



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

**“FENOTIPO METABOLÓMICO ASOCIADO A ESTEATOSIS Y FIBROSIS HEPÁTICA EN NIÑOS CON  
OBESIDAD”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

**GUADALUPE NAYELY GARIBAY NIETO**

**TUTOR PRINCIPAL**

FELIPE VADILLO ORTEGA

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto Nacional de Medicina Genómica

**COMITÉ TUTOR**

Dr. Juan Garduño Espinosa. Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera, Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Joselín Hernández Ruíz. Department of Human Genetics. University of Utah, USA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIAS**

A mis maestros de vida, mis pacientes

A mis verdaderos maestros que han compartido su conocimiento y me han brindado su apoyo y soporte, Dr. Felipe Vadillo Ortega, Dr. Juan Carlos López Alvarenga, Dra. Estibalitz Laresgoiti Servitje, Dra. Gloria Queipo García

A mis colaboradoras por compartir su esfuerzo y dedicación a lo largo de este trayecto, Dra. Karen Pedraza Escudero, Dra. Isabel Omaña Guzmán, Dra. Berenice Palacios González

### **A las personas indispensables en mi vida**

A mi esposo Lionel Leroy, por ser el mejor complemento de vida. Gracias por impulsar mis sueños

A mis hijos André y Natalia Leroy, por todos los momentos increíbles que compartimos

A mi madre Guadalupe Nieto, por su incansable entrega y ejemplo

A mi padre Juan Manuel Garibay, por los médicos que hacen ciencia

## INDICE

Resumen	4
1. Marco Teórico	6
2. Antecedentes	13
3. Planteamiento del problema	14
4. Justificación	15
5. Objetivo del estudio	15
6. Metodología	15
6.1 Materiales y métodos	15
6.2 Mediciones	17
6.3 Análisis Estadístico	19
7. Resultados	20
7.1 Características de la población de estudio	20
7.2 Fenotipo metabólico de acuerdo a la progresión de MASLD	20
8. Discusión	27
9. Conclusiones	35
10. Bibliografía	36

Título: “**Fenotipo metabolómico asociado a esteatosis y fibrosis hepática en niños con obesidad**”

**RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** La obesidad infantil es un problema de salud emergente en nuestro país. Se describe como una enfermedad sistémica, crónica, progresiva, recidivante y multifactorial. Se ha relacionado con la incidencia temprana de comorbilidades como la disfunción metabólica asociada a esteatosis hepática (MASLD), la cual se considera actualmente la principal causa de enfermedad crónica del hígado. La fisiopatología de la obesidad y de sus comorbilidades se asocia de forma directa con cambios metabólicos progresivos que incluyen alteraciones en la disponibilidad y utilización de los sustratos energéticos.

**OBJETIVO:** Identificar fenotipos metabolómicos asociados a esteatosis y fibrosis hepática en niños y adolescentes con obesidad.

**DISEÑO:** Estudio transversal, comparativo y analítico

**METODOLOGÍA:** Se incluyeron niños y adolescentes entre 8 y 16 años de edad con diagnóstico de obesidad. Se recabaron variables antropométricas, bioquímicas y metabolómicas que fueron determinadas mediante un estudio dirigido por espectrometría de masas que incluyó aminoácidos y acilcarnitinas. Se realizó elastografía transitoria mediante Fibroscan hepático, con la finalidad de evaluar por este medio, la presencia de esteatosis y fibrosis hepática. Los pacientes fueron clasificados en tres grupos de estudio: Pacientes sin MASLD, Pacientes con MASLD y Pacientes con MASLD + fibrosis. Se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para identificar los grupos de estudio y visualizar las diferencias entre sus mapas de calor. Se diseñaron los gráficos de Importancia de Proyección de Variables (VIP), para lo cual un puntaje > 1.5 discriminó los metabolitos y variables bioquímicas con mayor influencia que caracterizaron a cada grupo. Se construyeron modelos de regresión logística incluyendo las variables con puntaje > 1.5 y se estimaron las curvas ROC para evaluar diferentes combinaciones de dichas variables.

**RESULTADOS:**

El fenotipo MASLD se asoció con incremento en los niveles de aspartato aminotransferasa y disminución de arginina, glicina y acilcarnitina AC5:1; el fenotipo MASLD + fibrosis, que representa un estadio avanzando de la enfermedad, se caracterizó por niveles elevados de

alanino amino transferasa, prolina y alanina, con un índice de Matsuda de sensibilidad a la insulina disminuido.

**CONCLUSIÓN:** El fenotipo metabólico de MASLD se modifica conforme la enfermedad progresa. El acercamiento a un entendimiento de las alteraciones metabólicas en MASLD podría permitir su identificación temprana, así como el desarrollo de estrategias de intervención enfocadas en limitar la progresión del daño hepático en niños y adolescentes que viven con obesidad.

## **1. MARCO TEÓRICO**

La obesidad infantil es una enfermedad sistémica, crónica, progresiva, recidivante y multifactorial que se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial debido al incremento en su prevalencia e incidencia, así como su relación con las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) reportadas en población adulta.

Datos de la OMS emitidos para 2016 revelan que, en todo el mundo, el número de lactantes y niños pequeños (de 0 a 5 años) que padecen sobrepeso u obesidad aumentó de 32 millones en 1990 a 41 millones en 2016 (1). En el estudio publicado por el grupo de la NCD Risk Factor Collaboration, en el cual se incluyeron medidas de 2416 poblaciones de estudio a nivel mundial y que incluyó 128.9 millones de participantes de todas las edades, reportó que la prevalencia global de obesidad estandarizada por edad en niños y adolescentes aumentó de 0.7% en 1975 a 5.6% para 2016 en niñas, y de 0.9% en 1975 a 7.8% para 2016 en niños (2).

En el caso de México, en la Encuesta Nacional de Salud 2020-2022, 35.6% de los niños en edad escolar fueron diagnosticados con sobrepeso y obesidad; la prevalencia de obesidad en este grupo de edad fue 1.7 puntos porcentuales mayor que la observada en la Encuesta Nacional de 2018. Se observó una mayor prevalencia de obesidad en varones (18.3%), en comparación con las niñas (12.2%). La distribución por localidad de residencia mostró una mayor prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en localidades urbanas (34.9%) en comparación con las rurales (29.0%). En cuanto a la población de 12 a 19 años, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 41.1%, 2.7 puntos porcentuales superior a la prevalencia en 2018 (3).

### **Repercusiones de la Obesidad Infantil**

Simmonds y colaboradores publicaron datos muy relevantes en una revisión sistemática y meta-análisis, en el cual se incluyeron 15 estudios de cohorte que analizó poco más de 200,000 participantes que fueron seguidos a lo largo de la infancia y adultez temprana. En este estudio se evidenció que los niños y adolescentes con obesidad tienen un riesgo 5 veces mayor de persistir con obesidad en la etapa adulta en comparación con aquellos que no la padecen. El 55% de los niños con obesidad persisten con obesidad en la

adolescencia; alrededor de un 80% de los adolescentes llegan con obesidad a la etapa adulta y 70% persisten con esta condición a los 30 años (4).

La obesidad genera en los niños múltiples complicaciones médicas, psicológicas y sociales. Los niños con obesidad, manifiestan una mayor prevalencia de resistencia a la insulina y sus comorbilidades, incluida la enfermedad cardiovascular, la hipertensión arterial, la hipoalfalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, la disfunción metabólica asociada a esteatosis hepática (MASLD, por sus siglas en inglés *Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease*) y las alteraciones en el metabolismo de la glucosa (5). Muchos niños con obesidad y sobrepeso presentan una dislipidemia aterogénica desde edades tempranas (6),(7) y aunque es poco probable que presenten infarto agudo al miocardio o evento vascular cerebral en la infancia, se ha descrito que el proceso aterosclerótico inicia desde los primeros años de vida (8), y representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades en la edad adulta (9). El engrosamiento de la íntima media carotídea (EIM) se ha relacionado en forma directa con riesgo cardiovascular incrementado y puede predecir eventos cardiovasculares (10), así como manifestaciones tempranas de disfunción ventricular izquierda y enfermedad coronaria (11). Este se considera actualmente como un marcador subrogado de daño endotelial y marcador subclínico de pronóstico de aterosclerosis en niños y en adolescentes (12) (13). Estudios de cohorte prospectivos han sugerido que de manera particular los niveles de tensión arterial, de lípidos en sangre y el propio índice de masa corporal predicen incrementos del EIM en la edad adulta (14) (15) (16,17). Se ha reportado una mayor incidencia de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) en años recientes. Esta se ha asociado al incremento en la incidencia y prevalencia de obesidad, de tal modo que, en la actualidad del 25 al 45% de los casos nuevos de DM2 en niños en los Estados Unidos, están asociados a obesidad, además de los factores ya conocidos como el pertenecer a grupos étnicos de riesgo, (ascendencia hispana o amerindia, entre otros), así como tener antecedente familiar de DM2 (18) (19). De la misma manera, las anormalidades del síndrome metabólico en niños pueden predecir el desarrollo de diabetes mellitus, siendo el grupo de hispanos los que presentan la mayor incidencia (20,21).

Otra de las complicaciones emergentes es la presencia de disfunción metabólica asociada a esteatosis hepática (MASLD), la cual representa un continuo de anormalidades hepáticas que inicia con un depósito de grasa intrahepática y que puede progresar potencialmente a esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma (22). La prevalencia de MASLD en población pediátrica es de 7.6% en población general, pero incrementa hasta un 34.2% en



niños con obesidad. Los sujetos del sexo masculino tienen mayor prevalencia que las mujeres. Se ha observado que existe una predisposición genética en aquellos sujetos con el gen SNP PNPLA3, el cual es más frecuente en población mexicana (23). Se ha descrito también, que la población hispana tiene cuatro veces más riesgo de presentar MASLD (24,25) y particularmente la población México-americana en Estados Unidos (OR: 1.67, IC: 1.26,2.22) (26); otros factores asociados que han sido descritos son la adiposidad central, la resistencia a la insulina y la dislipidemia. El espectro de las anomalías abdominales va desde la simple acumulación de grasa intrahepática en más del 5% del parénquima, seguida de la esteatohepatitis (EH) caracterizada por la inflamación y la necrosis de los hepatocitos con diversos grados de fibrosis. Con el tiempo, estas anomalías pueden evolucionar a fibrosis hepática y eventualmente cirrosis que pueden requerir trasplante hepático (27). Cada vez existe mayor evidencia que sugiere que la fisiopatología de la enfermedad es compleja e implica múltiples factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Estudios transversales y longitudinales han descrito una asociación entre la MASLD y el grado de adiposidad, que es un fuerte predictor del desarrollo y la progresión de esta disfunción metabólica (28). Por otro lado, Schwimmer et al. informaron resultados de un estudio interesante en el cual 347 niños con sobrepeso y obesidad fueron referidos al gastroenterólogo por sospecha de MASLD, diagnóstico que pudo corroborarse por histología en el 55% de la muestra. El 18% del total de la muestra tenía otras patologías diferentes a MASLD. El 54% de los pacientes con MASLD mostraron EH. La prevalencia total de fibrosis fue del 11% y la fibrosis avanzada fue más frecuente en el grupo de pacientes con MASLD con un 17%. Aquellos con fibrosis avanzada mostraron niveles significativamente más elevados de ALT y AST. Estos hallazgos denotan la presencia de daño al tejido hepático desde las primeras etapas de la vida (29).

La MASLD al igual que muchas enfermedades crónico-degenerativas, puede no manifestar ningún síntoma clínico, por lo que es importante sospecharla en pacientes con obesidad. Actualmente se recomienda que, en niños con obesidad y datos clínicos de síndrome metabólico, se busque intencionadamente MASLD. El tamizaje diagnóstico de primera línea debe realizarse con instrumentos no-invasivos. La NASPGHAN (*North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) recomienda realizar biopsia hepática solo en pacientes con riesgo elevado de EH y/o fibrosis avanzada asociadas con enzimas hepáticas elevadas  $> 80$  UI/L, esplenomegalia, o una  $AST/ALT > 1$ . Se sugiere sospecha de MASLD en sujetos que presenten valores de  $ALT > 50$  mg/dl para niños y  $ALT > 44$  mg/dl para niñas. Valores por encima de 80 mg/dl de ALT pueden hacer sospechar la

presencia de EH (30). Otras enzimas hepáticas como AST y Gama glutamiltranspeptidasa (GGT) no se han estudiado de manera independiente para la valoración de MASLD, pero se encuentran en algunos de los casos.

Si bien la biopsia hepática continúa siendo el estándar de oro para el diagnóstico de MASLD, su carácter invasivo, la probabilidad de error en el muestreo y la escasa viabilidad como método de seguimiento son limitaciones importantes que tomar en consideración. Algunos índices bioquímicos han surgido particularmente como una necesidad de descubrir herramientas no invasivas que puedan diagnosticar con precisión la fibrosis hepática, que ha sido reconocida como un fuerte predictor de cirrosis hepática (31). El cociente AST/ALT, el índice de cociente AST/plaquetas (APRI), la puntuación FIB-4, la puntuación de fibrosis NAFLD (32) y la citoqueratina-18 plasmática (33) se trató de validar en la población pediátrica utilizando las biopsias hepáticas a modo de referencia, sin embargo, estos han mostrado un rendimiento limitado y han subrayado la urgencia de disponer de métodos de diagnóstico más precisos (34,35).

