



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

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

**“ANÁLISIS CRÍTICO DEL DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO DE SIETE NUEVOS BIOMARCADORES
PARA DIAGNÓSTICO DE CIRROSIS HEPÁTICA”**

PROPUESTA DE TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
VÍCTOR MANUEL PÁEZ ZAYAS**

**TUTORA
MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ
UNIDAD DE VINCULACIÓN CIENTÍFICA FACULTAD DE MEDICINA UNAM/INMEGEN**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. IGNACIO GARCÍA JUÁREZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”
DR. ENRIQUE GONZÁLEZ RIVAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL. UNAM.
DR. ERWIN CHIQUETE ANAYA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2021.



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.

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ

TUTORA ACREDITADA

UNIDAD DE VINCULACIÓN CIENTÍFICA FACULTAD DE MEDICINA UNAM/INMEGEN

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN

DR. VÍCTOR MANUEL PÁEZ ZAYAS

ALUMNO DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS,

ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. María del Carmen García de León Méndez

TA Titular C Facultad de Medicina UNAM. Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina con el Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Dr. Ignacio García Juárez

Médico adscrito al Departamento de Gastroenterología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Dr. Erwin Chiquete Anaya

Médico adscrito al Departamento de Neurología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Dr. Enrique González Rivas

Laboratorio de Inmunología. Unidad de Investigación en Medicina Experimental. Facultad de Medicina UNAM.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	5
1. Marco teórico	8
2. Antecedentes	22
3. Definición del problema	31
4. Justificación	31
5. Pregunta de investigación	32
6. Hipótesis	32
7. Objetivos	33
8. Material y Métodos	34
8.1 Diseño	34
8.2 Población de estudio	34
8.3 Criterios de selección	34
8.4 Tamaño de muestra	36
8.5 Descripción de procedimientos	37
8.6 Técnicas, aparatos e instrumentos que se utilizaron en la medición	37
8.7 Análisis estadístico	38
8.8 Consideraciones éticas	40
9. Resultados	41
10. Discusión	65
11. Conclusiones	68
12. Referencias	69

ABREVIATURAS

ADH1B	Alcohol Dehydrogenase 1B
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AH	Ácido Hialurónico
AKR1B10	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10
ALD	Alcohol Liver Disease
ALDH1A2	Aldehído Deshidrogenasa Familia1, subfamilia A2
ALDH1A3	Aldehído Deshidrogenasa Familia1, subfamilia A3
ALT	Alanina Aminotransferasa
APRI	AST to Platelet Ratio Index
AR	Ácido Trans-retinoico
ARFI	Acoustic Radiation Force Impulse
AST	Aspartato Aminotransferasa
AUC	Area Under Curve
BAMBI	Bone Morphogenetic Protein and Activin Membrane Bound Inhibitor
BD	Bilirrubina Directa
BI	Bilirrubina Indirecta
BIC	Criterio de Información Bayesiana
BT	Bilirrubina Total
C7	Componente del complemento 7
CBP	Colangitis Biliar Primaria
CCL2	Ligando de quimioquinas 2
CCL4	Tetracloruro de Carbono
CEP	Colangitis Esclerosante Primaria
CH	Cirrosis Hepática
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CPA	Área Proporcional de Colágena
CUCI	Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática
CYP26A1	Citocromo P450, familia 26, subfamilia A, polipeptido 1
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DHRS4	Dehydrogenase/Reductase 4
DM	Diabetes Mellitus
DO	Densidad Óptica
E	Especificidad
EH	Encefalopatía Hepática
EHNA	Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica
EHNA	Esteato Hepatitis No Alcohólica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERM	Elastografía por Resonancia Magnética
ET	Elastografía Transitoria
F	Fibrosis
FBN1	Fibrilina 1
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fibrosis Significativa
GGT	Gamma Glutamyl Transpeptidasa
HAI	Hepatitis Autoinmune

HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
HPH	Hipertensión Portal Hemorrágica
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hepatic Stellate Cell
IC	Intervalo de Confianza
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Proteins
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
INR	International Normalized Ratio
IQR	Rango Intercuartilar
IVA-PLA₂	Fosfolipasa A2, grupo IV-A
KPa	Kilo Pascales
LR-	Razón de Verosimilitud Negativa
LR+	Razón de Verosimilitud Positiva
MAC	Complejo de Ataque a la Membrana
MEC	Matriz Extracelular
MF	Miofibroblastos
MFAP4	Proteína 4 Asociada a Microfibrillas
MGP	Proteína de Matriz Gla
MICE	Multiple Imputation by Chained Equations
MMP-1	Matrix metalloproteinase 1
MMP-2	Matrix metalloproteinase 2
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MMPS	Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
OR	Odds Ratio
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBE	Peritonitis Bacteriana Espontánea
PDGF- BB	Platelet Derived Growth Factor – BB
PGCP	Glutamato Carboxipeptidasa Plasmática
PIIINP	Péptido Aminoterminal de Procolágeno tipo III
PLA2G13	Fosfolipasa A2, grupo XIII
PLA2G7	Fosfolipasa A2, grupo VII
PPARA	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha
pSWE	point Shear Wave Elastography
RDH10	Retinol Dehydrogenase 10
RDH11	Retinol Dehydrogenase 11
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROI	Region of Interest
RXRβ	Retinoid X Receptor Beta
S	Sensibilidad
SAFE	Sequential Algorithm for Fibrosis Evaluation
SEC	Células Endoteliales Sinusoidales
SHR	Síndrome Hepatorrenal

STK15	Proteína Cinasa de Serina/Treonina 15
SWE	Shear Wave Elastography
TAA	Tioacetamida
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β 1
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α
TP	Tiempo de Protrombina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VHB	Virus de Hepatitis B
VHC	Virus de Hepatitis C
VIF	Factor de Inflación de la Varianza
VPN	Valor de Predicción Negativa
VPP	Valor Predictivo Positivo
YKL-40	Chondrex, Human Cartilage Glycoprotein-39;
χ^2	Prueba de chi-cuadrado
2D-SWE	2D Shear Wave Elastography

1. MARCO TEÓRICO

El hígado desempeña un papel único como centro metabólico del cuerpo. Su peso promedio en individuos adultos es de aproximadamente de $1\ 400 \pm 270$ g, sin diferencias significativas relacionadas con el género. Se compone de cinco tipos distintos de células que ocupan cerca del 80% de su volumen. El 20% restante corresponde a los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular. (1).

El tejido hepático se organiza a nivel microscópico en lóbulos formados por placas constituidas por células que se extienden desde la zona porta en forma lineal a la vena central; los espacios que atraviesan los tabiques son los sinusoides hepáticos, separados de los hepatocitos por el espacio perisinusoidal de Disse. Los sinusoides hepáticos, conducen la sangre mezclada de las ramificaciones terminales de la arteria hepática y de la vena porta a la ramificación terminal de la vena hepática. Los sinusoides representan la única forma de tubo capilar en el hígado y tienen un revestimiento endotelial continuo, pero fenestrado, con ausencia de una membrana basal continua y, un espacio perisinusoidal (espacio de Disse), además de la presencia de células de Kupffer y células dendríticas dentro de la luz.

Los sinusoides hepáticos y el espacio de Disse se comunican a través de las ventanas o fenestras de las células endoteliales sinusoidales (SEC). La ausencia de membrana basal facilita el intercambio de componentes de la sangre con los hepatocitos. Los sinusoides conectan los espacios porta con las ramas terminales de la vena hepática (venas centrales). Las células endoteliales de la arteria hepática son alargadas y dispuestas longitudinalmente, mientras que las de las venas porta y central, son poligonales, aplanadas y, poseen microvellosidades (2).

El endotelio sinusoidal, cuya estructura es señalada como el filtro del hígado, es probablemente el blanco principal del estrés oxidativo, éste permite estratégicamente el libre intercambio de proteínas y otros nutrientes entre los hepatocitos y la sangre, además de aislarlos de la mayoría

de las células sanguíneas, de las plaquetas y de partículas coloidales más grandes, como los quilomicrones y los virus (3).

Fisiopatología de la fibrosis

La fibrosis es el resultado de la acumulación excesiva de tejido cicatricial (matriz extracelular MEC). Existe una gran variedad de estímulos que causan enfermedades hepáticas crónicas, como toxinas, virus, trastornos autoinmunes, colestasis, hipoxia o resistencia a la insulina los cuales conducen a la apoptosis de los hepatocitos y, a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cual genera inflamación. Estos estímulos, desencadenan la fibrogénesis de forma indirecta a través de la inducción de citocinas profibrogénicas, factores de crecimiento y otros mediadores a través de la activación de las células estelares hepáticas (HSC) y miofibroblastos (MF). (4)

En la enfermedad hepática temprana, a la par de la fibrogénesis, existe una remoción del exceso de MEC a través de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), tales como MMP-1, -3, -8, -9, -12 y -13. En caso de lesión prolongada, la fibrogénesis prevalece sobre la degradación de la MEC. (5)

La célula efectora fibrogénica clave, es la célula HSC activada. Las características de la activación de estas células y su transformación fenotípica semejante MF, es regulada por su interacción con varios tipos celulares y la activación de vías específicas dentro del marco del proceso de cicatrización de heridas. Por su parte, la muerte de los hepatocitos produce la liberación de contenido celular (p.ej. ADN y patrones moleculares asociados a daño, DAMPs) y especies reactivas de oxígeno que activan a los macrófagos residentes (células de Kupffer), las cuales liberan factores como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$, así como factores profibrogénicos que incluyen quimiocinas, como CCL2 y patrones moleculares asociados a patógenos derivados del intestino (PAMPs). Un ejemplo es la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4) que conduce a la represión

del inhibidor BAMBI unido a la membrana de activina, que incrementa la activación de HSC dependiente de TGF β . (6)

Entre los efectos de la fibrogénesis, se encuentra la neoformación de membranas basales a lo largo del espacio de Disse; lo que se denomina “capilarización”. Las membranas basales impiden el flujo bidireccional de los metabolitos entre los hepatocitos y el torrente sanguíneo sinusoidal, el cual daña, no solo las funciones biosintéticas de los hepatocitos, sino también impide la eliminación de las macromoléculas circulantes. Esta situación se complica aún más por el estrechamiento del flujo sanguíneo sinusoidal debido a la fibrosis perisinusoidal. Este incremento en la resistencia hemodinámica contribuye a la hipertensión portal. (7)

Dentro de las áreas más importantes en el estudio de la fisiopatología de la fibrosis, se encuentran determinar el papel que tienen, la microbiota intestinal, la hipoxia y el establecimiento de un ambiente proinflamatorio anaeróbico, así como la influencia de la modificación epigenética en la progresión de la fibrosis y la importancia de la rigidez tisular en el proceso fibrogénico. (8)

La fibrosis progresa a tasas variables, dependiendo de la causa de la enfermedad hepática, factores ambientales y del individuo. La cirrosis hepática (CH), representa la etapa más avanzada de fibrosis y desde el punto de vista histopatológico, se caracteriza por septos fibrosos vascularizados que unen los tractos portales entre sí y con la venas centrales, dando lugar a islas de hepatocitos rodeadas por fibrosis que carecen de una vena central. La principales consecuencias clínicas de la CH son: la alteración en la función sintética (resultado del daño de los hepatocitos) y la hipertensión portal (debida al incremento de la resistencia intrahepática).

(9)

Evaluación de fibrosis mediante biopsia hepática

El diagnóstico del grado de fibrosis, se ha basado tradicionalmente en el análisis de la biopsia

hepática, el estándar de referencia. Existen múltiples clasificaciones histológicas para valorar la severidad de la enfermedad hepática. Las más usadas son las de Knodell, Ishak y la del grupo cooperativo METAVIR. Esta última, debido a su practicidad y amplia validación es de las más utilizadas. La clasificación METAVIR utiliza los parámetros de actividad inflamatoria crónica y fibrosis. La actividad inflamatoria crónica se gradúa en una escala de 4 puntos (A0-A3) donde A0 significa ausencia de actividad inflamatoria crónica y A3 actividad inflamatoria crónica severa. La fibrosis se gradúa en una escala de 5 puntos (F0-F4) donde F0 significa ausencia de fibrosis, F1 fibrosis portal leve, F2 fibrosis portal moderada (con pocos puentes fibróticos), F3 fibrosis portal severa (muchos puentes) y F4 cirrosis.

A pesar de su indudable valor, la biopsia ha demostrado hasta un 33% de error en el diagnóstico, con limitantes y desventajas tales como el carácter invasivo, error de muestreo (tamaño de la muestra de 1/50,000 del total de la masa hepática), la calidad irreproducible de la muestra en función de la longitud y tamaño del tejido (coeficiente de variación de 45%-35%) así como también, depender para su evaluación, de la experiencia del patólogo (error del observador). Los riesgos asociados al procedimiento van desde dolor (84%) e hipotensión, hasta sangrado (0.5%) y morbilidad (0.09-0.12%). Además de ser un procedimiento costoso y, que, por consideraciones éticas, no se sugiere la toma seriada de muestras mediante este método. (7).

Con la intención de mejorar la reproducibilidad, se desarrolló el análisis digital morfométrico de la biopsia hepática, el cual, es un método relativamente simple y automatizado para el procesamiento de imagen que permite la cuantificación de áreas de colágena (área proporcional de colágena, CPA). (10). La principal ventaja de este método es proporcionar una escala finita cuantitativa, lineal y más exacta, con respecto a la determinada por métodos semicuantitativos. La morfometría ha sido adoptada en ensayos clínicos, sin embargo, estos estudios han demostrado que no existe relación lineal entre el CPA y la estadificación de la fibrosis. (11). De

hecho, el CPA fue desarrollada para subclasificar pacientes con CH, más que para proporcionar una medición continua. Dentro de sus desventajas principales, se encuentra el tiempo que se requiere para llevarla a cabo, lo cual la vuelve poco práctica.

Biomarcadores de fibrosis hepática

Debido a los inconvenientes asociados a la biopsia hepática, previamente descritos, se han desarrollado métodos diagnósticos no invasivos con el propósito de diagnosticar fibrosis hepática. Estos métodos se basan en dos principios: uno de ellos es una aproximación biológica (cuantificación de marcadores en suero) y la segunda en una aproximación física (a través de la medición de la rigidez hepática).

Marcadores séricos

El término se refiere a la medición de una o más moléculas circulantes que han mostrado aplicación clínica, que se expresan y secretan de manera alterada durante el desarrollo de un proceso patológico, en este caso relacionado con la generación de fibrosis.

Gressner A.M. y cols. (7), y posteriormente diversos autores (12,13), realizaron una búsqueda sistemática para determinar una serie de marcadores de fibrosis no invasivos, empleando bases de datos electrónicas y listas de referencias de publicaciones relevantes. Partiendo de estos estudios, diferenciaron dos clases de marcadores que definieron como: **clase I**, en la cual incluyeron componentes del suero que tenían una relación directa con la fibrogénesis, ya sea como mediadores del recambio o síntesis de matriz extracelular o, como elementos relacionados con la misma MEC, secretados por miofibroblastos y HSC activadas o que reflejan principalmente la actividad del proceso fibrogénico.

Tabla 1. Marcadores séricos clase I, que han mostrado aplicación clínica.

Grupo	Marcador sérico
Enzimas extracelulares relacionadas con la matriz	Prolil hidroxilasa N-acetil-β-D-glucosaminidasa
Colágena	Carboxi péptido procolágena I Procolágeno tipo III amino péptido (PIIINP) Colágeno tipo IV
Glicoproteínas e inhibidores de las metaloproteinasas de matriz	Laminina, fragmento P1 YKL-40 MMP-2, 9. TIMP-1, TIMP-2 ICAM-1
Glucosaminoglicanos	Ácido hialurónico
Citocinas y marcadores proteómicos	TGF-α TGF-β PDGF-BB MFAP-4 CK-18 <i>Wisteria floribunda</i> aglutinina positiva Mac-2

MMP-2: metaloproteinasas de la matriz tipo 2, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteinasas-1, TIMP-2: inhibidor tisular de la metaloproteinasas-2, ICAM-1: molécula de adhesión intracelular-1. TGF-α: factor de crecimiento epidérmico alfa, TGF-β1: factor de crecimiento epidérmico beta, PDGF-BB: CK-18: citoqueratina 18. Modificado de (6).

La procolágena I y procolágena III (78 y 81%), se han asociado con baja sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de fibrosis. Además, no se observó relación entre la concentración sérica de carboxi péptido procolágena I y PIIINP con el grado de fibrosis, lo que los hace no útiles para estadificación. (14, 15)

El ácido hialurónico (AH) es el principal componente de la MEC. Un incremento en su concentración sérica se asocia con la fibrosis de etiología diversa. El análisis del AUC de esta

molécula muestra valores de sensibilidad entre 86 y 95% y de especificidad del 86 al 100%, respectivamente. (16)

La laminina, una glicoproteína no colagénica depositada en la membrana basal del hígado, cuya concentración también se eleva a la par que la fibrosis, independientemente de la etiología, a un punto de corte de 1.45 U/ml, posee una sensibilidad de 87% y especificidad de 74%. (17)

YKL-40, es también una glicoproteína capaz de distinguir entre fibrosis leve y avanzada, con un VPP de 80%. (18)

Existe una relación inversa entre la concentración entre MMP-1, MMP-9 y la severidad de la fibrosis. MMP-2, tiene una exactitud diagnóstica de 92%. Contrario a lo que ocurre con las MMPs, a medida que progresa la fibrosis, la concentración de TIMPs se incrementa. Se ha reportado utilidad diagnóstica en la medición del índice MMP-1/TIMP-1. (19)

Los niveles altos de TGF- β 1, correlacionan con el grado de fibrosis, sin embargo, tiene el inconveniente de que está mezclado con TGF- β plaquetario. PDGF-BB, se expresa en plaquetas, fibroblastos, células endoteliales, mastocitos y macrófagos. Yoshida et al. y Jiyuan y cols., demostraron disminución en los niveles de PDGF-BB en fibrosis hepática. (20, 21)

El factor de crecimiento similar a insulina (IGF), es una proteína con secuencia similar a la de la insulina. El sistema IGF, funciona como eje regulador endócrino, parácrino autócrino para la proliferación celular, supervivencia y apoptosis en diferentes tipos celulares. De manera general, el sistema de IGF consiste de 2 receptores de superficie (IGF1R e IGF2R), 2 ligandos (IGF-1 e IGF-2) y una familia de proteínas de unión al IGF (IGFBP). Se han descrito al menos 7 (IGFBP-1 a 7) que tienen un papel importante como reguladores fisiológicos de la interacción de los IGF con sus receptores celulares en diferentes órganos, incluyendo tracto gastrointestinal e hígado. Martínez-Castillo y cols., llevaron a cabo un estudio transversal en una cohorte de pacientes con infección crónica por VHC, en el que se evaluó la concentración sérica del IGFBP tipos 1 a 7

(determinadas por arreglo en suspensión múltiple), y su asociación con el grado de fibrosis. Las concentraciones de IGFBP-1 y -7 fueron más altas en pacientes con VHC, mientras que las de IGFBP-3, -5 y -6, los niveles mostraron tendencia a la baja. Se observó un aparente incremento de todos los IGFBP en los pacientes con fibrosis grado 4, pero con diferentes valores. Las IGFBP -2, -4, -6 y -7 mantuvieron el mejor OR, mostrando relación con la progresión de la fibrosis. Las curvas ROC mostraron que IGFBP-7, fue la única proteína capaz de distinguir F1 y F2 de F3. (22)

Los marcadores **clase II**, comprenden en general, pruebas estándar de laboratorio cuya utilidad se interpreta de forma aislada o, agrupada en paneles. Tablas 2, 3, 4, 5 y 6.

Los estudios de laboratorio convencionales son pruebas de funcionamiento hepático tales como: AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gamma glutamil transpeptidasa), bilirrubina total (BT), directa (BD) e indirecta (BI).

Pruebas relacionadas con hipertensión portal: conteo plaquetario y tiempo de protrombina (TP) y, parámetros relacionados con la función sintética como: albúmina, colesterol, insulina, entre otros.

Dentro de los paneles más estudiados, se encuentran: APRI, FIB 4, FibroTest®, Hepascore, y FibroMeter®. **Tabla 2.** Algunos de estos índices se pueden calcular de manera manual en la práctica diaria, ya que sus fórmulas se encuentran disponibles para consulta, mientras que otros, corresponden a algoritmos patentados, y se envían los parámetros solicitados por el dueño de la patente y su laboratorio entrega el reporte con los resultados correspondientes.

Tabla 2. Componentes de los marcadores séricos clase II más utilizados y mejor validados.

