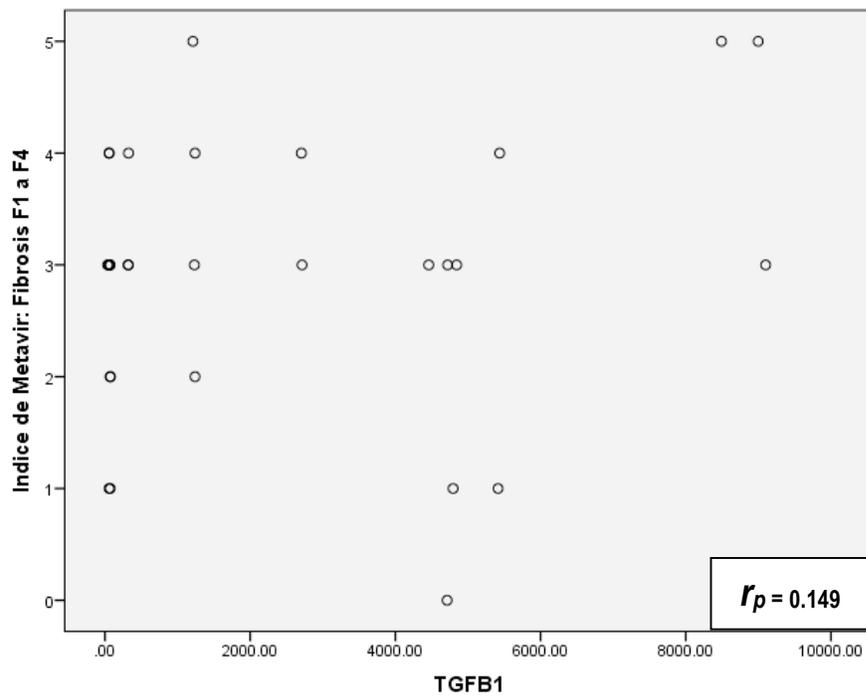
Debido a la ausencia del polimorfismo de un solo nucleótido en el codón 25 del TGFB1 no se realizó correlación entre la presencia de fibrosis y actividad del índice de Metavir evaluado en biopsias hepáticas del grupo de pacientes con hepatopatía crónica.

Correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y grado de fibrosis – actividad hepática:

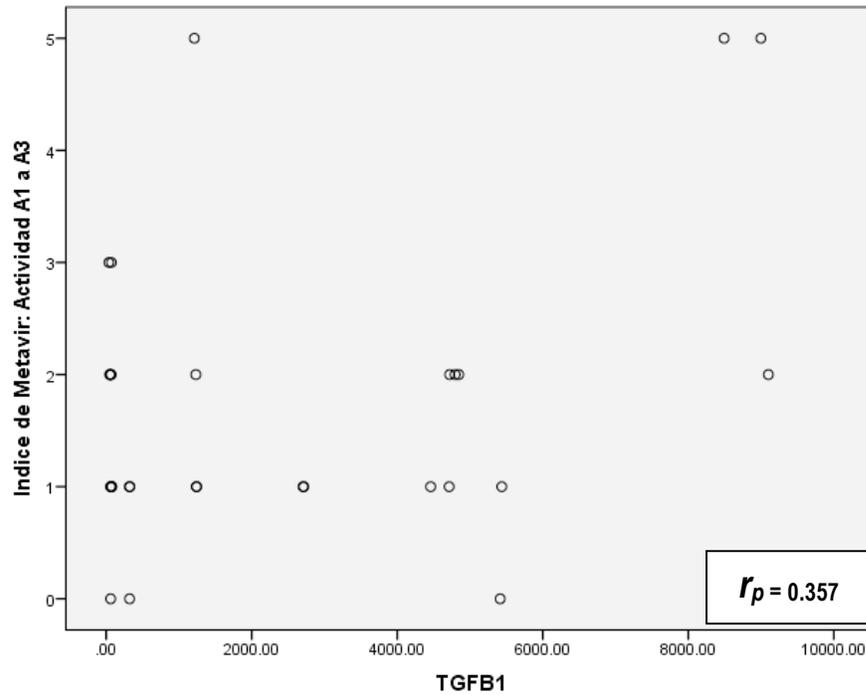
Se realizó correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y el grado de fibrosis hepática evaluado de F1 a F4 así como del grado de actividad evaluado de A1 a A3 por índice de Metavir en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica en los que fue valorable la biopsia hepática (n=27), sin encontrarse correlación estadísticamente significativa, los resultados se muestran en la tabla 28 y gráfica 1 y 2.

Tabla 28. Correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y la puntuación de los grados de fibrosis y actividad evaluado por Índice de Metavir (n=27) (coeficiente de correlación de Pearson).

Índice de Metavir	Nivel Sérico TGF-B1	
	r _p	p
Fibrosis F1-F4	0.149	0.433
Actividad A1-A3	0.357	0.052



Gráfica 1: Correlación de Pearson entre el nivel sérico de TGF-B1 y la presencia de Fibrosis evaluado por índice de Metavir ($p=0.433$)



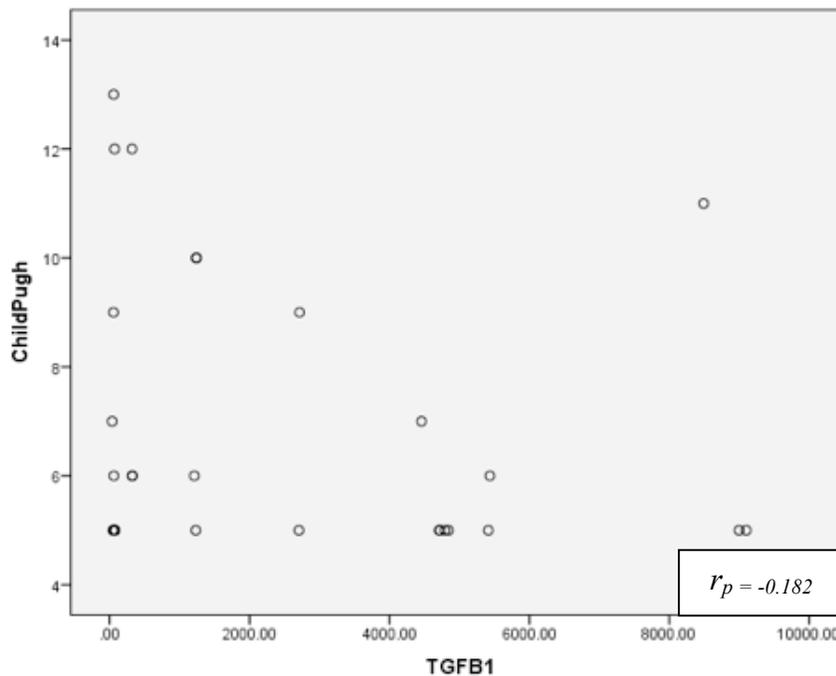
Gráfica 2: Correlación de Pearson entre el nivel sérico de TGF-B1 y la presencia de actividad evaluado por índice de Metavir ($p=0.052$)

Correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y escalas pronósticas:

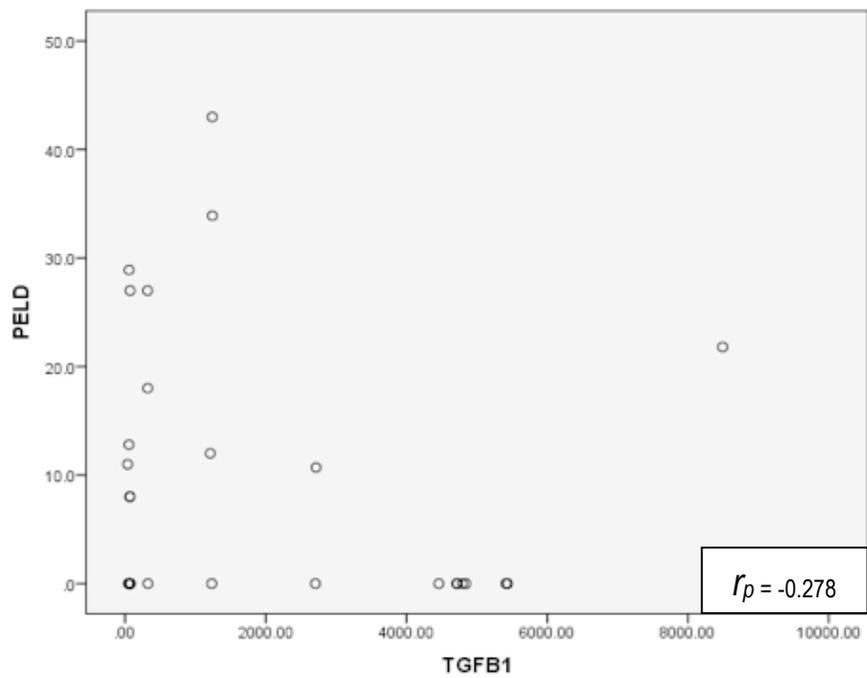
Se realizó correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y la puntuación de las escalas pronósticas de Child-Pugh y PELD en el grupo de hepatopatía crónica (n=30), sin encontrarse correlación estadísticamente significativa, los resultados se muestran en la tabla 29 y gráfica 3 y 4.