En relación a los estudios de imagen para el análisis de la infiltración grasa del hígado, el más utilizado es el ultrasonido, sin embargo, tiene una limitada sensibilidad para detectar casos de esteatosis leve (tejido hepático con < 30% de grasa) (24,25). La ecografía convencional (USG modo B) es un método frecuentemente utilizado, con una sensibilidad del 79.9% y una especificidad del 86.2%, para el diagnóstico de esteatosis moderada a grave, con un área bajo la curva de 0,87 (36,37); sin embargo, presenta limitaciones para la detección de EH y fibrosis, además del inconveniente de ser una técnica operador-dependiente. Otros métodos, como la espectroscopía por resonancia magnética y la fracción grasa de densidad protónica por resonancia magnética (MRS-PDFF), han demostrado una mayor precisión para diferenciar los grados de esteatosis, comparando los grados moderados-graves frente a los leves con un área bajo la curva de 0,87 (IC 95% [0,80-0,94]), y de 0,79 (IC 95% [0,70-0,87]) para distinguir la esteatosis grave de las formas leves y moderadas (38). Sin embargo, no pueden detectar la fibrosis y su capacidad de cribado y diagnóstico es limitada; además, lamentablemente no siempre están disponibles. Draijer et al. publicaron una revisión sistemática que evaluó varios métodos diagnósticos que analizaban la presencia de fibrosis hepática en la población pediátrica. La elastografía transitoria mediante FibroScan® mostró una elevada precisión con un área bajo la curva de 0.98 (IC 95% [0.90-0.99]), lo que se traduce en una sensibilidad y especificidad >90% en un umbral de 5.1 kPa (39). Este método ha demostrado superioridad sobre las puntuaciones

bioquímicas tradicionales (40). Por otro lado, también es capaz de detectar esteatosis hepática en niños, con un punto de corte para el parámetro de control atenuado (CAP) de 225 dB/m, con un área bajo la curva de 0.93, sensibilidad del 87% y especificidad del 83% (41).

### **La metabolómica como herramienta para identificar y cuantificar moléculas como potenciales biomarcadores en el estudio de la Obesidad y Resistencia a la Insulina**

Si bien existe suficiente evidencia científica que relaciona a la obesidad en la infancia con el desarrollo de complicaciones asociadas, tales como las alteraciones de la tolerancia a la glucosa, la hipertensión, las dislipidemias, la resistencia a la insulina, la inflamación crónica de bajo grado y la disfunción metabólica asociada a esteatosis hepática, entre otras, las vías metabólicas que inducen el desarrollo y la progresión de estos procesos no han sido descritas por completo.

El término metabolómica se refiere a la determinación e interacción de moléculas endógenas pequeñas, involucradas en reacciones metabólicas comunes que forman parte de vías bioquímicas involucradas en el crecimiento, desarrollo, reproducción y respuesta metabólica al estrés. La metabolómica se define como una tecnología que se enfoca en la medición e identificación de cambios sensibles en los metabolitos menores de 1500 Da, presentes dentro de una célula, un tejido o un organismo, en respuesta a variaciones genéticas, epigenéticas o estímulos fisiopatológicos (42). De tal manera que, esta herramienta de alto rendimiento tiene la capacidad de captar en forma instantánea la relación biológica de varios metabolitos en un momento determinado y, por tanto, evidenciar las interacciones de los mismos en los procesos fisiológicos o fisiopatológicos. La metabolómica tiene la capacidad de analizar en forma cualitativa y cuantitativa perfiles moleculares y su relación intra e intercelular, mediante dos conceptos; el primero se refiere a un análisis no dirigido, en el cual se determinan una gran cantidad de metabolitos y sus precursores. En el segundo, existe un análisis dirigido en el cual, se hace especial énfasis en metabolitos de interés específico, que pueden ser aminoácidos, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, hormonas y otras moléculas de señalización, basados en una hipótesis, a priori, de la interrelación entre los metabolitos del sistema biológico que intenta estudiarse. Esta tecnología ha emergido como una herramienta relevante en el estudio de la obesidad, dada la estrecha relación de los mecanismos metabólicos existente en las diferentes vías

de consumo y almacenamiento de sustratos energéticos entre los diversos tejidos involucrados, como el tejido visceral, tejido adiposo blanco, tejido adiposo pardo, tejido muscular y hepático, entre otros.

Se han publicado una sustancial cantidad de trabajos relacionados con la descripción de perfiles metabólicos en condiciones de obesidad, diabetes, resistencia a la insulina y sus comorbilidades en población adulta. La mayoría de estos estudios evidencian una consistente asociación con un perfil metabólico que involucra la elevada concentración de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés *Branched-chain aminoacids*) que son Valina, Leucina e Isoleucina y aminoácidos aromáticos (AA) como Fenilalanina y Tirosina, otros como Glutamina y Alanina, además de las Acilcarnitinas C3 (propionilcarnitina) y C5 (Isovalerilcarnitina). Estas moléculas han mostrado una alta asociación con fenómenos de resistencia a la insulina (43), y DM2 (44) Sin embargo, los estudios no dirigidos, resaltan la creciente asociación de un mayor número de metabolitos y sus metabolitos intermedios.

Los estudios transversales realizados en población adulta, han evidenciado la asociación entre niveles elevados de BCAA y comorbilidades resultantes o asociadas a RI evaluada por el estándar de oro (clamp euglucémico-hiperinsulinémico) o por índices subrogados (insulinemia de ayuno, insulinemia a los 30 y 120 minutos posterior a una carga de glucosa, índices de HOMA-IR, HOMA-B y sensibilidad a la insulina Matsuda-ISI), y su relación final con desenlaces como perfil cardiovascular de riesgo, hipertensión arterial, alteraciones de la tolerancia a la glucosa, obesidad abdominal y síndrome metabólico (45–47).

La evidencia científica publicada en relación a los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina y las comorbilidades asociadas en el paciente con obesidad, han propuesto una interrelación profunda entre las alteraciones de las vías del metabolismo de los carbonos centrales, los fenómenos de activación de las vías inflamatorias que exacerbaban la interrupción de las vías de señalización de insulina, así como la influencia de la microbiota intestinal.

Los mecanismos de interrelación de estos metabolitos con las vías que regulan la señalización de insulina y el depósito de grasa en el hígado son aún poco conocidos y muy probablemente expliquen el fenómeno solo de manera parcial. Los dos mecanismos que se han propuesto asociados a estos eventos fisiopatogénicos son las alteraciones en el complejo Rapamicina 1 de mamíferos y el segundo es precisamente la alteración en el

metabolismo de los BCAAs. La activación sostenida de la vía del complejo Rapamicina-1/serina cinasa, mediado por BCAAs, inactiva los substratos del receptor de insulina IRS-1 e IRS-2, y estimula la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas (48). Estas alteraciones se potencializan con el fenómeno de meta-inflamación que prevalece en estos pacientes. En la segunda teoría, se propone que los metabolitos tóxicos derivados del metabolismo alterado de los BCAA (provenientes de la dieta, de su catabolismo depletado en el tejido adiposo, y de la proteólisis inducida por insulina), promueven su catabolismo a nivel hepático y muscular. En consecuencia, se generan ácido ceto-isocapróico y acilcarnitinas de cadena corta (y sus intermediarios), que interfieren con la oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos libres; los productos derivados de su oxidación incompleta favorecen estrés mitocondrial y alteraciones en la vía de señalización de la insulina. Se ha descrito también, que niños con obesidad muestran niveles elevados de ácido cetoisocapróico y acilcarnitinas C3 y C4 y niveles disminuidos de carnitina libre (C0). Se han encontrado también niveles elevados de alanina en esta población, la cual es sintetizada en el músculo esquelético a partir de piruvato y otros aminoácidos, particularmente los BCAA, a través del ciclo alanino-glucosa. A nivel hepático, la alanina es nuevamente convertida a piruvato, intermediario en el ciclo de Krebs y en la gluconeogénesis (49).

La obesidad se caracteriza por aumento en los depósitos de grasa corporal e incremento de ácidos grasos libres circulantes. La carnitina es un metabolito crítico en la fisiopatología de la obesidad dada su participación en el metabolismo de los ácidos grasos. La disponibilidad incrementada de ácidos grasos libres promueve su oxidación mediante la única vía en su metabolismo, la  $\beta$ -oxidación, proceso dependiente de carnitina. Las acilcarnitinas son ácidos grasos unidos a carnitina, que fisiológicamente permiten el transporte de estos al interior de la mitocondria.

Cuando la capacidad de la maquinaria enzimática de este proceso se ve rebasada, existe un acúmulo de acilcarnitinas y de intermediarios lipídicos (ceramidas y diacilglicerol) (50). Estas moléculas inducen la activación de vías de inflamación que generan estrés del retículo endoplásmico, producción de especies reactivas de oxígeno, interrumpen los procesos de la vía de señalización de insulina y por tanto las vías metabólicas relacionadas con el metabolismo intermediario (51).

## 2. ANTECEDENTES

### **Metabolómica y MASLD en pacientes pediátricos**

Por su parte, basándose en los mecanismos fisiopatológicos implicados en la MASLD y EH, ciertos estudios han intentado identificar biomarcadores útiles para predecir y actuar como firmas de la MASLD y su estadificación (52). Por lo que, han versado su atención en la metabolómica (tanto en métodos dirigidos como en los no dirigidos). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado únicamente en población adulta, con un número reducido en edad pediátrica (52–55).

Además, ninguno de estos estudios se realizó en poblaciones residentes de Latinoamérica, donde la prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil, así como las comorbilidades asociadas son las más altas a nivel global (56).

El análisis metabolómico dirigido ha evaluado las alteraciones de aminoácidos y lípidos. En niños residentes en Los Ángeles, CA, USA, se observó que la MASLD estaba asociada con moléculas del metabolismo de ácidos grasos, glutatión y triptófano (52). Por otra parte, en niños austriacos con obesidad grave (54) y niños con obesidad en Estados Unidos (53), se observó que los que padecían MASLD presentaban concentraciones más elevadas de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y acilcarnitinas de cadena corta en comparación con los niños sin esta afectación. Además, los modelos que incluían estos metabolitos han demostrado tener una capacidad adecuada para identificar el MASLD en niños (53,54) independientemente de otras alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y la obesidad. Jin y cols. realizaron un estudio en 39 adolescentes hispanos con obesidad y esteatosis hepática diagnosticada por resonancia magnética con espectroscopía en quienes se determinó mediante un análisis metabolómico no dirigido las concentraciones de 7711 metabolitos, de los cuales 478 se asociaron con la presencia de MASLD comparado con controles. Los metabolitos mayormente asociados fueron lípidos además de una evidente desregulación de las principales vías de aminoácidos, siendo la de tirosina la más representativa. Utilizando un enfoque no dirigido, consistente con lo anterior, en niños y adolescentes autoidentificados como hispanos con un IMC  $\geq$  Pc 85, se observó que aquellos con MASLD presentan alteraciones en algunas vías de aminoácidos (BCAAs, metabolismo de tirosina, metionina y cisteína) y del metabolismo lipídico (lipogénesis y

metabolismo de ácidos grasos) (45). Este hallazgo ha sido descrito en otros estudios en población pediátrica, que han asociado niveles elevados de tirosina con resistencia a la insulina, particularmente con el índice de HOMA-IR. Este estudio muestra modulación de los niveles de este aminoácido una vez que los pacientes mejoraron su índice de masa corporal posterior a un programa de intervención de cambios en el estilo de vida (57).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La obesidad es un problema de salud emergente en nuestro país, dada su alta prevalencia e incidencia temprana de comorbilidades como resistencia a la insulina y la MASLD. La fisiopatología de la obesidad y de sus comorbilidades se asocia de forma directa con cambios metabólicos progresivos que incluyen alteraciones en la disponibilidad y utilización de los sustratos energéticos. La MASLD es una entidad con una fisiopatología compleja que involucra múltiples factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Estudios transversales y longitudinales han descrito una asociación entre la MASLD y el grado de adiposidad, que es un fuerte predictor del desarrollo y la progresión de esta disfunción metabólica. Existen a la fecha limitados marcadores bioquímicos que hayan mostrado adecuada sensibilidad y especificidad para predecir la presencia de esteatosis y fibrosis hepática. De igual manera, los estudios de imagen no han sido estandarizados para esta población y algunos son inaccesibles. La biopsia hepática sigue considerándose en la actualidad como el estándar de oro para el diagnóstico de esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis, sin embargo, existen limitaciones de seguridad y éticas para su uso de manera rutinaria en el ámbito clínico-práctico. En años recientes, la creciente disponibilidad de técnicas especializadas y el acceso al estudio de metabolitos endógenos que se consideran marcadores del fenotipo biológico y que están directamente relacionados con las señales regulatorias que generan procesos de enfermedad y sus efectos, ofrece la posibilidad de describir mecanismos fisiopatogénicos no conocidos. Existe escasa información relacionada con fenotipos metabólicos en población pediátrica que se hayan utilizado para describir la MASLD, sin embargo resulta interesante explorar la utilidad que podrían tener estas herramientas de alto rendimiento.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La obesidad infantil representa un problema de salud emergente en nuestro país. Existe suficiente evidencia epidemiológica que sustenta el panorama adverso del problema de salud y las comorbilidades que limitarán de manera importante la calidad de vida y la productividad de los futuros adultos jóvenes con obesidad, así como la mortalidad prematura que se proyecta en las próximas generaciones. Las comorbilidades metabólicas registradas con mayor frecuencia en los niños que acuden a la Clínica de Obesidad Infantil del Hospital General de México son la adiposidad abdominal, la resistencia a la insulina, la disfunción metabólica asociada a esteatosis hepática (MASLD) y alteraciones en el espesor de la íntima media carotídea, además de otras no menos importantes como las limitaciones funcionales y los trastornos psicoemocionales. Estos hallazgos sugieren que el daño en los diversos órganos inicia desde etapas muy tempranas, cuando no existe aún expresión bioquímica de los marcadores de riesgo comúnmente utilizados, y que describir fenómenos metabólicos explicativos que nos ayuden a entender la progresión del daño, particularmente del parénquima hepático, podría ser de gran utilidad. Estos biomarcadores podrían ser probados en estudios longitudinales y de cohorte con la intención de contribuir al entendimiento de la enfermedad, así como establecer índices predictivos de respuesta a tratamiento, y eventualmente blancos terapéuticos.