Marcador sérico	Componentes
APRI	AST, plaquetas
BARD	IMC ≥ 28 = 1 punto, AST/ALT ≥ 0.8 = 2 puntos, DM = 1 punto

FIB-4	Edad, AST
NFS	Edad, IMC, Glucemia alterada en ayuno/DM, AST/ALT, plaquetas, albúmina
Índice de Forns	Plaquetas, GGT, edad, colesterol
GPR	GGT, plaquetas
Índice Lok	Plaquetas, AST/ALT, INR
ELF	Edad, AH, PIIINP, TIMP-1
FibroTest-ActiTest	Edad, sexo, α 2-macroglobulina, haptoglobina, GGT, ALT, apolipoproteína A1
FibroMeter	Edad, plaquetas, TP, AST, α 2-macroglobulina, AH, urea
FibroMeter NAFLD	Edad, peso, plaquetas, AST, ALT, glucosa, ferritina
Hepascore	Edad, género, bilirrubina, GGT, AH, α 2-macroglobulina

AST: aspartato aminotransferasa, IMC: Índice de masa corporal, ALT: alanino aminotransferasa, DM: diabetes mellitus, INR: razón internacional normalizada. Modificado de (23).

Tabla 3. Desempeño diagnóstico de los principales paneles de marcadores clase II, para el diagnóstico de fibrosis significativa (FS) y cirrosis hepática (CH), en pacientes con infección crónica por VHC.

Panel	Grado de fibrosis/ Escala	Prevalencia de FS	AUC cohorte de estudio (n)	AUC cohorte de validación (n)	Umbral inferior	Umbral superior
APRI ²⁴	F2/3/4 METAVIR	64	0.8 (192)	0.8 (78)	91 (Se) 47 (Sp) 1.7 (+LR) 0.2 (-LR)	41 (Se) 95 (Sp) 8.2 (+LR) 0.6 (-LR)
ELF ²⁵	3/4 Scheuer	27	n/a	0.77 (261)	95 (Se) 29 (Sp)	38 (Se) 95 (Sp)
Fibrotest ²⁶	F2/3/4 METAVIR	40	0.84 (205)	0.87 (134)	97 (Se) 24 (Sp) 1.3 (+LR) 0.1 (-LR)	29 (Se) 95 (Sp) 5.7 (+LR) 0.7 (-LR)
FibroMeter ²⁷	F2/3/4 METAVIR	55	0.88 (383)	0.91 (<120)	n/a	81 (Se) 84 (Sp)
Forns ²⁸	F2/3/4 METAVIR	25	0.86 (351)	0.81 (125)	94 (Se) 45 (Sp) 1.7 (-LR) 0.1 (-LR)	44 (Se) 96 (Sp) 11.6 (+LR) 0.6 (-LR)
Hepascore ²⁹	F2/3/4 METAVIR	44	0.85 (117)	0.82 (104)	n/a	67 (Se) 92 (Sp)

n: número de sujetos estudiados, Se: sensibilidad, Sp: especificidad, LR: razón de verosimilitud, (+) positiva, (-) negativa.

Tabla 4. Desempeño diagnóstico de los principales paneles de marcadores clase II, para el diagnóstico de fibrosis significativa (FS) y cirrosis hepática (CH), en pacientes con consumo de alcohol.

Panel	Grado de fibrosis/ Escala	Prevalencia de FS	AUC cohorte de estudio (n)	AUC cohorte de validación (n)	Umbral inferior	Umbral superior
APRI ³⁰	Fibrosis septal Ishak	37	n/a	0.7 (507)	94 (Se) 26 (Sp) 1.3 (+LR) 0.24 (-LR)	9 (Se) 97 (Sp) 3.1 (+LR) 0.9 (-LR)
ELF ²⁵	3/4 Scheuer	27	n/a	0.94 (64)	100 (Se) 17 (Sp)	93 (Se) 100 (Sp)
Fibrotest ³¹	F2/3/4 METAVIR	64	n/a	0.84 (221)	84 (Se) 66 (Sp) 2.5 (+LR) 0.25 (-LR)	55 (Se) 93 (Sp) 7.4 (+LR) 0.5 (-LR)
Fibrometer ²⁷	F2/3/4 METAVIR	80	n/a	0.96 (95)	n/a	92 (Se) 93 (Sp) 13 (+LR) 0.09 (-LR)

APRI: Índice AST/plaquetas, ELF: Enhanced Liver Fibrosis, n: número de sujetos estudiados, Se: sensibilidad, Sp: especificidad, LR: razón de verosimilitud, (+) positiva, (-) negativa.

Tabla 5. Desempeño diagnóstico de los principales paneles de marcadores clase II, para el diagnóstico de fibrosis significativa (FS) y cirrosis hepática (CH), en pacientes con Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica (EHGNA).

Panel	Grado de fibrosis/ Escala	Prevalencia de FS	AUC cohorte de estudio (n)	AUC cohorte de validación (n)	Umbral inferior	Umbral superior
ELF ³²	2/3/4 Kleiner	40	n/a	0.82 (192)	95 (Se) 22 (Sp) 1.21 (+LR) 0.24 (-LR)	45 (Se) 95 (Sp) 8.7 (+LR) 0.57 (-LR)
FibroTest ³³	2/3/4 Kleiner	27	n/a	0.81 (267)	77 (Se) 77 (Sp)	15 (Se) 98 (Sp)
NAFLD Fibrosis score ³⁴	3/4 Kleiner	26	0.88 (480)	0.82 (253)	82 (Se) 77 (Sp) 3.5 (+LR) 0.23 (-LR)	51 (Se) 98 (Sp) 26 (+LR) 0.49 (-LR)

NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease. ELF: Enhanced Liver Fibrosis, n: número de sujetos estudiados, Se: sensibilidad, Sp: especificidad, LR: razón de verosimilitud, (+) positiva, (-) negativa.

Tabla 6. Desempeño diagnóstico de los principales paneles de marcadores clase II, para el diagnóstico de fibrosis significativa (FS) y cirrosis hepática (CH), en pacientes infección crónica por virus de hepatitis B (VHB).

Panel	Grado de fibrosis/ Escala	Prevalencia de FS	AUC cohorte de estudio (n)	AUC cohorte de validación (n)	Umbral inferior	Umbral superior
APRI ³⁵	2/3/4 METAVIR	68	n/a	0.72 (110)	71 (Se) 87 (Sp) 5.45 (+LR) 0.36 (-LR)	27 (Se) 96 (Sp) 6.3 (+LR) 0.76 (-LR)
Fibrotest ³⁶	2/3/4 METAVIR	29	n/a	0.78 (209)	89 (Se) 52 (Sp) 1.85 (+LR)	18 (Se) 99 (Sp) 26.7 (+LR)
Hui y cols. ²⁵	3/4/5/6 Ishak	27	0.80 (150)	0.76 (85)	93 (Se) 49 (Sp)	41 (Se) 90 (Sp)

APRI: Índice AST/plaquetas, n: número de sujetos estudiados, Se: sensibilidad, Sp: especificidad, LR: razón de verosimilitud, (+) positiva, (-) negativa.

Como podemos observar, la mayor parte de información disponible de marcadores séricos proviene de estudios realizados en cohortes de pacientes con infección crónica por VHC, por lo que la determinación de su utilidad y reproducibilidad en otro tipo de poblaciones es aún motivo de estudio. Además, es importante mencionar que la inflamación hepática, así como otras condiciones como el síndrome de Gilbert, y la hemólisis, pueden supra o infra estimar el resultado de los marcadores, especialmente los de clase II.

Marcadores con Principio Físico

Además de los marcadores séricos, existen métodos basados en técnicas radiológicas, estudiados para diagnosticar y estadificar el grado de fibrosis hepática. Éstos incluyen la elastografía por ultrasonido (ET) y por resonancia magnética (ERM). De los anteriores, la ET por ultrasonido, es el método radiológico más estudiado.

La ET por ultrasonido (Fibroscan ®). Fue aprobada por la FDA en abril de 2013; se trata de una forma de medición de la rigidez del tejido hepático, no invasiva y rápida. Esta técnica cumple muchas de las características deseables de una prueba: rapidez para su obtención, bajo costo, reproducibilidad y ausencia de efectos adversos, además de que examina una mayor porción de tejido hepático (aproximadamente 1 cm de diámetro y 5 cm de longitud, lo cual es 100 veces mayor en tamaño a una biopsia hepática estándar), reduciendo el error de muestreo.

Se realiza mediante un transductor ultrasónico que emite vibración de baja frecuencia (50 MHz). Primero, se emite el pulso mecánico que produce una onda elástica que se transmite a través del tejido. Segundo, la onda ultrasónica que sigue la onda mecánica mide la velocidad de propagación de la onda elástica en el interior del tejido.

La velocidad de propagación de la onda elástica es proporcional a la rigidez del tejido. Entre más rígido sea el tejido, más rápido se propagará la onda. El resultado se expresa en kilo Pascales (kPa), con rangos entre 2.5 a 75 kPa. En la clínica, los puntos de corte empleados comúnmente, son de >7 kPa para fibrosis significativa ($\geq F2$), >9.5 kPa, fibrosis avanzada ($\geq F3$) y >12.5 kPa para CH. (14) Una medición superior a 21 kPa es significativa de hipertensión portal (AUC de 0.93). (37)

Múltiples estudios han descrito las características de la prueba. Con los datos obtenidos en el metanálisis de 50 estudios de Friedrich-Rust, se estimó que el área bajo la curva (AUC) para el diagnóstico de fibrosis significativa, fibrosis grave y cirrosis fue de 0.84, 0.89 y 0.94, respectivamente. Cabe destacar que la estimación del diagnóstico de fibrosis significativa se ve influenciada por el tipo de enfermedad hepática y el punto de corte para el diagnóstico de CH. Los hallazgos más consistentes se realizaron en pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C. (38)

Entre las desventajas de la aplicabilidad del Fibroscan®, se encuentran: La restricción de su uso

en pacientes obesos y con ascitis (a pesar de que la sonda XL mejora el éxito técnico en el primer grupo de pacientes).

Se requiere de un dispositivo específico que incrementa los costos. Es impreciso para la determinación de estadios intermedios de fibrosis y finalmente, la presencia de factores que afectan la calidad de las mediciones, como congestión hepática, colestasis e inflamación. (39)

Elastografía de onda de cizallamiento puntual (pSWE, point shear wave elastography).

A diferencia de la ET, pSWE genera ondas de cizalla con pulsos de alta frecuencia o ARFI en la región de interés (ROI) elegida por el operador, con lo que se pretende evitar las áreas de artefacto. Después de que el ultrasonido es colocado en la ROI, lleva a cabo la medición de 10 x 6 mm, los resultados son expresados en metros por segundo en un rango de 0.5-5 m/s. ARFI es capaz de detectar rigidez aún en presencia de obesidad y ascitis, con un AUC de 0.91 para detectar fibrosis avanzada y 0.93 CH, respectivamente. (40) Un beneficio adicional, es que se puede adaptar a las imágenes convencionales basadas en ecografía, lo que proporciona una caracterización adicional del parénquima hepático (detección de lesiones focales, Doppler) y de otras estructuras abdominales, lo que disminuye los costos.

Elastografía de onda de cizallamiento de dos dimensiones (2D-SWE). ARFI es usado a varias profundidades para crear múltiples ondas en múltiples ROIs, lo que permite la medición secuencial de un área más amplia, con la opción de elegir el tamaño de la ROI y obtener un mapa de color en tiempo real de la rigidez hepática. Comparado con pSWE, con SWE se reduce la variabilidad de muestreo. La exactitud de este método, se estimó en 93% para el diagnóstico de fibrosis avanzada y 95% para CH. (41)

Entre las limitaciones de ARFI (pSWE y 2D-SWE) se encuentran: menor disponibilidad comparado con ET, criterios de calidad de técnica que aún no se encuentran estandarizados, falta de precisión en estadios intermedios de fibrosis y finalmente, la necesidad de estudios que permitan su validación.

Elastografía por resonancia magnética (ERM). Por su parte, la elastografía por resonancia magnética (ERM), utiliza vibraciones mecánicas generadas en un impulsor que crea ondas de corte, las cuales son evaluadas a través de un software especializado que genera mapas cuantitativos de rigidez hepática, conocidos como elastogramas. Esta técnica permite un área mayor de muestreo ($\geq 250 \text{ cm}^3$), la cual es 5 000 veces mayor que la biopsia y 250 veces mayor que ET. La rigidez hepática se reporta en kPa, siendo normales entre 2.05 y 2.44. (42)

Shing y cols, reportaron valores de AUC para el diagnóstico de no fibrosis de 0.84, fibrosis significativa 0.88, avanzada 0.93 y CH 0.92. Su precisión diagnóstica es independiente del índice de masa corporal, de la existencia de esteatosis y de la etiología de la enfermedad hepática crónica. (43) Al igual ARFI, tiene la capacidad para detectar lesiones focales, con la ventaja de caracterizarlas a través de la administración de contraste y también se ha propuesto (como en ET), un papel predictor de hipertensión portal y descompensación.

Si bien representa actualmente el mejor método no invasor para el diagnóstico de fibrosis hepática, su interpretación se puede ver afectada por actividad inflamatoria y hasta un 5% de los estudios no se pueden llevar a cabo debido a la presencia de sobrecarga de hierro. (44) Además de su alto costo y el tiempo que requiere para llevarse a cabo, no se encuentra disponible en la mayoría de los centros, lo cual limita mucho su uso.

En todos los métodos físicos descritos, los pacientes requieren ayuno ya que la ingesta de alimentos puede sobreestimar el resultado de las mediciones.

Combinación de marcadores

La combinación de diferentes modalidades de marcadores permite la medición de diferentes aspectos de estructura y función, con la finalidad de disminuir la cantidad de “puntos ciegos” en el diagnóstico de fibrosis hepática.

Fibrotest y APRI fueron usados en forma paralela o secuencial en tres algoritmos: SAFE biopsy, Leroy Algorithm y Fibropaca. En todos ellos, la biopsia se indicó cuando resultados fueron discordantes. El desempeño diagnóstico fue equiparable, con AUC > 0.85 para todos los desenlaces y evitando la realización de biopsia en 29 a 79% de los casos. (45, 46)

A pesar de que esta estrategia ha demostrado que puede mejorar el rendimiento y evitar una cantidad importante de biopsias, requieren ser validadas de acuerdo con grupo étnico, prevalencia y en etiologías diferentes a VHC. Entre sus inconvenientes principales, se encuentran: un incremento importante en el costo y que para su implementación se requiere contar con la disponibilidad de los dos métodos, lo cual en la puede resultar no factible o poco práctico en centros con recursos limitados.

2. ANTECEDENTES

La investigación realizada mediante el empleo de tejidos y suero se ha aplicado en la búsqueda de marcadores específicos de fibrosis hepática, para comprender los procesos biológicos fundamentales que intervienen; sus interrelaciones y el resultado de esta, ha sido empleado como herramienta en el desarrollo de métodos tanto diagnósticos, como terapéuticos. (47)

No existe un modelo experimental que reproduzca exactamente la fibrosis hepática humana por

etiología. A pesar de ello, cada uno de los modelos desarrollados ha servido para fortalecer nuestra comprensión de los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

Estos modelos se dividen en tres grupos: El primero incluye los cultivos celulares, en los cuales se estudian *in vitro* células primarias aisladas de hígado normal o dañado experimentalmente. Este tipo del modelo facilita el estudio detallado del comportamiento de la célula y del efecto de mediadores específicos, pero no puede recapitular claramente los acontecimientos que ocurren *in vivo* resultantes de la interacción compleja de las células entrantes y residentes en un microambiente.

En el segundo, se incluyen tejidos humanos tomados por biopsia o después de resección hepática. Los estudios que implican este tipo de modelos son esenciales para validar las observaciones hechas en cultivo de tejidos y modelos animales. La selección cuidadosa de muestras y el uso de técnicas moleculares garantizan que pueda ser generada una gran cantidad de información, sin embargo, las consideraciones éticas evitan que sean tomadas múltiples biopsias del hígado de los pacientes con propósitos de investigación. (48)

Finalmente, el tercero, incluye modelos experimentales de fibrosis, los cuales se llevan a cabo en modelo animal. Esto permite el muestreo seriado del tejido en el volumen requerido para los estudios de patogenia celular y molecular. (48) La fibrosis se puede inducir a través de varios mecanismos: administración de agentes hepatotóxicos (CCl₄, TAA y dimetiltrosamina) o mecánicos (ligadura de conductos biliares). (49)

Con base en estas observaciones, el grupo de la Dra. García de León realizó un proyecto con el fin de obtener un perfil molecular susceptible de emplearse en el diseño de una prueba pronóstica y/o diagnóstica no invasiva, que permitiera detectar a los pacientes con riesgo de padecer fibrosis hepática. El proyecto se basó en el desarrollo de dos modelos animales de fibrosis hepática inducidos con (CCl₄) y tioacetamida (TAA), analizados a través de la

metodología de microarreglos y monitoreados mediante la determinación de la cantidad de colágena intrahepática depositada, pruebas de funcionamiento hepático y, análisis histopatológicos.

Se obtuvieron 239 genes alterados, expresados en las distintas etapas del modelo animal y seleccionados con la ayuda de herramientas bioinformáticas (DAVID e IPA), con los que se llegó a la selección de 50 genes con mayor frecuencia de alteraciones (sub o hiper expresión) en el proceso, implementándose una lista final con aquéllos que presentaron valor de cambio por arriba del control, cuyas funciones estuvieran involucradas en el proceso fibrótico y, sin relación con patologías que cursaran con fibrosis en otros órganos; finalmente se escogieron 21 genes que mostraron ser significativos y cuyos productos de traducción pudieron ser detectados en suero, para ser analizados como candidatos para conformar un panel de diagnóstico no invasivo para fibrosis hepática, que al ser investigado en el suero de pacientes con enfermedad hepática crónica permitieron precisar las diferencias en el grado de fibrosis (Knodell F0-1 y F4) de los mismos, con un alto grado de especificidad y sensibilidad (95-99%), parámetros establecidos estadísticamente mediante curvas ROC.

Como controles, fueron explorados igualmente, en el suero de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y absceso hepático amebiano, al igual que en sueros de individuos sanos y en el suero de animales provenientes de un modelo de fibrosis renal, con lo cual se demostró que las moléculas cumplen con criterios de eficacia y confiabilidad.

Estos genes que codifican para las proteínas del mismo nombre son: **proteína 4 asociada a microfibrillas (MFAP4), Citocromo P450, familia 26, subfamilia A, polipeptido 1 (CYP26A1), aldehído deshidrogenasa familia 1, subfamilia A3 (ALDH1A3), Fibrilina 1 (FBN1), Fosfolipasa A2, grupo VII (Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, plasma) PLA2G7,**

componente 7 del complemento (C7), proteína de matriz Gla (MGP). Las cuales cuentan con patente concedida **No. DE REGISTRO: MX/a/2013/010937.** Tabla 7.

Tabla 7. Proteínas y su función, propuestas como biomarcadores, obtenidas del análisis de los genes que se encuentran alterados en el proceso de fibrosis de un modelo animal murino, inducido con CCl₄ (microarreglos).

Gen / Proteína	Nombre	Grupo	Función
MFAP4	Proteína 4 asociada a microfibrillas	Genes MEC	Involucrada en la adhesión celular e interacciones intercelulares
CYP26A1	Citocromo P450, familia 26, subfamilia A, polipeptido 1	Genes MEC	Unión a Heme, a ión Hierro, a iones metal, actividad de monoxigenasa, acarreador de electrones
ALDH1A3	Aldehído deshidrogenasa familia1, subfamilia A3	Genes relacionados con proliferación celular	Participación en vías de glucólisis/gluconeogénesis, metabolismo de histidina, Xenobioticos por el citocromo P450 de fenilalanina y de tirosia; morfogénesis del ojo embrionario
FBN1	Fibrilina 1	Genes MEC	Constituyente estructural de matriz extracelular
PLA2G7	Fosfolipasa A2, grupo VII (Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, plasma)	Genes relacionados con ácidos grasos	Actividad de hidrolasa
C7	Componente 7 del complemento	Genes relacionados con inmunidad	Homeostasis del ión sodio celular y de los iones celulares, inducción de apoptosis
MGP	Proteína de matriz GLA	Genes MEC	Unión a ión calcio, proteínas de unión dependientes de calcio

MEC: Matriz extracelular.