Tabla 29. Correlación entre los niveles séricos de TGF-B1 y la puntuación de escalas pronósticas en enfermedad hepática (n=30) (coeficiente de correlación de Pearson).

Escala Pronostica	Nivel Sérico TGF-B1	
	r_p	p
Puntuación Child-Pugh	-0.182	0.337
Puntuación PELD	-0.278	0.138



Gráfica 3: Coeficiente de correlación de Pearson entre los niveles séricos de TGF-B1 y escala pronóstica de Child-Pugh ($p=0.337$)



Gráfica 4: Coeficiente de correlación de Pearson entre los niveles séricos de TGF-B1 y escala pronostica de PELD ($\rho=0.138$)

DISCUSIÓN

En el desarrollo de la hepatopatía crónica existen múltiples factores que determinan la progresión de la fibrogénesis hepática, como son los factores genéticos e inmunológicos. Históricamente se ha considerado el TGF-B1 como la citocina maestra de la fibrogénesis hepática, por otro lado se ha reconocido que la angiotensina y la enzima convertidora de angiotensina producidos por un sistema local de angiotensina aldosterona parece contribuir de forma importante en este proceso. Los polimorfismos asociados a los genes que codifican las proteínas que expresan estas sustancias (ECA y TGFB1) pueden estar involucrados en su estado de producción. En nuestro estudio se investigó la distribución de los polimorfismos Inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y de un solo nucleótido (PSN) del gen de TGFB1 codón 25 así como los niveles séricos de su expresión en pacientes pediátricos con hepatopatía crónica de diversas etiologías. Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio de este tipo realizado en población pediátrica.

Se incluyeron un total 55 pacientes, 30 de ellos pacientes con hepatopatía crónica de diversas etiologías y 25 pacientes con estreñimiento crónico funcional que se utilizó como grupo de referencia.

En el grupo de pacientes con hepatopatía crónica predominó el sexo femenino, siendo mas frecuente el grupo etario de escolares. No se encontró predominio nosológico, sin embargo los diagnósticos más frecuentes fueron la hepatitis autoinmune, seguido de atresia de vías biliares. El estado nutricional está afectado en el 44% de nuestros pacientes. En cuanto a la valoración del estado clínico utilizamos las escalas pronosticas de Child-Pugh y PELD/MELD como punto de orientación, la mayor parte de nuestra población estudiada se mantiene en una escala de Child-Pugh A y B, y un menor porcentaje en la escala C; En la escala

PELD/MELD la media fue de 6 puntos lo que traduce que se mantienen clínicamente estables.

Desde el punto de vista histológico observamos que a pesar de que la mayoría de los pacientes mantienen un adecuado estado clínico predominaron estadios avanzados de fibrosis y/o cirrosis evaluados por el índice de Metavir: F3 (43%) y F4 (20%) con una actividad de leve a moderada (A1 y A2), lo que coincide con la presencia de hipertensión portal evaluada por ultrasonido doppler en el 63% de nuestros pacientes.

En el análisis de la determinación de los polimorfismos de I/D del gen de la ECA se obtuvo una mayor distribución de la presentación I/D seguida en orden decreciente por I/I y D/D tanto en grupo de pacientes con hepatopatía crónica como en el grupo de referencia con estreñimiento crónico funcional. En el grupo de estudio global se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de la presentación genotípica y sexo, encontrando una mayor frecuencia de I/I en hombres e I/D en mujeres en nuestro grupo global de estudio. Sin embargo al realizarse la determinación de dicha correlación en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica, si bien la mayor frecuencia del polimorfismo I/D en mujeres mantuvo la significancia estadística, la mayor frecuencia en hombres de la presentación I/I no mantuvo dicha significancia en la comparación por sexos. Este es un resultado que a pesar de ser significativo en nuestro estudio, debe tomarse con cautela ya que nuestra muestra estudiada es pequeña dentro del contexto de un estudio genético.

Este estudio surge como nueva línea de investigación a partir de las observaciones realizadas por Pérez et al, estudio realizado en nuestro centro hospitalario (datos no publicados), en donde se realizó perfil de trombofilia en pacientes con hepatopatía crónica encontrándose una mayor frecuencia del genotipo del gen de la ECA D/D; aunque nuestros resultados contrastan hay diferencias en cuanto a las características clínicas de la muestra ya que en dicho

estudio el mayor porcentaje de pacientes se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad.

En los estudios experimentales se ha demostrado que la expresión de los polimorfismos del gen de la ECA I/D desempeñan un papel en la fibrogénesis hepática, sin embargo la mayoría de los estudios clínicos no lo han demostrado, como es el caso de nuestro estudio donde no se encontró una asociación significativa entre los polimorfismo I/D y D/D en pacientes con hepatopatía crónica en comparación con el grupo control. Así mismo al realizar la correlación entre la presencia del alelo deleción de forma global, con el grado de fibrosis y actividad evaluado por el índice de Metavir no fue significativa. Por lo tanto inferimos que los polimorfismos de la ECA de tipo I/D no se asocian con un mayor grado de fibrosis y actividad hepática en nuestros pacientes con hepatopatía crónica estudiados.

Nuestros hallazgos son consistentes con lo reportado por Raslan et al ⁴² y Turhan et al ⁴⁴, estudios realizados en población turca y egipcia respectivamente, en ambos se determinó la presencia de los polimorfismos I/D del gen de la ECA en pacientes adultos con hepatopatía crónica de diversas etiologías, si bien en el estudio de Turhan et al ⁴⁴ se encontró una mayor frecuencia del polimorfismo I/D en ambos la asociación con la fibrogénesis hepática no fue estadísticamente significativa.

Una debilidad de nuestro estudio fue la ausencia de la determinación de la expresión de dicho gen, la determinación sérica de la enzima convertidora de angiotensina; En un estudio realizado por Mackawy et al ⁴³, se informó que los niveles séricos de ECA fue más elevada en los pacientes con presentación del polimorfismo D/D lo que puede contribuir al proceso de la fibrogénesis hepática en pacientes con hepatopatía crónica.

En el análisis del PSN del gen TGFB1 codón 25 se obtuvo una distribución de 100% de la presentación homocigota G/G en nuestro grupo de estudio global, es decir tanto en el grupo de pacientes con hepatopatía crónica, como en el grupo

de referencia de pacientes con estreñimiento crónico funcional. Por lo tanto en nuestra población analizada no se encontraron presentaciones de TGFB1 codón 25 heterocigoto G/C ni homocigoto C/C.

Estudios previos realizados a nivel mundial han analizado la asociación de estos polimorfismos del gen TGFB1 codón 25 con la fibrogénesis hepática de pacientes adultos con diferentes etiologías, principalmente con infección crónica por el virus de hepatitis C (VHC), sin embargo los resultados en dichos estudios han sido contradictorios y algunos no han sido concluyentes.

La presentación homocigota G/G de este gen en mención es su presentación silvestre, por lo tanto nuestra población analizada no fue polimórfica para este gen. Investigaciones previas en este ámbito han concluido que el homocigoto G/G es un factor genético predisponente para el inicio de la fibrogénesis hepática, sin embargo debemos de tener en cuenta que este es el genotipo silvestre.

Sánchez et al ³⁷ y Armendáriz et al ³⁸, han analizado la asociación de dicho gen con la progresión de la fibrogénesis hepática, ambas investigaciones son consideradas un antecedente importante para nuestra investigación ya que fueron realizadas en población étnico racial mexicana-mestiza del occidente de México, población que corresponde a nuestro estudio. En ambos se estudió la asociación de los PSN TGFB1 codón 25 en pacientes adultos con hepatopatía crónica secundaria a la infección del VHC y etiología alcohólica, ambos encontraron una mayor distribución del homocigoto G/G en pacientes con fibrosis hepática avanzada en comparación con la población control sana; los autores concluyen que dicho genotipo se asocia a un mayor grado de fibrosis hepática. Nosotros consideramos que estas aseveraciones deben tomarse con cautela debido a limitaciones en el diseño de estudio sobre todo en el tamaño de la muestra.