#### **5. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

El objetivo de este estudio fue identificar los fenotipos metabólicos asociados a dos estadios de progresión del MASLD (esteatosis hepática y esteatosis hepática más fibrosis), en niños con obesidad.

#### **6. METODOLOGÍA**

##### **6.1 Materiales y métodos**

###### *Diseño del estudio y participantes*

Se realizó un estudio comparativo transversal derivado de un ensayo clínico aleatorizado cuyo objetivo principal fue evaluar diversas intervenciones respecto a la actividad física en pacientes pediátricos con obesidad incluidos en un programa de intervención multidisciplinario centrado en cambios en el estilo de vida. Para el presente estudio, se



analizaron solo los datos de los pacientes incluidos previos a ser sometidos a la intervención. Los pacientes fueron reclutados entre diciembre de 2018 y marzo de 2020, cuando se declaró la pandemia de COVID-19. A partir de ese momento, no fue posible incluir más paciente ya que las consultas externas y proyectos de investigación permanecieron suspendidos hasta marzo de 2022. Una vez levantado el confinamiento no fue posible seguir utilizando el equipo de Fibroscan®.

Niños y adolescentes de entre 8 y 16 años que no habían recibido manejo médico previo y que fueron referidos a la Unidad de Bienestar Infantil del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” fueron incluidos. La obesidad se definió usando las gráficas publicadas por la Centers of Disease Control (CDC) y sus Criterios de Prevención (índice de masa corporal (IMC  $\geq$  al percentil 95 ajustado a edad y género) ([https://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr\\_11/sr11\\_246.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_11/sr11_246.pdf)), y únicamente pacientes clasificados con obesidad Grado 1 fueron incluidos (IMC  $<120\%$  por encima del percentil 95 ajustado a edad y a género) (58). Entre los criterios de exclusión se consideraron la obesidad Clases 2 y 3, obesidad de origen genético u endócrino, enfermedades sistémicas, dislipidemia familiar, consumo de alcohol, y lesión hepática inducida por alcohol o medicamentos. Se descartaron otros antecedentes de enfermedades hepáticas.

El estudio fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad para la Investigación en Humanos del Hospital General de México, Dr. Eduardo Liceaga) (Número DI/17/311/03/028) y registrado en ClinicalTrials.gov (NCT03552367). Los padres y los niños proporcionaron su consentimiento informado y asentimiento por escrito, respectivamente. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las Declaraciones de Helsinki de 1975 y 2013, y se adhirió a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Conferencia Internacional de Armonización. Todos los datos de los pacientes fueron protegidos de conformidad con la Ley de Transferencia y Responsabilidad de Seguro Médico (HIPAA).

## **6.2 Mediciones**

### *Antropometría*

Las mediciones fueron realizadas por pediatras y nutriólogos entrenados posterior a un procedimiento de estandarización. El peso corporal total se midió con los participantes vestidos con ropa ligera y se utilizó una báscula mecánica de columna (al 0.1 kg más cercano); la estatura de pie se midió utilizando un estadiómetro estándar montado en la pared (al 0.1 cm más cercano). La circunferencia de la cintura se midió en el punto medio entre el último cartílago costal y la cresta ilíaca anterosuperior con una cinta métrica de fibra de vidrio no flexible al final de la exhalación. La composición corporal se determinó utilizando el analizador de composición corporal modelo IOI 353 (hasta 0.1 kg) (Jawson Medical Co, Gyeonggi-do, República de Corea) después de un período de ayuno de 12 horas. Se registró la presión arterial mediante un esfigmomanómetro digital, tras un reposo de quince minutos y utilizando un tamaño de manguito adecuado al brazo de los niños y adolescentes. Un endocrinólogo pediátrico exploró y definió las evaluaciones puberales según los estados mamario, genital y púbico tanto para niños como para niñas y basadas en la estadificación de Marshall y Tanner (59). El IMC se calculó conforme a la ecuación de Quetelet.

### *Evaluación Bioquímica*

Tras 12 horas de ayuno, se obtuvo una muestra sanguínea venosa con la finalidad de medir las concentraciones de alaninoaminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamiltranspeptidasa (GGT), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y triglicéridos (TG) usando equipos disponibles en el mercado. Para calcular el Índice de Matsuda, se llevaron a cabo curvas de tolerancia oral a la glucosa usando 1.75 g/kg de peso corporal de glucosa anhidra (teniendo como límite superior 75 g). Las muestras fueron recolectadas a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos, y se determinaron niveles de glucosa y de insulina. El índice fue calculado aplicando la siguiente fórmula:  $10\,000/\sqrt{(\text{glucosa en ayuno [mg/dL]} \times \text{insulina en ayuno [mU/L]}) \times (\text{glucosa media} \times \text{insulina media})}$  (60). El índice de HOMA-IR fue calculado empleando la fórmula señalada a continuación:  $(\text{insulina en ayuno [mU/L]} \times \text{glucosa en ayuno [mg/dL]})/405$  (61). El nivel de glucosa fue evaluado enzimáticamente

mediante reactivos disponibles en el mercado. La insulina fue medida usando inmunoensayos para insulina Bio-Plex Pro de Bio-Rad (Hercules, CA, EE. UU.).

Los niveles de triglicéridos, el colesterol total, y la lipoproteína de alta densidad fueron analizados mediante métodos enzimáticos estandarizados, y la lipoproteína de baja densidad fue calculada usando el método de Friedewald.

#### *Evaluación de la esteatosis hepática y fibrosis*

La presencia de esteatosis y fibrosis hepática fue estimada usando elastografía transitoria (FibroScan® Echosens, París, Francia). El parámetro de atenuación controlado (CAP) fue empleado para detectar acumulación grasa en el parénquima hepático y se utilizó el transductor "M" de 3.5 MHz (diámetro 7 mm) ó el transductor "XL" de 2.5 MHz (diámetro 10 mm) si se encontraba tejido adiposo muy grueso. Los pacientes fueron colocados en posición supina, y el examinador colocó el transductor en la piel de los espacios intercostales, mirando verticalmente al lóbulo derecho del hígado. El punto de corte para predecir la esteatosis fue  $CAP \geq 225$  dB/m (41). La rigidez del hígado se midió en kPa. La fibrosis se diagnosticó utilizando el punto de corte propuesto por Nobili y colegas de  $\geq 5.1$  kPa (62). Los datos de CAP (dB/m) y kPa reportados fueron la mediana de 10 mediciones obtenidas por un solo investigador hepatólogo altamente calificado en la metodología y bajo las mismas condiciones; sólo fueron considerados como válidos los resultados con un rango intercuartil inferior al 30.

Se clasificaron tres grupos según las anomalías hepáticas encontradas mediante Fibroscan®: no MASLD (niños sin esteatosis ni fibrosis), MASLD (niños con esteatosis y sin fibrosis) y MASLD + fibrosis (niños con esteatosis y fibrosis).

#### *Determinaciones metabólicas dirigidas*

Se llevó a cabo un análisis de metabolomas específicos, incluyendo glucosa, carnitina libre, acilcarnitinas (AC2, AC3, AC4, AC5, AC5:1, AC6, AC8, AC8:1, AC10, AC10:1, AC10:2, AC12, AC12:1, AC14, AC14:1, AC14OH, AC16, AC16:1, AC16:1OH, AC16OH, AC18, AC18:1, AC18:1OH, AC18:2 y AC18OH), arginosuccinato (ASA) y 12 L-aminoácidos (alanina, glicina, arginina, metionina, prolina, arginina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, citrulina y ornitina). Lo anterior se logró utilizando un espectrómetro de

masas en tándem (MS-MS) Quattro Micro API (MicroMass, Cary, NC, EE. UU.). Todos los procedimientos para la preparación de muestras y el análisis MS-MS se realizaron utilizando un kit NeoBase no derivatizado (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El suero se secó en papeles de filtro y se perforaron discos individuales de cada punto utilizando un punzón de 3 mm. Se utilizó un disco por pocillo. Usando una pipeta multicanal, se agregaron a cada pocillo 190  $\mu$ L de solución de extracción que contenía una mezcla de los respectivos estándares internos marcados con isótopos estables. La placa se cubrió con papel de aluminio, se agitó a 650 x g y se incubó durante 30 minutos a 30°. Finalmente, la placa se colocó en el muestreador automático para su análisis. Todos los resultados se expresaron en  $\mu$ M.

### **6.3 Análisis Estadístico**

Para describir la población estudiada se estimaron la media y las desviaciones estándar (DE) para las variables continuas. Para evaluar las diferencias entre los grupos (no MASLD, MASLD, MASLD + fibrosis) se realizaron pruebas de ANOVA, exactas de Fisher, y se aplicaron pruebas post hoc de Bonferroni para identificar las diferencias entre los grupos. Las concentraciones de metabolitos y los datos bioquímicos se normalizaron en medianas, se transformaron en raíz cuadrada o cúbica y se escalaron en rango. Se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parcial (PLS-DA) para identificar la discriminación entre grupos (no MASLD versus MASLD, no MASLD versus MASLD + fibrosis y MASLD versus MASLD + fibrosis). Se obtuvieron gráficos de proyección de importancia variable (VIP) para visualizar los metabolitos que más contribuyeron a la discriminación de muestras, y se crearon mapas de calor basados en las puntuaciones VIP para visualizar las diferencias entre las concentraciones de metabolitos de los grupos y los datos bioquímicos.

Finalmente, se construyeron modelos de regresión logística considerando como variables independientes los metabolitos y datos bioquímicos con puntuaciones VIP >1.5 (se probaron diferentes combinaciones de estas variables), y los grupos MASLD (no MASLD vs MASLD, y no MASLD vs MASLD + fibrosis) como variables dependientes. Para evaluar si diferentes conjuntos de metabolitos y datos bioquímicos podían identificar los grupos de MASLD y MASLD + fibrosis, se estimaron características operativas del receptor

(áreas bajo la curva ROC). Para definir el fenotipo metabolómico se seleccionaron modelos con un número reducido de metabolitos y un área bajo la curva adecuada.

Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los análisis se realizaron utilizando MetaboAnalyst 5.0 y Stata versión 15.

## **7. RESULTADOS**

### ***7.1 Características de la población de estudio***

Se incluyeron un total de 74 niñas y niños en el estudio. El 52.7% fueron niñas con una media de edad fue de  $11.74 \pm 2.52$  años; mientras que en los niños la media fue de  $10.66 \pm 1.71$  años. De los participantes el 59.5% tuvieron diagnóstico de MASLD (sólo estatois hepática) y el 21.6% de MASLD + fibrosis.

En la tabla 1 se muestran las características clínicas y bioquímicas de los participantes de acuerdo al grupo de diagnóstico (no-MASLD, MASLD, MASLD + fibrosis). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las siguientes variables: circunferencia de cintura, ALT, CAP, kPa, prolina y alanina. La circunferencia de cintura, la concentración de ALT y el CAP fueron menores en el grupo no-MASLD respecto a los otros dos grupos. Por otro lado, el kPa, la prolina y la alanina fueron menores en los grupos no-MASLD y MASLD, en comparación con el grupo MASLD + fibrosis.