La **MFAP4**, es una proteína de 66 kDa, asociada a matriz extracelular con sitios de unión a colágena y a carbohidratos (50). Se ha propuesto que tiene un papel en el mantenimiento de la integridad de la matriz extracelular en tejidos sometidos a alto esfuerzo tensil como la aorta y en la periferia de fibras elásticas de la piel. También se ha sugerido su participación en procesos inflamatorios pulmonares. (51)

Fue propuesta por primera vez como biomarcador de fibrosis hepática por el grupo del Dr. Mölleken a través de un estudio de proteómica en tejido hepático de pacientes trasplantados; en donde se observó que la expresión de MFAP4 fue 46.7 veces mayor en el tejido de pacientes con cirrosis, la cuantificación sérica se llevó a cabo por ELISA demostrando una diferencia significativa entre su concentración en pacientes con cirrosis por VHC (42.4 ± 18.7 U/mL) y ALD (43.8 ± 36 U/mL) comparada con controles (17 ± 5.2) ($p=0.007$), el área bajo la curva fue de 0.97 (VHC) y 0.82 (ALD) respectivamente para el diagnóstico de cirrosis, permitiendo la distinción incluso en estadios intermedios de fibrosis. (52)

Sækmoose y cols., llevaron a cabo un estudio de validación para la medición de sMFAP4 (MFAP4 sistémica), mediante la técnica de ELISA, en una cohorte de 1, 417 gemelos daneses, analizado a través de un modelo de regresión. Concluyendo que la variabilidad asociada con la herencia así como con otros factores, es relativamente baja (51). Estos mismos autores, corroboraron el desempeño diagnóstico de MFAP4 en una cohorte de usuarios de drogas intravenosas ($n=351$), de los cuales a 28 de ellos, se les realizó biopsia hepática y, en una cohorte mixta de pacientes ($n=248$). A través de un análisis de regresión, se demostró una asociación significativa con infección viral crónica en el grupo de usuarios de drogas intravenosas y con elastografía transitoria en ambos grupos. En el subgrupo de los pacientes con biopsia, se demostró además asociación significativa con los estadios en la escala METAVIR, sin embargo es importante señalar que el número de pacientes de éste subanálisis fue pequeño, lo que no permite generalizar ésta conclusión, finalmente, si bien se ha reportado incremento de ésta molécula en pacientes con insuficiencia cardíaca, la concentración sérica se encontró predominantemente elevada en padecimientos hepáticos, al comparar la concentración sérica entre ambos grupos. (53)

Por su parte Bracht y cols, evaluaron su potencial en la diferenciación entre ausencia – fibrosis moderada (F0-F2) comparada con fibrosis severa/cirrosis (F3-F4), encontrando significancia estadística, en una cohorte de pacientes con VHC (n=542) los cuales contaban con biopsia hepática. Mölleken en 2019, además demostró que posterior a la curación de la hepatitis C, con antivirales de acción directa, las concentraciones de MFAP4 disminuyen, lo cual está presuntamente relacionado con una disminución en la fibrogénesis o fibrosis hepática. (54) En el mismo año, Madsen y cols, estudiaron la utilidad de este biomarcador en la detección de cirrosis y fibrosis avanzada en pacientes con antecedente o historia de consumo de alcohol en patrón de abuso. En los tres estudios comentados, la técnica utilizada para la medición de la proteína sérica fue AlphaLISA® (PerkinElmer).

La **CYP26A1** enzima identificada por primera vez en 1996 y se ha relacionado con el metabolismo del ácido transretinóico (AR), el cual es un metabolito activo de la vitamina A, cuya deficiencia o exceso da como resultado efectos negativos en la salud de los humanos demostrada en padecimientos como la enfermedad de Alzheimer, alteraciones en la fertilidad y desarrollo, entre otros. (55)

Las enzimas de la familia CYP26A incluyen CYP26A1, CYP26B1 y CYP26C1, las cuales, se piensa, son responsables de la depuración de AR, ya que algunos estudios en los que se evaluó la expresión del mRNA, se identificó la presencia de CYP26A1 como la mayor isoforma en hígado humano. (56) Del mismo modo, Thatcher y cols., llevaron a cabo un estudio en el que corroboraron la hipótesis previamente descrita, que CYP26A1 es expresada en el hígado humano y que dicha expresión correlaciona con la hidroxilación de RA, lo cual tiene un rol dominante en la depuración de AR. (55)

Desde el punto de vista celular, se ha observado que las HSC, mantienen un fenotipo inactivo no proliferativo que almacena del 70 al 80% del total del retinoide hepático. Cuando las HSC se

activan, pierden su almacenamiento intracelular de vitamina A, lo que conduce a la transformación a células semejantes miofibroblastos productores de colágena. (57)

La **ALDH1A3** pertenece a la familia de deshidrogenasas (de las cuales se han descrito 19 isoformas) encargadas de oxidar aldehídos endógenos y exógenos, generados durante el metabolismo de aminoácidos, lípidos, aminos biogénicas, vitaminas y esteroides. Se trata de uno de los tres isotipos de ALDH1, localizado en el cromosoma 15 (15q26.3); cuya función es catalizar la reacción de oxidación de retinol a ácido retinoico, almacenado en las HSC en reposo (57). Chen y cols., reportaron que ALDH1A3, tiene un papel importante como factor independiente de mal pronóstico en pacientes con colangiocarcinoma intrahepático, asociado además con resistencia a gemcitabine, por lo que se considera como un nuevo blanco terapéutico oncológico en esta enfermedad. (58)

Pettinelli y cols., determinaron la relación entre los niveles de retinol plasmático y la expresión hepática de genes relacionados con su metabolismo, en pacientes con EHGNA o EHNA comparados con sujetos sanos, así como la evaluación de la expresión, a nivel hepático (Illumina microarray), de los factores de transcripción regulados por el ácido retinoico. Para este fin, se evaluaron 39 pacientes con EHGNA, diagnosticada por biopsia (20 esteatosis, 19 esteatohepatitis), comparados con 24 sujetos sanos, a través de un análisis de componentes principales y, determinaron 10 genes diferencialmente expresados: RXRB, RDH10, ADH1B, **ALDH1A3**, PPARA, **CYP26A1**, ALDH1A2, AKR1B10, DHRS4, RDH11. entre ellos, se encontró CYP26A1 sobreexpresada en pacientes con esteatosis simple. (57) Ambos grupos de pacientes, mostraron baja expresión de los dos genes que codifican para ALDH1A2 y ALDH1A3, lo cual no concuerda con literatura previa (59). Estas enzimas, se correlacionaron inversamente con los niveles plasmáticos de retinol ($\rho = 0.41$, $p=0.02$ y $\rho = -0.30$, $p=0.03$, respectivamente). Se presupone que, la sobreexpresión de AKR1B10 acompañada de la baja expresión de ALDH1A2

y ALDH1A3, podrían favorecer la progresión de esteatohepatitis a carcinoma hepatocelular (CHC). (57)

FBN1 o Fibrilina-1, es uno de los principales componentes de las microfibrillas, forma parte de una familia que incluye fibrilina 1 y 2, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la matriz extracelular de la piel, pulmón, riñones, vasos sanguíneos, tendones y tejido ocular. Las mutaciones en el gen para FBN1, también se asocian a trastornos como el síndrome de Marfan, el cual es una enfermedad multisistémica, con afectación aórtica como condicionante de supervivencia. (60)

La presencia de FBN1 en hígado, fue descrita en el 2001 por Dubuisson y colaboradores. Actualmente se sabe que está presente en tejido hepático normal, se encuentra sobreexpresado en zonas de fibrosis rodeando los nódulos de regeneración y, en el estroma fibroso de CHC. (61) Lamireau y cols., llevaron a cabo un estudio en el que evaluaron biopsias de pacientes pediátricos con enfermedad colestásica diversa, mediante un método inmunohistoquímico, empleando como controles, muestras normales de tejido hepático. En los controles sanos, al igual que en adultos, la fibrilina-1 se expresó en las paredes de los vasos, sinusoides y tejido conectivo portal, particularmente en la placa limitante y cerca de la membrana basal de los conductos biliares, mientras que, en pacientes con patología colestásica, se observó una acumulación incrementada de tejido conectivo portal y septos fibrosos, perdiéndose la expresión de estructuras biliares hacia la membrana basal, excepto en presencia de atresia biliar. (60).

La **PLA2G7 (Fosfolipasa A2, grupo VII)**, es una enzima que cataliza la degradación del factor activador de plaquetas a productos biológicamente inactivos. Los defectos en el gen que codifica para esta enzima, causan la deficiencia en la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas. (62). Smith y cols., llevaron a cabo un estudio en muestras de carcinoma hepatocelular (CHC) y tejido cirrótico circundante, el cual tuvo como objetivo la identificación de los genes expresados

en CHC (a través de la técnica de microarreglos), cuyas proteínas pudieran ser empleadas como biomarcadores que pudiesen ofrecer un mejor rendimiento diagnóstico que los existentes para este tipo de neoplasia. El panel de biomarcadores obtenido, incluyó el gen para proteína cinasa de serina/treonina 15 (STK15), la cual no se había relacionado previamente con cáncer hepático; además de un conjunto de genes que codifican para, la glutamato carboxipeptidasa plasmática (PGCP) y dos fosfolipasas de secreción, la PLA2G13 y la PLA2G7, donde la magnitud de los cambios de expresión fue mucho mayor para el gen PLA2G13. (63).

Por su parte, Ishihara y cols, a través de un modelo murino de fibrosis, evaluaron el efecto de la deficiencia de la fosfolipasa A2, grupo IV-A (IVA-PLA₂), encontrando que dicha carencia se asocia con la atenuación en la acumulación de grasa y generación de fibrosis hepática, a través de la inhibición de la infiltración de células de Kupffer, bloqueando de este modo la activación de HSC, posterior a la inyección con CCL₄. (64).

La **MGP o Proteína de matriz Gla**, se ha descrito en numerosos tejidos de mamíferos, aves y peces, tales como hueso, cartílago, corazón y riñón. El gen que codifica para esta molécula, se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 y su mRNA en humanos, tiene una longitud de 585 pb. Su mutación, causa el síndrome de Keutel, trastorno autosómico recesivo caracterizado por calcificación anormal del cartílago, estenosis pulmonar periférica e hipoplasia facial. (65, 66).

El **C7** es un componente importante para la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), fase final de la activación del Complemento, que forma un poro en la membrana de algunos patógenos. Su síntesis se lleva a cabo en el hígado (67), por lo cual es una de las moléculas que se ven alteradas durante su síntesis en el proceso de fibrosis inducida por inyección de CCL₄ en el modelo murino.

De Lima y colaboradores, investigaron la asociación de un polimorfismo del gen para C7 con fibrosis hepática y el desarrollo de CHC, en muestras de 456 pacientes con hepatitis crónica por

VHC, mediante PCR en tiempo real, concluyendo que el genotipo G/G de C7 parece ser un factor protector para el desarrollo de fibrosis avanzada, demostrando además, asociación con el riesgo de formación de nódulos de regeneración y CHC, lo que sugiere que C7 tiene una función importante en el desarrollo de fibrosis y cáncer hepático. (68).

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La CH es una de las principales causas de muerte en México en sujetos entre los 25 y 50 años de edad. En promedio un 40% de pacientes con cirrosis son asintomáticos y pueden permanecer así por más de una década, sin embargo, una vez que se hace clínicamente evidente o que el paciente cursa con descompensación, ésta se asocia con gravedad e internamientos recurrentes, por lo cual, la única opción curativa en la actualidad es el trasplante hepático.

El estándar de referencia para el diagnóstico de fibrosis en pacientes con hepatopatía es la biopsia hepática, sin embargo, tiene el inconveniente de ser un procedimiento invasivo, por lo que rara vez se utiliza con este fin. Por tal motivo, recientemente se ha incrementado la demanda del uso de marcadores no invasivos de fibrosis, los cuales han mostrado utilidad diagnóstica en los extremos de la enfermedad, pero con limitantes en la estadificación, además de variabilidad en su desempeño, dependiente de la etiología.

4. JUSTIFICACIÓN

Al momento no existen marcadores séricos que indiquen con certeza la actividad fibrogénica hepática ya que, los que se encuentran disponibles, no han mostrado los resultados de validez y seguridad esperados; es decir, mientras unas pruebas resultan ser adecuadas para tamizaje, otras lo son como complemento para validar a otras (confirmatorias). Por lo tanto, no existe una prueba única que pueda aproximarse con excelente eficiencia al desempeño del estándar de

referencia (la biopsia hepática). Por este motivo, es necesaria la elaboración de un perfil molecular, específico para la fibrosis hepática, que permita determinar el diagnóstico de las diferentes etapas por las que cursa la enfermedad, con lo cual se podría disponer de una herramienta más certera, especialmente en pacientes asintomáticos, con el fin de determinar la etapa del padecimiento en la que se encuentran y con ello, poder plantear opciones de tratamiento y seguimiento.

El presente estudio es parte de un programa científico colaborativo de medicina traduccional que tiene como meta final evaluar el papel potencial de este panel de biomoléculas en el diagnóstico de la fibrosis hepática en sus distintos estadios histopatológicos en diversas etiologías. La hipótesis global de este proyecto es, el panel diagnóstico en cuestión es específico para fibrosis hepática, independientemente de la etiología de esta y, que podrá distinguir entre los distintos estadios de la inflamación y fibrosis que conducen ulteriormente a la cirrosis.

En esta etapa, se busca caracterizar primeramente el desempeño diagnóstico de este panel en pacientes con cirrosis hepática, comparado con controles sin hepatopatía conocida.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el desempeño diagnóstico (sensibilidad, especificidad, valor de predicción positiva y negativa, exactitud, y razones de verosimilitud) de un panel de siete biomarcadores asociadas con fibrosis hepática, en la identificación de casos de cirrosis hepática?

6. HIPÓTESIS

El desempeño diagnóstico del panel bioquímico conformado por 7 moléculas, asociados con fibrosis hepática, tendrá una precisión muy buena, para la distinción entre pacientes con cirrosis hepática e individuos sin hepatopatía conocida.

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, exactitud y razones de verosimilitud de 7 nuevos biomarcadores para fibrosis hepática, comparando pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática y controles sin hepatopatía conocida.

Objetivos específicos

- Comparar la magnitud de la expresión sérica de 7 biomoléculas asociadas a la fibrosis hepática: proteína 4 asociada a microfibrillas (**MFAP4**), citocromo p450, familia 26, subfamilia A, polipéptido 1 (**CYP26A1**), aldehído deshidrogenasa familia1, subfamilia A3 (**ALDH1A3**), fibrilina 1 (**FBN1**), fosfolipasa A2, grupo VII (factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, plasma) (**PLA2G7**), componente 7 del complemento (**C7**), proteína de matriz Gla (**MGP**), entre pacientes con cirrosis y controles sin hepatopatía conocida.
- Determinar los puntos de corte para el diagnóstico de cirrosis hepática, mediante la determinación de niveles de expresión sérica de los biomarcadores mediante la prueba de ELISA.
- Evaluar la validez, seguridad, exactitud y eficiencia del panel de 7 biomarcadores en la identificación de pacientes con cirrosis hepática y sujetos sin hepatopatía.

Objetivos secundarios

- Determinar si la expresión sérica de los biomarcadores se modifica a medida que progresa la enfermedad hepática, es decir si ésta es diferente en grupos de pacientes CHILD-PUGH, A, B y C.

- Determinar si los puntos de corte para el diagnóstico de cirrosis hepática de los biomarcadores se modifican al agrupar a los pacientes por etiología subyacente (autoinmune, viral, etílica, EHGNA, entre otras).

8. MATERIAL Y METODOS

8.1 Diseño

Prolectivo, observacional y transversal, tipo análisis crítico del desempeño diagnóstico.

8.2 Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática que acudieron para valoración a la clínica de Hígado del Instituto Nacional de Ciencias Médica y Nutrición “Salvador Zubirán” o que se encontraban internados por alguna complicación relacionada con la cirrosis hepática, quienes aceptaron participar, mediante la firma de la carta de consentimiento informado.

Controles fueron incluidos, previo consentimiento informado, pacientes que aprobaron la evaluación para ser donadores en el banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” o voluntarios que aceptaron participar en el estudio.

8.3 Criterios de Selección

Criterios de inclusión pacientes con cirrosis hepática

- Pacientes con registro en el Instituto.
- Género masculino o femenino.
- Mayores de 18 años y menores de 65 años.
- Haber aceptado firmar la carta de consentimiento informado.
- Diagnóstico de cirrosis hepática de cualquier etiología *

***Criterios para diagnóstico de cirrosis hepática**

Criterios clínicos: Red venosa colateral en abdomen, atrofia tenar e hipotenar, eritema palmar, ginecomastia, telangiectasias, uñas de Terry, ascitis, edema de miembros pélvicos, asterixis e hipertrofia parotídea en caso de alcohol.

Alteraciones bioquímicas: Bilirrubina directa elevación de 2 veces por arriba del valor normal, Transaminasas (AST y ALT) incremento de 2 veces por arriba del valor normal, albúmina < 3.5 g/dL, INR \geq 1.3

Hipertensión Portal: Varices esofágicas en la esofagogastroduodenoscopia.

Biopsia de hígado: compatible (puentes de fibrosis y/o nódulos de regeneración).

Ultrasonido de Hígado: Presencia de nódulos de regeneración, esplenomegalia, datos compatibles con hipertensión portal (resistencia vascular) y ascitis.

***Criterios diagnóstico de cirrosis hepática:** Se necesitan criterios clínicos y de imagen para cumplir la definición operacional o diagnóstico histopatológico.

Criterios de exclusión pacientes con CH

- Antecedente de trasplante hepático.

Criterios de inclusión de pacientes sin hepatopatía conocida

- Pacientes mayores de 18 y menores de 65 años.
- Que hayan aprobado la evaluación para ser considerados donadores en banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".
- **Voluntarios sin antecedentes personales patológicos**, que desearon participar en el estudio y además aceptaron firmar la carta de consentimiento informado.
- Resultado de Fibroscan®, F0-F1.
- Resultado de pruebas hepáticas, dentro de rango normal (alteración no mayor al doble del valor superior normal establecido por laboratorio).
- Serología negativa para VHB y/o VHC.

Criterios de exclusión de pacientes sin hepatopatía conocida

- Fibroscan®, resultado \geq F2.
- Pruebas de hepáticas alteradas \geq 2 veces el parámetro superior establecido por laboratorio.
- Serología positiva VHB y/o VHC.

8.4 Tamaño de muestra

Se llevó a cabo muestreo de tipo no probabilístico, por conveniencia, en pacientes consecutivos que acudieron a consulta médica en la clínica de Hígado del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Se realizó el cálculo del tamaño de muestra para la detección de la biomolécula con la diferencia más estrecha entre pacientes con cirrosis y controles sanos, en los estudios preliminares del proyecto científico del que forma parte el presente estudio (Patente concedida **No. DE REGISTRO: MX/a/2013/010937**). El cálculo se basó en el supuesto de que la diferencia más estrecha en la magnitud de la densidad óptica del ELISA para la concentración de C7 (la molécula con la diferencia más estrecha entre grupos) fue de 0.14 unidades de densidad óptica (DO) en pacientes con cirrosis hepática y de 0.05 DO en controles sanos ($\Delta=0.09$ DO, $DE=0.19$ DO), con un error tipo I (alfa) de 5% y error tipo II (beta) de 20%.

De esta manera, 70 pacientes por cada grupo mostraron tener poder estadístico del 80% en la detección de al menos 0.09 DO en la diferencia de la biomolécula con el peor desempeño para discriminar entre casos con cirrosis y controles sin hepatopatía. Así cubrimos con el tamaño de muestra calculado las comparaciones de las concentraciones de las biomoléculas en las que se espera una mayor diferencia.

8.5 Descripción de Procedimientos

Pacientes con cirrosis hepática

Se tomaron 5 ml de sangre periférica, en un tubo Vacutainer sin anticoagulante, se recabaron los datos del expediente y se registraron en un formato estructurado y estandarizado. Las muestras biológicas obtenidas no fueron asociadas con ninguna información personal y se codificaron con un número seriado para evitar cualquier posibilidad de identificación particular. Posteriormente se trasladaron al laboratorio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la UNAM, en el HGM, donde fueron almacenadas y posteriormente procesadas.

Pacientes sin hepatopatía conocida

A los pacientes que aprobaron la evaluación para ser considerados donadores en el banco de sangre del Instituto (INCMNSZ), se les tomó de igual manera, una muestra de 5 ml de sangre periférica, así como a voluntarios sin antecedentes personales patológicos y, que decidieron participar en el estudio, para la determinación de pruebas de funcionamiento hepático y serología para VHB y VHC. y, 5 ml de sangre extra, los cuales se centrifugaron, almacenaron y, posteriormente se trasladaron a la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la UNAM, para la determinación de los biomarcadores. De forma adicional, todos los participantes fueron programados para la realización del Fibroscan® en el Departamento de Gastroenterología (INCMNSZ).