De manera similar Pereira et al ⁶⁰, encontraron en un mayor grupo de estudio que la frecuencia del genotipo G/G en población brasileña infectada por el VHC fue más alta en comparación a su grupo control sano.

Otras investigaciones al respecto realizadas en diferente tipo de población étnico-racial son consistentes con nuestros resultados. Migita et al ⁶¹, analizaron la frecuencia del PSN TGFB1 codón 25 en población japonesa con infección crónica del virus de hepatitis C, observando una distribución del 100% de la presentación homocigota G/G tanto el grupo de casos como en el grupo control. Romaní et al ³⁶, estudio llevado a cabo en población Iraní con infección crónica de VHC no encontró una asociación significativa de dicho polimorfismo en comparación con el grupo control de población sana.

En cuanto a las presentaciones polimórficas de un solo nucleótido del gen TGFB1 codón 25, es decir la sustitución de un alelo “G por “C”: heterocigoto G/C y homocigoto C/C, no fueron encontrados en el grupo de estudio global de nuestra investigación. En general, estos polimorfismos se han encontrado con mayor frecuencia en población caucásica como en los estudios realizados por Vidigal et al ⁶², Wang et al ³⁵ y Romaní et al ³⁸, con mayor presentación en los grupos controles pero sin significancia estadística en comparación con los grupos de casos, en contraste con los estudios de población mexicana y brasileña realizados por Sánchez et al ³⁷, Armendáriz et al ³⁸ y Pereira et al ⁶⁰, en donde si han establecido una asociación significativa a favor de la población sana. Kilis et al ⁶³, realizaron análisis genético para polimorfismos de TGF-B1 codón 25 en población europea en pacientes con enfermedad renal crónica utilizando grupo control de población sana en donde no se estableció una asociación significativa entre los polimorfismos y la presentación silvestre en el grupo de pacientes con enfermedad renal.

De acuerdo a estos resultados podríamos hipotetizar que la presentación polimórfica puede conferir un factor genético protector para el desarrollo de fibrogénesis hepática tras un estímulo de lesión, en lugar de concluir que una presentación silvestre es un factor de riesgo para ello.

Se debe tener en cuenta que el haplotipo del gen TGF-B1 consiste en 8 presentaciones polimórficas de un solo nucleótido y uno de inserción/delección.

La mayoría de los estudios reportados en la literatura solo se han enfocado en tres o cuatro polimorfismos de dicho gen, es posible que se haya perdido asociación genética para otros polimorfismos por lo que consideramos inapropiado en este momento adjudicar a la presentación homocigoto G/G la responsabilidad de un mayor riesgo para la fibrogénesis hepática, por lo tanto se necesitan estudios genéticos que determinen otros polimorfismos no estudiados hasta este momento.

En la determinación de niveles séricos de TGF-B1 se encontraron niveles elevados en ambos grupos de estudio, incluso mayores en el grupo comparativo de pacientes con estreñimiento crónico funcional.

La capacidad de producción de citocinas tienen un componente genético importante. Se ha descrito previamente que polimorfismos dentro de regiones reguladoras o de secuencias de señal en genes de citocinas pueden estar involucrados en una mayor producción.

Nuestros resultados son consistentes en otros estudios reportados en la literatura. En el estudio realizado por Romaní et al, en población Iraní en donde se encontró la presentación silvestre del gen TGFB1 codón 25 G/G se observaron niveles séricos elevados de TGF-B1 tanto en el grupo de casos con hepatopatía crónica como en el grupo comparativo sano, sin diferencia estadística significativa. Otros estudios han presentado resultados similares como el de Awad et al ⁶⁴ y Dunning et al ⁶⁵ en los que se ha concluido que la presencia de un alelo "G" en el gen estudiado exhibe un fenotipo de producción de citocina alto. Esto podría ser el caso de nuestra investigación en donde se encontraron niveles muy altos de TGF-B1 en pacientes portadores del genotipo homocigoto G/G del TGFB1 codón 25. Sin embargo nosotros tenemos nuestras reservas ya que como se menciona anteriormente la falta de estudio de otros polimorfismos pueden generar pérdida de asociación genética de otros polimorfismos de TGFB1 en su estado de producción.

En nuestro estudio no se encontró correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de TGF-B1 con el grado de fibrosis y actividad evaluado

por índice de Metavir en las biopsias de tejido hepático del grupo con hepatopatía crónica. Sin embargo llama la atención que al realizar comparación de dichos niveles por grado de actividad esta fue más elevada de forma significativa en el grupo de pacientes con actividad severa versus actividad leve. Por lo tanto inferimos que el nivel sérico de TGF-B1 no influye en el grado de fibrosis hepática pero si en el grado de actividad.

Los niveles altos de TGF-B1 sérico en el grupo de referencia “grupo sano” es llamativo, y no esperado, este grupo corresponde principalmente a niños con estreñimiento crónico funcional, directamente no encontramos relación y justificación, sin embargo reconocemos que este grupo podría estar traslapado con síntomas de un síndrome de intestino irritable (SII), que en edad pediátrica es difícil de diferenciar; en este sentido si se ha estado investigando recientemente el papel de las citocinas, como el reporte de Vázquez et al ⁶⁶, donde se demuestra en pacientes pediátricos una alteración en la regulación inmune, y existen algunos estudios donde han evidenciado niveles altos de TGF-B1, esto explicado por ser un modulador de la respuesta inmunológica que se expresa constitutivamente en el intestino, sin estar aclarado aún su papel en SII, en este estudio de referencia han encontrado también niveles elevados de la citocina proinflamatoria TNF- α , tanto en el SII como en controles, pero sin diferencias significativas entre ambos grupos. Esta elevación de la TGF-B1 en el grupo control es novedoso, pero lo ha sido en estudios recientes, como esta referencia, y tratando de entender más su función, por un lado podemos recordar que es una citocina multifuncional y que se ha asociado a efectos gastrointestinales y extraintestinales.

Los niveles séricos de TGF-B1 que observamos en nuestro estudio son muy altos, respecto a ello la literatura es ambigua, se han reportado niveles séricos que no son consistentes entre diferentes estudios ya que estos pueden diferir al tipo del kit comercial utilizado para su determinación, por lo que a pesar de que sabemos que nuestros resultados son altos no hemos podido determinar un

punto de corte de normalidad, este conflicto ya se ha reportado previamente en otros estudios como en el ya mencionado de Vázquez et al ⁶⁶.

Reconocemos que nuestro estudio tiene debilidades, la heterogeneidad del grupo de pacientes con hepatopatía crónica en los diagnósticos así como la presencia de estreñimiento crónico funcional en nuestro grupo control pueden generar sesgos en nuestros resultados. Así mismo consideramos debilidad la falta de determinación de la expresión del gen de la ECA con la determinación sérica del mismo. Y por último la ausencia de un punto de corte de normalidad de los niveles séricos de TGF-B1.

CONCLUSIONES

En resumen, en el presente estudio se realizó la determinación de los polimorfismos del gen de la ECA y TGFB1 y el nivel sérico de TGF-B1 en pacientes con hepatopatía crónica y en un grupo de referencia, con las siguientes conclusiones:

- 1.-El grupo etario y sexo más frecuente fue escolares y femenino respectivamente.
- 2.-Los diagnósticos de hepatopatía crónica fueron muy diversos, predominando Atresia de vías biliares en lactantes y Hepatitis autoinmune en escolares y adolescentes.
- 3.- En la evaluación clínica se aplicó Child Pugh siendo más común A y B, y PELD/MELD con puntuación predominante en 6 puntos, lo que reflejó estabilidad clínica y bioquímica.
- 4.-El estado nutricional evaluado por CMB/E estuvo afectado en el grupo en el 44% de los casos.
- 5.- En la evaluación histológica, predominaron estadios avanzados de fibrosis/cirrosis, evaluados por índice de Metavir F3 (43%) F4 (20%), con un predominio de actividad de leve a moderada (A1 A2).
- 6.- En la distribución de los polimorfismos de I/D del gen de la ECA tuvo una mayor distribución la presentación I/D seguida por I/I y D/D tanto en grupo de pacientes con hepatopatía crónica como en el grupo de referencia.
- 7.- No se encontró una asociación significativa entre los polimorfismo I/D y D/D en pacientes con hepatopatía crónica en comparación con el grupo control.
- 8.- No se encontró asociación significativa al realizar la correlación entre la presencia del alelo deleción, I/D y D/D con el grado de fibrosis y actividad evaluado por el índice de Metavir
- 9.- En el análisis del PSN del gen TGFB1 codón 25 se obtuvo una distribución de 100% de la presentación homocigota G/G en el grupo de hepatopatía crónica y en el grupo de referencia.