### ***7.2 Fenotipo metabolómico de acuerdo a la progresión de MASLD***

A continuación, se presentan los resultados respecto a la identificación de los fenotipos metabolómicos para los grupos MASLD y MASLD + fibrosis considerando como grupo de referencia al no-MASLD.

- ***Fenotipo metabolómico MASLD***

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos de los análisis realizados para identificar el fenotipo metabolómico de niños con MASLD. En la figura 1a se observa que los niños con MASLD tienen concentraciones más elevadas de AC10, AC8, AC4, AC18:2, ornitina, ácido úrico y ALT que niños sin este diagnóstico. La figura 1b muestra que el análisis de PLS-DA discriminó dos clusters en los dos grupos de estudio que se incluyeron (no-MASLD

vs MASLD). Posteriormente, el análisis VIP identificó que el ASA, la AC5:1, la glicina, la arginina y la citrulina son las variables que mejor discriminan a los grupos con un puntaje VIP mayor a 1.5 (Figura 1c). Finalmente, se compararon los siguientes cinco modelos con diferentes combinaciones de los metabolitos que mostraron un puntaje VIP>1.5. (ver tabla 2).

**Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas de los participantes**

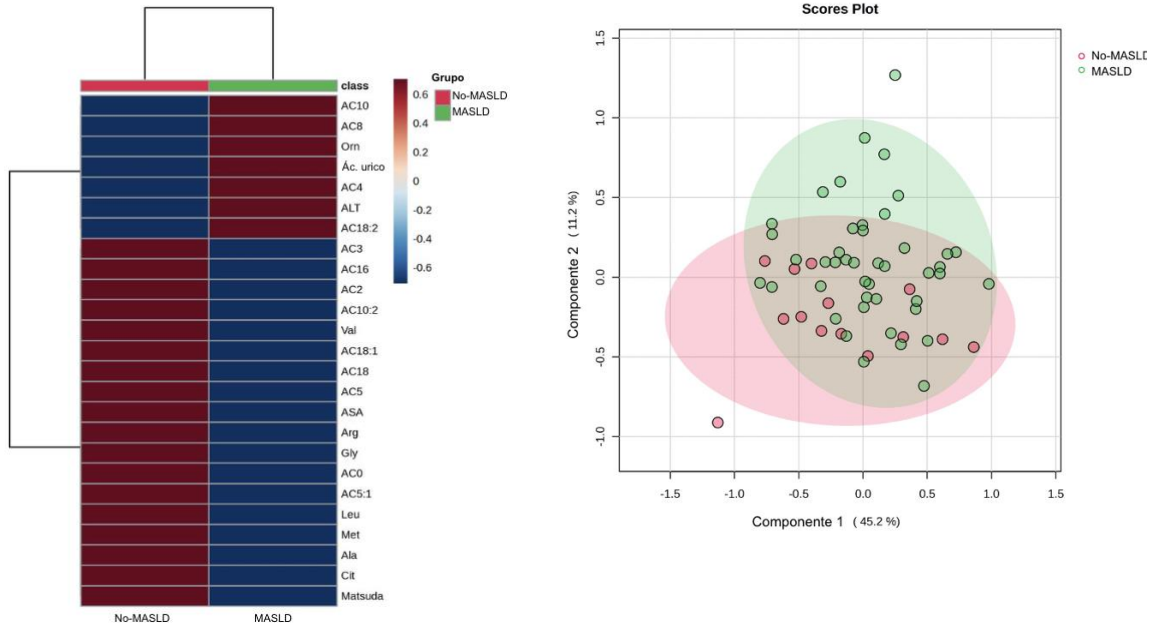
Variable	No-MASLD n = 14	MASLD n = 44	MASLD + Fibrosis n = 16	Valor p
	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)	
Edad (años)	10.46 ± 1.39	11.31 ± 2.39	11.69 ± 2.24	0.32
Duración de la obesidad (años)	4.73 ± 4.28	5.57 ± 4.12	4.15 ± 2.60	0.49
Peso (kg)	51.80 ± 10.42	61.58 ± 14.08	62.54 ± 13.22	0.053
Talla (cm)	142.69 ± 7.54	148.55 ± 10.43	150.11 ± 11.55	0.12
IMC z-score	1.88 ± 0.17	2.05 ± 0.29	2.07 ± 0.41	0.17
Circunferencia de cintura (cm)	80.63 ± 9.37	87.48 ± 8.26	88.85 ± 8.59	0.023 <sup>a,b</sup>
Masa corporal magra (kg)	36.16 ± 4.78	41.17 ± 7.39	41.71 ± 8.43	0.72
Masa corporal grasa (kg)	15.03 ± 6.27	19.82 ± 7.29	20.45 ± 5.54	0.061
Tensión arterial sistólica (mmHg)	103.54 ± 9.30	105.56 ± 9.78	108.30 ± 14.32	0.49
Tensión arterial diastólica (mmHg)	66.67 ± 8.36	69.40 ± 7.21	69.25 ± 11.25	0.60
Glucosa (mg/dL)	89.30 ± 5.43	89.44 ± 8.55	94.00 ± 6.07	0.17
Ácido úrico (mg/dL)	5.03 ± 1.21	5.58 ± 0.96	5.92 ± 0.98	0.36
Colesterol total (mg/dL)	158.61 ± 28.32	158.82 ± 24.86	158.87 ± 26.16	0.46
Triglicéridos (mg/dL)	141.07 ± 61.20	168.68 ± 86.37	149.68 ± 108.30	0.72
C-HDL (mg/dL)	39.07 ± 3.88	38.88 ± 8.42	37.75 ± 7.10	0.38
C-LDL (mg/dL)	102.30 ± 22.98	100.95 ± 17.89	105.75 ± 22.43	0.28
ALT IU/L	18.38 ± 4.94	29.02 ± 19.02	36.81 ± 25.57	0.014 <sup>a,b</sup>
AST IU/L	23.84 ± 3.78	26.88 ± 8.73	31.00 ± 13.11	0.22
GGT IU/L	16.15 ± 5.36	19.28 ± 8.67	20.06 ± 9.69	0.69
Insulina IU/L	16.53 ± 11.11	18.34 ± 9.6	21.46 ± 8.23	0.29
HOMA-IR	3.63 ± 2.49	4.20 ± 2.27	5.00 ± 1.99	0.23
Matsuda-ISI	3.48 ± 2.53	3.23 ± 2.22	2.07 ± 1.07	0.051
CAP dB/m	176.60 ± 45.03	279.69 ± 37.90	287.06 ± 56.17	<0.001 <sup>a,b</sup>
kPa	3.97 ± 0.59	3.91 ± 0.72	6.25 ± 1.80	<0.001 <sup>b</sup>
Glicina	100.81 ± 22.85	100.39 ± 16.90	103.83 ± 16.90	0.31
Arginina	29.23 ± 4.85	29.01 ± 4.00	31.89 ± 6.59	0.10
Citrulina	9.23 ± 1.72	9.39 ± 1.46	9.41 ± 2.29	0.45
Prolina	63.12 ± 8.69	67.56 ± 16.18	81.29 ± 21.18	0.005 <sup>b</sup>
Alanina	115.77 ± 23.38	119.43 ± 18.86	137.54 ± 20.19	0.014 <sup>b,c</sup>
ASA	1.75 ± 0.14	1.73 ± 0.20	1.81 ± 0.22	0.39
Tiglylcarnitine (C5:1)	0.03385 ± 0.004	0.03333 ± 0.0054	0.03375 ± 0.005	0.28
<b>Estadío puberal de Tanner</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>p</b>
Prepubertad	8 (57.1)	17 (38.6)	4 (25.0)	0.526
Pubertad temprana	3 (21.4)	15 (34.1)	6 (37.5)	
Pubertad avanzada	3 (21.4)	12 (27.3)	6 (37.5)	

**a** Diferencia significativa entre no-MASLD y MASLD

**b** Diferencia significativa entre no-MASLD y MASLD + Fibrosis

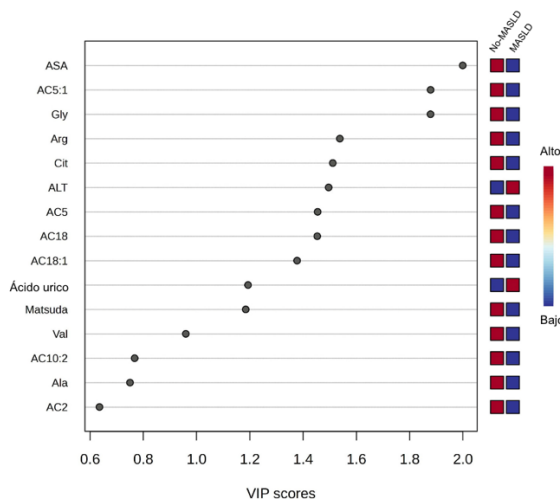
**c** Diferencia significativa entre MASLD y MASLD + Fibrosis

**Figura 1. Perfil de metabolitos séricos y parámetros bioquímicos en niños con MASLD en comparación con el grupo sin MASLD**

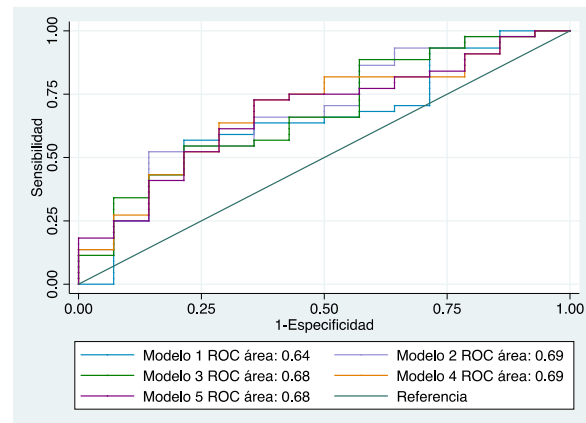


**a)** Mapa de calor jerárquico para el diagnóstico de MASLD. Los colores rojo y azul representan concentraciones aumentadas y disminuidas, respectivamente.

**b)** El gráfico de PLS-DA muestra la discriminación entre los grupos (Precisión: 0,69; R2 0,22; Q2 -0,20).



**c)** El análisis VIP representa la contribución relativa de los metabolitos a la variación entre los grupos (un puntaje VIP alto indica una mayor contribución de los metabolitos a la separación de los grupos). Las cajas rojas y azules a la derecha indican si la concentración del metabolito está aumentada (rojo) o disminuida (azul).



**d)** Comparación de las áreas bajo la curva ROC de los modelos evaluados (Modelo 1: ASA + AC5:1 + glicina + arginina + citrulina; Modelo 2: Modelo 1 + ALT; Modelo 3: AC5:1 + glicina + arginina + citrulina + ALT; Modelo 4: AC5:1 + glicina + arginina + ALT; Modelo 5: glicina + arginina + ALT).

En la figura 1d, se observan las áreas bajo la curva de estos modelos. No se encontraron diferencias significativas entre las áreas bajo la curva construidas, por lo que se seleccionó el modelo 4 que incluyó cuatro variables y un área bajo la curva aceptable (AC5:1 + glicina + arginina + ALT). Los coeficientes para este modelo fueron:  $Pr(y = 1|x) = 1.31 - 1.043 AC5:1 - 2.093 \text{ Glicina} - 1.427 \text{ Arginina} + 4.096 \text{ ALT}$

Derivado de lo anterior, se observó que el fenotipo metabólico de niños con MASLD se caracterizó por concentraciones bajas de AC5:1, glicina y arginina y concentraciones elevadas de ALT.