8.6 Técnicas, Aparatos e Instrumentos que se utilizaron en la medición

Panel de Biomarcadores.

ELISA: se utilizó el tipo sándwich indirecto con la finalidad de detectar la expresión sérica de las siguientes moléculas: **proteína 4 asociada a microfibrillas (MFAP4), citocromo p450,**

familia 26, subfamilia a, polipeptido 1 (CYP26A1), aldehído deshidrogenasa familia1, subfamilia A3 (ALDH1A3), fibrilina 1 (FBN1), fosfolipasa A2, grupo VII (PLA2G7), componente 7 del complemento (C7), proteína de matriz Gla (MGP), a cada una de las muestras de suero, de acuerdo con la técnica descrita por Harlow y cols. 1998 (69) con algunas modificaciones, se emplearon dos tipos de anticuerpos específicos para cada molécula, uno de captura (policlonal) que permite concentrar el antígeno para una detección más eficiente y uno monoclonal para asegurar la especificidad de la reacción y evitar falsos positivos, todos los anticuerpos utilizados fueron de origen comercial

La reacción fue estandarizada para cada sistema antígeno/anticuerpo. Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a HRP (IgG de cabra contra IgG de ratón-HRP) (Zymed Laboratories, San Francisco. CA, USA), empleándose Ortofenil ninhidrina como sustrato, la lectura de la reacción enzimática se realizó, en un lector de ELISA a 450 nm (ELx800 Bio-Tek Instruments, Inc., Winoosky, VT. USA).

FibroScan®. (FibroScan®, Echosens, France).

El estudio se llevó a cabo por un técnico con experiencia (>100 procedimientos) en pacientes con enfermedades crónicas del hígado. La elastografía se determinó en el lóbulo derecho del hígado, en el espacio intercostal con el paciente en posición supina y el brazo derecho en máxima abducción. Los resultados fueron expresados en kilopascales (kPa) y se reportó la mediana de 10 determinaciones. Los casos fueron incluidos cuando se obtuvo una tasa de éxito por arriba del 60% y un índice IQR de <0.3.

8.7 Análisis Estadístico

La mayoría de los datos demográficos se presentaron como frecuencias relativas simples en forma de porcentajes. Las variables cuantitativas continuas de distribución normal (por ej., peso,

talla, IMC, etc.) se analizaron como promedios y desviaciones estándar, mientras que las variables de distribución no paramétrica (por ej., edad, unidades de densidad óptica, etc.) se presentaron como medianas con rangos intercuartiles.

La prueba χ^2 de Pearson se usó para comparar las frecuencias de variables nominales cualitativas. En la prueba χ^2 se empleó la corrección de Yates cuando la frecuencia de calificación de alguna variable nominal en un grupo determinado (casillero de la tabla de 2x2) fue <5 , y la prueba exacta de Fisher cuando dicha frecuencia fue $= 0$. La prueba t de Student se usó en la comparación de variables cuantitativas continuas de distribución normal.

Se utilizó U de Mann-Whitney en la comparación de medianas, para variables continuas no paramétricas entre 2 grupos, y Kruskal-Wallis, cuando se compararon más de 2 grupos. Se empleó la prueba de Pearson para evaluar la correlación lineal entre dos variables cuantitativas continuas y el valor resultante (rho de Pearson) se elevó al cuadrado para obtener el coeficiente de determinación. Todos los valores de p para comparaciones y correlaciones fueron calculados a dos colas y considerados como significativos con un valor de $p < 0.05$. En todos estos cálculos, se usó el paquete estadístico SPSS v21.0.

Se realizó imputación de las variables con datos faltantes $<10\%$. La cual se llevó a cabo mediante la imputación multivariable por ecuaciones encadenadas (MICE, por sus siglas en inglés) con 50 iteraciones para un conjunto de datos, bajo el supuesto de datos faltantes completamente al azar, utilizando el paquete *mice* de R.

Para evaluar la asociación de las moléculas con los casos, se realizaron modelos de regresión logística univariada y multivariada, ajustados por edad y sexo. Los diagnósticos del modelo se realizaron utilizando R^2 y minimización del criterio de información bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés); la multicolinealidad se evaluó mediante la tolerancia y el factor de inflación de la varianza (VIF, por sus siglas en inglés). Los predictores se probaron en supuestos de

homocedasticidad y linealidad; en beneficio de los supuestos de los modelos, se aplicaron transformaciones de cuantiles ordenados a las moléculas; los diagnósticos de los modelos fueron conducidos mediante la evaluación de la normalidad de los residuos. Los parámetros del modelo se expresaron mediante razón de probabilidades/momios (OR) e intervalos de confianza (IC) al 95%.

Posteriormente, dentro del paquete *OptimalCutpoints* de R se calcularon puntos de corte y curvas ROC para analizar el rendimiento diagnóstico de las moléculas [sensibilidad y especificidad (validez), valores de predicción negativa y positiva (seguridad), razones de verosimilitud o probabilidad (del inglés likelihood ratio), índice de Youden (eficiencia)].

Se usaron aquellas que se asociaron positivamente en los modelos univariados, además de calcular un cociente M3/M4 y M3 x M2. Por último, con el paquete *pROC* de R, se compararon las áreas bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de las diferentes moléculas usando 2000 permutaciones de bootstrap.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud, en materia de investigación para la Salud (Artículo 17), en el apartado referente a investigaciones en seres humanos, este trabajo es considerado con “**riesgo mínimo**”, ya que la obtención de datos para fines de protocolo se lleva a cabo a través de la medición de signos vitales y recolección de muestras de muestras de laboratorio, así como la revisión de resultados de laboratorio, cuando estos hayan sido solicitados.

El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 11 de septiembre de 2016.

9. RESULTADOS

Se llevó a cabo la prueba de Kolmogórov-Smirnov para las variables cuantitativas continuas. Se incluyeron 150 pacientes, 80 con diagnóstico de cirrosis hepática y 70 sin hepatopatía conocida, en las tablas 8, 9 y 10, se describen las características demográficas de cada grupo.

Tabla 8. Características demográficas de los pacientes con cirrosis hepática.

Variable	Población total (n= 80)
Sexo femenino, n (%)	42 (52.5)
Edad, mediana (RIC), años	56 (56-63)
Etiología, n (%)	
VHC	20 (25)
Criptogénica	3 (3.75)
Alcohol	6 (7.5)
EHNA	9 (11.25)
Secundaria	5 (6.25)
Autoinmune	25 (31.25)
HAI	12 (15)
CBP	6 (7.5)
CEP	1 (1.25)
Sobreposición	6 (7.5)
Otras*	2 (2.5)
CHILD-Pugh (%)	
A	2 (2.5)
B	32 (40)
C	46 (57.5)
MELD (RIC), puntaje	18 (18 - 22)

VHC: Virus de hepatitis C., EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica., HAI: Hepatitis autoinmune., CBP: Colangitis biliar primaria, CEP: Colangitis esclerosante primaria., *Otras: Deficiencia de lipasa ácida lisosomal, deficiencia de alfa 1 antitripsina.

Tabla 9. Complicaciones y comorbilidades de los pacientes con cirrosis hepática.

Variable	Población total (n= 80)
Complicaciones, n (%)	
EH	56 (70)
HPH	35 (43.8)
Ascitis	70 (83.8)
PBE	9 (11.3)
CHC	9 (12.5)
Hidrotórax hepático	7 (8.8)
Trombosis portal	8 (10)
SHR	9 (11.3)
Comorbilidades, n (%)	
DM	18 (22.5)
ERC	8 (10)
HAS	7 (8.8)
Enfermedad autoinmune	7 (8.8)
CUCI	1 (1.3)

EH: Encefalopatía hepática, HPH: Hipertensión portal hemorrágica, PBE: Peritonitis bacteriana espontánea, CHC: Carcinoma hepatocelular, SHR: Síndrome Hepatorrenal, DM: Diabetes mellitus, ERC: Enfermedad renal crónica, HAS: Hipertensión arterial sistémica, CUCI: Colitis ulcerosa crónica idiopática.

Tabla 10. Características demográficas de los pacientes sin hepatopatía conocida.

Variable	Población total (n= 70)
Sexo femenino, n (%)	45 (64.3)
Edad, mediana (RIC) años	26 (25-30)
Fibroscan, mediana (%) kPa (min-max)	3.3 (3.3-4.8)
Pruebas hepáticas, mediana (RIC)	
BT (mg/dL)	0.64 (0.5 - 0.8)
BD	0.13 (0.1 - 0.17)
ALT (U/L)	15.3 (12 - 20.5)
AST (U/L)	19 (16 - 22)
FA (U/L)	62 (52.5 - 78)
GGT (U/L)	15 (12.2 - 20.7)
Albúmina (g/dL)	4.8 (4.5 - 5)

RIC: Rango Intercuartilar, kPa: Kilopascales, BT: Bilirrubina total, BD: Bilirrubina directa, ALT: Alanino aminotransferasa, AST: Aspartato aminotransferasa, FA: Fosfatasa alcalina, GGT: Gammaglutamil transpeptidasa, mg/dL: Miligramo/decilitro., U/L: Unidades/litro., g/dL: gramos/decilitro.

A los resultados obtenidos del análisis de biomarcadores por el método de ELISA, se les aplicó el test de normalidad y se determinó que tienen distribución no paramétrica, por lo tanto, los valores fueron reportados en medianas. Posteriormente se llevó a cabo prueba U de Mann-Whitney para determinar si existían o no diferencias entre las medianas de los grupos. Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de los valores de las medianas de la expresión sérica, en unidades de densidad óptica (DO), de los biomarcadores entre pacientes con cirrosis hepática y pacientes sin hepatopatía conocida.

Biomarcador, mediana (RIC), DO	Cirrosis Hepática (n=80)	Sin Hepatopatía (n=70)	p *
MFAP4	0.226 (0.162 - 0.410)	0.215 (0.175 - 0.287)	0.339
CYP26A1	0.087 (0.064 - 0.137)	0.055 (0.051 - 0.060)	< 0.001
ALDH1A3	0.236 (0.181 - 0.383)	0.139 (0.125 - 0.150)	< 0.001
FBN1	0.147 (0.099 - 0.193)	0.193 (0.145 - 0.239)	< 0.001
PLA2G7	0.057 (0.049 - 0.084)	0.052 (0.046 - 0.072)	0.019
C7	0.178 (0.096 - 0.558)	0.257 (0.096 - 0.518)	0.589
MGP	0.166 (0.144 - 0.198)	0.172 (0.148 - 0.206)	0.745

DO: Unidades de densidad óptica., *Prueba utilizada: U de Mann-Whitney, p: < 0.05.

Se elaboraron gráficos de cajas y bigotes para cada uno de los biomarcadores. (Gráficos 1-7)

Gráfico 1. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de MFAP4 (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.

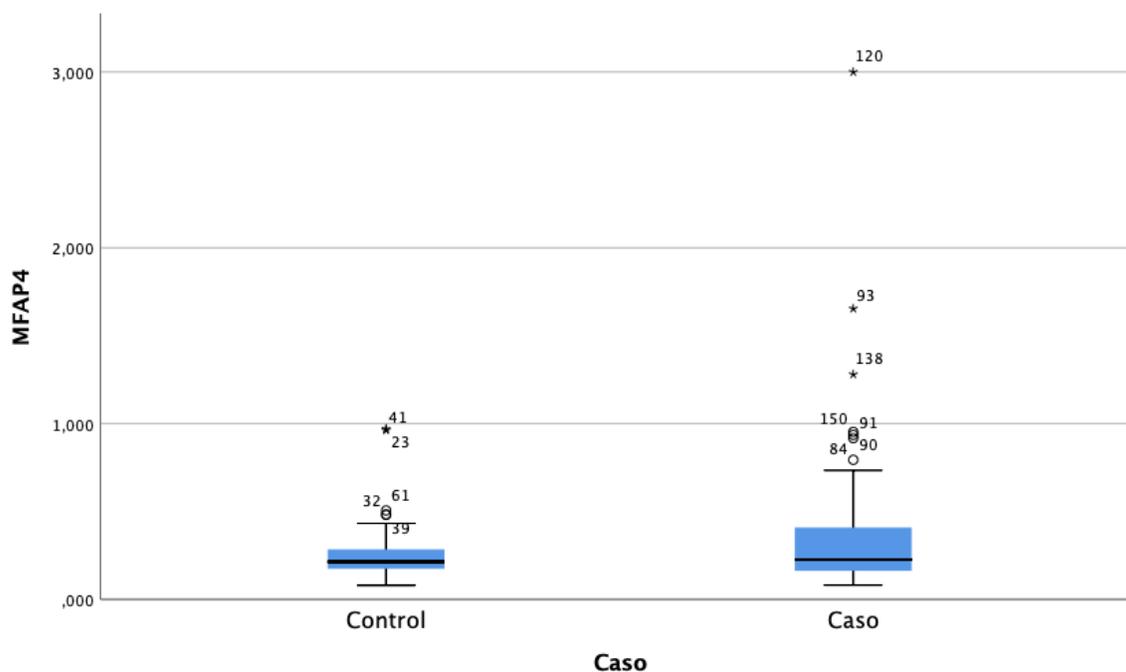


Gráfico 2. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de CYP26A1 (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.

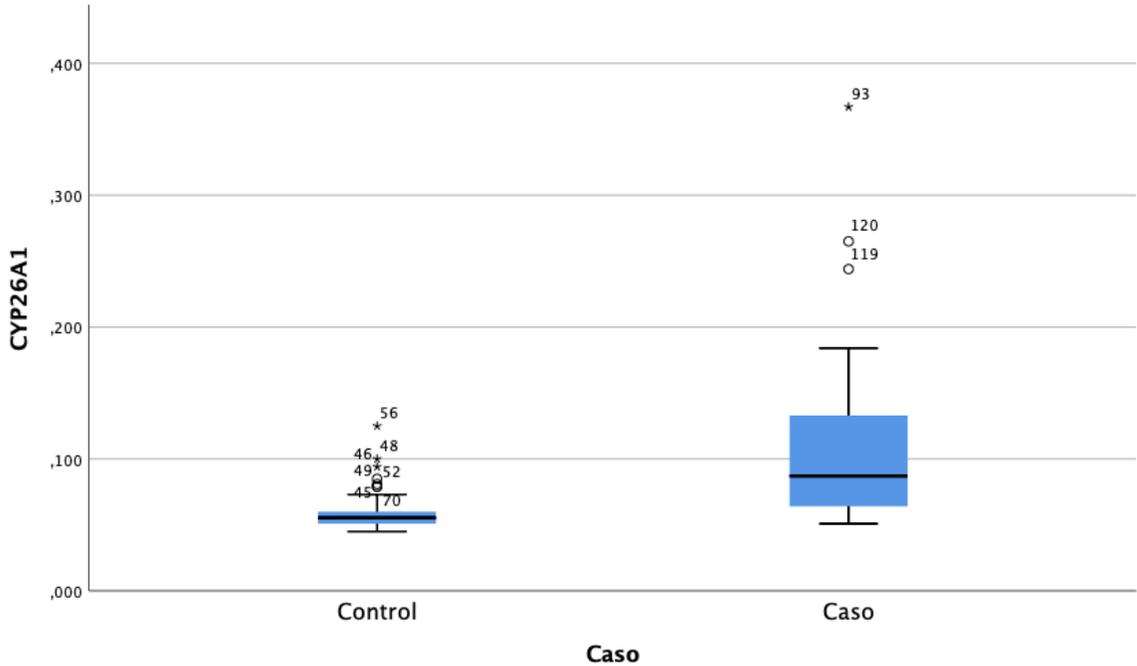


Gráfico 3. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de ALDH1A3 (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.

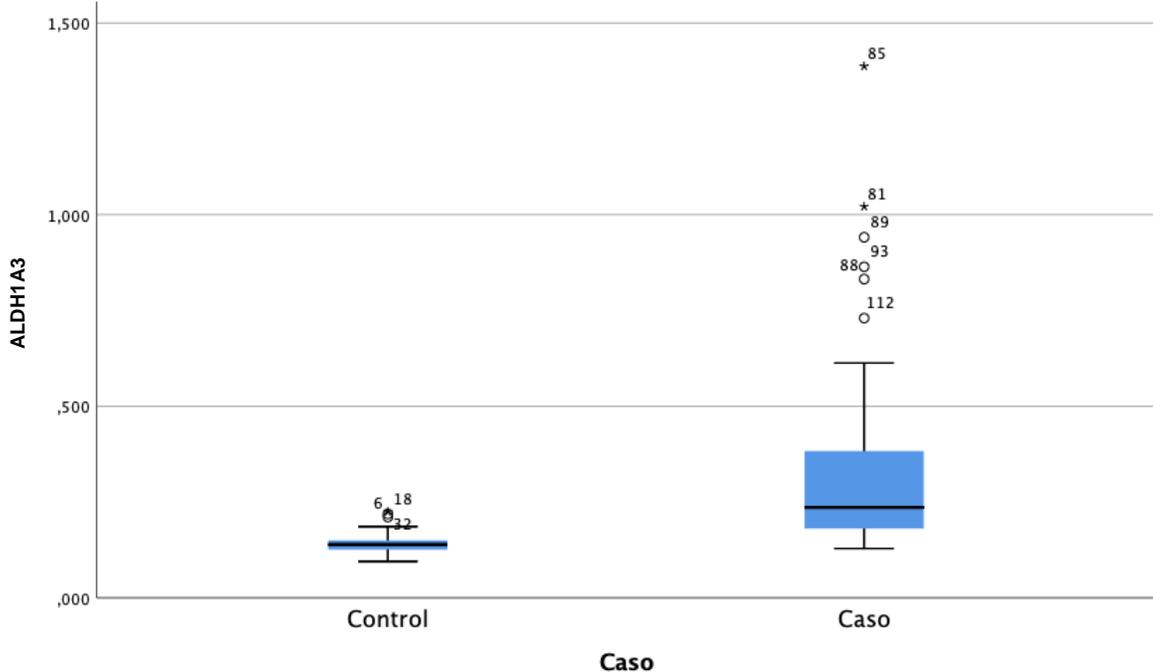


Gráfico 4. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de FBN1 (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.

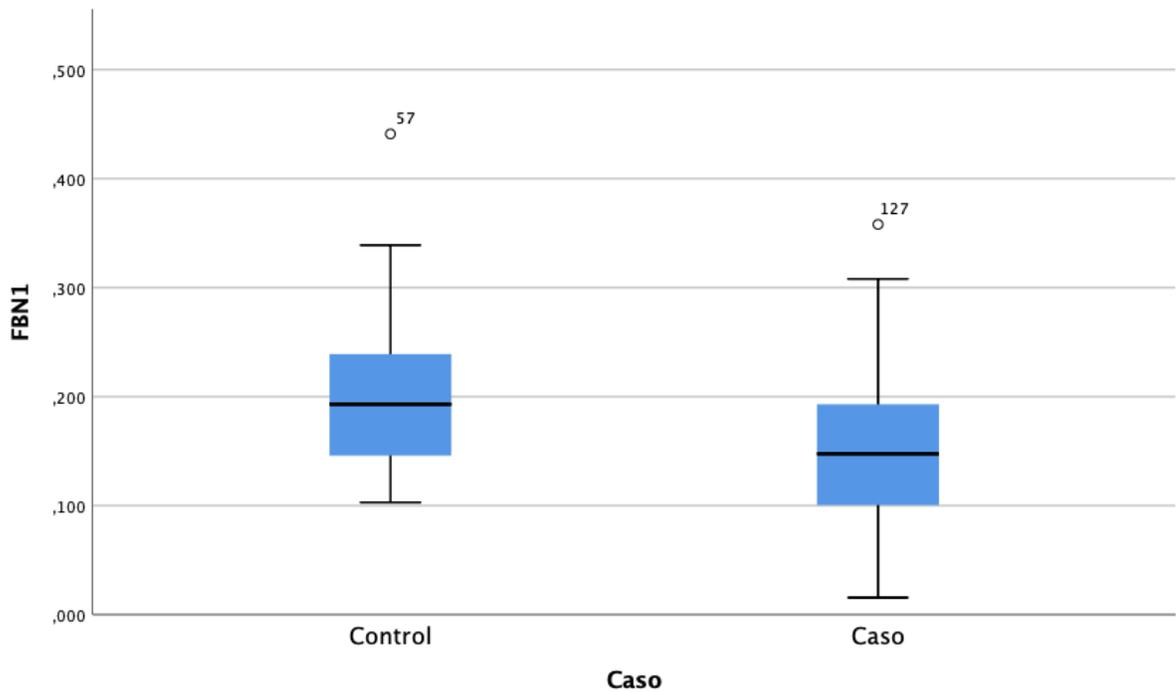


Gráfico 5. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de PLA2G7 (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.