10.-No se encontraron presentaciones de TGFB1 codón 25 heterocigoto G/C ni homocigoto C/C en grupo de hepatopatía crónica ni en grupo de referencia.

11.- La determinación de niveles séricos de TGF-B1 se encontraron elevados en ambos grupos de estudio.

12.- No se encontró correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de TGF-B1 la presencia de fibrosis evaluado por índice de Metavir en las biopsias de tejido hepático del grupo con hepatopatía crónica.

13.-No se encontró correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de TGF-B1 con la presencia de actividad evaluado por índice de Metavir en las biopsias de tejido hepático del grupo con hepatopatía crónica; sin embargo hubo una asociación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de TGF-B1 y la comparación entre el grado de actividad leve a severa (A1 y A3).

Consideramos que nuestro estudio es interesante y el primero en llevarse a cabo en un grupo pediátrico, viene a sumarse a las investigaciones que existen en diferentes partes del mundo, y a dar otra visión a los grupos de estudio en México, los cuales han mostrado resultados inconsistentes y aún limitados, esto probablemente por las diferencias entre la metodología, las diversas poblaciones analizadas, la heterogeneidad de etiologías que implican diferentes mecanismos fisiopatológicos participantes y grados de lesión hepática, la interpretación de los polimorfismos, particularmente el TGFB1 G/G, y el uso de diferentes kits comerciales para la determinación de citocinas.

Reconociendo que nuestro grupo de estudio es pequeño, aún considerando el uso de un grupo de referencia que ha permitido ampliar una visión comparativa, concluimos que en este momento los polimorfismos I/D del gen de la ECA, los PNS del gen TGFB1 p25 y su estado de producción de citocina TGF-B1 no son útiles como parte de un perfil genómico y/o como biomarcadores de la fibrogénesis hepática. Se requieren más estudios genéticos moleculares con unificación de criterios metodológicos que incluya haplotipos completos de estos

genes para lograr determinar un perfil genómico y así mismo dilucidar la multifunción, presencia en el organismo y papel en la fibrosis hepática de la citocina TGF-B1.

IMPLICACIONES

Este estudio demuestra que la implicación genética en la fibrogénesis hepática es un campo muy amplio de estudio, y de este estudio exploratorio consideramos las siguientes implicaciones y campo a futuro:

- 1.- Lograr la determinación del polimorfismo TGFB1 codón 10, el cual por cuestiones de factibilidad no se llevo a cabo.
- 2.- Incrementar el tamaño de muestra del grupo de hepatopatía crónica, y lograr estadificar por patología específica o entidades nosológicas.
- 3.- Elección de grupo comparativo, sin patología, ni síntomas, y conocer la etnicidad.
- 4.- Realizar un perfil genómico más amplio, y ampliar otras pruebas relacionadas a fibrosis y papel del gen de ECA con medición de su expresión con la determinación de su nivel sérico.
- 5.-Lograr determinar niveles de normalidad de la TGF-B1, y equiparar los diferentes resultados de la variabilidad de kits o marcas comerciales.
- 6.-De los resultados obtenidos en el grupo control con estreñimiento crónico, patología funcional, y la revisión con estudios iniciales en niños abre la posibilidad o una línea de investigación sobre el papel de citocinas en dichas entidades.
- 7.-Actualmente se encuentra en proceso la entrega de resultados a los padres de los pacientes del grupo de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Consejo de Salubridad General (2009). Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Hepática Crónica. Ciudad de México: Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud, pp. 1-44.
- 2.-McPherson S, Anstee QM. Changing Epidemiology of Chronic Liver Disease Among Ethnic Groups in the United States. *Hepatology*. 2016; 64(6): 1843-1845.
- 3.-Fernández SB, Gutiérrez G, Viguri R. Principales causas de mortalidad infantil en México: tendencias recientes. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2012; 69(2): 144-148.
- 5.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía: Mortalidad [Internet]. Ciudad de México: 3 de julio 2017 [citado 14 marzo 2018]. Disponible en:
- 4.-Sistema Nacional de Información en Salud. Boletín de Información Estadística 2014-2015 [Internet]. Gobierno de Mexico [citado 08 Mar 2018]. Disponible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>.
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
- 6.-Kim G, Kim J, Lim YL, Kim MY, Soon B. Renin-angiotensin system inhibitors and fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. *Hepatol Int*. 2015; 10(5): 819-828.
- 7.-Moreira S, Antunes T, Feltenberg JD, Santos SH. The Role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides*. 2014; 62: 189-196.
- 8.-Cordova J, Jericho H, Azzam RK. An Overview of Cirrhosis in Children. *Pediatric Annals*. 2016; 45(12): 427-432.
- 9.-Goldschmidt I, Baumann U. Hepatic fibrosis in paediatric liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012; 36(3): 268-270.
- 10.-Squires RH, Ng V, Romero R, Ekong U, Hardikar W, Emre S, et al. Evaluation of the Pediatric Patient for Liver Transplantation: 2014 Practice Guideline by the American Association for the study of Liver Diseases, American Society of Transplantation and the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Hepatology*. 2014; 60(1): 363-398.
- 11.-Tsóchatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2014; 383 (9930): 1749-1761.
- 12.-Pereira RM, Souza RA, Da Costa FL, Martins M, Simoes AC. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol*.

2009; 15(21): 2579-2586.

13.-Grace JA, Herath CB, Mak KY, Burrell LM, Angus PW. Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options. *Clin Sci*. 2012; 123(4): 225-239.

14.-Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. 2008; 134(6): 1655-1669.

15.-Lee UE, Friedman SL. Mechanism of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25(2): 195-206.

16.-Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015; 62(1): 15-24.

17.-Goldschmidt I, Baumann U. Hepatic fibrosis in paediatric liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012; 36(3): 268-270.

18.-Kamruzzman M, Mohamed U, Shannon G. The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis. *Ex Biol Med*. 2011; 236(5): 557-566.

19.-Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010; 30(3): 215-225.

20.-Kisseleva T, Brenner DA. Anti-Fibrogenic Strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25(2): 305-317.

21.-Lubel JS, Hertah CB, Burreli LM, Angus PW. Liver disease and the renin-angiotensin system: Recent discoveries and clinical implications. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23(9): 1327-1338.

22.-Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38(4): 499-507.

23.- Abbas G, Silveira MG, Lindor KD. Hepatic Fibrosis and the Renin-Angiotensin System. *Am J Ther*. 2011; 18(6): 202-208.

24.- Efe C, Cengiz M, Kahramanoglu-Aksoy E, Yimaz B, Ozseker B, Beyazt Y, et al. Angiotensin-converting enzyme for noninvasive assessment of liver fibrosis in autoimmune hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 27(6): 649-654.

25.-Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Blockade of renin-angiotensin-system in antifibrotic therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22(1): 93-95.

- 26.-Simoes AC, Miranda AS, Rocha NP, Teixeira AL. Renin angiotensin system in liver diseases: Friend or foe?. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(19): 3396-3406.
- 27.-Moreira S, Antunes T, Feltenberger JD, Sousa SH. The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides*. 2014; 62: 189-196.
- 28.-Sancho-Bru P, Gines P. Targeting the renin-angiotensin system in liver fibrosis. *Hepatol Int*. 2016; 10(5): 730-732.
- 29.-Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-B an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 2012; 10(183): 183-206.
- 30.- Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor-B in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Research*. 2017; 6(1): 1-31.
- 31.-Blobe GC, Schiemann W, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor B in Human Disease. *N Engl J Med*. 2000; 18(342): 1350- 1358.
- 32.-Hernandez V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Rev Pathol Mech Dis*. 2011; 6(1): 425-456.
- 33.-Gálvez FJ, Sandoval AS, Armendaríz J. El factor de crecimiento transformante B como blanco terapéutico. *Salud Publ Mex*. 2004; 46(4): 341-350.
- 34.-Cebinelli GC, Truglio KP, Garcia SB, Oliveira KB. TGF-B1 functional polymorphisms: a review. *Eur Cytokine Netw*. 2016; 27(4): 81-89.
- 35.-Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, et al. Transforming growth factor-B1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasian with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2015; 11(13): 1929-1936.
- 36.-Romani S, Azimzadesh P, Mohebbi SR, Kazemian S, Almasi S, Naghoosi H, et al. Investigation of Transforming Growth Factor-B1 Gene Polymorphisms Among Iranian Patients With Chronic Hepatitis C. 2011; 11(11): 901-906.
- 37.-Sánchez MG, Álvarez BA, Gómez BC, Troyo R, Sánchez LV, Zamora AL, et al. Association of Genetic Polymorphisms With Histological Grading of Necroinflamattion, Staging of Fibrosis, and Liver Function in Mexican With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Investig Med*. 2013; 61(7): 1088-1096.