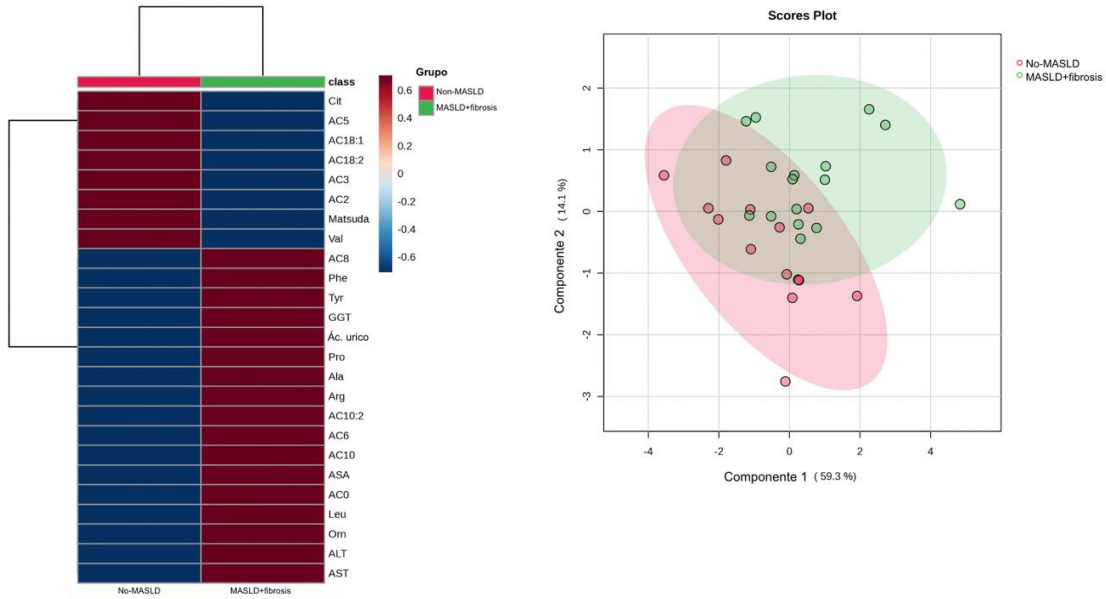
- ***Fenotipo metabólico MASLD + fibrosis***

En la figura 2a se pueden observar los metabolitos que tuvieron mayores y menores concentraciones en niños con diagnóstico de MASLD + fibrosis. Aquellos con este diagnóstico tuvieron concentraciones más elevadas de fenilalanina, tirosina, GGT, ácido úrico, prolina, alanina, arginina, leucina, ornitina, carnitina, acilcarnitinas de cadena media (AC8, AC10:2, AC6 y AC10), carnitina, ASA, ALT y AST que los niños clasificados en el grupo de no-MASLD. De acuerdo al PLS-DA, los dos grupos (no-MASLD y MASLD + fibrosis) se separaron en dos clusters (Figura 2b). Las variables que discriminaron mejor a los grupos fueron la ALT, la prolina, la alanina, el Índice Matsuda y la AST (puntaje VIP > 1.5) (Figura 2c). Una vez identificados estos metabolitos y parámetros bioquímicos, se evaluaron los modelos con diferentes combinaciones de variables (ver tabla 2).

Los resultados de la comparación de las curvas ROC se muestran en la figura 2d; el modelo 3 obtuvo la mayor área bajo la curva (0.82). Sin embargo, la diferencia con el área bajo la curva del modelo 2 (0.81) no fue significativa y considerando que uno de los criterios para elegir el mejor modelo era un número reducido de variables, se eligió el modelo 2 que incluyó ALT + prolina + alanina + Índice Matsuda. Los coeficientes para este modelo fueron:  $Pr(y = 1|x) = 0,283 + 0,625 \text{ ALT} + 1,07 \text{ Prolina} - 1,98 \text{ Ala} - 2,98 \text{ Índice de Matsuda}$ .

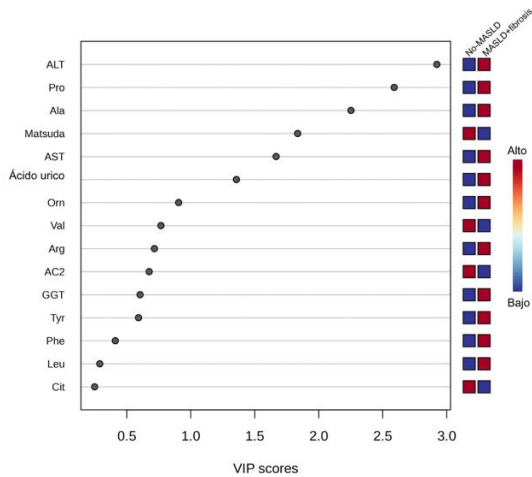


**Figura 2. Perfil de metabolitos séricos y parámetros bioquímicos en niños con MASLD + fibrosis en comparación con el grupo sin MASLD**

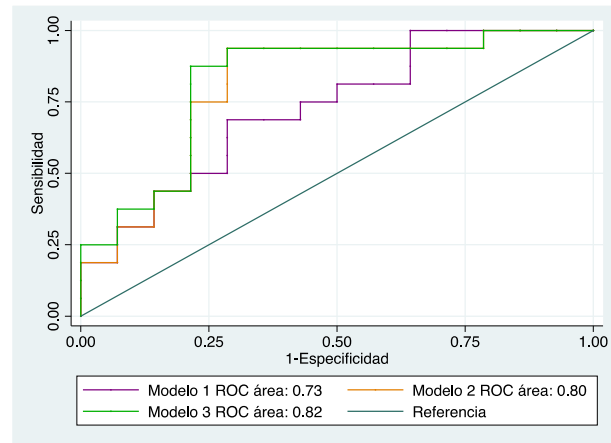


**a)** Mapa de calor jerárquico para el diagnóstico de MASLD + fibrosis. Los colores rojo y azul representan concentraciones aumentadas y disminuidas, respectivamente.

**b)** El gráfico de PLS-DA muestra la discriminación entre los grupos (Precisión 0.74; R2 0.48; Q2 0.20).



**c)** El análisis VIP representa la contribución relativa de los metabolitos a la variación entre los grupos (un puntaje VIP alto indica una mayor contribución de los metabolitos a la separación de los grupos). Las cajas rojas y azules a la derecha indican si la concentración del metabolito está aumentada (rojo) o disminuida (azul).

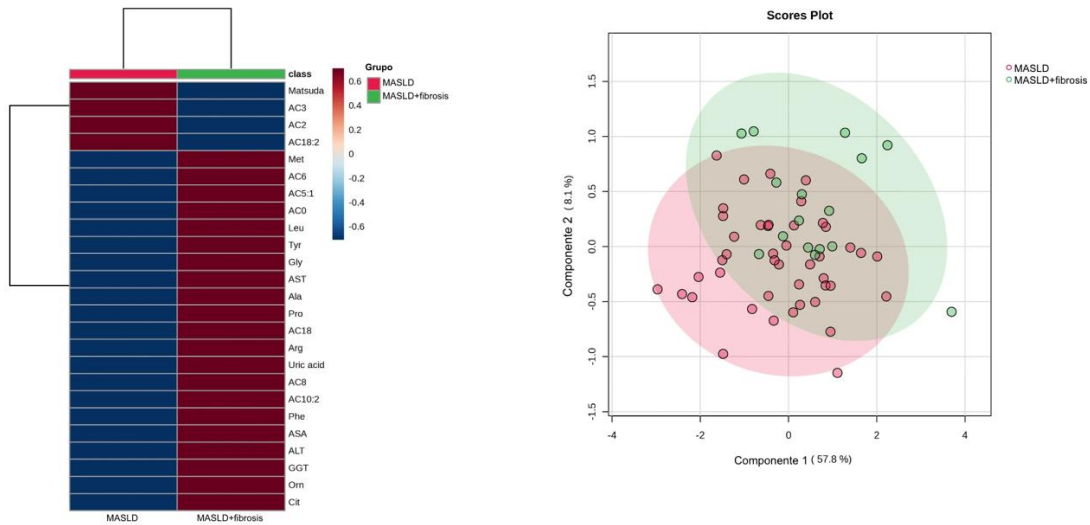


**d)** Comparación de las áreas bajo la curva ROC (Modelo 1: ALT + prolina + alanina; Modelo 2: ALT + prolina + alanina + Índice de Matsuda; Modelo 3: ALT + prolina + alanina + Índice de Matsuda + AST).

- **Diferencias entre los fenotipos metabólicos de MASLD y MASLD + fibrosis**

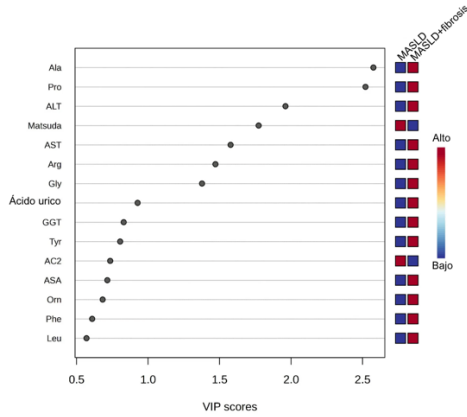
Una vez identificados los fenotipos de MASLD y MASLD + fibrosis, se evaluaron las diferencias entre estos dos grupos. En la figura 3 se puede observar que el grupo de MASLD + fibrosis tuvo concentraciones mayores de metionina, leucina, tirosina, glicina, alanina, prolina, arginina, fenilalanina, ornitina, citrulina, carnitina, AC5:1, acilcarnitinas de cadena media (AC6, AC8 y AC10:2), AC18, ALT, AST y GGT respecto al grupo de MASLD (figura 3a). Mediante el PLS-DA, se identificaron dos clusters (Figura 3b) y de acuerdo al análisis VIP, la alanina, la prolina, la ALT, el Índice Matsuda y la AST fueron las variables que mejor discriminaron a los grupos (puntaje VIP>1.5) (figura 3c)

**Figura 3. Diferencia entre el perfil de metabolitos séricos y parámetros bioquímicos en niños con MASLD y MASLD + fibrosis.**



**a)** Mapa de calor jerárquico para la diferencia de fenotipos de MASLD y MASLD + fibrosis. Los colores rojo y azul representan concentraciones aumentadas y disminuidas, respectivamente.

**b)** El gráfico de PLS-DA muestra la discriminación entre los grupos (Precisión 0.68; R2 0.29; Q2 0.01).



c) El análisis VIP representa la contribución relativa de los metabolitos a la variación entre los grupos (un puntaje VIP alto indica una mayor contribución de los metabolitos a la separación de los grupos). Las cajas rojas y azules a la derecha indican si la concentración del metabolito está aumentada (rojo) o disminuida (azul).

**Tabla 2. Modelos de regresión logística evaluados para identificar los diversos fenotipos con MASLD**

<b>Modelo propuesto</b>	<b>Área bajo la curva</b>
<b>Fenotipo MASLD</b>	
Modelo 1: argininosuccinato + AC5:1 + glicina + arginina + citrulina	0.64
Modelo 2: Modelo 1+ ALT	0.68
Modelo 3: AC5:1 + glicina + arginina + citrulina + ALT	0.68
Modelo 4: AC5:1 + glicina + arginina + ALT	0.69
Modelo 5: glicina + arginina + ALT	0.69
<b>Fenotipo MASLD+fibrosis</b>	
Modelo 1: ALT+ prolina + alanina	0.73
Modelo 2: ALT+ prolina + alanina + Índice de Matsuda	0.80
Modelo 3: ALT+ prolina + alanina + Índice de Matsuda + AST	0.82

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se describieron los fenotipos metabólicos asociados con dos etapas de la progresión de MASLD (MASLD (esteatosis hepática) y MASLD + fibrosis (esteatosis hepática más fibrosis)) en niños mexicanos con obesidad comparados con aquellos con obesidad, pero sin MASLD. En base a los modelos de regresión logística, MASLD se asoció con un fenotipo caracterizado por un incremento en las concentraciones de ALT, y concentraciones de arginina, glicina y AC5:1 (tiglicarnitina) disminuidas. Por otro lado, MASLD + fibrosis, una etapa de progresión de MASLD, se asoció con un fenotipo caracterizado por concentraciones aumentadas de ALT, prolina y alanina, y un Índice de Matsuda disminuido. Esta firma metabólica también identificó niños con MASLD + fibrosis de aquellos en el grupo con MASLD. Una huella metabólica encontrada en niños afectados por MASLD + fibrosis en el presente estudio, se caracterizó por disponibilidad aumentada de aminoácidos circulantes.

De manera general, los análisis VIP identificaron otras diferencias en los metabolitos entre grupos; sin embargo, se intentó seleccionar un conjunto reducido de metabolitos y datos bioquímicos capaces de discriminar a los grupos con MASLD y MASLD + fibrosis que puedan tener alguna utilidad en la práctica clínica.

La ALT es el marcador de daño hepático mayormente utilizado para tamizaje de MASLD, EH, y fibrosis hepática en adultos y niños (63–65). Sin embargo, existen casos de niños con MASLD y niveles normales de ALT (65), lo que pone en evidencia que pudieran existir limitaciones en la sensibilidad de la ALT para tamizaje de MASLD. En el presente estudio la ALT fue un biomarcador consistente en la discriminación del grupo sin MASLD y los otros dos grupos, sugiriendo eventos fisiopatológicos evolutivos en la progresión de MASLD (MASLD y MASLD + fibrosis). Además, observamos que la ALT discriminó entre el grupo de MASLD + fibrosis y el de MASLD, lo que significa que esta enzima aumentó conforme la MASLD progresó y el daño hepático avanzó. Por lo tanto, seleccionamos a la ALT como parte del fenotipo metabólico de MASLD y de MASLD + fibrosis.