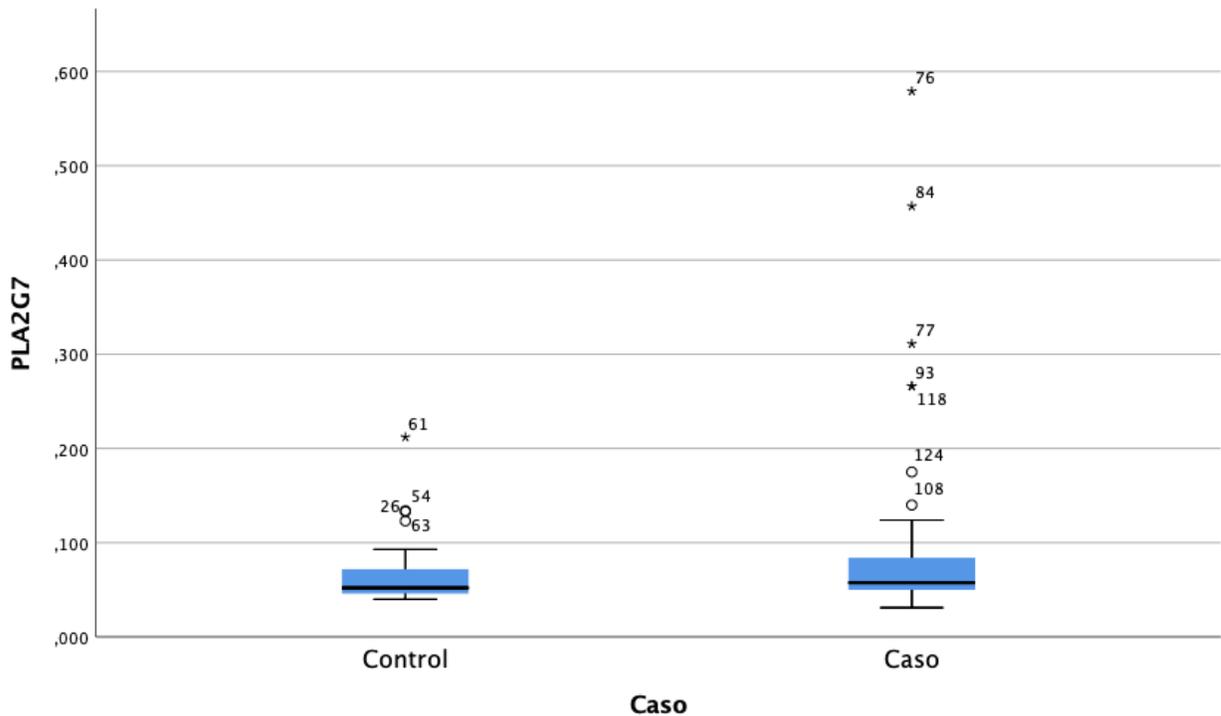


Gráfico 6. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de C7 (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.

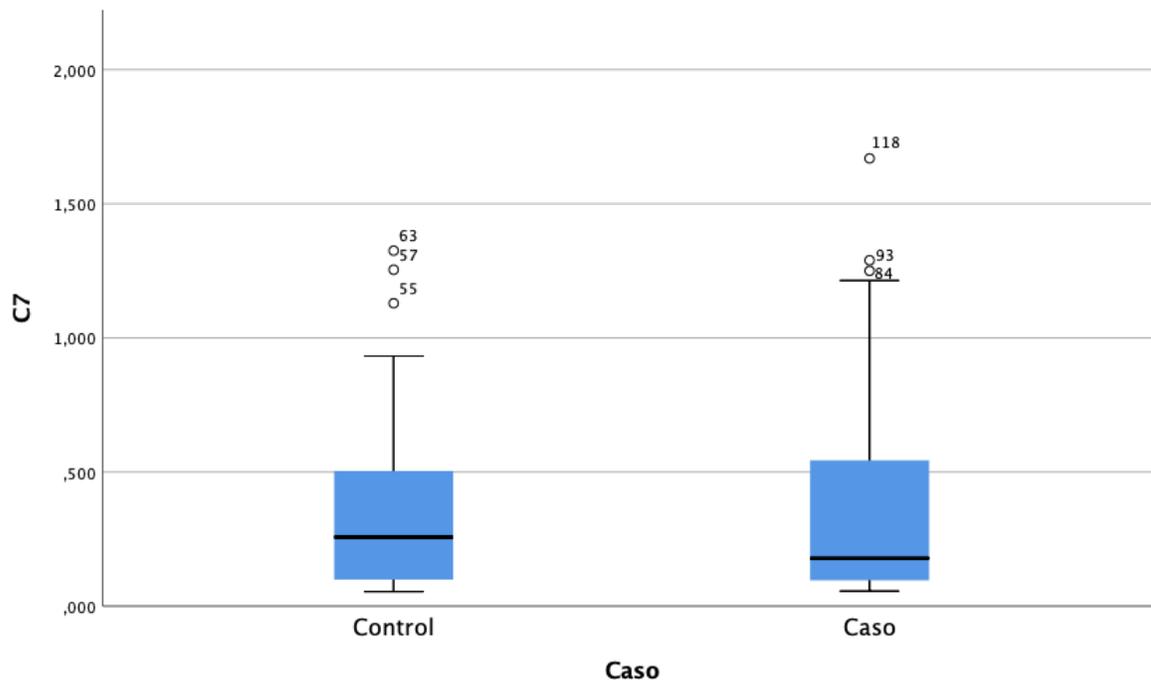
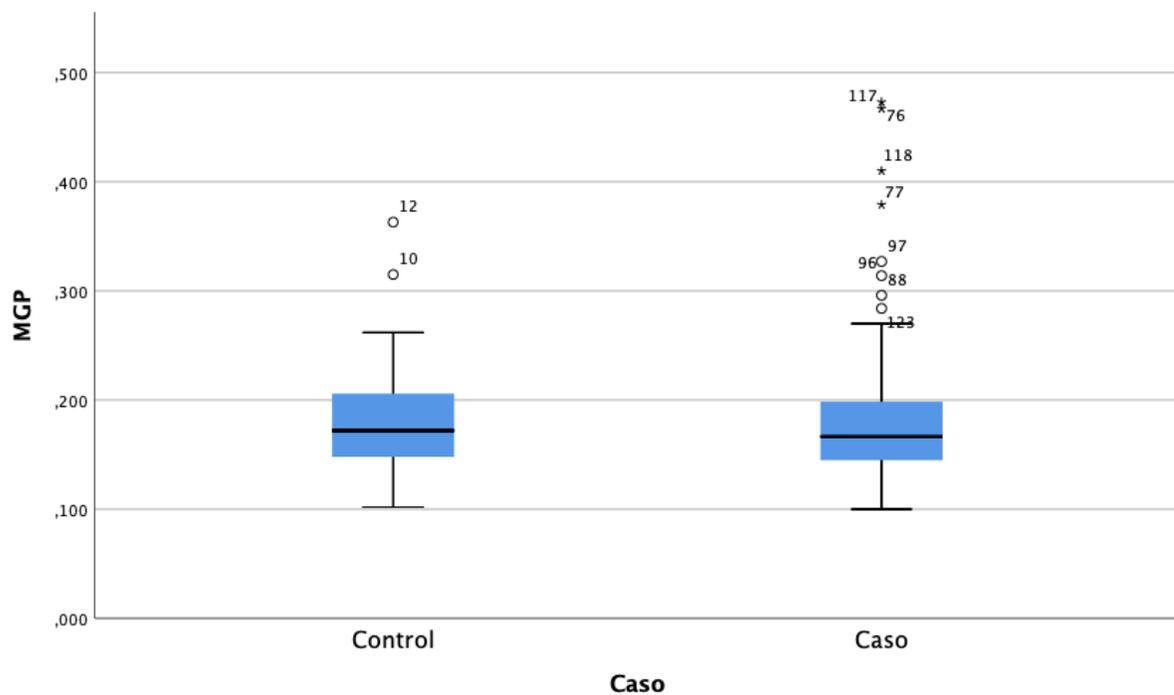


Gráfico 7. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de MGP (DO) entre pacientes con cirrosis y pacientes sin hepatopatía conocida.



Las cuatro moléculas que mostraron diferencia significativa en la comparación de sus medianas entre los grupos en estudio, fueron: **CYP26A1**, **ALDH1A3**, **FBN1** y **PLA2G7**. (Tabla 11). El valor de la expresión de los biomarcadores es mayor en los pacientes con cirrosis hepática para CYP26A1, ALDH1A3 y PLA2G7, mientras que la relación se invierte en FBN1.

A partir de los resultados anteriores, se generaron curvas ROC para cada uno de los biomarcadores. (Gráfico 8).

Gráfico 8. Curva ROC comparativa para CYP26A1, ALDH1A3, FBN1, PLA2G7, el cociente ALDH1A3/FBN1 y ALDH1A3 * CYP26A1.

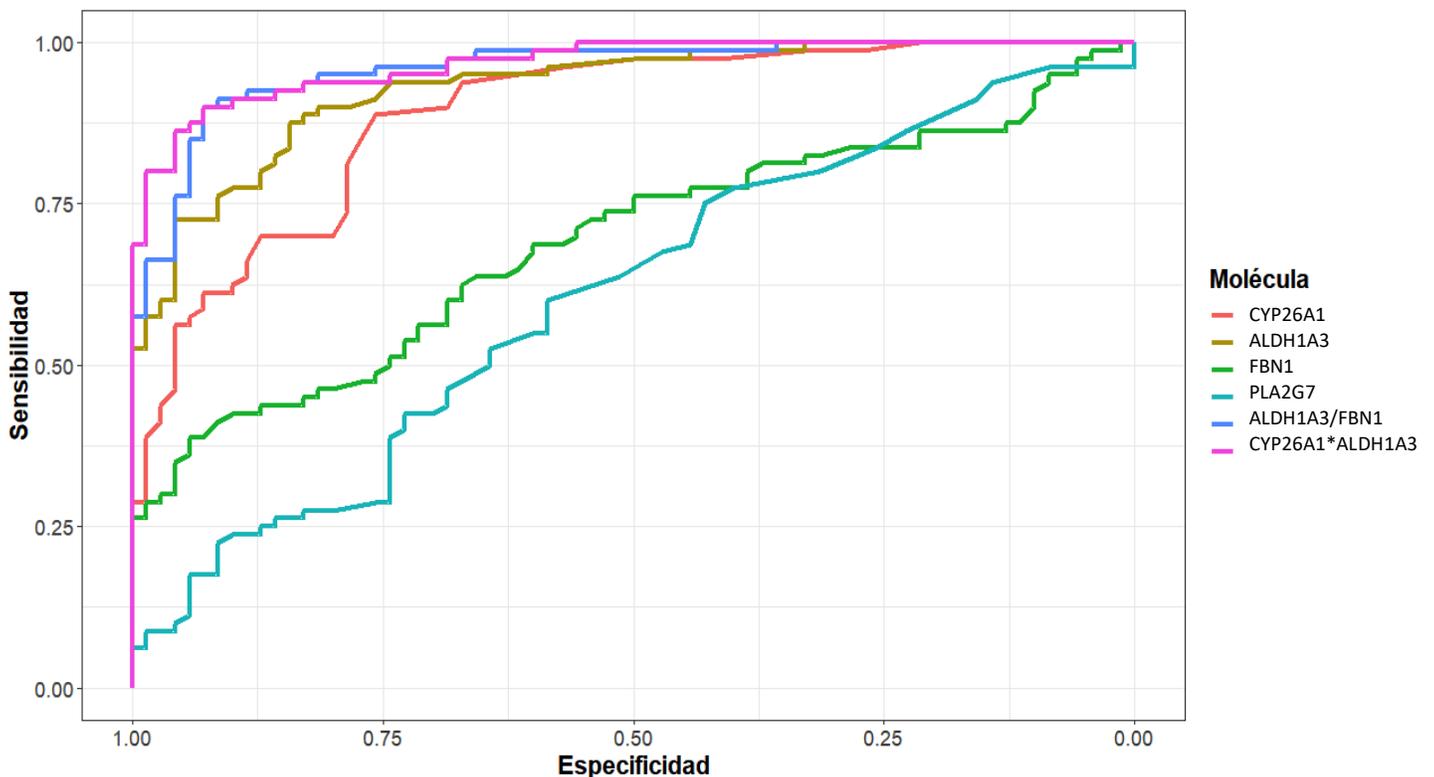


Tabla 12. Comparativa ROC de CYP26A1.

Molécula	Punto de corte	AUC (IC95%)	p
CYP26A1	0.061	0.89 (0.839, 0.94)	
ALDH1A3	0.158	0.931 (0.893, 0.968)	p<0.001 (2.197e-01)
FBN1	0.123	0.688 (0.603, 0.773)	4.128e-04
PLA2G7	0.054	0.606 (0.516, 0.697)	1.368e-07
ALDH1A3/FBN1	1.117	0.96 (0.932, 0.988)	2.709e-02
CYP26A1*ALDH1A3	0.011	0.966 (0.943, 0.99)	6.61e-05

El AUC de CYP26A1 es significativamente mayor al de FBN1 y PLA2G7, pero significativamente menor a: ALDH1A3/FBN1 y CYP26A1*ALDH1A3.

Tabla 13. Comparativa ROC de ALDH1A3

Molécula	Punto de corte	AUC (IC95%)	p
ALDH1A3	0.158	0.931 (0.893, 0.968)	
FBN1	0.123	0.688 (0.603, 0.773)	3.368e-06
PLA2G7	0.054	0.606 (0.516, 0.697)	9.543e-14
ALDH1A3/FBN1	1.117	0.96 (0.932, 0.988)	1.770e-01
CYP26A1*ALDH1A3	0.011	0.966 (0.943, 0.99)	0.04698

El AUC de ALDH1A3 es significativamente mayor que el de FBN1 y PLA2G7, pero no tiene diferencia significativa con ALDH1A3/FBN1 y CYP26A1*ALDH1A3.

Tabla 14. Comparativa ROC de FBN1

Molécula	Punto de corte	AUC (IC95%)	p
FBN1	0.123	0.688 (0.603, 0.773)	
PLA2G7	0.054	0.606 (0.516, 0.697)	2.432e-01
ALDH1A3/FBN1	1.117	0.96 (0.932, 0.988)	1.110e-13
CYP26A1*ALDH1A3	0.011	0.966 (0.943, 0.99)	6.296e-09

El AUC de FBN1 es significativamente menor al de ALDH1A3/FBN1 y CYP26A1*ALDH1A3, pero no tiene una diferencia significativa con PLA2G7.

Tabla 15. Comparativa de PLA2G7

Molécula	Punto de corte	AUC (IC95%)	p
PLA2G7	0.054	0.606 (0.516, 0.697)	
ALDH1A3/FBN1	1.117	0.96 (0.932, 0.988)	1.391e-13
CYP26A1*ALDH1A3	0.011	0.966 (0.943, 0.99)	1.824e-15

El AUC de PLA2G7 es significativamente menor al de ALDH1A3/FBN1 y CYP26A1*ALDH1A3.

A partir de los datos de las curvas ROC se calculó el índice de Youden para determinar los puntos de corte para cada molécula. **CYP26A1: 0.061, ALDH1A3: 0.158, FBN1: 0.123, PLA2G7: 0.054. ALDH1A3/FBN1: 1.11, ALDH1A3 * CYP26A1: 0.011.**

Con los puntos de corte establecidos, se llevó a cabo el análisis crítico del desempeño diagnóstico, con los resultados que se muestran a continuación. Tabla 16, 17, 18, 19, 20 y 21.

Tabla 16. Análisis de desempeño diagnóstico de CYP26A1, para la distinción entre cirrosis hepática comparada con pacientes sin hepatopatía conocida.

Variable	CYP26A1 (punto de corte >0.011 DO)	IC del 95%
Sensibilidad	0.88	(0.797 – 0.947)
Especificidad	0.75	(0.639 – 0.851)
Valor de predicción positiva (VPP)	0.80	(0.704 – 0.904)
Valor de predicción negativa (VPN)	0.85	(0.745 – 0.915)
Razón de verosimilitud positiva (LR+)	3.65	(2.398 – 5.567)
Razón de verosimilitud negativa (LR-)	0.14	(0.079 – 0.278)
Exactitud	0.89	(0.839 – 0.94)

IC: Intervalo de confianza, CH: Cirrosis hepática.

Tabla 17. Análisis de desempeño diagnóstico de ALDH1A3, para la distinción entre cirrosis hepática comparada con pacientes sin hepatopatía conocida.

Variable	ALDH1A3 (CH vs controles sanos)	IC del 95%
Sensibilidad	0.87	(0.782 – 0.938)
Especificidad	0.84	(0.736 – 0.918)
Valor de predicción positiva (VPP)	0.86	(0.768 – 0.932)
Valor de predicción negativa (VPN)	0.85	(0.751 – 0.925)
Razón de verosimilitud positiva (LR+)	5.56	(3.216 – 9.639)
Razón de verosimilitud negativa (LR-)	0.14	(0.082 – 0.267)
Exactitud	0.93	(0.893 – 0.968)

IC: Intervalo de confianza, CH: Cirrosis hepática.

Tabla 18. Análisis de desempeño diagnóstico de FBN1, para la distinción entre pacientes sin hepatopatía conocida de aquellos con cirrosis hepática.

Variable	FBN1 (Controles sanos vs CH)	IC del 95%
Sensibilidad	0.38	(0.280 – 0.503)
Especificidad	0.94	(0.860 – 0.984)
Valor de predicción positiva (VPP)	0.88	(0.742 – 0.925)
Valor de predicción negativa (VPN)	0.57	(0.453 – 0.835)
Razón de verosimilitud positiva (LR+)	6.78	(2.518 – 18.261)
Razón de verosimilitud negativa (LR-)	0.64	(0.540 – 0.780)
Exactitud	0.68	(0.603 – 0.773)

IC: Intervalo de confianza, CH: Cirrosis hepática.

Tabla 19. Análisis de desempeño diagnóstico para la distinción entre cirrosis hepática frente a controles sanos, PLA2G7.

Variable	PLA2G7 (CH vs controles sanos)	IC del 95%
Sensibilidad	0.60	(0.484 – 0.707)
Especificidad	0.58	(0.461 – 0.702)
Valor de predicción positiva (VPP)	0.62	(0.500 – 0.727)
Valor de predicción negativa (VPN)	0.56	(0.445 – 0.681)
Razón de verosimilitud positiva (LR+)	1.44	(1.040 – 2.016)
Razón de verosimilitud negativa (LR-)	0.68	(0.489 – 0.952)
Exactitud	0.60	(0.516 – 0.697)

IC: Intervalo de confianza, CH: Cirrosis hepática.

Tabla 20. Análisis de desempeño diagnóstico para la distinción entre cirrosis hepática frente a controles sanos, cociente de ALDH1A3/FBN1.

Variable	ALDH1A3/FBN1 (CH vs controles sanos)	IC del 95%
Sensibilidad	0.90	(0.812 – 0.955)
Especificidad	0.92	(0.841 – 0.976)
Valor de predicción positiva (VPP)	0.93	(0.854 – 0.971)
Valor de predicción negativa (VPN)	0.89	(0.796 – 0.962)
Razón de verosimilitud positiva (LR+)	12.6	(5.397 – 29.414)
Razón de verosimilitud negativa (LR-)	0.10	(0.055 – 0.208)
Exactitud	0.96	(0.932 – 0.988)

IC: Intervalo de confianza, CH: Cirrosis hepática.

Tabla 21. Análisis de desempeño diagnóstico para la distinción entre cirrosis hepática frente a controles sanos, múltiplo de ALDH1A3 * CYP26A1

Variable	ALDH1A3 * CYP26A1 (CH vs controles sanos)	IC del 95%
Sensibilidad	0.90	(0.812 – 0.955)
Especificidad	0.92	(0.841 – 0.976)
Valor de predicción positiva (VPP)	0.93	(0.854 – 0.971)
Valor de predicción negativa (VPN)	0.89	(0.796 – 0.962)
Razón de verosimilitud positiva (LR+)	12.6	(5.397 – 0.208)
Razón de verosimilitud negativa (LR-)	0.10	(0.05 – 0.208)
Exactitud	0.96	(0.943 - 0.99)

IC: Intervalo de confianza, CH: Cirrosis hepática.

Se determinó, si la expresión sérica de los biomarcadores se modifica a medida que progresa la enfermedad hepática, es decir si ésta es diferente entre los grupos de pacientes Child-Pugh, A, B y C. Para ello se llevó a cabo la comparación de medianas de la expresión sérica de los biomarcadores en cada grupo. Tabla 22.