- 38.-Armendariz J, Rincon AR, Muñoz JF, Bueno M, Oregon E, Islas MC, et al. Fibrogenic Polymorphisms (TGF-B, PAI-1, AT) in Mexican Patients With Established Liver Fibrosis. Potential Correlation With Pirfenidone. *J Investig Med*. 2008; 56(7): 944-953.
- 39.-Yu-Sheng L, Shu-Yan N, Ying M, Xiao-Lan S, Xu-When Z, Hai-hua L, et al. Angiotensin II Facilitates Fibrogenic Effect of TGF-B1 through Enhancing the Down-regulation of BAMBI Caused by LPS: A New Pro-Fibrotic Mechanism of Angiotensin II. *PLoS One*. 2013; 8(10): 1-11.
- 40.-Xu XD, Zeng K, Gong CS, Chen YQ. Transforming growth-B genetic polymorphisms on development of liver cirrhosis in a meta-analysis. 2013; 40(1): 535-543.
- 41.-Han SL, Wang Q, Wang XQ, Mu ZB. Association between transforming growth factor-B1 polymorphisms and liver cirrhosis: a meta-analysis in a single ethnic group. *Int J Clin Exp Med*. 2016; 9(12): 22969-22971.
- 42.-Raslan HM, Amr KS, Elhosary YA, Ezzat WM, Abdullah NA, El-Batae HE. Possible role of angiotensin-converting enzyme polymorphism on progression of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011; 105(7): 396-400.
- 43.-Mackawy AM, Badawy ME, Megahed OA. Angiotensin converting enzyme (ACE D/I) polymorphism and its relation to liver fibrosis progression in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Egypt Med Assoc*. 2012; 13(3): 291-299.
- 44.-Turhan NK, Llikhan SU, Hamamcioglu AC, UStundag Y, Dursun A, Kokturk F. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism (insertion/deletion) and liver fibrosis in Turkish patients from the western Black Sea región, Turkey. *Genet Mol Res*. 2015; 14(4): 17079-17090.
- 45.-Vargas G, Hernández G, Rodríguez JM, Pérez N, Pavón Z, Fragoso JM, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Gene (ACE) Insertion/Deletion Polymorphism in Mexican populations. *J Human Biol*. 2004; 75(6): 889-896.
- 46.-Eskandari E, Metanat M, Pahlevani E, Nakhzari T. Association between TGFB1 polymorphisms and chronic hepatitis B in an Iranian population. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(3): 301-308.
- 47.-Mohy A, Fouad A; Role of transforming growth factor-B1 in serum and -509 C>T promoter gene polymorphism in development of liver cirrhosis in Egyptian patients. *Meta Gene*. 2014; 2: 631-637.
- 48.-Falletti E, Fabris C, Toniutto P, Fontanini E, Cussing A, Bitetto D, et al. TGF-

B1 genotypes in cirrosis: Relationship with the occurrence of liver cáncer. *Cytokine*. 2008; 44(2): 256-261.

49.-Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver Biopsy. *Hepatology*. 2009; 49(3): 1017-1044.

50.-Lefkowitz JH. Liver Biopsy Assessment in Chronic Hepatitis. *Arch Med Res*. 2007; 38(6): 634-643

51.-Bedossa P, Carrat F. Liver biopsy: The best, not the gold standard. *J Hepatol*. 2009; 50(1): 36-41.

52.-Cequera A, García de León MC. Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas. *Rev Gastroenterol Mex*. 2014; 79(3): 187-199.

53.-Zhu Q, Li N, Li F, Zhou Z, Han Q, Lv L, et al. Therapeutic effect of renin angiotensin system inhibitors on liver fibrosis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2016; 17(1): 1-9.

54.- Shim KY, Eom YW, Kim MY, Kang SH, Baik SK. Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. *Korean J Intern Med*. 2018; 33(3): 453-461

55.-Grizzi F. Pirfenidone: a potential therapeutic option in the Treatment of liver fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36(10): 961-962.

56.-Mora DA, Sánchez C, Montoya M, Sánchez S, Lucano S, Macías J, et al. Role and New insights of Pirfenidone in Fibrotic Diseases. *Int. J. Med. Sci*. 2015; 12(11): 840-847.

57.-Rockey DC. Current and Future Anti-fibrotic Therapies for Chronic Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2008; 12(4): 2-25.

58.-García L, Hernández I, Sandoval A, Salázar A, García J, Vera J, et al. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol*. 2002; 37(6): 797-805.

59.-Flores L, Sandoval AS, Mena MG, Lucano S, Arellano A, Sánchez MG, et al. Treatment with pirfenidone for two years decreases fibrosis, cytokine levels and enhances CB2 gene expression in patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol*. 2014; 14(131): 2-11.

60.-Pereira F, Pinheiro N, Ferreira I, Azevedo TM, Carneiro D, Galvao M. Association of TGF-B1 Codon 25 (G915C) Polymorphism with Hepatitis C Virus Infection. *J Med. Virol*. 2008; 80: 58-64.

- 61.-Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, et al. Cytokine gene polymorphism in Japanese patients with hepatitis B virus infection – association between TGF-B1 polymorphism and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2005; 42: 506-510.
- 62.-Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol.* 2002; 36: 271–277.
- 63.-Kilis K, Mastalerz A, Zwolinska D, Grzeszczak K, Zachwieja, Zachwieja J, et al. The rs1800471 Polymorphism of TGFB1 Gene, Serum TGF-Beta 1 Level and Chronic Kidney Disease Progression. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 2: 37-46
- 64.-Awad M, El-Gamel A, Hasleton P, Turner D, Sinnott P, Hutchinson I. Genotypic variation in the transforming growth factor-B1 gene: Association with Transforming Factor-B1 production, Fibrotic Lung Disease and Graft Fibrosis after Lung Transplantation. *Transplantation.* 1998; 66(8): 1014-1020.
- 65.-Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, et al. A Transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res.* 2003; 63(10): 2610-2615.
- 66.-Vázquez R, Gutiérrez G, Urbán M, Velázquez N, Fortoul TI, Reyes A, et al. Perfil de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en pacientes pediátricos con síndrome de intestino irritable. *Rev Gastroenterol Mex.* 2015; 80(1): 6-12.

ANEXOS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN:

“DETERMINACION DE LOS POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ECA, TGF-B1 Y NIVEL SÉRICO DE TGF-B1 EN PACIENTES CON HEPATOPATIA CRONICA DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA CMNO”

Número de registro:

Guadalajara, Jalisco. A _____ de _____ del 2018.

Nombre del paciente: _____ NSS _____

Justificación y objetico del estudio: Muchas cosas pueden estar involucradas en la enfermedad crónica del hígado, algunas de ellas son variaciones en unas partículas llamadas genes, que hay dentro de nuestras células, que nos heredan nuestros padres y que determinan las características de todo nuestro cuerpo así como la predisposición a algunas enfermedades. Identificar a las partículas que se involucran en las enfermedades del hígado es importante para hacer investigaciones de nuevos tratamientos. Dado que mi hija (o) padece problemas en el hígado, se nos invitó a participar en esta investigación cuyo objetivo es estudiar dos de estas partículas ya mencionadas en mi hija (o) y saber si están o no involucrados en su enfermedad.

Se me ha informado que la participación de mi hija (o) es voluntaria y consistirá en lo siguiente:

1. Tomar una muestra de sangre de 7.5 ml (un tubo con tapón rojo y un tubo con tapón morado), que equivale aproximadamente a 2 cucharadas cafeteras de sangre, con la que se analizará si mi hija (o) presenta cambios en dos partículas que existen dentro de sus células llamadas genes que predispongan a la producción de algunas sustancias que causen cicatrices en el hígado, esta muestras se tomarán junto los estudios de laboratorio de rutina en el seguimiento de la enfermedad. La obtención de la muestra de sangre será en la vena de su brazo, como normalmente se hace cuando va al laboratorio.

2. Revisión del expediente clínico donde se tomarán los datos clínicos (peso, talla, estado nutricional, alteraciones mentales y/o presencia de agua en su panza), reporte de biopsia de hígado tomado previamente en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de mi hija (o), siempre guardando la confidencialidad y privacidad de mi hija (o).