Aunque la elevación de la ALT es parte de los fenotipos de MASLD y MASLD + fibrosis, otros metabolitos actuaron como huellas metabólicas en cada grupo. El fenotipo MASLD incluyó concentraciones disminuidas de arginina, glicina, y AC5:1. El área bajo la curva ROC de este modelo estuvo por debajo de 0.70, y los puntajes VIP estuvieron por debajo de 2.0, por lo que la participación de estos metabolitos fue insuficiente para

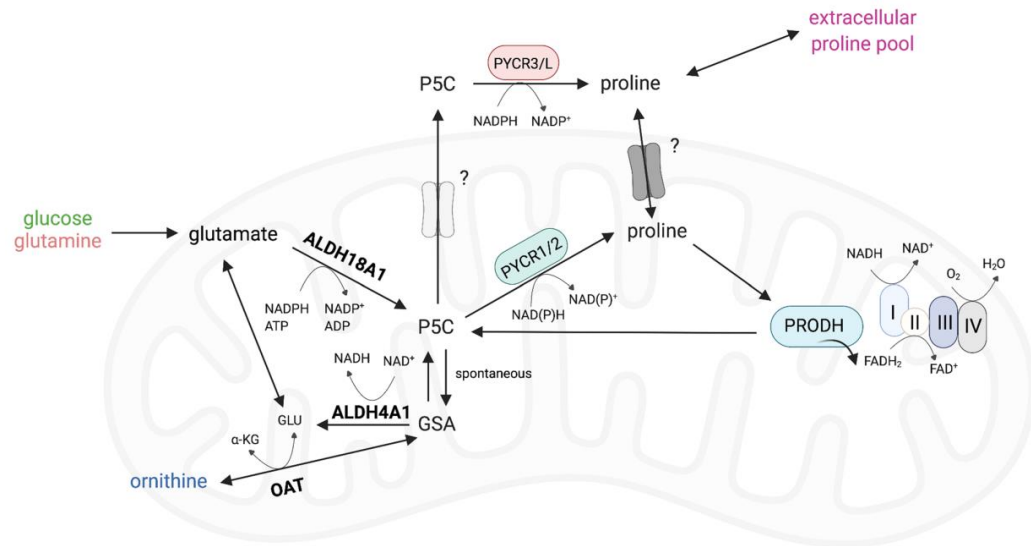
identificar el fenotipo MASLD. A pesar de lo anterior, otros estudios han encontrado alteraciones en algunos de estos metabolitos. La arginina es esencial en el ciclo de la urea y es un precursor del óxido nítrico (NO) (66), la creatina, y las poliaminas (67). Adicionalmente, este aminoácido regula procesos inflamatorios mediante la activación del sistema del glutatión, que induce la regulación a la alta de la piruvato carboxilasa, con la consecuente disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno. La vía de la arginina NO sintasa (NOS) mejora la secreción y la sensibilidad de la insulina; en consecuencia, la regulación a la baja del metabolismo de la arginina se ha asociado con daño endotelial y resistencia a la insulina (68). No existe suficiente evidencia publicada de una desregulación del metabolismo de la arginina en casos de MASLD, sin embargo, las concentraciones disminuidas en los pacientes incluidos en el presente estudio podría sugerir alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina, mismas que se correlacionan con esteatosis hepática y obesidad (69). Por otra parte, la glicina participa en la síntesis del glutatión y en la regulación de su expresión génica, entre otras funciones (70). Concentraciones bajas de este aminoácido podrían condicionar limitación en la síntesis de glutatión y con esto peroxidación de las membranas celulares con el consiguiente daño celular. Algunos estudios han evidenciado que concentraciones bajas de glicina se asocian con alteraciones cardiometabólicas en adultos y niños (71,72). La evidencia científica muestra consistencia con lo encontrado en nuestro estudio en relación a menores concentraciones de glicina en niños con sobrepeso y MASLD en comparación con niños con sobrepeso, pero sin MASLD (73). Además, en un análisis metabolómico no dirigido realizado en adolescentes hispanos con MASLD residentes en EE. UU., se evidenció una desregulación en el metabolismo de la glicina (74).

La AC5:1 es una acilcarnitina de cadena corta derivada del metabolismo de la isoleucina (75). Dado que los ácidos grasos libres (en forma de acil-CoA) son incapaces de penetrar la membrana mitocondrial interna, la carnitina presente en la membrana externa se une con los grupos acilos para formar acilcarnitinas. De esta manera, los ácidos grasos son transferidos hasta la membrana interna, accediendo así a los complejos procesos enzimáticos de la  $\beta$ -oxidación. Cuando los complejos enzimáticos de esta vía se saturan, los productos derivados de su oxidación incompleta, particularmente acilcarnitinas, tienden a acumularse e inducir estrés mitocondrial y alteraciones en la vía de señalización de la insulina (76,77). Estudios han evidenciado concentraciones bajas de AC5:1 en sujetos con enfermedades inflamatorias intestinales (78) y concentraciones más elevadas en pacientes adultos con síndrome metabólico (79). Sin embargo, ningún estudio ha caracterizado las

concentraciones de AC5:1 en niños con MASLD; por lo tanto, se necesitan más estudios que puedan ayudarnos a entender este hallazgo.

En relación al fenotipo metabólico encontrado en nuestros pacientes con MASLD + fibrosis, se detectó además de un aumento de ALT, un aumento de prolina y alanina y una disminución del Índice de Matsuda. La prolina es esencial en la estructura y función de las proteínas y es un componente principal de la colágena (80,81). La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas en la matriz extracelular (MEC), principalmente colágena, y es una consecuencia de la lesión hepática crónica y de la inflamación (82), que se describe en la evolución de la MASLD (83). Si bien la prolina es un componente estructural importante de las proteínas, sus funciones en la regulación del estrés celular, como osmolito, como quelador de metales y como antioxidante han sido bien reconocidas. Su relevancia en la homeostasis del sistema de oxido-reducción intra mitocondrial, involucra un incremento en su síntesis que participa directamente en la oxidación de nucleótidos reducidos de piridina (NAD[P]H) mediada por la activación de la Aldehído deshidrogenasa 18A1 (ALDH18A1) y/o de Pirrolina carboxilato reductasa 5 en cualquiera de sus tres isoformas (PYCR1,2 o 3). De manera contraria, la degradación de la prolina esta mediada por la activación de la prolina deshidrogenasa 1 (PRODH) y la Aldehído deshidrogenasa 4A1 (ALDH4A1); la primera actúa como donador de electrones a la Flavina Adenina Dinucleótido (FAD<sup>+</sup>), mientras que la última reduce la Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD<sup>+</sup>). (ver figura 4). Estos mecanismos han sido propuestos también como mecanismos fisiopatológicos en el contexto de mutaciones oncogénicas en algunos tipos de tumores, y síndromes hipomielinizantes (84,85). Se ha sugerido que la reducción del glutamato a prolina mediada por PYCR1 es un mecanismo que mantiene la homeostasis de oxido-reducción mitocondrial en microambientes hostiles como la hipoxia e inflamación, al favorecer una relación NADH/NAD<sup>+</sup> baja, lo que induce un desacoplamiento del Ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, que permite además de la síntesis de ATP, producir precursores anabólicos como el aspartato. Este mecanismo explica la sobrevivencia de células tumorales en condiciones de hostilidad, ya que el aspartato (igual que el piruvato) puede promover la proliferación celular aun cuando la fosforilación oxidativa esté bloqueada (86,87). Modelos in vitro, y animales han demostrado la capacidad que tiene la prolina para quelar especies reactivas de oxígeno, particularmente oxígeno y radicales hidroxilo, y como la suplementación reduce el estrés oxidativo y previene la apoptosis (88).

Figura 4. Relevancia de la Prolina como modulador de a homeostasis Redox



Tomado de (80)

La MASLD es una condición que puede asociarse de manera exclusiva a la acumulación de lípidos a nivel hepático, aunque se ha descrito la posibilidad de evolución a esteatohepatitis, la cual se caracteriza por esteatosis aunada a inflamación lobular, fibrosis y daño hepatocelular. La fibrosis es una condición que refleja un proceso de remodelación dinámico, con reclutamiento de células inflamatorias, depósito de colágeno y otros componentes de matriz extracelular (CME). Durante el daño hepático agudo, las células apoptóticas son remplazadas mediante el proceso de regeneración hepática; cuando existe una exposición crónica al insulto, la capacidad de regeneración se va perdiendo de manera gradual, prevalece la presencia de hepatocitos apoptóticos (que vierten sus contenidos los cuales quedan expuestos al sistema inmune, generando un mayor grado de inflamación) y se observa una pérdida de la arquitectura de las células endoteliales de los sinusoides con pérdida de las fenestraciones; este fenómeno favorece la adherencia de los macrófagos en estas células, perpetuando la secreción local de citocinas proinflamatorias (89,90). La células de Kupffer (CK), y los macrófagos circulantes dependientes de monocitos (MCDM) son mediadores importantes de inflamación,

fibrogénesis y fibrinolisis que van condicionando el desarrollo de Esteatohepatitis (EH). En condiciones normales, las CK tienen funciones relacionadas con el aclaramiento de microorganismos y la homeostasis tisular y carecen de receptores CX3CR1 y CCR2; sin embargo, en condiciones patológicas éstas son remplazadas por monocitos denominados Ly-6C<sup>hi</sup>, CD11b<sup>hi</sup>, MHC II<sup>neg</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>. Estudios en modelos animales han evidenciado que el reclutamiento de monocitos CCR2<sup>+</sup> desde la médula ósea promueve la acumulación de monocitos con capacidad de producir citocinas proinflamatorias que median el desarrollo de fibrosis (91,92). Posteriormente, existe activación de las células hepáticas estelares (CHE) que tienen la capacidad de expresar nuevos receptores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento y transformación  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), lo que le confiere su capacidad fibrogénica. La especialización de estas células es secundaria al estímulo de células de Kupffer y de macrófagos Ly-6C<sup>hi</sup>. El fenotipo proinflamatorio de estos macrófagos muestra una estrecha relación con diversos subtipos de células T que secretan también IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, e IL-23 y que participan en el desarrollo de esteatohepatitis. Se ha evidenciado que la producción de IL-17 por células T-17, facilita la transición de esteatosis simple a esteatohepatitis (93). La internalización de cuerpos apoptóticos en CHE estimula la producción de TGF- $\beta$  que induce la producción de colágena tipo 1, que es componente fundamental de las cicatrices que se forman en el parénquima. Por otro lado, se ha demostrado que al mismo tiempo se induce su transformación fenotípica a miofibroblastos. Una matriz extracelular alterada puede a su vez inducir la expresión de genes pro apoptóticos en los hepatocitos y una regulación a la alta de Fas/FasL, lo cual exacerba el proceso de fibrogénesis (89).

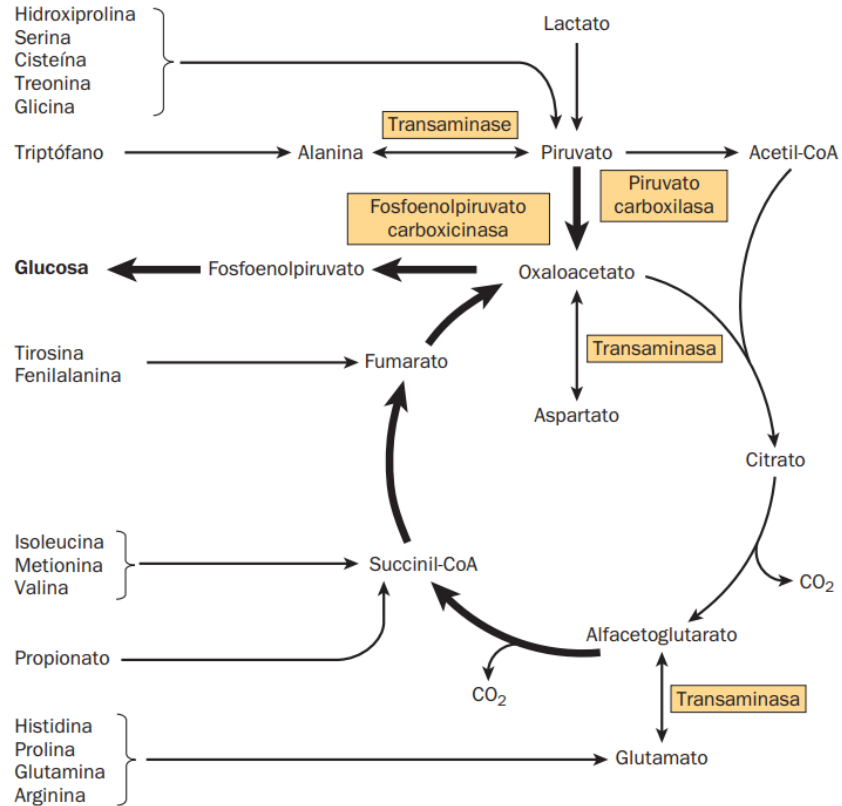
La prolina es una molécula clave en la homeostasis del estado de oxido-reducción, compensa las necesidades de modulación de la actividad reductora en el ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, protegiendo a los sistemas biológicos del estrés oxidativo; este mecanismo se ve sustentado además por su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno y evitar así apoptosis en condiciones de alta demanda metabólica, como puede ser la inflamación que genera la acumulación de grasa intrahepática. Por otro lado, se requiere una tasa elevada de disponibilidad de prolina dado su requerimiento para la síntesis de colágena en los casos en los que se manifiesta evolución de esteatosis a fibrosis. La prolina muestra una participación relevante en los mecanismos fisiopatogénicos asociados al desarrollo de fibrosis hepática. En el presente estudio, el modelo de predicción para el estado de MASLD+ fibrosis que sugiere la interacción de prolina, alanina, índice de Matsuda y ALT explican el fenómeno de estrés oxidativo que representa la esteatosis



asociada a inflamación y fibrosis, su asociación con una limitada sensibilidad a la insulina secundaria a resistencia a insulina, además del depósito de colágena que sugiere el Fibroscan. Dado que la síntesis de colágena requiere cantidades elevadas de prolina, este aminoácido y la hidroxiprolina se han sugerido como biomarcadores de la fibrosis hepática (94).