Tabla 22. Comparación los valores de las medianas de la expresión sérica en unidades de densidad óptica (DO), de los biomarcadores entre pacientes con cirrosis hepática en estadios CHILD-Pugh A, B y C.

Biomarcador DO (mediana)	Cirrosis hepática CHILD A (n=2)	Cirrosis hepática CHILD B (n=30) (RIC)	Cirrosis hepática CHILD C (n=46) (RIC)	p *
MFAP4	0.302	0.209 (0.148- 0.403)	0.239 (0.161- 0.422)	0.859
CYP26A1	0.128	0.079 (0.061 – 0.137)	0.091 (0.071- 0.133)	0.389
ALDH	0.556	0.230 (0.172- 0.346)	0.238 (0.181- 0.438)	0.109
FBN1	0.138	0.152 (0.101- 0.190)	0.142 (0.098- 0.214)	0.924
PLA2G7	0.072	0.053 (0.048- 0.069)	0.062 (0.050- 0.104)	0.150
C7	0.097	0.189 (0.1- 0.55)	0.180 (0.094- 0.651)	0.477
MGP	0.233	0.176 (0.148- 0.212)	0.162 (0.142- 0.190)	0.577

DO: Unidades de densidad óptica., *Prueba utilizada: Kruskal Wallis, p: < 0.05.

Del resultado de la prueba de contraste utilizada, se concluye que no existe diferencia significativa entre las medianas de los grupos de pacientes con cirrosis en estadios CHILD-PUGH A, B y C. Se elaboraron gráficos de cajas y bigotes, donde se muestra la distribución de los valores por grupo. Gráficos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15.

Gráfico 9. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de MFAP4 (DO) entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.

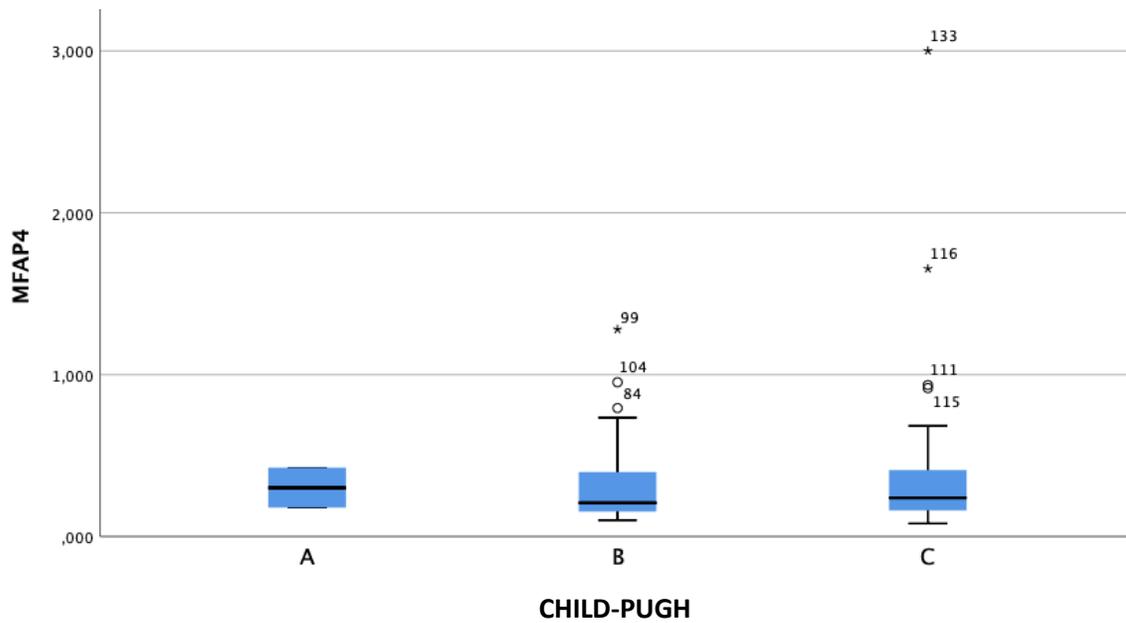


Gráfico 10. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de CYP26A1 (DO) entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.

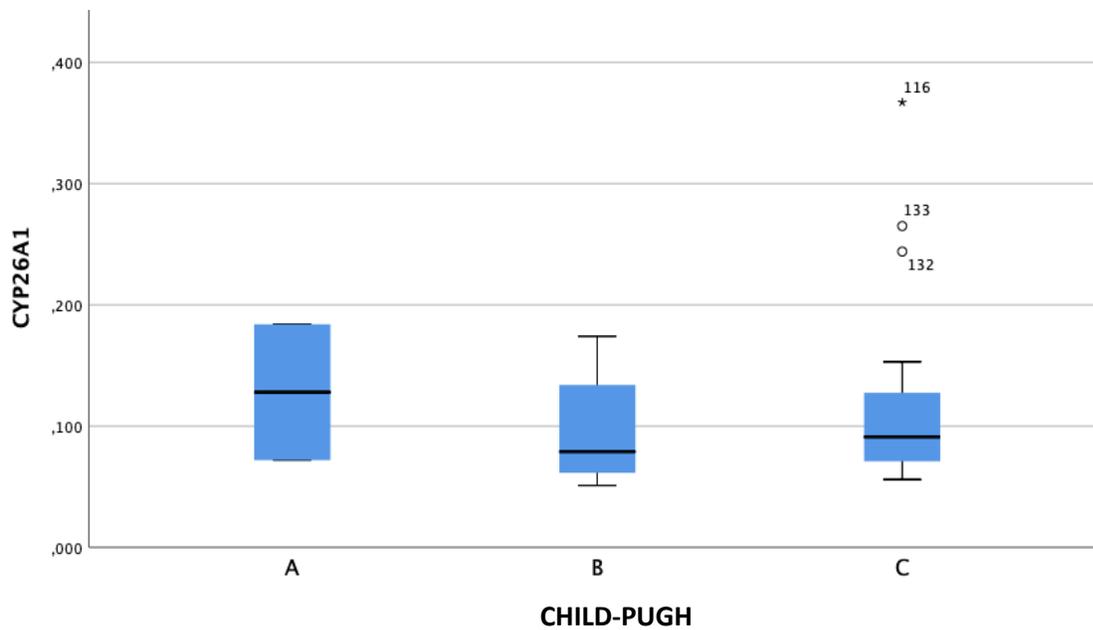


Gráfico 11. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de ALDH1A3 entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.

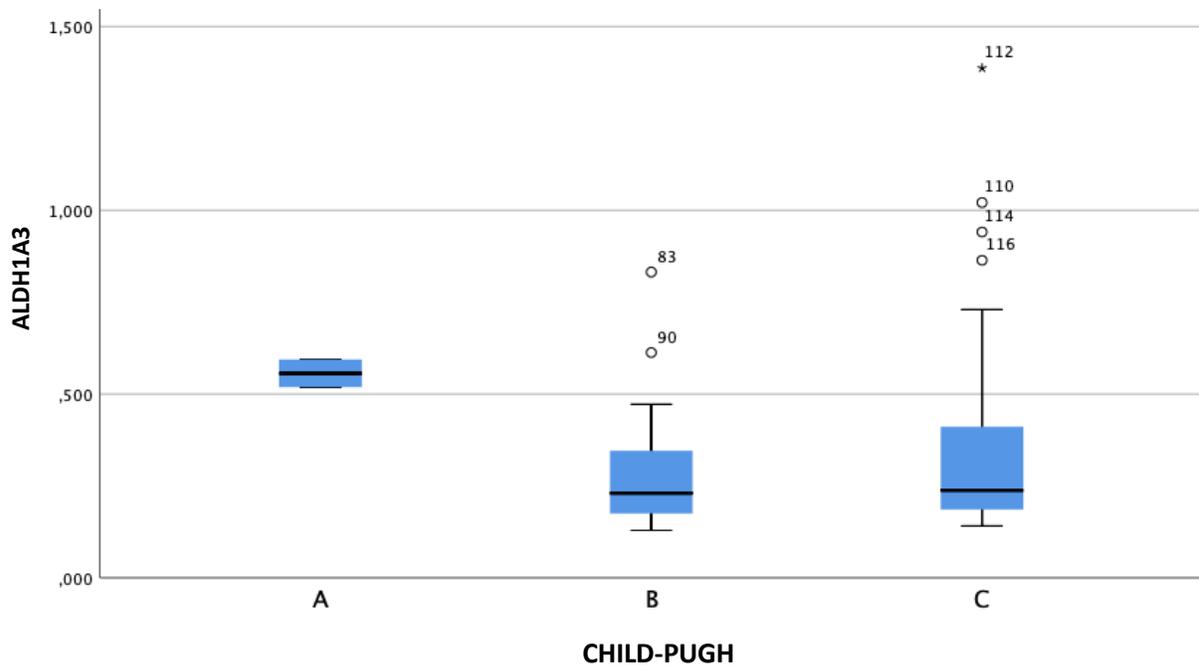


Gráfico 12. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de FBN1 (DO) entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.

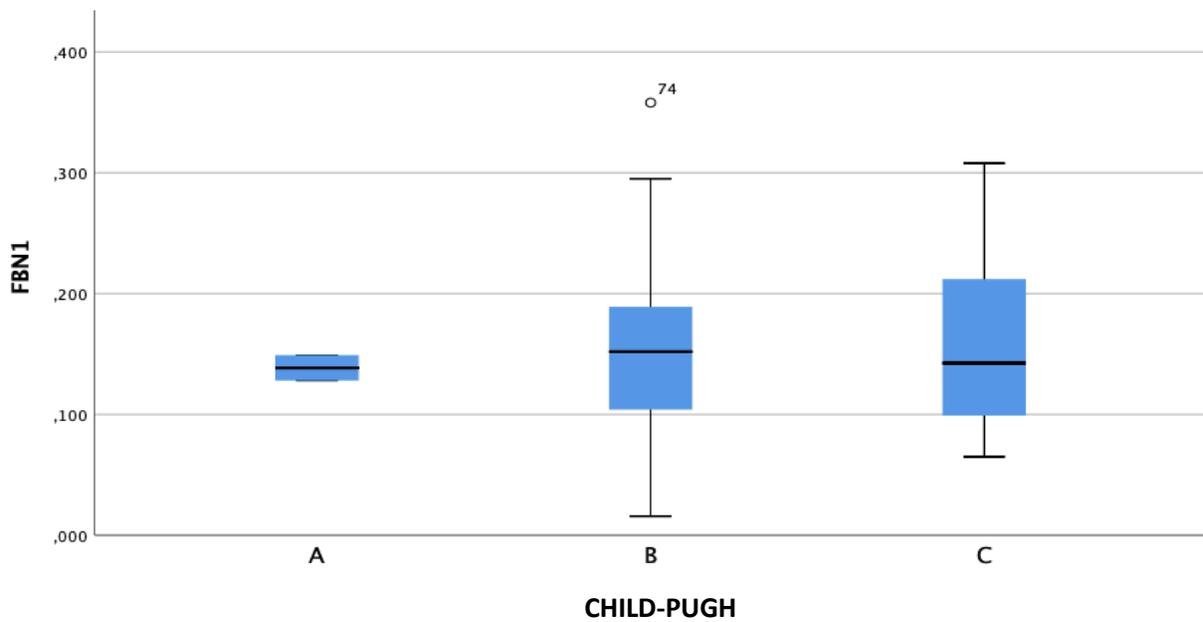


Gráfico 13. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de PLA2G7 entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.

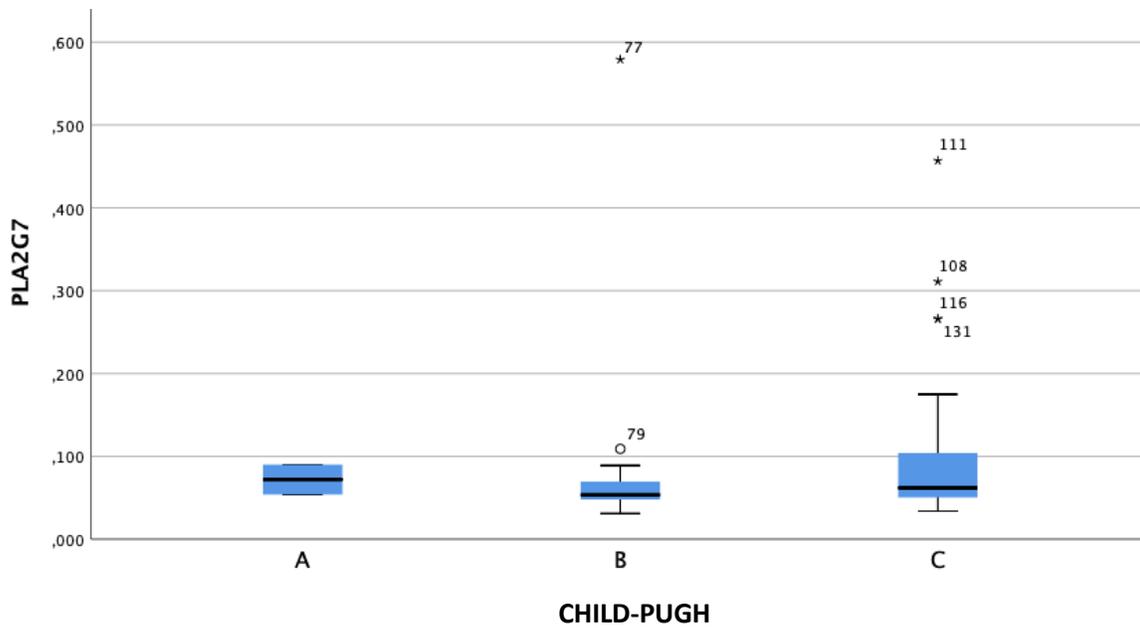


Gráfico 14. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de C7 entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.

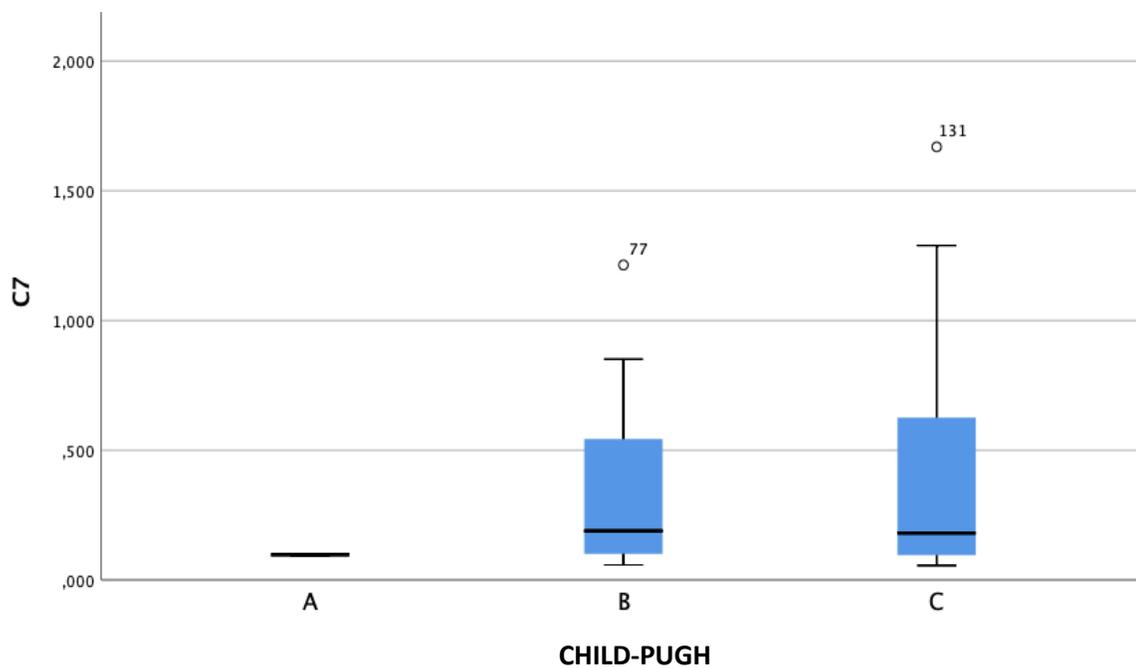
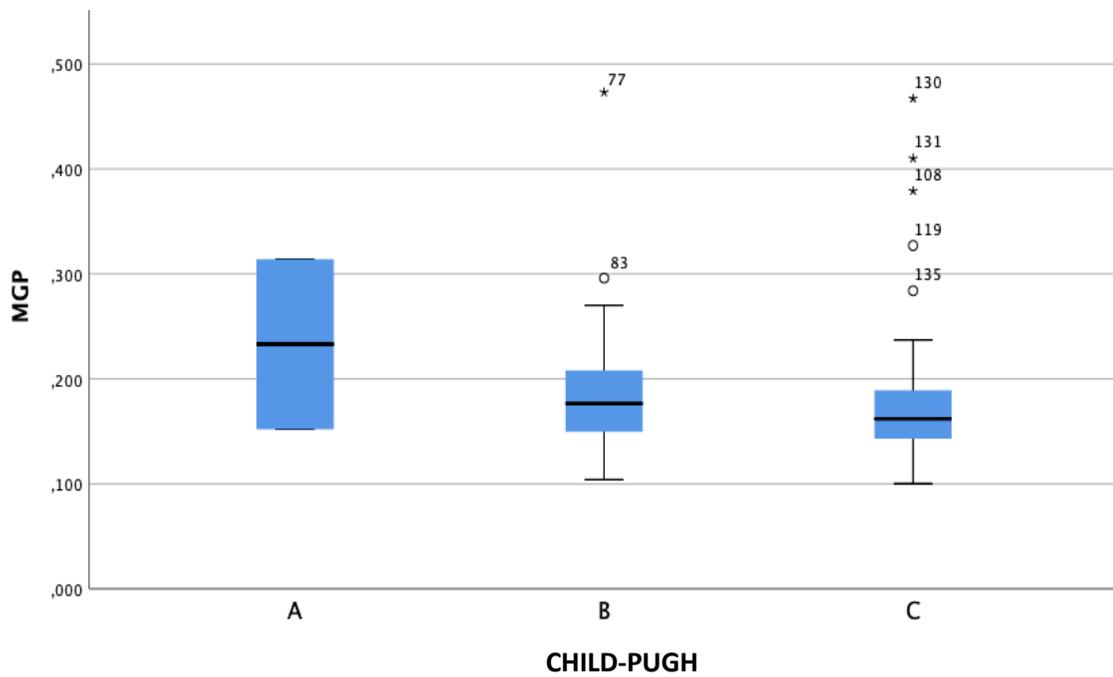


Gráfico 15. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de MGP entre pacientes con cirrosis hepática CHILD-PUGH A, B y C.



Posteriormente se calcularon las medianas de los valores obtenidos por etiología, para determinar si existía diferencia en la expresión sérica de biomarcadores de acuerdo con la enfermedad subyacente a la cirrosis hepática. Tabla 23.

Tabla 23. Comparación los valores de las medianas de la expresión sérica en unidades de densidad óptica (DO), de los biomarcadores entre pacientes con cirrosis hepática, de acuerdo con su etiología.