Posibles riesgos y molestias: Se me explicó que la obtención de la muestra de sangre es en una vena del brazo y en ocasiones puede causar alguna molestia como por ejemplo, dolor al momento del piquete de la aguja y la posibilidad de la formación de un moretón o de una bolita que le cause molestias por unos días.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio: Estoy enterada (o) que no recibiré remuneración económica ni material por la participación de mi hija (o) en este estudio. Obtendré el beneficio de conocer el resultado de los análisis realizados en la consulta subsecuente de mi hija (o).

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: Se me informó que se me notificarán los resultados del análisis de sangre que se tomen en mi hija (o); y si se encuentra alguna anomalía se me otorgará la asesoría médica correspondiente y en mi hija (o) la atención médica y el manejo necesario que se otorgue dentro del IMSS.

Participación o retiro: Se me explico que la participación de mi hija (o) en este estudio es completamente voluntaria. Nuestra decisión, no afectará su relación con el IMSS ni su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que ya recibe. Estoy enterada (o) que tengo derecho de retirar a mi hija (o) del estudio si así lo considero, sin embargo se me notificó que la muestra de sangre una vez analizada se ingresará a un almacén y se perderá la identidad de la misma por lo que ya no se podrá eliminar dicha muestra.

En caso de que mi hija (o) sea mayor de 7 años, así como a mi, se le explicó también en que consiste este estudio y se le ha solicitado su asentimiento estando de acuerdo con ello.

Privacidad y confidencialidad: Se me explicó que toda la información que proporcione será de carácter estrictamente confidencial, es decir, será utilizado únicamente por los investigadores del proyecto. Para proteger la identidad de mi hija (o), los datos del expediente clínico que se tomen, así como de los análisis de sangre se le asignará un número para identificarlos; las muestras de sangre una vez analizadas se ingresarán a donde serán almacenadas, perdiendo la

identidad de mi hija (o). También se me explicó que se me proporcionará la información para el bienestar de mi hija (o) (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley.

Se me dijo que cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se mencionarán nombres de pacientes, su identidad será protegida y ocultada.

Debido a que hay muchas cosas más por estudiar en las enfermedades del hígado, también se me pidió mi autorización para que al término de esta investigación se pueda guardar lo que sobra de la muestra de sangre, con el objetivo de ser utilizadas en futuras investigaciones. Estoy enterada (o) que de aceptar, este material se almacenará en congelación en un lugar especial. También se me explicó que al momento del ingreso de la muestra a este lugar, se guardará con un número para su identificación y no con sus datos personales perdiéndose la identidad de la misma por lo que ya no podré recuperar dicha muestra de sangre, es decir en ningún momento se sabrá el nombre de la persona a quien corresponde la muestra de sangre. También estoy enterada (o) que para poder utilizarlo en otros estudios relacionados, estos deben de estar registrados en los Comités de Investigación y ética correspondientes. Por lo anterior he decidido lo siguiente:

- Sí autorizo que se tome muestra para este estudio y guardar el sobrante para estudios futuros
 Sí autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
 No autorizo que se tome la muestra.

Beneficios al término del estudio: se me informó que obtendré el beneficio de conocer los resultados de los análisis de sangre realizados en mi hija (o), además de ser necesario, mi hija (o) recibirá el manejo médico oportuno que se otorgue dentro del IMSS. Así mismo estoy enterada (o) del beneficio en general del estudio, esperando que los resultados ayuden a los médicos a conocer algunos factores que se relacionan con las enfermedades del hígado, apoyando futuras investigaciones para encontrar nuevos tratamientos médicos.

Se me ha explicado que en caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podré dirigirme con el investigador clínico responsable: Dr. Francisco José López Rodríguez; teléfono celular: (311) 1848454; o bien con el director de la investigación: Dra. Yolanda Castillo de León. Teléfono: (33) 3617 0060 Extensión 31 727.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podré dirigirme a la Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Declaración de consentimiento informado: Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas se contestaron a mi satisfacción.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en que mi hija (hijo) participe en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de ambos padres
o tutores o representante legal

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1
Nombre, dirección, relación y firma

Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN:

“DETERMINACION DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ECA, TGF-B1 Y NIVEL SÉRICO DE TGF-B1 EN PACIENTES CON HEPATOPATIA CRONICA DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA CMNO”

(GRUPO DE REFERENCIA)

Número de registro:

Guadalajara, Jalisco. A _____ de _____ del 2018.

Nombre del paciente: _____ NSS _____

Justificación y objetivo del estudio: Muchas cosas pueden estar involucradas en la enfermedad crónica del hígado, algunas de ellas son variaciones en unas partículas llamadas genes, que hay dentro de nuestras células, que nos heredan nuestros padres y que determinan las características de todo nuestro cuerpo así como la predisposición a algunas enfermedades. Identificar a las partículas que se involucran en la enfermedad del hígado es importante para el estudio de nuevos tratamientos; el objetivo de esta investigación es estudiar si estas partículas mencionadas están o no involucradas en el desarrollo de enfermedades del hígado. De forma inicial el estudio se realiza con niños que padezcan esta enfermedad, pero también se tiene que comprobar que estas variaciones no se encuentren presentes en la población general, en este caso particular en niños con estreñimiento crónico funcional. Por tal motivo se nos invitó a participar en este estudio como parte de un grupo de pacientes llamados “comparativos o de referencia”.

Se me ha explicado que la participación de mi hija (o) es voluntaria y consistirá en lo siguiente:

1. Se me ha pedido que mi hija (o), al momento de tomar los exámenes de laboratorio de rutina utilizados para su consulta de seguimiento, done una muestra de sangre de 7.5 ml (un tubo con tapón rojo y un tubo con tapón morado), que equivale aproximadamente a 2 cucharadas cafeteras de sangre, con la que se analizará si mi hija (o) presenta cambios en las partículas ya mencionadas, que hacen producir sustancias que causen cicatrices en el hígado. La obtención de la muestra de sangre será en la vena de su brazo, como normalmente se hace cuando va al laboratorio.

Posibles riesgos y molestias: Se me informó que la obtención de la muestra de sangre de la vena del brazo en ocasiones puede causar alguna molestia como por ejemplo, dolor al momento del piquete de la aguja y la posibilidad de la formación de un moretón o de una bolita que le cause molestias por unos días

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio: Estoy enterada (o) que no recibiré remuneración económica ni material por la participación de mi hija (o) en este estudio. Obtendré el beneficio de conocer el resultado de los análisis realizados en la consulta subsecuente de mi hija (o).

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: Se me informó que se me notificarán los resultados del análisis de sangre que se tomen en mi hija (o); y si se encuentra alguna anomalía se me otorgará la asesoría médica correspondiente y en mi hija (o) la atención médica y el manejo necesario que se otorgue dentro del IMSS.

Participación o retiro: Se me explico que la participación de mi hija (o) en este estudio es completamente voluntaria. Nuestra decisión, no afectará su relación con el IMSS ni su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que ya recibe. Estoy enterada (o) que tengo derecho de retirar a mi hija (o) del estudio si así lo considero, sin embargo se me notificó que la muestra de sangre una vez analizada se ingresará a un almacén y se perderá la identidad de la misma por lo que ya no se podrá eliminar dicha muestra.

En caso de que mi hija (o) sea mayor de 7 años, así como a mi, se le explicó también en qué consiste este estudio y se le ha solicitado su asentimiento estando de acuerdo con ello.

Privacidad y confidencialidad: Se me explicó que toda la información que proporcione será de carácter estrictamente confidencial, es decir, será utilizado únicamente por los investigadores del proyecto. Para proteger la identidad de mi hija (o), los datos del expediente clínico que se tomen, así como de los análisis de sangre se le asignará un número para identificarlos; las muestras de sangre una vez analizadas se ingresarán a donde serán almacenadas, perdiendo la identidad de mi hija (o). También se me explicó que se me proporcionará la información para el bienestar de mi hija (o) (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley. Se me dijo que cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se mencionarán nombres de pacientes, su identidad será protegida y ocultada.

Debido a que hay muchas cosas más por estudiar en las enfermedades del hígado, también se me pidió mi autorización para que al término de esta investigación se pueda guardar lo que sobra de la muestra de sangre, con el objetivo de ser utilizadas en futuras investigaciones. Estoy enterada (o) que de aceptar, este material se almacenará en congelación en un lugar especial. También se me explicó que al momento del ingreso de la muestra a este lugar, se guardará con un número para su identificación y no con sus datos personales perdiéndose la identidad de la misma por lo que ya no podré recuperar dicha muestra de sangre, es decir en ningún momento se sabrá el nombre de la persona a quien corresponde la muestra de sangre. También estoy enterada (o) que para poder utilizarlo en otros estudios relacionados, estos deben de estar registrados en los Comités de Investigación y ética correspondientes. Por lo anterior he decidido lo siguiente:

- Sí autorizo que se tome muestra para este estudio y guardar el sobrante para estudios futuros
 Sí autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
 No autorizo que se tome la muestra.