Por otro lado, la alanina es un aminoácido con múltiples funciones biológicas, como la síntesis de glucosa, la síntesis de urea y la síntesis de la proteína hemo, entre otras (95). Los estudios en niños con MASLD no han encontrado diferencias en las concentraciones de alanina en comparación con los controles. Sin embargo, estudios en población adulta han reportado aumento de alanina en pacientes con MAFDL (73) y MASLD + fibrosis (75). La elevación de ALT coincide con el aumento de las concentraciones séricas de alanina, prolina y otros aminoácidos en el grupo MASLD + fibrosis, lo que apoya la canalización metabólica de aminoácidos para su uso en la gluconeogénesis, que es una respuesta compensatoria ante la resistencia a la insulina que se describe en este grupo. Los aminoácidos involucrados aportan sus esqueletos de carbono para sintetizar metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs. La glicina al igual que la alanina y la hidroxiprolina son aminoácidos que pueden formar piruvato, el cual por efecto de la piruvato carboxilasa, puede ser convertido a oxalacetato y entrar directamente al ciclo de Krebs. La arginina y prolina producen alfa-cetoglutarato que puede incorporarse de igual manera al ciclo de Krebs. Los aminoácidos de cadena ramificada, valina e isoleucina, producen succinil-CoA y se incorporan al mismo ciclo. Todos estos metabolitos intermediarios son utilizados para la síntesis de moléculas reductoras que posteriormente serán transferidas a la cadena respiratoria y a su reacción final con el oxígeno para formar  $H_2O$  y energía libre para formar complejos fosfato de alta energía. Por otro lado, cuando por un exceso de aporte de aminoácidos en la dieta o por recambio de proteínas en los tejidos se excede la capacidad de síntesis proteica, se genera una acumulación de substratos intermediarios del ciclo de Krebs, que condiciona exceso de Oxalacetato. El oxalacetato puede ser dirigido al ciclo de la gluconeogénesis al ser convertido en fosfoenolpiruvato y posteriormente glucosa. (ver figura 5). (77).

**Figura 5. Aminoácidos involucrados en el ciclo de Krebs y en la gluconeogénesis**



Tomado de (77)

La resistencia a la insulina presente en el MASLD (61) está asociada a un aumento de la tasa gluconeogénica, la cual participa en la progresión de la esteatosis hepática a la fibrosis (78). El aumento de ALT, prolina y alanina y la disminución del Índice de Matsuda fueron características de los niños con MASLD + fibrosis en el presente estudio, que discriminaron a este grupo de los sujetos sin MASLD y con MASLD, lo que indica que estas variables reflejan cambios específicos que podrían ser consecuencia de la progresión de MASLD a fibrosis. En consonancia con nuestros hallazgos, un estudio realizado en una población de adultos mexicanos con obesidad (96) evidenció que un conjunto de aminoácidos, que incluía alanina y prolina, predecían el Índice de Matsuda y la MASLD, lo que sugiere que estos aminoácidos desempeñan un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina y el daño hepático. Con base en nuestros resultados, parece que esta firma

metabólica caracterizada por mayores concentraciones de alanina y prolina y menor Índice de Matsuda está presente desde la infancia. La mayoría de los estudios metabólicos realizados en niños con MASLD no han evaluado la presencia de fibrosis y, según nuestros resultados, es importante separar la esteatosis hepática de la esteatosis más fibrosis. A este respecto, con un enfoque no dirigido, Kordy et al. (52) observaron que los niños con EH y fibrosis tenían una firma metabólica diferente a la de aquellos con esteatosis simple, caracterizada por alteraciones en el metabolismo de un carbono, aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

Desde un punto de vista práctico y clínico, parece imperativo generar herramientas diagnósticas para detectar oportunamente las alteraciones hepáticas en niños con obesidad, ya que los pocos estudios a largo plazo disponibles han demostrado que la remisión de EH en niños y adolescentes que participaron en un programa de intervención fue de solo el 30% en los casos que no recibieron suplementación, ni medicación; en aquellos con suplementación, la remisión fue del 58% y, con medicación, fue del 41% (97). Dado que sabemos que el daño progresivo del parénquima hepático caracteriza estas alteraciones, y que la regresión del daño puede no ser completa, consideramos la necesidad de realizar un cribado intencionado y precoz de esta comorbilidad en pacientes pediátricos con obesidad para reforzar las estrategias de intervención. También es imperativo aunar esfuerzos para tratar de describir mecanismos fisiopatológicos que nos ayuden a comprender el fenómeno y proponer potenciales moléculas diana para el desarrollo de terapias específicas.

El presente trabajo debe tener en cuenta algunas limitaciones. En primer lugar, el tamaño de la muestra es pequeño. Sin embargo, fue suficiente para identificar fenotipos metabólicos que concuerdan con los hallazgos de otros estudios y con la fisiopatología de la MASLD, aunque estos metabolitos aún no se utilicen de forma rutinaria. Por otro lado, no se realizó una biopsia hepática, que sabemos que es el estándar de oro para diagnosticar esteatosis y fibrosis hepática; no obstante, el FibroScan® se ha propuesto como un método no invasivo, indoloro, fiable y reproducible para diagnosticar daño hepático en niños y adolescentes (39). La rigidez, que se determina mediante elastografía transitoria y se considera una consecuencia del proceso fibrótico, está estrechamente relacionada con los hallazgos histológicos en niños con fibrosis (40,62,98). Aunque no pudimos evaluar la presencia de EH debido a la falta de biopsias hepáticas, la esteatohepatitis se ha descrito como una etapa de progresión en el MASLD que puede o no estar asociada a la fibrosis. De manera interesante, un estudio previo realizado principalmente en niños latinos

residentes en Estados Unidos, reveló que todos los niños con EH también presentan fibrosis (32). Otra limitación es que pudo haber existido un sesgo de selección, ya que varios participantes fueron remitidos a la Clínica de Obesidad de la Unidad de Bienestar Infantil debido a comorbilidades relacionadas con la obesidad. Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas, nuestros resultados parecen ser indicativos del enfoque patológico de un sistema biológico, y sin duda se necesitan más estudios para evaluar si estos metabotipos pueden utilizarse como biomarcadores fiables en otros contextos y en otras poblaciones. Además, sería interesante evaluar, mediante estudios de intervención longitudinales, si las firmas metabolómicas encontradas en este estudio se modifican a medida que mejoran las alteraciones hepáticas o si persisten cuando no se observa regresión del daño hepático.

Una fortaleza de este estudio es que todos los pacientes pertenecían a la Clase 1 de obesidad (lo que proporciona validez interna), tenían antecedentes genético-ambientales similares y presentaban duraciones de su proceso de obesidad. Además, evaluamos el metabolismo de la glucosa mediante el índice de Matsuda, que refleja con mayor exactitud la sensibilidad hepática y muscular a la glucosa en comparación con los que consideran una determinación aislada en sangre. Adicionalmente, éste parece el primer estudio dirigido a identificar un metabotipo para las etapas de la MASLD en niños mexicanos con obesidad.

## **9. CONCLUSIONES**

Con base en los hallazgos encontrados, el fenotipo MASLD cambia a medida que avanza esta disfunción y que implicó básicamente un cambio en la utilización de ciertos aminoácidos. La evaluación de ALT, prolina, alanina y el índice Matsuda podrían considerarse potenciales firmas metabólicas de MASLD + fibrosis en niños que viven con obesidad. Sin embargo, son necesarios más estudios para ampliar el conocimiento sobre las alteraciones metabólicas en MASLD con el fin de prevenir e identificar esta patología desde la infancia, así como sus comorbilidades, con la intención de mejorar el abordaje e intervenciones que permitan preservar la salud hepática en niños y adolescentes que viven con obesidad.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. WHO Report of the commission on ending childhood obesity. World Health Organization, Geneva 2015.
2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet Lond Engl*. 2017 Dec 16;390(10113):2627–42.
3. Shamah-Levy T, Gaona-Pineda EB, Cuevas-Nasu L, Morales-Ruan C, Valenzuela-Bravo DG, Méndez-Gómez Humarán I, Ávila-Arcos MA. Prevalencias de sobrepeso y obesidad en población escolar y adolescente de México. *Ensanut Continua 2020-2022. Salud Publica Mex*. 2023;65(supl 1):S218-S224.
4. Simmonds M, Llewellyn A, Owen CG, Woolacott N. Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2016 Feb;17(2):95–107.
5. Andersen LB, Lauersen JB, Brønd JC, Anderssen SA, Sardinha LB, Steene-Johannessen J, et al. A new approach to define and diagnose cardiometabolic disorder in children. *J Diabetes Res*. 2015;2015(Cvd).
6. McCrindle BW. Hyperlipidemia in children. *Thromb Res*. 2006;118(1):49–58.
7. Magnussen CG, Venn A, Thomson R, Juonala M, Srinivasan SR, Viikari JSA, et al. The Association of Pediatric LDL-cholesterol and HDL-cholesterol Dyslipidemia Classifications and Change in Dyslipidemia Status with Carotid Intima-Media Thickness in Adulthood: Evidence from the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Bogalusa Hear. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(10):860–9.
8. Reaven GM. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: Role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease. *Am Heart J*. 1991;121(4 PART 2):1283–8.
9. Zimmet P, Alberti GKMM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - An IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. 2007;8(5):299–306.
10. Pollock BD, Stuchlik P, Harville EW, Mills KT, Tang W, Chen W, et al. Life course trajectories of cardiovascular risk: Impact on atherosclerotic and metabolic indicators. *Atherosclerosis*. 2019;280(November 2018):21–7.
11. Polak JF, Szklo M, O’Leary DH. Carotid Intima-Media Thickness Score, Positive Coronary Artery Calcium Score, and Incident Coronary Heart Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(1).
12. Peters S a E, Bots ML. Carotid Intima-Media Thickness Studies: Study Design and Data Analysis. *J Stroke*. 2013;15(1):38–48.

13. Le J, Zhang D, Menees S, Chen J, Raghuv eer G. Vascular age is advanced in children with atherosclerosis-promoting risk factors. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3:8–14.
14. Raitakari O, Juonala M, nnemaa TR, kerblom H, Viikari J. 3P-0919 Cardiovascular risk factors in childhood as predictors of carotid artery intima-media thickness in adulthood. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(2):264.
15. Koskinen J, Magnussen CG, Sinaiko A, Woo J, Urbina E, Jacobs DR, et al. Childhood age and associations between childhood metabolic syndrome and adult risk for metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus and carotid intima media thickness: The international childhood cardiovascular cohort consortium. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(8):1–16.
16. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age the muscatine Study. *Circulation*. 2001;104(23):2815–9.
17. Bogalusa T, Study H, Bond MG, Urbina EM, Berenson GS. Childhood Cardiovascular Risk Factors. *The Lancet*. 2003;290(17):2271–6.
18. Kaufman FR, Shaw J. Type 2 diabetes in youth: Rates, antecedents, treatment, problems and prevention. *Pediatr Diabetes*. 2007;8(SUPPL. 9):4–6.
19. Pulgaron ER, Delamater AM. Obesity and type 2 diabetes in children: Epidemiology and treatment. *Curr Diab Rep*. 2014;14(8):1–21.
20. Dong B, Arnold LW, Peng Y, Wang Z. Ethnic differences in cardiometabolic risk among adolescents across the waist-height ratio spectrum: National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Int J Cardiol*. 2016 Nov 1;222:622–8.
21. Noubiap JJ, Nansseu JR, Lontchi-Yimagou E, Nkeck JR, Nyaga UF, Ngouo AT, et al. Global, regional, and country estimates of metabolic syndrome burden in children and adolescents in 2020: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Child Adolesc Health*. 2022 Mar;6(3):158–70.
22. Berardo C, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Vairetti M, Ferrigno A. Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current issues and future perspectives in preclinical and clinical research. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):1–30.
23. Chinchilla-López P, Ramírez-Pérez O, Cruz-Ramón V, Canizales-Quinteros S, Domínguez-López A, Ponciano-Rodríguez G, et al. More Evidence for the Genetic Susceptibility of Mexican Population to Nonalcoholic Fatty Liver Disease through PNPLA3. *Ann Hepatol*. 2018 Mar 1;17(2):250–5.
24. S C, T M, G P. Prevalence of Liver Steatosis and Fibrosis Detected by Transient Elastography in Adolescents in the 2017-2018 National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* [Internet]. 2021 Feb [cited 2023 Nov 21];19(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32623006/>
25. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006 Oct;118(4):1388–93.
26. Schneider ALC, Lazo M, Selvin E, Clark JM. Racial Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the U.S. Population. *Obes Silver Spring Md*. 2014 Jan;22(1):292–9.

27. Feldstein AE, Charatcharoenwitthaya P, Treeprasertsuk S, Benson JT, Enders FB, Angulo P. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years. *Gut*. 2009 Nov;58(11):1538–44.
28. Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JPT, Lawlor DA, Fraser A. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2015;10(10).
29. Schwimmer JB, Newton KP, Awai HI, Choi LJ, Garcia MA, Ellis LL, et al. Paediatric gastroenterology evaluation of overweight and obese children referred from primary care for suspected non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Nov;38(10):1267–77.
30. Vos MB, Abrams SH, Barlow SE, Caprio S, Daniels SR, Kohli R, et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. Vol. 64, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017. 319–334 p.
31. Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):373–5.
32. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):846–54.
33. Mandelia C, Collyer E, Mansoor S, Lopez R, Lappe S, Nobili V, et al. Plasma Cytokeratin-18 Level As a Novel Biomarker for Liver Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016 Aug;63(2):181–7.
34. Mansoor S, Yerian L, Kohli R, Xanthakos S, Angulo P, Ling S, et al. The evaluation of hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2015 May;60(5):1440–7.
35. Ja J, Jv K, Mv M, A K, R J, S C, et al. Performance of fibrosis prediction scores in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *J Paediatr Child Health* [Internet]. 2018 Feb [cited 2023 Sep 5];54(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28948665/>
36. Shannon A, Alkhouri N, Carter-Kent C, Monti L, Devito R, Lopez R, et al. Ultrasonographic quantitative estimation of hepatic steatosis in children With NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011 Aug;53(2):190–5.
37. Runge JH, van Giessen J, Draijer LG, Deurloo EE, Smets AMJB, Benninga MA, et al. Accuracy of controlled attenuation parameter compared with ultrasound for detecting hepatic steatosis in children with severe obesity. *Eur Radiol*. 2021 Mar;31(3):1588–96.
38. Middleton MS, Van Natta ML, Heba ER, Alazraki A, Trout AT, Masand P, et al. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging hepatic proton density fat fraction in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2018 Mar;67(3):858–72.
39. Draijer LG, van Oosterhout JPM, Vali Y, Zwetsloot S, van der Lee JH, van Etten-Jamaludin FS, et al. Diagnostic accuracy of fibrosis tests in children with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2021 Sep;41(9):2087–100.
40. de Lédinghen V, Le Bail B, Rebouissoux L, Fournier C, Foucher J, Miette V, et al. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest,

aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Oct;45(4):443–50.

41. Desai NK, Harney S, Raza R, Al-Ibraheemi A, Shillingford N, Mitchell PD, et al. Comparison of Controlled Attenuation Parameter and Liver Biopsy to Assess Hepatic Steatosis in Pediatric Patients. *J Pediatr.* 2016 Jun;173:160-164.e1.

42. Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiol Rev.* 2019 Oct 1;99(4):1819–75.

43. Newgard CB. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 2017;25(1):43–56.

44. Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Gil A. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. Vol. 15, *Metabolomics.* Springer US; 2019. 1–31 p.

45. Yamaguchi N, Mahbub MH, Takahashi H, Hase R, Ishimaru Y, Sunagawa H, et al. Plasma free amino acid profiles evaluate risk of metabolic syndrome, diabetes, dyslipidemia, and hypertension in a large Asian population. *Environ Health Prev Med.* 2017;22(1):1–8.

46. Weng L, Quinlivan E, Gong Y, Beitelshes AL, Shahin MH, Turner ST, et al. Association of branched and aromatic amino acids levels with metabolic syndrome and impaired fasting glucose in hypertensive patients. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015;13(5):195–202.

47. Zhang ZY, Monleon D, Verhamme P, Staessen JA. Branched-chain amino acids as critical switches in health and disease. *Hypertension.* 2018;72(5):1012–22.

48. Zhou M, Shao J, Wu CY, Shu L, Dong W, Liu Y, et al. Targeting BCAA Catabolism to Treat Obesity-Associated Insulin Resistance. *Diabetes.* 2019 Sep;68(9):1730–46.

49. Mastrangelo A, Martos-Moreno G, García A, Barrios V, Rupérez FJ, Chowen JA, et al. Insulin resistance in prepubertal obese children correlates with sex-dependent early onset metabolomic alterations. *Int J Obes.* 2016;40(10):1494–502.

50. Fang X, Miao R, Wei J, Wu H, Tian J. Advances in multi-omics study of biomarkers of glycolipid metabolism disorder. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022;20:5935–51.

51. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133–223.

52. Kordy K, Li F, Lee DJ, Kinchen JM, Jew MH, La Rocque ME, et al. Metabolomic Predictors of Non-alcoholic Steatohepatitis and Advanced Fibrosis in Children. *Front Microbiol.* 2021;12:713234.

53. Goffredo M, Santoro N, Tricò D, Giannini C, D’Adamo E, Zhao H, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature Characterizes Obese Adolescents with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017 Jun 22;9(7):642.

54. Lischka J, Schanzer A, Hojreh A, Ba Ssalamah A, Item CB, de Gier C, et al. A branched-chain amino acid-based metabolic score can predict liver fat in children and adolescents with severe obesity. *Pediatr Obes.* 2021 Apr;16(4):e12739.



55. Jin R, Banton S, Tran VT, Konomi JV, Li S, Jones DP, et al. Amino Acid Metabolism is Altered in Adolescents with Nonalcoholic Fatty Liver Disease-An Untargeted, High Resolution Metabolomics Study. *J Pediatr*. 2016 May;172:14-19.e5.
56. Caballero B, Vorkoper S, Anand N, Rivera JA. Preventing childhood obesity in Latin America: an agenda for regional research and strategic partnerships. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2017 Jul;18 Suppl 2(Suppl 2):3-6.
57. Hellmuth C, Kirchberg FF, Lass N, Harder U, Peissner W, Koletzko B, et al. Tyrosine Is Associated with Insulin Resistance in Longitudinal Metabolomic Profiling of Obese Children. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2108909.
58. Gulati, A.K.; Kaplan, D.W.; Daniels, S.R. Clinical Tracking of Severely Obese Children: A New Growth Chart. *Pediatrics* 2012,130, 1136-1140.
59. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch Dis Child*. 1970 Feb;45(239):13-23.
60. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999 Sep;22(9):1462-70.
61. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
62. Nobili V, Vizzutti F, Arena U, Abraldes JG, Marra F, Pietrobattista A, et al. Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Baltim Md*. 2008 Aug;48(2):442-8.
63. Hadizadeh F, Faghihimani E, Adibi P. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017 May 15;8(2):11-26.
64. Ma Q, Liao X, Shao C, Lin Y, Wu T, Sun Y, et al. Normalization of  $\gamma$ -glutamyl transferase levels is associated with better metabolic control in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2021 May 10;21(1):215.
65. Vos MB, Abrams SH, Barlow SE, Caprio S, Daniels SR, Kohli R, et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Feb;64(2):319-34.
66. Morris SM. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr*. 2016 Dec;146(12):2579S-2586S.
67. Scheja L, Kluwe J. Arginine and NASH--do macrophages deliver the first hit? *J Hepatol*. 2015 Feb;62(2):260-1.
68. Forzano I, Avvisato R, Varzideh F, Jankauskas SS, Cioppa A, Mone P, et al. L-Arginine in diabetes: clinical and preclinical evidence. *Cardiovasc Diabetol*. 2023 Apr 18;22:89.
69. Scapaticci S, D'Adamo E, Mohn A, Chiarelli F, Giannini C. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Youth With Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol*. 2021 Apr 6;12:639548.

70. Alves A, Bassot A, Bulteau AL, Pirola L, Morio B. Glycine Metabolism and Its Alterations in Obesity and Metabolic Diseases. *Nutrients*. 2019 Jun 16;11(6):1356.
71. Gaggini M, Carli F, Rosso C, Buzzigoli E, Marietti M, Della Latta V, et al. Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatol Baltim Md*. 2018 Jan;67(1):145–58.
72. Butte NF, Liu Y, Zakeri IF, Mohny RP, Mehta N, Voruganti VS, et al. Global metabolomic profiling targeting childhood obesity in the Hispanic population. *Am J Clin Nutr*. 2015 Aug;102(2):256–67.
73. Chae W, Lee KJ, Huh KY, Moon JS, Ko JS, Cho JY. Association of Metabolic Signatures with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Pediatric Population. *Metabolites*. 2022 Sep 19;12(9):881.
74. Jin R, Banton S, Tran VT, Konomi JV, Li S, Jones DP, et al. Amino acid metabolism is altered in adolescents with NAFLD - an untargeted, high resolution metabolomics study. *J Pediatr*. 2016 May;172:14-19.e5.
75. Violante S, IJlst L, Ruiter J, Koster J, van Lenthe H, Duran M, et al. Substrate specificity of human carnitine acetyltransferase: Implications for fatty acid and branched-chain amino acid metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2013 Jun 1;1832(6):773–9.
76. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018 Oct 1;98(4):2133–223.
77. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kenelly PJ, Weil PA. 2018. *Harper Bioquímica Ilustrada*. 31a edición. Editorial McGrawHill/Interamericana editores S.A de C.V. Cd. De México. ISBN 978-145-62-6738-4.
78. Danese C, Cirene M, Colotto M, Aratari A, Amato S, Di Bona S, et al. Cardiac involvement in inflammatory bowel disease: role of acylcarnitine esters. *Clin Ter*. 2011;162(4):e105-109.
79. Yu ZR, Ning Y, Yu H, Tang NJ. A HPLC-Q-TOF-MS-based urinary metabolomic approach to identification of potential biomarkers of metabolic syndrome. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban*. 2014 Apr;34(2):276–83.
80. Vettore LA, Westbrook RL, Tennant DA. Proline metabolism and redox; maintaining a balance in health and disease. *Amino Acids*. 2021 Dec;53(12):1779–88.
81. Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*. 2011 Apr;40(4):1053–63.
82. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb 1;115(2):209–18.
83. Heyens LJM, Busschots D, Koek GH, Robaey G, Francque S. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Front Med*. 2021;8:615978.
84. Phang JM. Proline Metabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances and Hypotheses. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Feb 2;30(4):635.

85. Phang JM, Liu W, Hancock C, Christian KJ. The proline regulatory axis and cancer. *Front Oncol.* 2012;2:60.
86. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell.* 2015 Jul 30;162(3):540–51.
87. Hollinshead KER, Munford H, Eales KL, Bardella C, Li C, Escribano-Gonzalez C, et al. Oncogenic IDH1 Mutations Promote Enhanced Proline Synthesis through PYCR1 to Support the Maintenance of Mitochondrial Redox Homeostasis. *Cell Rep.* 2018 Mar 20;22(12):3107–14.
88. Wang J, Xue Z, Lin J, Wang Y, Ying H, Lv Q, et al. Proline improves cardiac remodeling following myocardial infarction and attenuates cardiomyocyte apoptosis via redox regulation. *Biochem Pharmacol.* 2020 Aug;178:114065.
89. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* Baltim Md. 2004 Feb;39(2):273–8.
90. Li H, Zhou Y, Wang H, Zhang M, Qiu P, Zhang M, et al. Crosstalk Between Liver Macrophages and Surrounding Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Front Immunol.* 2020;11:1169.
91. Reid DT, Reyes JL, McDonald BA, Vo T, Reimer RA, Eksteen B. Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159524.
92. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* Baltim Md. 2009 Jul;50(1):261–74.
93. Rau M, Schilling AK, Meertens J, Hering I, Weiss J, Jurowich C, et al. Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *J Immunol* Baltim Md 1950. 2016 Jan 1;196(1):97–105.
94. Gabr SA, Alghadir AH, Sherif YE, Ghfar AA. Hydroxyproline as a Biomarker in Liver Disease. In: Patel VB, Preedy VR, editors. *Biomarkers in Liver Disease* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2017 [cited 2023 Jul 13]. p. 471–91. (Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7675-3\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7675-3_26)
95. Butte NF, Liu Y, Zakeri IF, Mohny RP, Mehta N, Voruganti VS, et al. Global metabolomic profiling targeting childhood obesity in the Hispanic population. *Am J Clin Nutr.* 2015 Aug;102(2):256–67.
96. Romero-Ibarguengoitia ME, Vadillo-Ortega F, Caballero AE, Ibarra-González I, Herrera-Rosas A, Serratos-Canales MF, et al. Family history and obesity in youth, their effect on acylcarnitine/aminoacids metabolomics and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Structural equation modeling approach. *PLoS One.* 2018;13(2):e0193138.
97. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA.* 2011 Apr 27;305(16):1659–68.
98. Chaidez A, Pan Z, Sundaram SS, Boster J, Lovell M, Sokol RJ, et al. The discriminatory

ability of FibroScan liver stiffness measurement, controlled attenuation parameter, and FibroScan-aspartate aminotransferase to predict severity of liver disease in children. *Hepatol Commun.* 2022 Nov;6(11):3015–23.