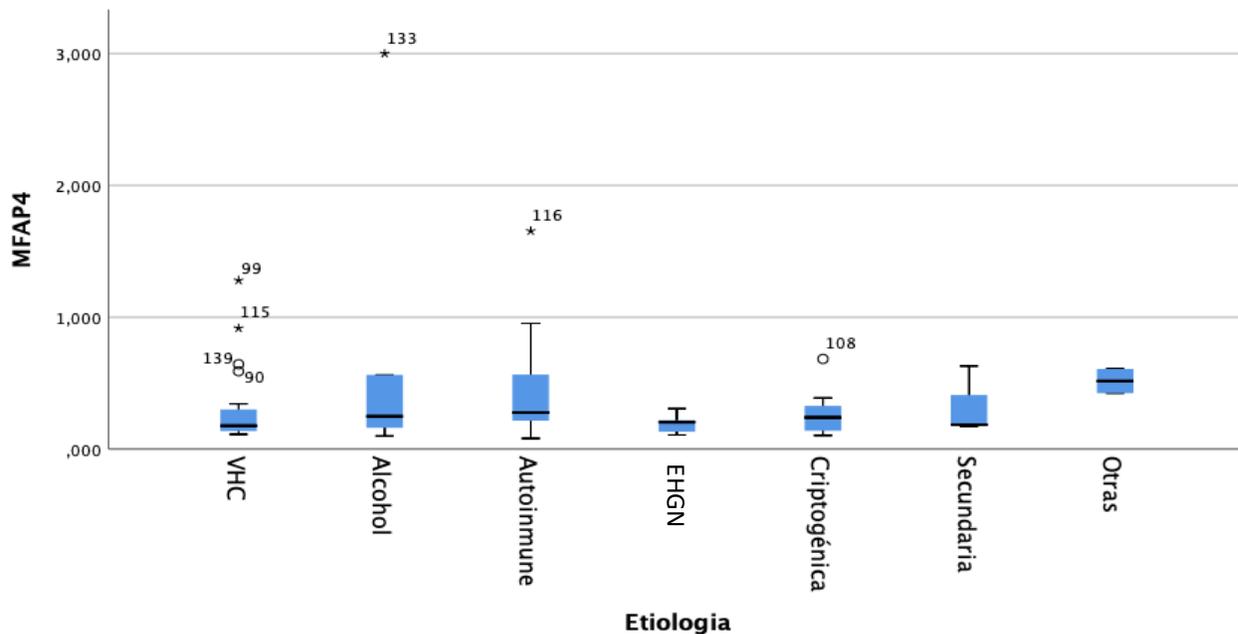
Biomarcador	VHC	Alcohol	Autoinmune	EHNA	Criptogénica	Secundaria	Otras	p *
DO (mediana)	(n=20) (RIC)	(n=6) (RIC)	(n=25) (RIC)	(n=9) (RIC)	(n=12) (RIC)	(n=5) (RIC)	(n=2)	
MFAP4	0.177 (0.137-0.322)	0.249 (0.145-1.172)	0.278 (0.205-0.580)	0.204 (0.131-0.224)	0.240 (0.137-0.351)	0.185 (0.176-0.520)	0.516	0.020
CYP26A1	0.076 (0.061-0.141)	0.122 (0.058-0.249)	0.106 (0.065-0.145)	0.080 (0.064-0.098)	0.087 (0.066-0.136)	0.080 (0.061-0.149)	0.083	0.64
ALDH	0.225 (0.163-0.344)	0.229 (0.208-0.521)	0.218 (0.184-0.358)	0.242 (0.168-0.597)	0.277 (0.224-0.429)	0.249 (0.140-1.204)	0.436	0.775
FBN1	0.119 (0.092-0.154)	0.150 (0.078-0.215)	0.165 (0.112-0.253)	0.153 (0.110-0.173)	0.180 (0.090-0.252)	0.212 (0.104-0.237)	0.153	0.152
PLA2G7	0.064 (0.047-0.088)	0.052 (0.049-0.118)	0.056 (0.047-0.080)	0.062 (0.040-0.080)	0.057 (0.051-0.070)	0.052 (0.046-0.114)	0.097	0.285
C7	0.142 (0.105-0.489)	0.129 (0.063-0.730)	0.252 (0.088-0.675)	0.177 (0.073-0.317)	0.159 (0.096-0.229)	0.513 (0.120-0.676)	0.446	0.107
MGP	0.157 (0.146-0.181)	0.159 (0.142-0.238)	0.171 (0.144-0.218)	0.184 (0.143-0.195)	0.168 (0.131-0.293)	0.173 (0.150-0.213)	0.172	0.887

VHC: Virus de hepatitis c, EHNA: Esteatosis hepática no alcohólica., *Prueba utilizada: Kruskal Wallis, p: < 0.05.

Sin embargo, no se encontró diferencia en la expresión de los biomarcadores entre pacientes con cirrosis cuando se agruparon por etiología, excepto para MFAP4. Cabe mencionar que éste biomarcador no mostró diferencia en su expresión entre pacientes con cirrosis e individuos sin hepatopatía. Se elaboraron diagramas de cajas y bigotes para la representación gráfica de la distribución de los biomarcadores de cirrosis hepática, cuando se comparan por etiología.

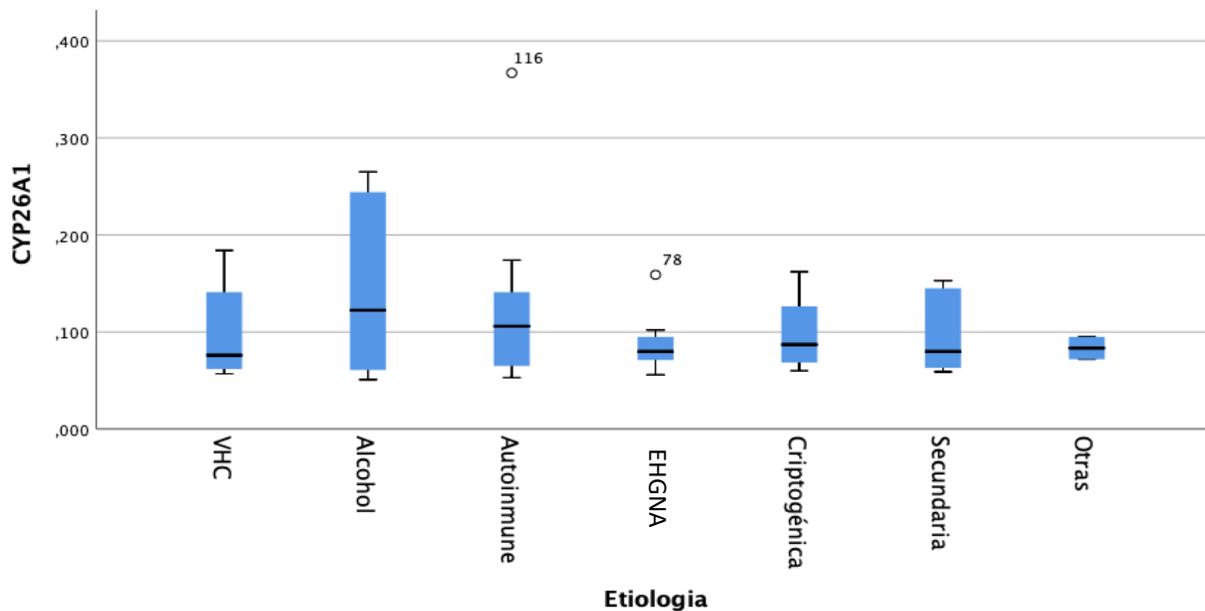
Gráficos 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22.

Gráfico 16. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de MAFAP4 (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



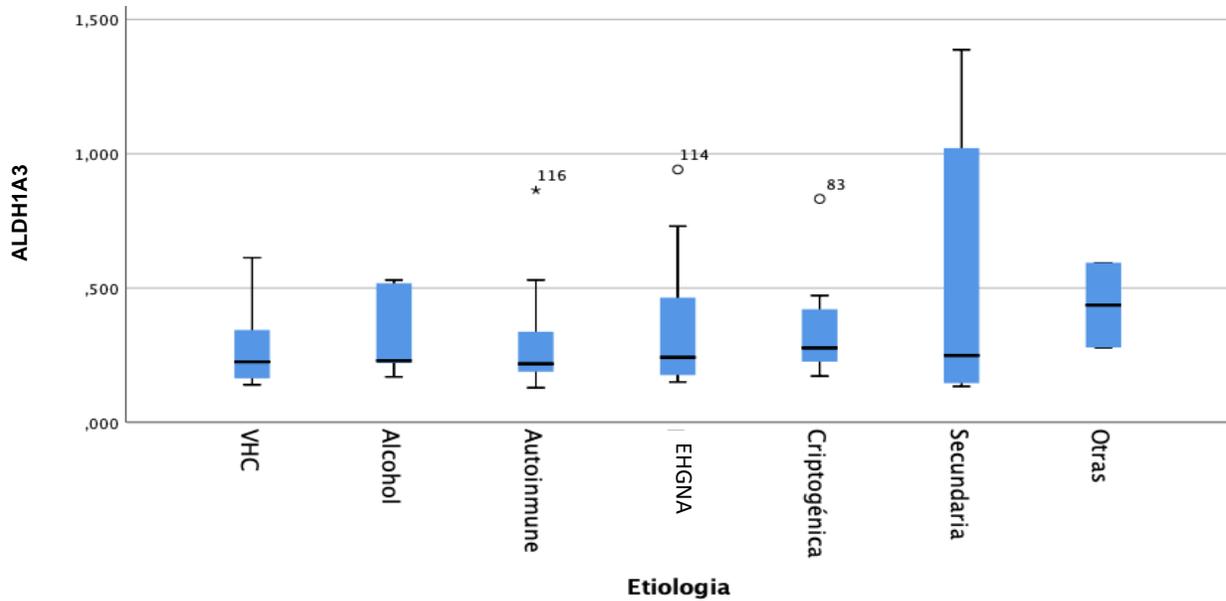
VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Gráfico 17. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de CYP26A1 (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



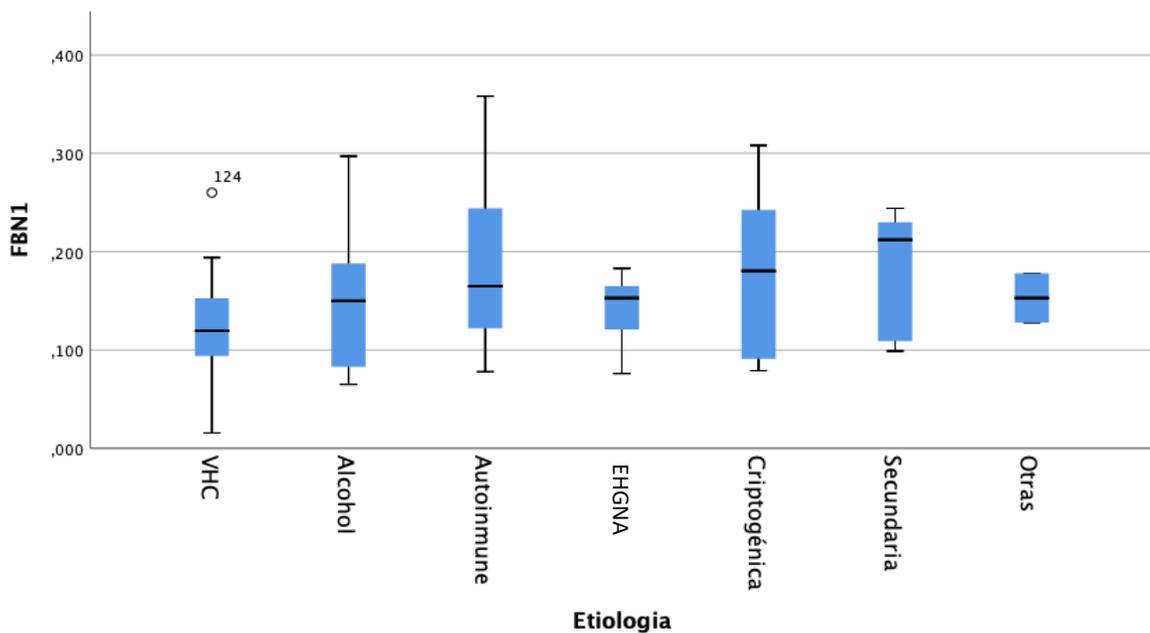
VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Gráfico 18. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de ALDH1A3 (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



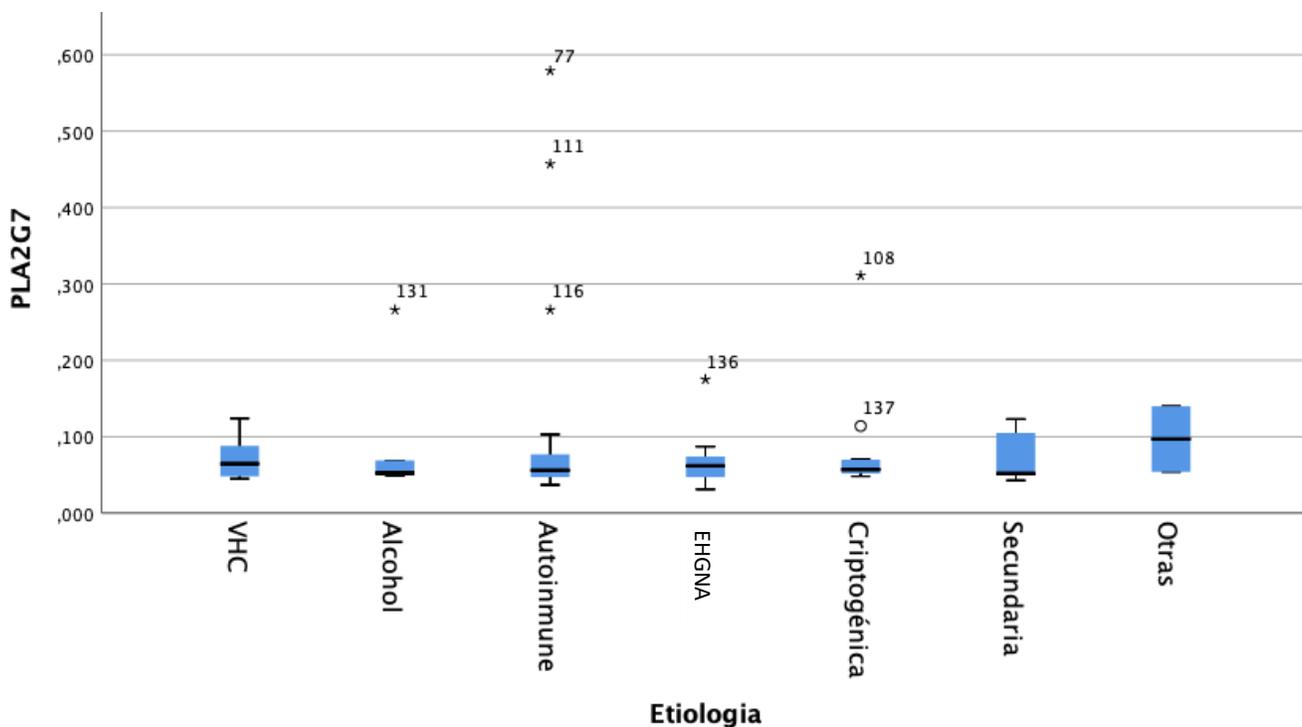
VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Gráfico 19. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de FBN1 (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



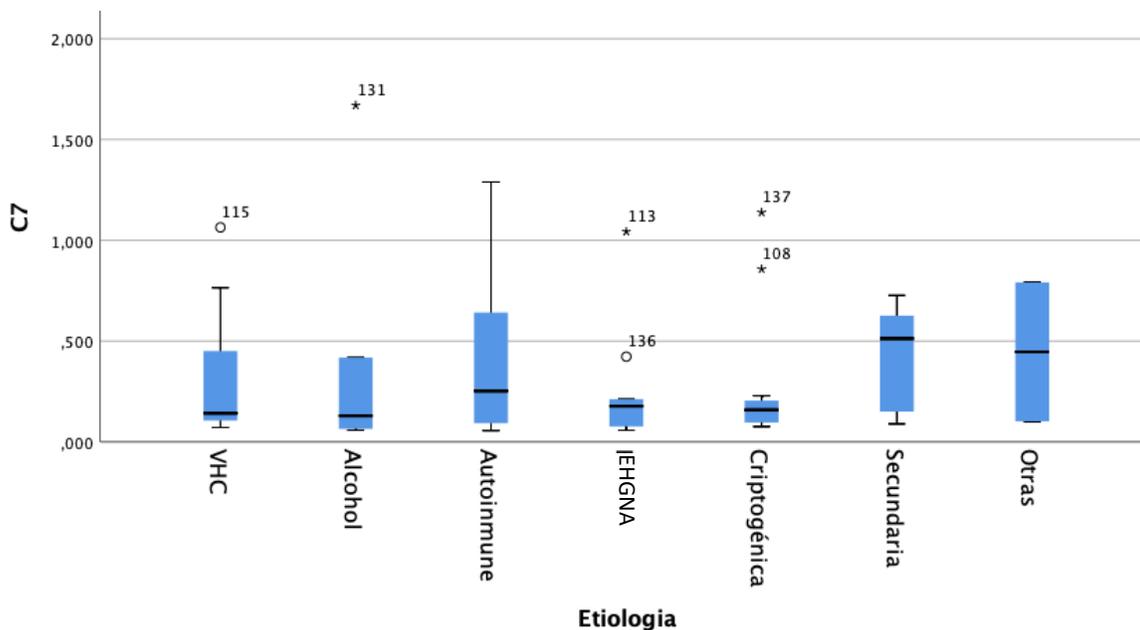
VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Gráfico 22. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de PLA2G7 (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



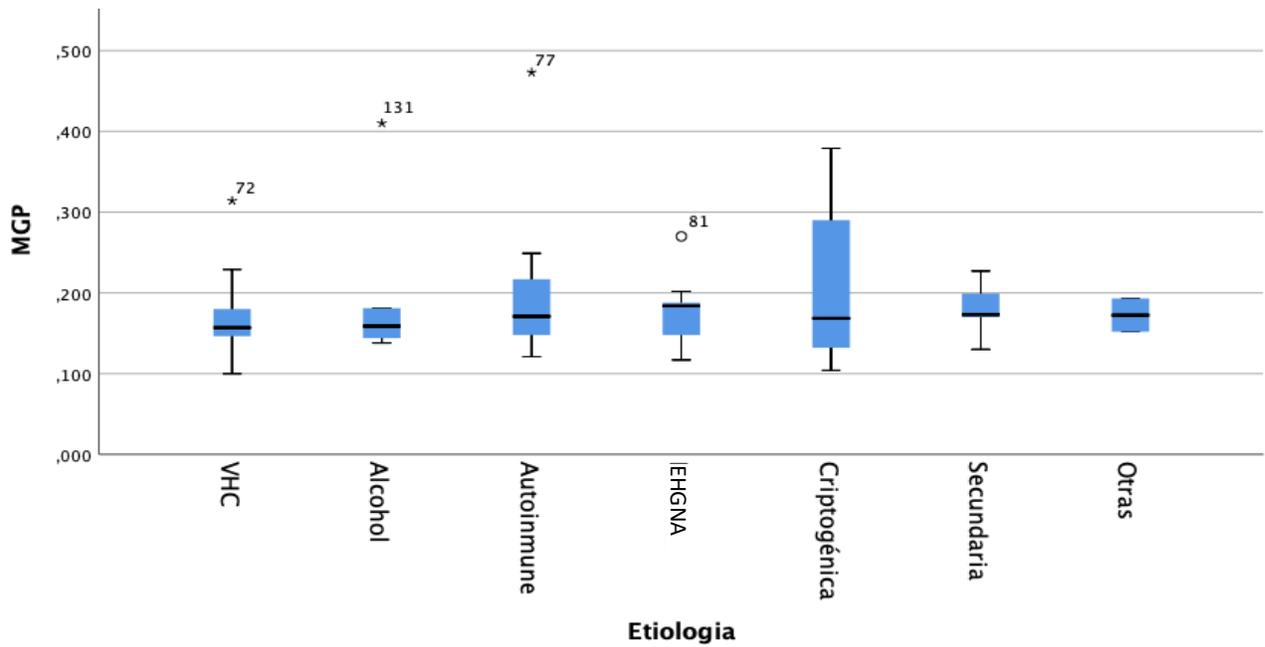
VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Gráfico 23. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de C7 (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Gráfico 24. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la comparación de las concentraciones de MGP (DO) en pacientes con cirrosis hepática, agrupados por etiología.



VHC: Virus de hepatitis C, EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Finalmente, en la tabla 24, se resume el resultado de los modelos de regresión logística ajustados por edad y sexo.

Tabla 24. Modelos de regresión logística.

Predictores	Modelo univariado			Modelo ajustado		
	OR (IC 95%)	p	R ²	OR (IC 95%)	p	R ²
MFAP4	1.23 (0.89, 1.72)	0.215	0.010	2.21 (1.18, 4.50)	0.019	0.672
CYP26A1	11.41 (5.65, 27.00)	<0.001	0.462	15.31 (4.66, 80.24)	<0.001	0.803
ALDH1A3	28.37 (10.86, 96.43)	<0.001	0.574	41.23 (8.23, 517.05)	<0.001	0.853
FBN1	0.48 (0.33, 0.70)	<0.001	0.104	1.00 (0.50, 2.00)	0.991	0.652
PLA2G7	1.46 (1.05, 2.07)	0.028	0.033	1.87 (1.01, 3.67)	0.055	0.670
C7	0.97 (0.70, 1.34)	0.854	0.0	2.09 (1.05, 4.55)	0.047	0.669
MGP	1.01 (0.73, 1.40)	0.932	0.0	0.84 (0.46, 1.51)	0.549	0.653
ALDH1A3/ FBN1	102.63 (25.68, 653.14)	<0.001	0.683	26.05 (6.37, 221.70)	<0.001	0.817
CYP26A1* ALDH1A3	179.93 (36.71, 1565.34)	<0.001	0.706	155.34 (16.84, 6507.75)	0.001	0.902

Ajuste por edad y sexo. La edad se asoció con los casos, tanto en el modelo univariado (OR =1.22; IC95% 1.15,1.30; p-valor <0.001) como en los modelos ajustados.