Beneficios al término del estudio: se me informó que obtendré el beneficio de conocer los resultados de los análisis de sangre realizados en mi hija (o), además de la asesoría médica correspondiente en la prevención de la enfermedad en caso de ser un resultado positivo y/o de ser necesario, mi hija (o) recibirá el manejo médico oportuno que se otorgue dentro del IMSS. Así mismo estoy enterada (o) del beneficio en general del estudio, esperando que los resultados ayuden a los médicos a conocer algunos factores que se relacionan con las enfermedades del hígado, apoyando futuras investigaciones para encontrar nuevos tratamientos médicos.

Se me ha explicado que en caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podré dirigirme con el investigador clínico responsable: Dr. Francisco José López Rodríguez; teléfono celular: (311) 1848454; o bien con el director de la investigación: Dra. Yolanda Castillo de León. Teléfono: (33) 3617 0060 Extensión 31 727.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podré dirigirme a la Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Declaración de consentimiento informado: Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas se contestaron a mi satisfacción. Al firmar este formato estoy de acuerdo en que mi hija (o) participe en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de ambos padres
o tutores o representante legal

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1
Nombre, dirección, relación y firma

Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma

Obtención de ADN: Método de Miller.

De cada muestra de sangre periférica se realizó la separación de leucocitos para lo cual se colocaron inicialmente en refrigeración aproximadamente una hora. Se agregaron 30 ml de solución de lisis de eritrocitos (10:1 de NH_4Cl 0.144 M y NH_4HCO_3 0.01 M), se mezcló por inversión y se dejó reposar durante una hora a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 20 ml de la solución de lisis 9:1 para resuspender el paquete de leucocitos, se colocó en refrigeración durante media hora y se realizó nuevamente la centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos. El procedimiento de lavado anterior se repitió hasta que el paquete de leucocitos quedó libre de eritrocitos.

El paquete de leucocitos se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis de leucocitos (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, y Na_2EDTA 2 mM pH 8.2) posteriormente se agregaron 200 μl de SDS 10% y 125 μl de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en SDS al 10% y Na_2EDTA 2 mM pH 8.2). La muestra se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó 1 ml de una solución saturada de NaCl 6M agitando vigorosamente durante 15 segundos. Se centrifugó durante 20 minutos a 4800 rpm y el sobrenadante (que debía estar translúcido y sin grumos) se pasó a otro tubo de plástico de 50 ml, se agregaron lentamente dos volúmenes de etanol absoluto frío. Para ayudar a la precipitación del DNA se colocó el tubo aproximadamente 10 minutos en el congelador (0 °C).

El DNA precipitado se tomó con una punta estéril y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril conteniendo 1 mL de etanol absoluto. Se agitó hasta abrir la hebra de DNA y se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos. Se repitió el lavado con etanol al 70% realizando la centrifugación final a 5000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el botón completamente en una cámara seca. Una vez seco, se resuspendió el botón en Buffer TE 300 μl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, y Na_2EDTA 2mM pH 7.5), se colocó a 37°C durante dos horas aproximadamente, hasta resuspendirse por completo el DNA.

Enseguida se realizó la cuantificación de las muestras por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8% utilizando buffer TEB 1X para determinar la integridad del ADN.

Genotipificación de lo polimorfismos propuestos

Para la determinación del polimorfismo del gen TGFB1 (codón 25) se realizó genotipificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real en equipo LightCycler 96 (Roche) utilizando sondas taqman de fabricación comercial (C_22272997_10 y C_11464118_30 de Applied BioSystems) siguiendo las recomendaciones y metodología ya validada por el mismo fabricante.

En el caso del gen ECA (I/D) se realizó tipificación por PCR convencional utilizando los oligonucleótidos específicos. Las condiciones de reacción y secuencia de las sondas Taqman y los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en el cuadro "Anexo de determinaciones bioquímicas".

Procedimiento para la cuantificación de citocinas en suero en equipo

Invitrogen.

Se tomó un tubo seco extra para la separación del suero y medición de TGF-B1. Después de la extracción la muestra fue centrifugada inmediatamente a 4°C y 1500 rpm durante 10 minutos, y el suero se congeló a -80°C hasta su medición.

El inmunoensayo utiliza anticuerpos monoclonales específicos para TGF-beta1 humano con el sistema Invitrogen que involucra la tecnología de tres áreas de especialidad: detección de fluorescencia avanzada, manufactura de esferas de precisión y conjugación de reactivos a micro-esferas.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En breve el procedimiento es el siguiente:

1. Se preparan los estándares de acuerdo con las instrucciones del fabricante, ya que cada lote de reactivos maneja un rango de sensibilidad.
2. Mezclar durante 30 segundos en vórtex las perlas magnéticas que llevan adheridas los anticuerpos contra el analito de interés. Poner 30 microlitos de las perlas en cada uno de los pocillos de la placa.
3. Lavar las perlas con Buffer de Lavado utilizando la placa magnética.
4. Añadir 25 μ l de Buffer Universal, 25 μ l de Estándares y 25 μ l de muestra.
5. Mezclar brevemente y sellar la placa con film adhesivo.
6. Incubar durante 60-120 min a temperatura ambiente.
7. Lavar las perlas 3 veces con Buffer de lavado utilizando la placa magnética.
8. Añadir 25 μ l del anticuerpo de detección.
9. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
10. Lavar las perlas 3 veces con Buffer de lavado utilizando la placa magnética.
11. Añadir 50 μ l de Streptavidina-PE, e incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
12. Lavar las perlas 3 veces con Buffer de lavado utilizando la placa magnética.
13. Resuspender las perlas en 120 μ l de Buffer de Lectura y llevar la placa al equipo Invitrogen para obtener las lecturas.
14. El cálculo de la concentración se realiza a partir de la curva estándar.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	
Principios del procedimiento	Reactivos y equipo necesario
<p><u>AST</u> El slide VITROS AST es un elemento analítico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. En el slide se deposita una gota de muestra del paciente, que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. En el ensayo de la aspartato aminotransferasa, el grupo amino de L-aspartato se transfiere al α-cetoglutarato en presencia de piridoxal-5-fosfato (P-5-P) para producir glutamato y oxalacetato. El oxalacetato formado en la desaminación del L-aspartato es convertido a piruvato y dióxido de carbono por la oxalacetato descarboxilasa. La piruvato oxidasa oxida al piruvato en acetilfosfato y peróxido de hidrógeno. El paso final de la reacción implica la oxidación catalizada por la peroxidasa de un leucoderivado para dar un pigmento coloreado. La frecuencia de oxidación del leucoderivado se monitoriza por espectrofotometría de reflectancia. La frecuencia de cambio en la densidad de reflectancia es proporcional a la actividad enzimática en la muestra. El filtro de corte de la longitud de onda corta presente en la montura del slide minimiza los efectos de frecuencia del blanco de la luz incidente durante el desarrollo del colorante.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Tampón de pH 7,5 -Leucoderivado -Piruvato oxidasa -Oxalacetato descarboxilasa -Peroxidasa -Piridoxal-5-fosfato sódico <p>Equipo Vitros microslide</p>
<p><u>ALT</u> El slide VITROS ALT es un elemento analítico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. En el slide se deposita una gota de muestra del paciente, que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. La capa difusora contiene los sustratos de la ALT, L-alanina y α-cetoglutarato sódico. La alanina aminotransferasa cataliza la transferencia del grupo amino de la L-alanina al α-cetoglutarato para producir piruvato y glutamato. A continuación, la lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la conversión de piruvato y NADH en lactato y NAD. La frecuencia de oxidación del NADH se monitoriza por espectrofotometría de reflectancia. La frecuencia de cambio en la densidad de reflectancia es proporcional a la actividad enzimática.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Tampón de pH 8,0 -Lactato deshidrogenasa -NADH -Piridoxal-5-fosfato <p>Equipo Vitros microslide</p>
<p><u>Albúmina</u> El slide VITROS ALB es un elemento analítico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. En el slide se deposita una gota de muestra del paciente, que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. Al penetrar el líquido la capa reactiva, el verde de bromocresol (BCG) pasa a la capa difusora donde el colorante se une a la albúmina de la muestra. Esta unión da lugar a un desplazamiento de la longitud de onda del máximo de reflectancia del colorante libre. El complejo de color que se forma se lee por espectrofotometría de reflectancia. La cantidad de colorante unido a la albúmina es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Verde de bromocresol -Tampón de pH 3,1 <p>Equipo Vitros microslide</p>
<p><u>Bilirrubina Total</u> El slide VITROS TBIL es un elemento analítico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. El análisis se basa en una modificación de la clásica reacción diazo. En el slide se deposita una gota de muestra del paciente, que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. Esta capa proporciona un fondo reflectante para medir los productos diazo de la bilirrubina y contiene todos los reactivos necesarios para determinar la bilirrubina total. El método utiliza difilina para disociar la bilirrubina no conjugada de la albúmina. La bilirrubina no conjugada, la bilirrubina conjugada y la bilirrubina vinculada a la albúmina (delta) reaccionan posteriormente con la sal diazónica hexafluorofosfato de 4-(N-carboximetilsulfamilo) bencenodiazonio para producir cromóforos de azobilirrubina que tienen una absorptividad molar similar y máximos de absorbancia alrededor de 520 nm. La concentración de bilirrubina total se determina midiendo los cromóforos de azobilirrubina en dos longitudes de onda que pasan a través del soporte transparente. La medida de la reflectancia en 460 nm corrige las interferencias</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Tampón de pH 3,0 <p>Equipo Vitros microslide</p>