10. DISCUSIÓN

El panel molecular que ahora nos ocupa, fue obtenido a partir de un modelo de fibrosis murino y su validación interna se llevó a cabo en sueros de pacientes con cirrosis secundaria a VHC. (Patente concedida no. DE REGISTRO: MX/a/2013/010937). Por lo cual se buscó determinar el desempeño diagnóstico en sueros de pacientes con fibrosis/cirrosis, secundarias a diversas enfermedades hepáticas subyacentes como: hepatopatía autoinmune, VHC, alcohol, EHGNA, criptogénica, secundaria y metabopatías. Pudiendo demostrar la utilidad de ALDH1A3, CYP26A1, FBN1 y PLA2G7 para el diagnóstico de cirrosis hepática derivada de cualquiera de las etiologías estudiadas. De las cuales, ALDH1A3, CYP26A1 y PLA2G7, se asociaron con mayores concentraciones séricas en pacientes con cirrosis comparadas con individuos sin hepatopatía conocida; mientras que en FBN1 fue a la inversa.

La ALDH1A3 fue la molécula que mostró el mejor desempeño para el diagnóstico de CH por cualquier etiología: S 0.87, E 0.84, VPP 0.8, VPN 0.5, LLR+ 5.5, LLR - 0.1, AUC 0.93. Estos resultados cobran relevancia ya que si bien se conoce la relación entre la actividad de ALDH2 (principal enzima responsable de la depuración de acetaldehído a nivel hepático), con hepatopatía alcohólica, fibrosis y CHC (58) y se ha explorado el papel de ALDH1A3 en la fisiopatología de EHGNA/EHNA (57); a la fecha no existe, reporte que evalúe el papel de ésta molécula como biomarcador de fibrosis. Además, los parámetros son equiparables a los métodos serológicos y de imagen de uso más extendido, existentes en el mercado como FibroTest (AUC 0.87), FibroMeter (AUC 0.91), Fibroscan (AUC 0.94) y elastografía por resonancia magnética (0.92). (26, 38, 43).

CYP26A1, mostró el segundo mejor desempeño diagnóstico: S 0.88, E 0.75, VPP 0.8, VPN 0.8, AUC 0.89, el cual, a pesar de ser bueno, es discretamente menor que el observado para ALDH1A3. De esta molécula, se ha descrito su papel en el metabolismo de ácido transretinóico (AR) y su relación con el mecanismo de fibrogénesis hepática. (55) Tampoco existe en la literatura evidencia que relacione a este biomarcador con el diagnóstico de fibrosis hepática.

Con respecto a PLA2G7, se le ha propuesto un papel como biomarcador de carcinoma CHC (62), sin embargo, tampoco se ha descrito su utilidad como biomarcador de fibrosis. En nuestro estudio, a pesar de mostrar diferencia significativa entre el grupo de cirrosis comparado con el

grupo control, su desempeño fue el de menor rendimiento: S 0.6, E 0.5, VPP 0.6, VPN 0.5, LLR+ 1.4, AUC 0.6.

Por su parte la FBN1, cuyos datos mostraron mayor concentración en pacientes controles, además de determinarse una clara diferencia entre los grupos, su desempeño se asoció con buena especificidad (0.94), muy buena razón de verosimilitud positiva (6.7) y a pesar de un AUC de 0.68, por las características descritas, esta molécula tiene potencial para su uso como prueba confirmatoria. Nuestros resultados se contraponen con la evidencia descrita por Lamireau y cols., quienes reportaron que la FBN1 se encontró sobreexpresada en zonas de fibrosis que rodean a los nódulos de regeneración en biopsias hepáticas. (60)

Si bien la MFAP4, es la proteína que cuenta con más evidencia como biomarcador de fibrosis, así como MGP y C7, en nuestro grupo de pacientes con cirrosis hepática, a pesar de mostrar tendencia a la mayor expresión sérica, no se alcanzó significancia estadística al ser comparados con sujetos controles.

Con la intención de determinar si el desempeño diagnóstico de ALDH1A3, mejora al ser combinada con otras moléculas del panel, se elaboraron dos constructos, un basado en el cociente con ALDH1A3/FBN1 y otro en la multiplicación de ALDH1A3 * CYP26A1, sin embargo, no se demostró que las combinaciones propuestas, fueran significativamente mejores que la medición de ALDH1A3 de forma aislada.

Como parte de los objetivos secundarios, los biomarcadores no mostraron diferencia cuando se evaluaron por estadio de descompensación (CHILD PUGH A, B y C), ni por etiología (VHC, alcohol, autoinmune, EHGNA, criptogénica, secundaria a lesión de vía biliar y otras). Gráficos 18, 19.

Éste estudio tiene la fortaleza de contar con una cohorte de pacientes cirróticos de etiología diversa, debidamente diagnosticados en un centro de referencia (tercer nivel) y con controles (individuos sin hepatopatía concida) que fueron valorados estrictamente a través de estudios de laboratorio, serología y elastografía.

Consideramos que las diferencias no significativas reportadas para MFAP4, C7 y MGP podrían ser mejoradas al incrementar el tamaño de muestra, así como conocer si pudiesen identificarse

marcadores específicos entre las moléculas de nuestro panel, para cada enfermedad subyacente.

11. CONCLUSIONES

ALDH1A3 y CYP26A1 fueron las moléculas con mejor desempeño (AUC 0.93 y 0.89, respectivamente) para el diagnóstico de cirrosis hepática en una cohorte de pacientes con etiología mixta. PLA2G7, fue la molécula con menor desempeño diagnóstico de nuestro panel (AUC 0.6). Mientras que FBN1 a diferencia del resto de los biomarcadores estudiados, se encontró mayormente expresada en pacientes controles y debido a su alta especificidad y valor predictivo positivo, se propone su uso como prueba confirmatoria. Por otra parte, MFAP4, MGP y C7, no alcanzaron significancia estadística en la expresión sérica de los grupos estudiados. Cuando se llevó a cabo el análisis de cada biomarcador de forma conjunta, los constructos propuestos (ALDH1A3/FBN1 y ALDH1A3 * CYP26A1), no fueron significativamente mayores que la medición individual de ALDH1A3, sin embargo, los resultados indicaron para los dos constructos, valores de verosimilitud positiva mayores a 10, lo cual se asocia con modificaciones relevantes en la probabilidad pretest, determinando con alta certeza un cambio de conducta clínica. Los biomarcadores no estuvieron asociados de forma específica con alguna etiología subyacente, por lo que consideramos que los niveles séricos de cada uno de los marcadores son específicos, resultado directo del proceso fibrótico.

Finalmente, con tres de las 7 moléculas que integran nuestro panel (ALDH1A3, CYP26A1 y FBN1), se obtuvo un desempeño ligeramente superior para el diagnóstico de cirrosis hepática, estos biomarcadores no descritos aún para este fin, en la literatura, tienen potencial para ser estudiados en poblaciones distintas, ser comparados con métodos serológicos y de imagen existentes, así como evaluar su desempeño al ser combinados entre ellos. Además, al ser analizadas a través del método de ELISA, ofrecen la ventaja de mayor disponibilidad a un costo más accesible, ya que no se requiere de algoritmos patentados (Fibrotest, FibroMeter), sus resultados no se ven afectados por cambios en parámetros bioquímicos de pruebas convencionales secundarios a patología no hepática (APRI, FIB4, entre otros), ni requieren de software especializado en estudios de imagen (FibroScan, ARFI y elastografía por RM), por lo cual éste panel podría aportar mucho beneficio a poblaciones como la nuestra.

12. REFERENCIAS

1. Rojkind M, Greenwel P., 1994. The extracellular matrix and the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Shashter DA, Shafritz DA, (ed). *The Liver: Biology and Pathology*. Third Ed. Raven Press, New York, pp 843-868.
2. Kmiec Z., 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 161: III-XIII: 1-151
3. Cogger VC, Muller M, Fraser R, McLean AJ, Khan J, Le Couteur DG. The effects of oxidative stress on the liver sieve. *J Hepatol*. 2004 Sep;41(3):370-6.
4. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015 Sep;39 Suppl 1:S51-9.
5. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2013 May;123(5):1887-901.
6. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1 Suppl):S15-24.
7. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta*. 2007 Jun;381(2):107-13.
8. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1 Suppl):S15-24.
9. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008 Mar 8;371(9615):838-51. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9.
10. Calès P, Chaigneau J, Hunault G, Michalak S, Cavarro-Menard C, Fasquel JB, Bertrais S, Rousselet MC. Automated morphometry provides accurate and reproducible virtual staging of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Pathol Inform*. 2015 May 28;6:20.

11. Goodman ZD, Stoddard AM, Bonkovsky HL, Fontana RJ, Ghany MG, Morgan TR, Wright EC, Brunt EM, Kleiner DE, Shiffman ML, Everson GT, Lindsay KL, Dienstag JL, Morishima C; HALT-C Trial Group. Fibrosis progression in chronic hepatitis C: morphometric image analysis in the HALT-C trial. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1738-49.
12. Castera L, Pinzani M. Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut*. 2010 Jul;59(7):861-6.
13. Nguyen D, Talwalkar JA. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology*. 2011 Jun;53(6):2107-10.
14. Castera L. Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1293-1302.e4.
15. Jarcuska P, Janicko M, Veselíny E, Jarcuska P, Skladaný L. Circulating markers of liver fibrosis progression. *Clin Chim Acta*. 2010 Aug 5;411(15-16):1009-17.
16. Orasan OH, Ciulei G, Cozma A, Sava M, Dumitrascu DL. Hyaluronic acid as a biomarker of fibrosis in chronic liver diseases of different etiologies. *Clujul Med*. 2016;89(1):24-31. doi: 10.15386/cjmed-554. Epub 2016 Jan 15.
17. Körner T, Kropf J, Gressner AM. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol*. 1996 Nov;25(5):684-8.
18. Saitou Y, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Kawakita T, Yamamoto N, Sugimoto K, Murata K, Nakano T. Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease. *World J Gastroenterol*. 2005 Jan 28;11(4):476-81.
19. Zhang BB, Cai WM, Weng HL, Hu ZR, Lu J, Zheng M, Liu RH. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood

- mononuclear cells for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2003 Nov;9(11):2490-6.
20. Zhou J, Deng Y, Yan L, Zhao H, Wang G; China HepB-Related Fibrosis Assessment Research Group. Serum platelet-derived growth factor BB levels: a potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis.* 2016 Aug;49:94-9.
21. Yoshida S, Ikenaga N, Liu SB, Peng ZW, Chung J, Sverdlov DY, Miyamoto M, Kim YO, Ogawa S, Arch RH, Schuppan D, Popov Y. Extrahepatic platelet-derived growth factor- β , delivered by platelets, promotes activation of hepatic stellate cells and biliary fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2014 Dec;147(6):1378-92.
22. Martínez-Castillo M, Rosique-Oramas D, Medina-Avila Z, Pérez-Hernández JL, Higuera-De la Tijera F, Santana-Vargas D, Montalvo-Jave EE, Sanchez-Avila F, Torre A, Kershenobich D, Gutierrez-Reyes G. Differential production of insulin-like growth factor-binding proteins in liver fibrosis progression. *Mol Cell Biochem.* 2020 Jun;469(1-2):65-75.
23. Agbim U, Asrani SK. Non-invasive assessment of liver fibrosis and prognosis: an update on serum and elastography markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Apr;13(4):361-374.
24. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003 Aug;38(2):518-26.
25. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, Roskams T, Pinzani M, Arthur MJ; European Liver Fibrosis Group. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2004 Dec;127(6):1704-13.
26. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a

- prospective study. *Lancet*. 2001 Apr 7;357(9262):1069-75.
27. Calès P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konaté A, Gallois Y, Ternisien C, Chevaller A, Lunel F. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*. 2005 Dec;42(6):1373-81.
28. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002 Oct;36(4 Pt 1):986-92.
29. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem*. 2005 Oct;51(10):1867-73.
30. Lieber CS, Weiss DG, Morgan TR, Paronetto F. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index in patients with alcoholic liver fibrosis. *Am J Gastroenterol*. 2006 Jul;101(7):1500-8.
31. Naveau S, Raynard B, Ratzu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Feb;3(2):167-74.
32. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, Kaye P, Burt AD, Ryder SD, Aithal GP, Day CP, Rosenberg WM. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):455-60.
33. Ratzu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel JF, Le Bail B, de Ledinghen V, Poynard T; LIDO Study Group; CYTOL study group. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-

- FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2006 Feb 14;6:6.
34. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP, Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Therneau TM, Day CP. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007 Apr;45(4):846-54.
35. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Alberti A. Sequential algorithms combining non-invasive markers and biopsy for the assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 28;13(4):525-31. doi: 10.3748/wjg.v13.i4.525.
36. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di Martino V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2003 Aug;39(2):222-30.
37. Shi KQ, Fan YC, Pan ZZ, Lin XF, Liu WY, Chen YP, Zheng MH. Transient elastography: a meta-analysis of diagnostic accuracy in evaluation of portal hypertension in chronic liver disease. *Liver Int.* 2013 Jan;33(1):62-71.
38. Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, Herrmann E. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2008 Apr;134(4):960-74.
39. European Association for Study of Liver; Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hgado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol.* 2015 Jul;63(1):237-64.
40. Friedrich-Rust M, Nierhoff J, Lupsor M, Sporea I, Fierbinteanu-Braticevici C, Strobel D, Takahashi H, Yoneda M, Suda T, Zeuzem S, Herrmann E. Performance of Acoustic

- Radiation Force Impulse imaging for the staging of liver fibrosis: a pooled meta-analysis. *J Viral Hepat.* 2012 Feb;19(2):e212-9.
41. Feng JC, Li J, Wu XW, Peng XY. Diagnostic Accuracy of SuperSonic Shear Imaging for Staging of Liver Fibrosis: A Meta-analysis. *J Ultrasound Med.* 2016 Feb;35(2):329-39.
42. Low G, Kruse SA, Lomas DJ. General review of magnetic resonance elastography. *World J Radiol.* 2016 Jan 28;8(1):59-72. doi: 10.4329/wjr.v8.i1.59.
43. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, Miller FH, Motosugi U, Low RN, Hassanein T, Asbach P, Godfrey EM, Yin M, Chen J, Keaveny AP, Bridges M, Bohte A, Murad MH, Lomas DJ, Talwalkar JA, Ehman RL. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015 Mar;13(3):440-451.e6.
44. Yin M, Glaser KJ, Talwalkar JA, Chen J, Manduca A, Ehman RL. Hepatic MR Elastography: Clinical Performance in a Series of 1377 Consecutive Examinations. *Radiology.* 2016 Jan;278(1):114-24.
45. Sebastiani G, Halfon P, Castera L, Mangia A, Di Marco V, Pirisi M, Voiculescu M, Bourliere M, Alberti A. Comparison of three algorithms of non-invasive markers of fibrosis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Jan;35(1):92-104.
46. Castéra L, Sebastiani G, Le Bail B, de Lédinghen V, Couzigou P, Alberti A. Prospective comparison of two algorithms combining non-invasive methods for staging liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2010 Feb;52(2):191-8.
47. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000 Jan 28;275(4):2247-50.
48. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):539-48.

49. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis.* 1990 Feb;10(1):56-65.
50. Schlosser A, Thomsen T, Shipley JM, Hein PW, Brasch F, Tornøe I, Nielsen O, Skjødt K, Palaniyar N, Steinhilber W, McCormack FX, Holmskov U. Microfibril-associated protein 4 binds to surfactant protein A (SP-A) and colocalizes with SP-A in the extracellular matrix of the lung. *Scand J Immunol.* 2006 Aug;64(2):104-16.
51. Sækmose SG, Schlosser A, Holst R, Johansson SL, Wulf-Johansson H, Tornøe I, Vestbo J, Kyvik KO, Barington T, Holmskov U, Sørensen GL. Enzyme-linked immunosorbent assay characterization of basal variation and heritability of systemic microfibrillar-associated protein 4. *PLoS One.* 2013 Dec 4;8(12):e82383.
52. Mülleken C, Sitek B, Henkel C, Poschmann G, Sipos B, Wiese S, Warscheid B, Broelsch C, Reiser M, Friedman SL, Tornøe I, Schlosser A, Klöppel G, Schmiegel W, Meyer HE, Holmskov U, Stühler K. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology.* 2009 Apr;49(4):1257-66.
53. Sækmose SG, Mössner B, Christensen PB, Lindvig K, Schlosser A, Holst R, Barington T, Holmskov U, Sorensen GL. Microfibrillar-Associated Protein 4: A Potential Biomarker for Screening for Liver Fibrosis in a Mixed Patient Cohort. *PLoS One.* 2015 Oct 13;10(10):e0140418.
54. Mülleken C, Ahrens M, Schlosser A, Dietz J, Eisenacher M, Meyer HE, Schmiegel W, Holmskov U, Sarrazin C, Sorensen GL, Sitek B, Bracht T. Direct-acting antivirals-based therapy decreases hepatic fibrosis serum biomarker microfibrillar-associated protein 4 in hepatitis C patients. *Clin Mol Hepatol.* 2019 Mar;25(1):42-51.
55. Thatcher JE, Zelter A, Isoherranen N. The relative importance of CYP26A1 in hepatic clearance of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol.* 2010 Sep 15;80(6):903-12. doi:

10.1016/j.bcp.2010.05.023.

56. Tay S, Dickmann L, Dixit V, Isoherranen N. A comparison of the roles of peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptor on CYP26 regulation. *Mol Pharmacol*. 2010 Feb;77(2):218-27. doi: 10.1124/mol.109.059071. Epub 2009 Nov 2.
57. Pettinelli P, Arendt BM, Teterina A, McGilvray I, Comelli EM, Fung SK, Fischer SE, Allard JP. Altered hepatic genes related to retinol metabolism and plasma retinol in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2018 Oct 31;13(10):e0205747.
58. Chen MH, Weng JJ, Cheng CT, Wu RC, Huang SC, Wu CE, Chung YH, Liu CY, Chang MH, Chen MH, Chiang KC, Yeh TS, Su Y, Yeh CN. ALDH1A3, the Major Aldehyde Dehydrogenase Isoform in Human Cholangiocarcinoma Cells, Affects Prognosis and Gemcitabine Resistance in Cholangiocarcinoma Patients. *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 15;22(16):4225-35.
59. Ashla AA, Hoshikawa Y, Tsuchiya H, Hashiguchi K, Enjoji M, Nakamuta M, Taketomi A, Maehara Y, Shomori K, Kurimasa A, Hisatome I, Ito H, Shiota G. Genetic analysis of expression profile involved in retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2010 Jun;40(6):594-604.
60. Lamireau T, Dubuisson L, Lepreux S, Bioulac-Sage P, Fabre M, Rosenbaum J, Desmoulière A. Abnormal hepatic expression of fibrillin-1 in children with cholestasis. *Am J Surg Pathol*. 2002 May;26(5):637-46.
61. Dubuisson L, Lepreux S, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Costa AM, Rosenbaum J, Desmoulière A. Expression and cellular localization of fibrillin-1 in normal and pathological human liver. *J Hepatol*. 2001 Apr;34(4):514-22.
62. RefSeq, Dec 2009. Gene Cards Summary for PLA2G7 gene.
63. Smith MW, Yue ZN, Geiss GK, Sadovnikova NY, Carter VS, Boix L, Lazaro CA,

- Rosenberg GB, Bumgarner RE, Fausto N, Bruix J, Katze MG. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2003 Feb 15;63(4):859-64.
64. Ishihara K, Miyazaki A, Nabe T, Fushimi H, Iriyama N, Kanai S, Sato T, Uozumi N, Shimizu T, Akiba S. Group IVA phospholipase A2 participates in the progression of hepatic fibrosis. *FASEB J.* 2012 Oct;26(10):4111-21.
65. Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5;265(25):15040-8.
66. Sequence: M58549.1: Human matrix Gla protein (MGP) mRNA, complete cds. European Nucleotide Archive. European Bioinformatics Institute.
67. González S, Martínez-Borra J, López-Larrea C. Cloning and characterization of human complement component C7 promoter. *Genes Immun.* 2003 Jan;4(1):54-9.
68. de Lima RE, de Holanda Martins CM, do Carmo RF, Aroucha DCBL, Pereira LMMB, Vasconcelos LRS, Moura P. Two sides of a coin: GG genotype of C7 provides protection against fibrosis severity while showing a higher risk for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. *Hum Immunol.* 2018 Sep;79(9):702-707.
69. Harlow E, Lane D, editors. "Immunoassays". En: *Antibodies. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998. p.553-612.