espectrales.	
<p><u>Bilirrubina directa</u> Los slides TBIL determinan la bilirrubina total como los derivados diazo de la bilirrubina no conjugada, conjugada y "delta" unida covalentemente a proteínas. Las bilirrubinas conjugadas y no conjugadas se determinan simultáneamente en el slide BuBc usando una medición espectral de longitud de onda doble. En los sistemas, los valores de bilirrubina directa se calculan utilizando estos resultados medidos y la siguiente ecuación: bilirrubina directa = TBIL – Bu.</p>	Equipo Vitros microslide
<p><u>TP: tiempo de protrombina</u> El proceso de coagulación se desencadena mediante la incubación del plasma con cantidades óptimas de tromboplastina y calcio; se mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo de fibrina.</p>	-Tromboplastina completa recalcificada. -Plasma pobre en plaquetas del paciente. Equipo sysmex CS-2000i
<p><u>INR: Ratio Internacional Normalizado</u> Inicialmente se determina el ratio de protrombina dividiendo el tiempo de reacción de la muestra por el tiempo de reacción del pool de plasma normales: PR= tiempo de reacción de la muestra (s)/ tiempo de reacción del plasma normal (s). El ratio de protrombina se puede convertir a su correspondiente ratio internacional usando el índice internacional de sensibilidad (ISI). De esta manera se obtiene INR: $INR = PR^{ISI}$</p>	
<p><u>Urea</u> El slide VITROS BUN/UREA es un elemento analítico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. En el slide se deposita una gota de muestra del paciente, que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. Seguidamente el agua y los componente no proteicos se desplazan a la capa reactiva subyacente donde la reacción de la ureasa genera amoníaco. La membrana semipermeable sólo permite el paso del amoníaco a la capa de pigmentación donde reacciona con el indicador para dar lugar a un pigmento. Se determina la densidad de reflexión del colorante que es proporcional a la concentración de urea en la muestra.</p>	-Ureasa -Tampón de pH 7,8 Equipo Vitros microslide
<p><u>Creatinina</u> El slide VITROS CREA es un elemento analítico multicapa incorporado a un soporte de poliéster. En el slide se deposita una gota de muestra del paciente, que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. La creatinina se difunde a la capa reactiva, donde es hidrolizada a creatina en el paso determinante de la frecuencia. La creatina amidinohidrolasa convierte la creatina en sarcosina y urea. En presencia de sarcosina oxidasa, la sarcosina es oxidada a glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno. La reacción final implica la oxidación catalizada por peroxidasa de un leucoderivado para producir un producto coloreado. Tras la adición de la muestra se incuba el slide. Durante la fase inicial de la reacción, la creatina endógena presente en la muestra es oxidada. El cambio resultante en la densidad de reflexión se mide en 2 momentos diferentes. La diferencia de la densidad de reflexión es proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.</p>	-Creatinina amidinohidrolasa -Creatina amidinohidrolasa -Sarcosina oxidasa -Peroxidasa -Leucoderivado -Tampón de pH 7,0 Equipo Vitros microslide

<p><u>Proteinuria:</u> Se realizará la determinación mediante tiras reactiva marca Siemens, la metodología de la prueba consiste en sumergir por completo la tira reactiva durante un corto periodo de tiempo, en una muestra bien mezclada de orina, a continuación se extrae la tira y se deja reposar un tiempo para que se lleven a cabo las reacciones, finalmente se compara el color con la escala cromática provista por el fabricante.</p>	
<p>GENOTIPIFICACIÓN</p>	<p>Reactivos</p>
<p>Gen <i>TGFB1</i></p> <p>Secuencia de sonda Taqman que identifica el polimorfismo en codón 10:</p> <p>TAGCCACAGCAGCGGTAGCAGCAGC[A/G]GCAGCAGCCGCAGCCCGG AGGGCGG</p> <p>Mezcla de reacción 25 ul volumen final: iniciadores específicos* para el polimorfismo en codón 10, buffer de reacción, Cloruro de magnesio, mezcla de dNTPs, enzima Taq polimerasa, ADN del paciente, agua grado biología molecular.</p>	<p>Las reacciones se llevarán a cabo en equipo LightCycler 96 (Roche) en las condiciones de amplificación recomendadas por el fabricante.</p>
<p>Gen <i>TGFB1</i></p> <p>Secuencia de sonda Taqman que identifica el polimorfismo en codón 25:</p> <p>GCAGGTGGATAGTCCC GCGCCGGC[G/C]GGCCAGGCGTCAGCACCACT AGCCA</p> <p>Mezcla de reacción 25 ul volumen final: iniciadores específicos* para el polimorfismo en codón 10, buffer de reacción, Cloruro de magnesio, mezcla de dNTPs, enzima Taq polimerasa, ADN del paciente, agua grado biología molecular.</p>	<p>Las reacciones se llevarán a cabo en equipo LightCycler 96 (Roche) en las condiciones de amplificación recomendadas por el fabricante.</p>
<p>Gen ECA</p> <p>ECA-1-F 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3 ECA-1- R 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3</p> <p>Mezcla de reacción 10 ul volumen final: iniciadores específicos, buffer de reacción, Cloruro de magnesio, mezcla de dNTPs, enzima Taq polimerasa, ADN del paciente, agua grado biología molecular.</p>	<p>Las reacciones se llevarán a cabo en Termociclador MJ Reseach en las condiciones de amplificación estandarizadas que incluye temperatura de alineamiento de los iniciadores a 58°C durante 30 ciclos.</p>
<p>Los productos de PCR de la reacción de los polimorfismos de ECA se separan mediante electroforesis en geles de Acrilamida bis- acrilamida, 29:1 (6%) a 200 Volts durante 2.5 horas y los fragmentos se visualizarán mediante tinción con nitrato de plata al 0.2%.</p>	<p>Cámaras de electroforesis Owl y fuente de poder BioRad</p>

*la secuencia específica de oligos es marca registrada por el fabricante.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES								
2018-2019	Ene-Jun	Jul-Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
Elaboración del protocolo	X							
Presentación al comité		X	X					
Captación de pacientes, recolección de datos y toma de muestras sanguíneas				X	X			
Procesamiento de las muestras sanguíneas. Parte 1 obtención del DNA / parte 2: obtención del suero y almacenamiento -80 °C hasta su utilización				X	X	X		
Procesamiento de las muestras sanguíneas. Parte 3: genotipificación variantes de TGFB y ECA. Parte 4: Cuantificación de TGFB sérica					X	X		
Recolección y captura de datos				X	X			
Análisis de la información						X	X	
Elaboración de tesis							X	
Presentación							X	
Publicación								X

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Grupo:	Estudio	Referencia	Fecha
Numero de identificación:			Sexo: M F
Diagnóstico/Patología de base:			
Edad actual:	Edad al diagnóstico:		

Peso:	Talla:	CMB:	Estado nutricional:	EU	DM	DG
Ictericia:						
Hepatomegalia:			Esplenomegalia:			
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada			
Encefalopatía	No	Grado I-II	Grado III-IV			

AST	ALT	BT	BD
Albúmina	TP	INR	
Urea	Creatinina	Proteinuria	

ECA I/D
TGF-B1 p10
TGF-B1 p25
TGF-B1 nivel sérico

BIOPSIA HEPÁTICA

Fecha:	Folio:	METAVIR:
Tiempo transcurrido en meses:		

COMENTARIOS:
