

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
“FUNDACION H. A. BARCELO”**



**FUNDACION H.A.BARCELO
FACULTAD DE MEDICINA**

**ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA:
EVALUACIÓN DEL PERFIL INFLAMATORIO HEPÁTICO
Y DE MARCADORES SÉRICOS DE DAÑO**

Director: Dr. Gustavo Bertot

Co-directora: Dra. Pamela Valva

**Cátedra de Bioquímica-Inmunología y Nutrición Normal, IUCS, Fundación
Barceló, Buenos Aires**

**Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de
Niños Ricardo Gutiérrez.**

Índice

Índice	1
Resumen	2
1. Introducción	6
1.1 Patogénesis	6
1.2 Respuesta Inmune	8
1.3 Histología y marcadores de daño hepático.....	9
2. Hipótesis y Objetivos	11
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1 Pacientes y Muestras	14
3.2 Estudio histopatológico sobre las muestras de BHFFIP	15
3.3 Ensayos sobre muestras de biopsia hepática en fresco	16
3.4 Ensayos sobre muestras de plasma.....	20
3.5 Análisis estadístico:.....	21
4. Resultados	22
4.1 Pacientes y muestras incluidas en el estudio	22
4.2 Evaluación de las características histopatológicas en las muestras de biopsias hepáticas en fresco	22
4.3 Evaluación y cuantificación de genes endógenos y citoquinas por q-PCR en las muestras de biopsia hepáticas en fresco	24
4.4 Ensayos en las muestras de plasma	28
5. Discusión	33
6. Conclusiones	40
7. Bibliografía	41
Anexo 1: Tablas suplementarias	45
Anexo 2: Figuras suplementarias.....	46

Resumen

Introducción: La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica. Incluye desde la esteatosis simple (ES) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la primera con evolución favorable, en tanto que EHNA puede progresar a cirrosis o carcinoma hepático. El diagnóstico de EHNA requiere de la evaluación histopatológica en el contexto clínico apropiado siendo la biopsia hepática la que permite el diagnóstico de certeza. Existen casos *borderline* que no pueden ser definidos como ES o EHNA. La inflamación es una característica remarcable que define a la patología, aunque no están completamente elucidados los mecanismos de patogenia y la fibrosis es el principal factor relacionado al pronóstico de la enfermedad que refleja el balance dinámico entre el depósito y la remoción de la matriz extracelular. Los métodos de estudio por imágenes son útiles para la detección de esteatosis; sin embargo, no permiten identificar bajos grados de inflamación o fibrosis por lo cual no es posible diferenciar esteatosis simple de EHNA. Por su parte, aún no se identificaron marcadores predictivos, clínicos ni bioquímicos, que determinen el grado de lesión histológica.

Objetivos: El objetivo de este trabajo es estudiar el perfil de expresión molecular inflamatorio relacionado con la patogénesis de la EHGNA a partir de la cuantificación de la expresión de ARNm de citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio en biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA; y evaluar la presencia de marcadores serológicos directos que evidencien la dinámica de la matriz extracelular que correlacionen con el daño hepático y permitan determinar su progresión.

Material y Métodos: Se analizaron 34 muestras de biopsias hepáticas de pacientes adultos [49,5 años (28-72)]. Se realizó la caracterización histopatológica usando el sistema estándar de nomenclatura unificado, definiéndose las entidades EHNA, *borderline* y ES. Además se evaluó el grado de fibrosis. Se midió la expresión de ARNm de TGF- β , IFN- γ , IL-17 e IL-10 a partir de la extracción de ARN total de la muestra en fresco, la obtención de ADNc y cuantificación por PCR en tiempo real (q-PCR) con iniciadores específicos. Por otro lado, a partir de muestras de sangre concomitantes a la biopsia, se cuantificaron por enzimoimmuno ensayo los niveles plasmáticos de marcadores de depósito de matriz extracelular [ácido hialurónico (HA) y el inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz-1 (TIMP-1)] y los marcadores de muerte celular [citoqueratina-18 soluble (M65) y la citoqueratina-18 clivada (M30)], y se analizó su correlación con la lesión hepática y su desempeño en el valor diagnóstico.

Resultados: Según el sistema estándar de nomenclatura unificado para la interpretación de las biopsias que gradúa en forma semicuantitativa la esteatosis, la inflamación lobular, la balonización hepatocelular, en nuestra serie, 11,77% de los casos fueron clasificados como esteatosis simple, 35,29% como *borderline* y el 52,94% como EHNA.

En cuanto a los niveles de expresión de las citoquinas estudiadas, TGF- β fue variable, pero detectables en todos los casos estudiados mientras que solamente se detectaron niveles de IFN- γ en el 38% de los casos y con niveles muy bajos y los de IL-17 fueron indetectables en todos los casos evaluados, mientras que para IL-10 pudo ser detectada en 4 casos con nivel bajos.

Los niveles de expresión de TGF- β aumentaron con la progresión de la patología desde los estadios más tempranos hacia los más severos ($p = 0,0159$; *Student*). Los pacientes clasificados como *borderline*, a pesar de mostrar perfiles heterogéneos de expresión de TGF- β , presentaron una relación entre el nivel de TGF- β y el grado de inflamación ($p=0,0445$; *Student*). El análisis de curva ROC para TGF- β mostró ser un marcador complementario con buen valor diagnóstico para EHNA [AUROC=0,840 ($p=0,0001$); valor de corte=0,3514; Se%=88; Es%=71,4; VPP=91,7; VPN=62,5].

En cuanto los resultados de los biomarcadores séricos, los niveles de todos los marcadores fueron mayores en los pacientes que en los controles ($p<0,02$, *Mann-Whitney*). HA mostró asociación con la severidad de la fibrosis ($p=0,03$; *Student*). Por su parte, M30 mostró asociación con la esteatosis ($p=0,013$; *Kruskal-Wallis*), la inflamación ($p=0,004$; *Kruskal-Wallis*) y la fibrosis ($p=0,04$; *Student*). Por el contrario, los niveles séricos de TIMP-1 y M65 no se asociaron con ningún parámetro histológico. Se evaluó el valor diagnóstico para los marcadores que mostraron asociación con el daño a través del área bajo la curva ROC y se observó buen desempeño de HA (AUROC 0,928) y de M30 (AUROC 0,848) como marcadores de fibrosis. A partir del cálculo de los valores de corte (HA: 16,4 ng/ml, M30: 284,7 U/L) se determinó que casos serían correctamente clasificados utilizando los marcadores en forma individual, simultánea o secuencial. Este análisis demostró que se hubiera evitado la biopsia en el 71% y el 78% de los casos al utilizar ambos marcadores en forma simultánea o secuencial, respectivamente.

Conclusiones: Los resultados de este trabajo permitieron identificar herramientas relacionadas a la patogenia con resultados promisorios que, por un lado, permitan mejorar y complementar la caracterización histológica de las biopsias hepáticas y el diagnóstico de EHNA; y por el otro, clasificar y evaluar la severidad de la fibrosis mediante técnicas no invasivas.

En el primer caso, según el grado de inflamación, los casos clasificados como *borderline* que presenten un valor de TGF- β mayor al valor de corte podrían ser clasificados como EHNA y los que se encuentren por debajo como esteatosis simple.

Por el otro lado, la evaluación de los niveles plasmáticos de HA y M30 demostraron ser pruebas sencillas que pueden ser suficientes para predecir la severidad de la fibrosis en el paciente con EHNA y para evaluar la progresión de la misma en casos clasificados previamente según biopsia hepática incluso en un centro de atención primaria.

1. Introducción

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es una entidad clínico-patológica que se define por la presencia de esteatosis en el hígado no asociada al consumo de alcohol. Abarca un espectro de presentación histológica que incluye desde la esteatosis simple (acumulo de grasa macrovacuolar en el hepatocito) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, esteatosis macro- y microvacuolar acompañada de inflamación y evidencias de injuria celular). La diferenciación de la esteatosis simple de la EHNA es de importancia clínica, dado que la primera presenta una evolución favorable, en tanto que EHNA puede progresar a cirrosis o carcinoma hepático ¹⁻³.

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial compleja caracterizada por el aumento de tejido adiposo, como consecuencia de una falla en los mecanismos que mantienen la homeostasis energética. En la actualidad, representa la enfermedad crónica no transmisible más prevalente en el mundo. EHGNA está fuertemente asociada a la obesidad con datos que demuestran prevalencias mayores al 80% en pacientes obesos y solo 16% en individuos con índice de masa corporal normal y sin factores de riesgo metabólico⁴.

1.1 Patogénesis

Se considera que el tejido adiposo es metabólicamente activo. La regulación en el tamaño de los depósitos grasos es un proceso complejo que involucra una variedad de tejidos y de mediadores químicos como las adipocinas secretadas por el tejido adiposo (leptina, adiponectina, resistina, obestatina) y citoquinas proinflamatorias (TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa), interleuquina (IL)-6 y proteína C reactiva ⁵.

Diversos estudios han postulado la hipótesis de los “dos eventos” para explicar la patogénesis del EHNA, donde el “primer evento” es la acumulación hepática de lípidos y el “segundo evento” la injuria y la inflamación. No está claro cuál es el trastorno metabólico primario que dispara el primer evento; sin embargo, la esteatosis es el prerrequisito para los eventos subsiguientes que conducen al daño hepático y a la fibrosis. Los ácidos grasos mediante la activación de serino-quinasas en las células sensibles a la insulina desencadenan el mecanismo de resistencia a la insulina, por lo tanto la esteatosis hepática gatilla la insulinoresistencia que a su vez resulta en un incremento de ácidos grasos libres que se transportan al hígado y conllevan a una acumulación de grasa o esteatosis (“primer evento”). Posteriormente, la situación de esteatosis hepática se ve agravada por una serie de interacciones complejas entre los hepatocitos, células estrelladas o de Ito (CI), adipocitos, células de Kupffer, mediadores inflamatorios y especies reactivas del oxígeno que derivan en inflamación o cirrosis (segundo evento). La disfunción mitocondrial juega un papel central en la progresión de esteatosis simple a EHNA y de ésta a cirrosis. El aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno, como consecuencia de la peroxidación lipídica, y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial dan como resultado la activación de una cascada de eventos, que incluyen la liberación de diversas citoquinas e interleuquinas que conducen a la inflamación. Finalmente, en respuesta a estos procesos las CI, principales productoras de matriz extra celular, que están normalmente quiescentes, se activan y desencadenan la fibrogénesis hepática^{6,7}. A su vez, se postula que la apoptosis puede ser un componente clave del

“segundo evento”, numerosos autores han vinculado factores pro- y anti-apoptóticos a la patogénesis de la EHNA. Se ha demostrado que la apoptosis exacerbada de los hepatocitos es una característica patológica presente en las biopsias de EHNA. Más aún, se ha propuesto una correlación entre la apoptosis y el grado de inflamación y de fibrosis ⁸.

1.2 Respuesta Inmune

En la EHNA la respuesta inmune innata localmente activada en el hígado graso puede amplificarse a través de mecanismos que involucran *cross-talk* entre componentes humorales y celulares. La apoptosis de los hepatocitos estimula la producción de quimioquinas e induce a las células de Kupffer a producir FasL y citoquinas, lo que incrementa la muerte celular y promueve la inflamación hepática ⁹, y repercute a su vez sobre la fibrogénesis. Estos mecanismos pueden actuar de manera autócrina o parácrina, induciendo la producción de ERO y reclutando leucocitos circulantes. Además, existen evidencias sobre la mayor producción de diversas citoquinas y quimioquinas tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 y MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos-2), CCR1, CCR2, CCR5, CCL4, CCL5, en los hígados grasos, y se ha puesto especial atención en la determinación del perfil general de citoquinas proinflamatorias. A pesar de que EHNA no es considerada una patología polarizada hacia un perfil de linfocitos T *helper* (Th)1, diferentes estudios han sugerido que un desbalance resultante de un exceso de citoquinas proinflamatorias Th1 (IFN- γ) y un relativo defecto en citoquinas antiinflamatoria (IL-4, IL-10) puede tener una importante influencia en el desarrollo de la misma¹⁰. Por otra parte, un modelo murino de EHNA demuestra que la disminución en el

número de linfocitos T reguladores intrahepáticos podría contribuir en el desarrollo de la patología ¹¹.

1.3 Histología y marcadores de daño hepático

El diagnóstico de EHNA requiere de la evaluación histopatológica en el contexto clínico apropiado. La biopsia hepática es una herramienta fundamental que permite el diagnóstico de certeza ya que brinda información sobre el grado de esteatosis y sobre los cambios en la arquitectura global del hígado debidos a la inflamación y a la fibrosis. Los métodos de estudio por imágenes convencionales (ultrasonido, tomografía computada y resonancia magnética nuclear) son útiles para la detección de esteatosis; sin embargo, no permiten identificar bajos grados de inflamación o fibrosis por lo cual no es posible diferenciar esteatosis simple de EHNA. Por su parte, aún no se identificaron marcadores predictivos, clínicos ni bioquímicos, que determinen el grado de lesión histológica. Por lo tanto, a pesar de que la realización de la biopsia es un procedimiento complejo que presenta complicaciones en aproximadamente 0,5% de los pacientes ^{12,13} y el fragmento obtenido es muy pequeño y puede resultar en una variabilidad de muestreo ¹⁴; la biopsia hepática es el método patrón para determinar la severidad del daño. Para tal fin, se ha establecido un sistema estándar de nomenclatura y un sistema de puntuación unificado para la interpretación de las biopsias ¹⁵. El sistema gradúa en forma semicuantitativa la esteatosis (0-3), la inflamación lobular (0-2), la balonización hepatocelular (0-2) y la fibrosis (0-4) que son las principales características histológicas identificables en las muestras de los pacientes. En base a la puntuación de la esteatosis, la inflamación y la balonización se determina el grado de actividad (NAS; *Non*

alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score). De esta forma se clasifican casos con $NAS \leq 2$ como esteatosis simple, casos con $NAS 3-4$ *borderline* y casos con $NAS \geq 5$ como EHNA. Es importante destacar que si bien la fibrosis no corresponde a un criterio de diagnóstico es el principal factor relacionado al pronóstico de la enfermedad dado que las complicaciones asociadas a estadios severos de fibrosis y/o cirrosis determina que sea una de las principales causas de trasplante hepático y muerte ¹⁶.

Brevemente, la fibrogénesis hepática refleja el balance dinámico entre el depósito y la remoción de la matriz extracelular (MEC) ¹⁷. Las células estrelladas en su condición normal se encuentran quiescentes; sin embargo, se activan en respuesta a TGF- β , ROS y citoquinas y se transforman en la principal fuente de MEC ¹⁸⁻²⁰. Una vez activas secretan ácido hialurónico (AH) directamente al sinusoides, por lo que su nivel sérico reflejaría la actividad de estas células ²¹. Finalmente, las metaloproteasas de matriz (MPM) son las principales enzimas responsables de la degradación de MEC en hígado. El aumento de actividad de las MPM en hígado asociado a la disminución de la actividad de sus inhibidores tisulares (TIMP), podría conducir a la regresión de la fibrosis ²². La fibrogénesis se promueve también como una consecuencia de la apoptosis de hepatocitos ya que la eliminación de los cuerpos apoptóticos por las células de Kupffer en condiciones patológicas puede inducir una reacción inflamatoria que conlleva a la activación de las células estrelladas y fibrosis hepática ²³⁻²⁶. Entre los efectores del proceso de apoptosis se encuentran las caspasas, proteínas que pertenecen a la familia de cisteína proteasas, que se activan en forma de cascada y clivan sustratos en sitios específicos ²⁷. A pesar de los diferentes mecanismos que

pueden gatillar la apoptosis, la activación de la caspasa-3 es un evento universal y por lo tanto se la considera un marcador de apoptosis temprana. Por su parte, la familia de citoqueratinas tipo I es sustrato de las caspasas durante el proceso de apoptosis. La citoqueratina-18 (CQ-18) es el principal componente proteico de los filamentos intermedios del citoesqueleto en células hepáticas. Se ha descrito que la CQ-18 es clivada en dos residuos conservados de aspartato, por acción de caspasa-3-activa durante la apoptosis; como consecuencia del clivaje de Asp₃₉₆ se genera un neo-epitope llamado M30 ²⁸.

2. Hipótesis y Objetivos

Teniendo en cuenta que,

- I. la EHGNA actualmente es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica y está fuertemente asociada a la obesidad
- II. la EHGNA abarca un espectro de presentación histológica que incluye desde la esteatosis simple hasta la EHNA cuya diferenciación es de importancia clínica en relación con la evolución de la patología
- III. para el diagnóstico requiere de la evaluación histopatológica en el contexto clínico apropiado
- IV. la biopsia hepática es el método patrón para determinar el daño hepático y establecer un diagnóstico concluyente de EHNA, pero es reconocido que además de los riesgos relacionados con un procedimiento invasivo, se ha vinculado con errores de muestreo y costos de atención al paciente que podrían ser onerosos en países subdesarrollados

- V. el sistema de evaluación basado en el grado de actividad permite diferenciar esteatosis simple ($NAS \leq 2$) y EHNA ($NAS \geq 5$) pero existen casos *borderline* ($NAS 3-4$) que no pueden ser diagnosticados
- VI. la inflamación es una característica remarcable que define a la patología
- VII. la fibrogénesis hepática refleja el balance dinámico entre el depósito y la remoción de la matriz extracelular y se promueve como una consecuencia de la apoptosis de hepatocitos que en condiciones patológicas puede inducir una reacción inflamatoria

Nuestra hipótesis es que ***existen marcadores moleculares y séricos vinculados a la patogenia de la EHGNA que se correlacionan con el daño hepático y su progresión.***

Para evaluar ésta hipótesis en este proyecto se propone como objetivo general estudiar el perfil de expresión molecular inflamatorio relacionado con la patogénesis de la EHGNA; y evaluar la presencia de marcadores serológicos directos que evidencien la dinámica de la matriz extracelular que correlacionen con el daño hepático y permitan determinar su progresión. Este objetivo general se desdobra en dos objetivos específicos. Por un lado determinar y cuantificar en biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA el perfil de expresión de ARNm de citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio y definir posibles patrones de expresión de citoquinas diferenciales entre esteatosis simple y EHNA para identificar patrones o marcadores permitan establecer el diagnóstico de EHNA en los casos *borderline* y por el otro lado, medir los niveles plasmáticos concomitantes a la biopsia hepática de marcadores de depósito de matriz

extracelular [ácido hialurónico (HA) y el inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz-1 (TIMP-1)] y de marcadores de apoptosis [citoqueratina-18 soluble (M65) y la citoqueratina-18 clivada (M30)] y, evaluar la asociación con la lesión hepática y el análisis de su valor diagnóstico.

3. Materiales y Métodos

3.1 Pacientes y Muestras

Se enrolaron pacientes adultos de ambos sexos provenientes del Servicio de Hepatología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Criterios de Inclusión: esteatosis en ecografía y síndrome metabólico parcial o completo.

Criterios de Exclusión: ingesta de alcohol promedio >21 unidades/semana (hombre) y 14 unidades/semana (mujeres), otra causa conocida de enfermedad hepática: enfermedad de Wilson, déficit de α 1-antitripsina, hepatitis virales (HCV, HBV), CBP, HAI, hemocromatosis genética, portador HIV, hipo o hipertiroidismo no controlado, consumo de medicamentos que causen esteatosis hepática, contraindicación para PBH, trasplante hepático previo, pérdida de peso significativa reciente (>5% peso total dentro de los 6 meses previos), síndrome metabólico parcial, de causa secundaria a enfermedades endocrinológicas, lesiones hipotalámicas y síndromes genéticos, historia de nutrición parenteral completa, cirugía bariátrica, sospecha o hepatocarcinoma confirmado.

Se analizaron en forma prospectiva muestras de biopsia hepática. Las muestras fueron obtenidas por los médicos del Servicio de Hepatología para realizar el diagnóstico de dicha patología siguiendo los procedimientos habituales de toma de muestra. No se realizaron biopsias específicamente para este estudio, sólo se incluyeron las muestras de los pacientes que se hayan realizado la misma para el diagnóstico y mediante ésta confirmado la patología. Del material de biopsia obtenido por punción una fracción se fijó en formol e

incluyó en parafina (BHFFIP) y otra se colocó en un tubo eppendorf con TRizol® para la posterior extracción de ARN y se conservó en freezer a -86°C hasta su procesamiento.

A partir de las historias clínicas se confeccionaron planillas de datos de edad, sexo, peso y talla, índice de masa corporal, perímetro de cintura, concentración plasmática de aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), colesterol total, HDL-col, LDL-col, triglicéridos, glucosa, insulina y el cálculo del índice HOMA (*Homeostasis Model Assesement*).

Este estudio contó con la aprobación de los Comités de Docencia e Investigación y de Bioética del HNRG y del Hospital Italiano. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado firmado por los pacientes adultos para la participación en el trabajo.

3.2 Estudio histopatológico sobre las muestras de BHFFIP

Los cortes de biopsia hepática debieron incluir por lo menos 10 espacios porta para ser considerados material representativo para su evaluación. Las secciones de tejido fueron teñidas con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson, reticulina de Gomori y PAS. Se evaluó según el sistema estándar de nomenclatura unificado para la interpretación de las biopsias (*NAFLD scoring system proposed by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease NASH Clinical Research Network*)¹⁵. El sistema gradúa en forma semicuantitativa la esteatosis (0-3), la inflamación lobular (0-2), la balonización hepatocelular (0-2). De esta forma se consideraron pacientes con EHNA a aquellos en los que la sumatoria de todos estos componentes sea mayor a 5,

borderline EHNA a aquellos que se encuentren entre 3-4 y sin EHNA a los que la sumatoria sea menor a 3. Además el sistema gradúa de manera semicuantitativa a la fibrosis (0-4).

3.3 Ensayos sobre muestras de biopsia hepática en fresco

3.3.1 Extracción de ARN y ensayos de retrotranscripción

El ARN total fue aislado de las muestras de biopsias hepáticas en fresco usando el sistema Epicentre Master Pure RNA Purification kit (Illumina) según instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN presente en las muestras se realizó con el equipo NanoPhotometer® (IMPLEN). La integridad del ARN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Se realizó tratamiento con DNAasa (RQ1 RNase-free DNase, Promega) en todas las muestras de ARN extraído. A partir de 2 µg de ARN se realizó la retrotranscripción para obtener el ADNc utilizando iniciadores *random* hexámeros (5 µg/µl) y la enzima transcriptasa reversa *Superscript II* RT kit (Invitrogen, California, USA). La muestra se desnaturalizó durante 5 min a 70 °C en presencia de los hexámeros e incubada a 37 °C durante 90 min en la mezcla de retrotranscripción con buffer de reacción, MgCl₂, inhibidores de RNAsa y la retrotranscriptasa. Finalmente, la mezcla fue incubada 5 min a 95 °C y guardada a -20 °C.

3.3.2 Ensayos de q-PCR

Los iniciadores para cada citoquina, IFN-γ TGF-β, IL-10 e IL-17, fueron diseñados utilizando el programa ABI *primer Express* (Biosystems). Las secuencias y características de los mismos se detallan en el Anexo 1 (tabla 1 suplementaria).

Una alícuota del producto de reacción de ADNc diluido 1/10 fue utilizado para las reacciones de q-PCR por duplicado. Todas las PCR cuantitativas se realizaron en el termociclador *Step One Biosystems*, mediante la detección de los productos de PCR por aumento de la fluorescencia debida a la unión de *SybrGreen* al ADN doble cadena. Se tomaron 0,5 µg ADNc, 200 nmol de cada uno de los iniciadores sentido (F) y antisentido (R), y finalmente se adicionó *SybrGreen* PCR Master Mix (Applied Biosystems) con un volumen final de reacción de 25 µl. Los resultados fueron analizados utilizando el programa *Step One* software v2.1 (Applied Biosystem).

Se utilizaron los genes que codifican para hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) y β -actina como genes control endógeno para la normalización de las muestras de acuerdo al nivel de expresión de los genes estudiados. La secuencia de dichos iniciadores se detalla en el Anexo 1 (tabla 2 suplementaria).

Las condiciones de termociclado para el protocolo de q-PCR fueron 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 58 °C por 60 seg. Para verificar la especificidad de los productos de PCR, el análisis de las curvas de *melting* fue realizado de 60 °C a 95 °C con intervalos de 0,3 °C/seg y adquisición de la fluorescencia paso a paso.

3.3.3 Optimización de la cuantificación por q-PCR

Previo a los ensayos en las muestras de los pacientes se realizó la optimización de las reacciones de cuantificación de la expresión de citoquinas por RT-PCR en tiempo real.

3.3.3.1 Curva de calibración y cálculo de eficiencias

Se construyeron curvas de calibración evaluando diferentes estímulos y tiempos de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de individuos controles. Se utilizaron como estímulos fitohemaglutinina (PMA)/Ionomicina: 50 ng/ml / 1 µg/ml y OKT3/IL2: 0,33 µg/µl / 1,1 µg/µl, sobre la base de los siguientes protocolos:

- (1) PMA/ionomicina durante 5 h
- (2) PMA/ionomicina durante 18 h
- (3) OKT3/IL2 durante 5 h
- (4) OKT3/IL2 durante 18 h
- (5) OKT3/IL2 durante 5 días seguido de PMA/ionomicina durante 18 h.

Luego de la estimulación se aisló ARN de los PBMC y se hicieron los ensayos de RT. A partir del ADNc se realizaron diluciones seriadas (1/10) y las q-PCR para las citoquinas estudiadas. Los mejores porcentajes de detección de transcritos celulares fueron obtenidos con los estímulos PMA/ionomicina durante 18 h y OKT3/IL2 durante 18 h. Se decidió utilizar la segunda condición para el protocolo de trabajo.

A partir de los resultados de estos ensayos se calculó la eficiencia de reacción de amplificación para cada citoquina y control endógeno con el programa Step One software v2.1 (Applied Biosystem). Dado que el análisis de resultados se realiza mediante cuantificación relativa mediante la técnica de $\Delta\Delta CT$, las eficiencias deben ser entre 90% y 110%. En todos los casos las eficiencias estuvieron dentro del rango antes mencionado. En el Anexo 2 se muestran las curvas de amplificación por q-PCR, la curva estándar relativa para

IFN- γ , TGF- β , IL-10, IL-17 (Anexo 2, figura 1 suplementaria) y los resultados de eficiencia (Anexo 1, tabla 3 suplementaria).

3.3.3.2 Validación frente a la expresión de un gen endógeno

La validación tiene como objetivo determinar el comportamiento de la expresión de los genes diana en estudio frente a un gen endógeno de comportamiento similar utilizando sistema de cuantificación el método de Pfaffl ($\Delta\Delta CT$)²⁹. Los resultados fueron normalizados a la expresión del gen endógeno HPRT, y fueron expresados como *Fold Change* (FC), utilizando como calibrador el Ct promedio del primer punto de la curva de calibración (50 ng *input*) obtenida a partir del ARN de células mononucleares de sangre periférica estimulados previamente con OKT3/IL-2 durante 18 h.

$$\text{Fold change} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct \text{ target (control - tratamiento)}}}{(E_{\text{endógeno}})^{\Delta Ct \text{ endógeno (control - tratamiento)}}$$

Se realizaron los gráficos de $\Delta\Delta CT$ vs log cantidad de templado para cada citoquina (ver Anexo 2, figura 2 suplementaria). Se consideran relaciones válidas gen diana/gen endógeno cuando la pendiente de la curva de regresión es menor a 0,1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método de validación por $\Delta\Delta CT$ fue utilizado para la cuantificación de IFN- γ , TGF- β e IL-17. Como la determinación de IL-10 no logró validar por $\Delta\Delta CT$, se realizó la cuantificación relativa mediante curva estándar; por lo cual se incluyó en cada ensayo una curva estándar para realizar los cálculos.

3.4 Ensayos sobre muestras de plasma

Se realizó la cuantificación de los niveles plasmáticos de los marcadores de apoptosis y de depósito de matriz extracelular sobre las muestras de plasma recolectadas concomitantes a la biopsia hepática.

3.4.1 Cuantificación de marcadores plasmáticos de apoptosis

Determinación de M30 y M65: Se realizó por ELISA con equipos comerciales M30-Apoptosense ELISA y el M65-EpiDeath (PEVIVA), respectivamente, según instrucciones del fabricante. En ambos casos, para la cuantificación, se realizó una curva estándar de concentración creciente de estándares incluidos en el equipo. Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva estándar.

3.4.2 Cuantificación de marcadores séricos de depósito de matriz

Determinación de HA y TIMP-1: Se determinaron por sistemas comerciales ELISA Quantikine (R&D System Inc) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En ambos casos, para la cuantificación, se realizó una curva estándar de concentración creciente de estándares incluidos en el equipo. Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva estándar.

Todas las determinaciones a realizar en plasma se ensayaron por duplicado para cada muestra. Los valores de corte de los ensayos fueron determinados utilizando muestras de plasma de pacientes adultos infectológicamente sanos y sin afección hepática, con pruebas bioquímicas hepáticas normales.

3.5 Análisis estadístico:

Para comparar las medias entre grupos se utilizará ANOVA o test de Student. Para determinar las diferencias entre grupos que no se distribuyen normalmente, las medias se comparan mediante el test de Mann-Whitney o Kruskal Wallis según corresponda. Se utilizará el coeficiente de correlación de Pearson's para calcular el grado de asociación entre variables continuas normalmente distribuidas y el de Spearman para variables no paramétricas. Se considerarán significativos valores de $p < 0,05$. Se utilizará el programa GraphPad InStat versión 3.05. (Graphpad, San Diego, CA, USA).

Se estimó el valor de corte de cada uno de los marcadores séricos con la sensibilidad y la especificidad óptima mediante el análisis de ROC (*Receiver Operating Characteristics*) utilizando el programa "MedCalc demo statistical software" (Mariakerke, Belgium).

4. Resultados

4.1 Pacientes y muestras incluidas en el estudio

Se enrolaron 34 pacientes adultos provenientes del Servicio de Hepatología del Hospital Italiano de Buenos Aires [edad: 49,5 años (28-72), mediana (rango); 16 mujeres, 18 hombres]. En la tabla 1 se presentan las características clínicas de la población.

4.2 Evaluación de las características histopatológicas en las muestras de biopsias hepáticas en fresco

En la tabla 1 se describen las características histopatológicas de la muestra hepática de los pacientes incluidos en el estudio. El sistema de clasificación gradúa en forma semicuantitativa la esteatosis, la inflamación lobular, la balonización hepatocelular y la fibrosis según se especificó en el ítem 3.2.

Tabla 1: Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con EHGNA estudiados.

Factor	EHGNA	Esteatosis Simple	Borderline	NASH
Edad (años) median (rango)	49.5 (28-72)	37.5 (30-47)	55.5 (28-72)	45.5 (30-72)
Sexo (masculino %)	55.88	100	41.67	55.55
Características Clínicas e serológicas				
IMC				
• Sobrepeso %	25	50	36.36	7.69
• Obeso %	75	50	63.64	92.31
Transaminasas				
ALT (IU/l) mediana (rango)	81.5 (31-279)	76.5 (60-204)	73 (31-254)	94 (43-279)
• % elevada	96	100	90.90	100
AST (IU/l) mediana (rango)	52.5 (22-208)	59.5 (29-86)	50 (22-184)	60 (35—208)
• % elevada	53.57	50	54.54	53.85
AST/ALT ratio	0.71 (0.368-1)	0.54 (0.41-0.95)	0.71 (0.36-0.88)	0.73 (43-279)
Perfil lipídico				
• Colesterol mg/dl	207 (126-327)	231.5 (207-285)	206 (145-246)	200 (126-327)
• Triglicéridos mg/dl	166 (60-465)	281.5 (156-465)	157 (60-391)	158 (76-375)
Características Histológicas				
Esteatosis * (%)				
• 0	-	-	-	-
• 1	17.65	50	33.33	-
• 2	26.47	50	50	5.56
• 3	55.88	-	16.67	94.44
Inflamación Lobular				
• 0	20.59	100	25	-
• 1	61.76	-	75	66.64
• 2	17.65	-	-	33.33
• 3	-	-	-	-
Balonización (%)				
• 0	14.71	100	8.33	-
• 1	61.76	-	83.34	61.11
• 2	23.53	-	8.33	38.89
“NAFLD activity score” (%)				
• ≤2	11.77			
• 3-4	35.29			
• ≥5	52.94			
Fibrosis (%)				
• 0	67.65	100	58.33	66.67
• 1	14.71	-	25	11.11
• 2	11.76	-	-	22.22
• 3	5.88	-	16.67	-
• 4	-	-	-	-
n	34	4	12	18

En la figura 1 se pueden observar casos representativos de la histopatología que presentaron los pacientes. En base a la puntuación de la esteatosis, la inflamación y la balonización se determinó el grado de actividad, NAS. De esta forma se clasificaron los casos con NAS ≤2 como esteatosis simple, casos con NAS 3-4 *borderline* y casos con NAS ≥5 como EHGNA.

En nuestra serie, 11,77% de los casos fueron clasificados como esteatosis simple, 35,29% como *borderline* y el 52,94% como EHNA.

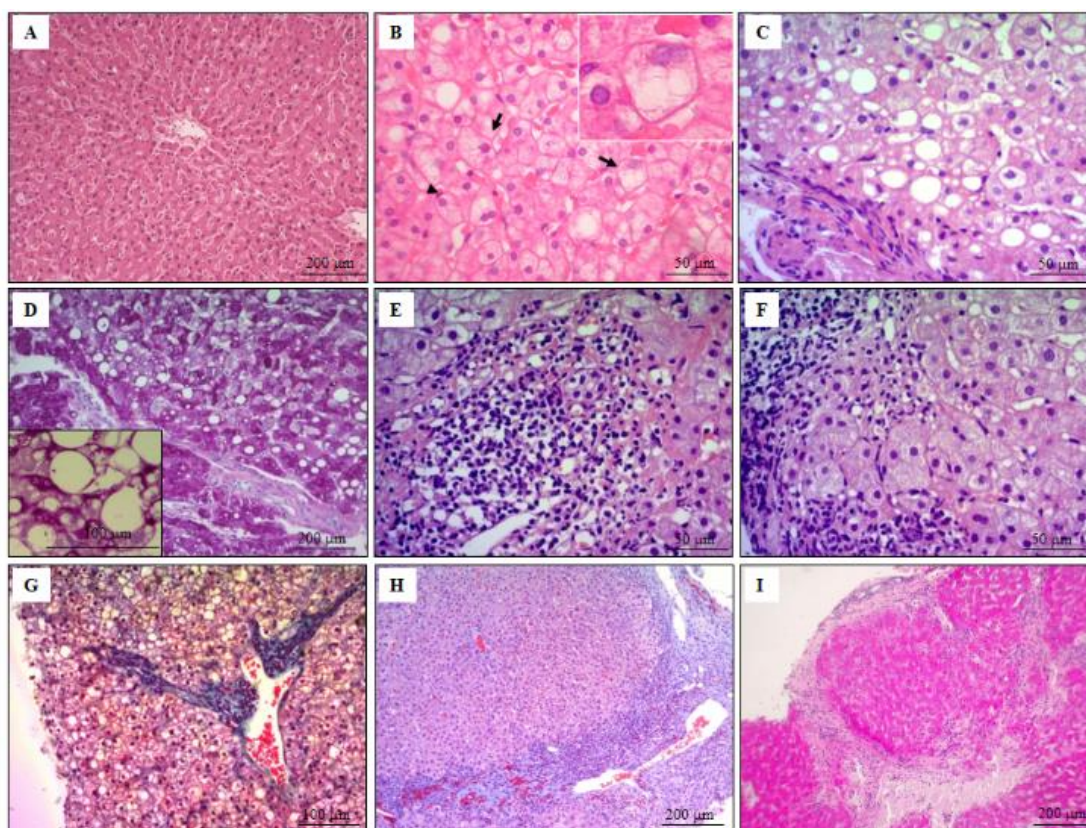


Figura 1: Cambios histopatológicos presentes en los pacientes estudiados. A) Muestra hepática control normal (H&E). B) Cambios hepatocelulares indicados por flechas, el recuadro muestran balonización hepatocitaria (H&E). C) Esteatosis mixta (macro- y microvacuolar) (H&E). D) Esteatosis mixta, el recuadro muestra esteatosis macrovacuolar (PAS). E) Inflamación lobulillar (H&E). F) Infiltrado inflamatorio portal con marcada actividad de interfase (H&E). G) Fibrosis portal (F1) (tinción tricrómico de Masson). H) Fibrosis porto-porto (F2) (tricrómico de Masson). I) Fibrosis porto-porto-porto (F3) (PAS).

4.3 Evaluación y cuantificación de genes endógenos y citoquinas por q-PCR en las muestras de biopsia hepáticas en fresco

4.3.1 Cuantificación de la expresión de citoquinas

A partir de los resultados de amplificación por q-PCR, se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm de las citoquinas: IFN- γ , TGF- β , IL-17 e IL-10. Los niveles de TGF- β fueron variables, pero detectables en todos los casos estudiados mientras que solamente se detectaron niveles de IFN- γ en el 38% de

los casos y con niveles muy bajos (Figura 2A y B). Por su parte los niveles de IL-17 fueron indetectables en todos los casos evaluados, mientras que para IL-10 pudo ser detectada en 4 muestras con nivel bajos no siendo representativas para el análisis.

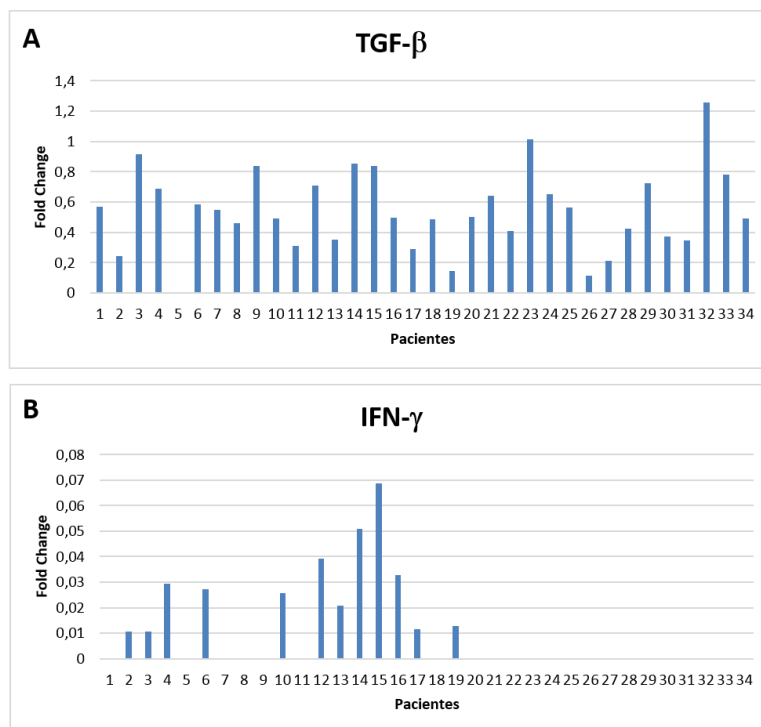


Figura 2: Cuantificación de expresión de TGF- β (A) e IFN- γ (B) por q-PCR en muestras de individuos con EHNA. Niveles de expresión de los pacientes analizados.

4.3.2 Evaluación de patrones de expresión de IFN- γ diferenciales entre esteatosis simple y EHNA.

El nivel de expresión de IFN- γ fue evaluado en 12 de los 34 casos en estudio. Los niveles de IFN- γ fueron variables en aquellos casos en donde fue detectado pero con niveles muy bajos. Cuando se evaluó la expresión de IFN- γ según se trate de muestras clasificadas como esteatosis simple (ES), *borderline* o EHNA no se observaron diferencias significativas (Figura 3).

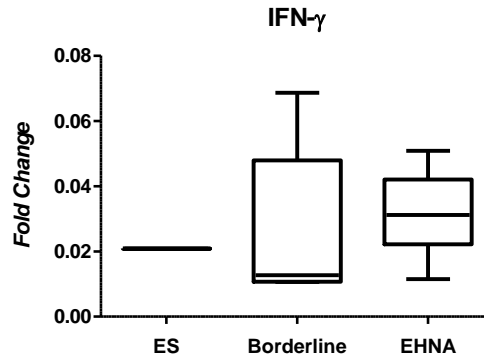


Figura 3: Cuantificación de expresión de IFN- γ por q-PCR en muestras de individuos con EHGNA. Niveles de expresión según clasificación NAS, media \pm DS. ES: esteatosis simple, EHNA: esteatohepatitis no alcohólica

4.3.3 Evaluación de patrones de expresión de TGF- β

4.3.3.1 Patrones de expresión diferencial de TGF- β entre esteatosis simple y EHNA.

El nivel de expresión de TGF- β fue evaluado en 32 de los 34 casos en estudio; de los casos restantes no se pudo obtener material adecuado para su evaluación.

Los niveles de TGF- β fueron variables. Cuando se analizan en forma conjunta, no se observan diferencias significativas en la expresión de TGF- β según se trate de muestras clasificadas como ES, *borderline* o EHNA (Figura 4A); sin embargo, cuando se analiza solamente a los pacientes con esteatosis simple vs EHNA se observa una diferencia significativa en el nivel de expresión de TGF- β ($p = 0,0159$) (Figura 4B). Teniendo en cuenta que la inflamación y la fibrosis son componentes característicos de los subtipos histológicos EHNA y EHNA *borderline* que no se presenta en el subtipo ES, cuando se agrupan los pacientes *borderline* con los que presentan EHNA se mantiene la diferencia significativa respecto de los individuos con ES ($p = 0,03$) (Figura 4C).

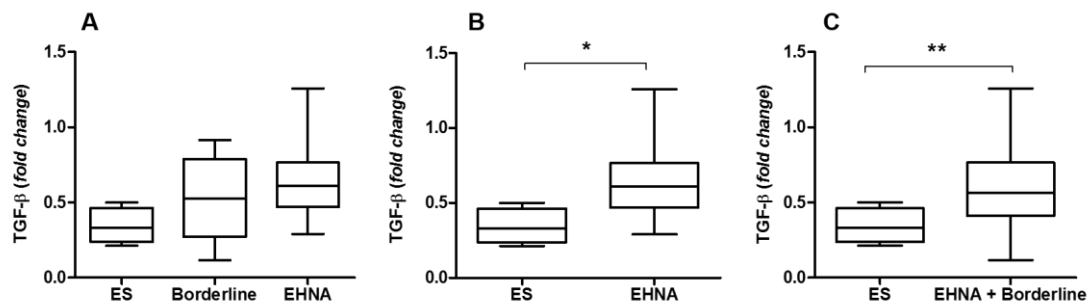


Figura 4: Cuantificación de expresión de TGF- β por q-PCR en muestras de individuos con EHGNA, según clasificación NAS (A), ES versus EHNA (B) y agrupando individuos *borderline* con EHNA (C). ES: esteatosis simple, EHNA: esteatohepatitis no alcohólica. Los datos se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana y las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. * $p=0,0159$, ** $p=0,03$

Los niveles de expresión de TGF- β se incrementan a medida que progresa la patología desde los estadios más tempranos hacia la patología más severa. La falta de diferencias significativas que se observa entre los pacientes ES y EHNA cuando se incluyen al grupo *borderline* hizo evidente la heterogeneidad de expresión de TGF- β en las muestras de estos pacientes.

4.3.3.2 Patrones de expresión de TGF- β en relación al daño hepático.

No se observaron diferencias cuando se analizaron los niveles de expresión de TGF- β y el grado de fibrosis según clasificación F<2 vs F \geq 2, tanto para todos los pacientes ($p=0,1$) como para los individuos del subgrupo *borderline* + EHNA ($p=0,17$) o exclusivamente el grupo EHNA ($p=0,25$).

Los resultados fueron similares cuando se analizaron los niveles de expresión de TGF- β y el grado de esteatosis (1, 2 o 3), tanto para todos los pacientes ($p=0,45$) como cuando se agrupó a los individuos *borderline* + EHNA ($p=0,62$).

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de TGF- β y el grado de inflamación lobulillar ($p = 0,0139$) (Figura 5).

Cuando se agrupó a los pacientes *borderline* + EHNA o solamente frente a los pacientes EHNA, no se observaron diferencias significativas.

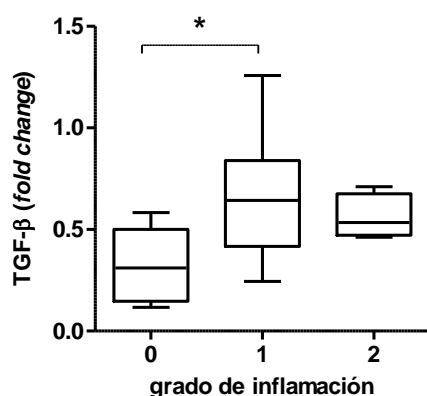


Figura 5: Niveles de expresión de TGF- β por Q-PCR en muestras de individuos con EHGNA y su relación con el grado de inflamación lobular por número de focos (0= 0 focos; 1= 2 focos; 2= 2-4 focos; 3= >4 focos). Los datos se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana y las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. * $p= 0,0139$.

4.3.3.3 Patrones de expresión de TGF- β y el diagnóstico de EHNA en los casos *borderline*.

Para caracterizar a la población *borderline*-EHNA dada la heterogeneidad observada en el patrón de expresión de TGF- β sumado a su relación con el grado de inflamación, se realizó el análisis de las características histológica de este subgrupo particular de pacientes (Tabla 2).

Tabla 2: Características histopatológicas de los pacientes *borderline* EHNA.

		N = 13 (%)
Esteatosis (% células)		
	0 (<5%)	0 (0)
	1 (5-33%)	4 (31)
	2 (33-66%)	7 (54)
	3 (>66%)	2 (15)
Inflamación lobular (nº focos)		
	0 (0)	3 (23)
	1 (<2)	10 (77)
	2 (2 a 4)	0 (0)
	3 (>4)	0 (0)
Fibrosis		
	<2	11 (84)
	≥2	2 (16)

Los pacientes tipificados como *borderline* mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión de TGF- β según el grado de inflamación que presentó el tejido ($p = 0,0445$) (Figura 6).

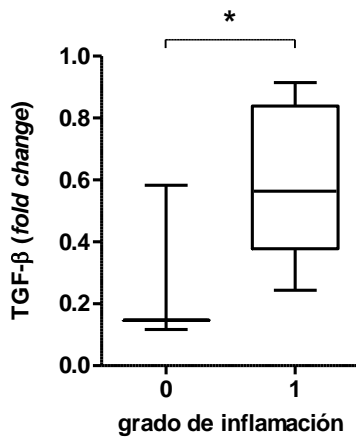


Figura 6: Niveles de expresión de TGF- β por q-PCR en muestras de individuos clasificados como *borderline* y su relación con el grado de inflamación lobular por número de focos (0= 0 focos; 1= 2 focos). Los datos se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana y las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. * $p= 0,0445$.

Teniendo en cuenta que los individuos clasificados como *borderline* presentan una relación entre el patrón de expresión de TGF- β y el grado de inflamación, se realizó un análisis agrupando a los pacientes según el grado de inflamación. De esta manera se conformaron dos subgrupos, por un lado los pacientes con esteatosis simple + *borderline* sin inflamación y por el otro, los pacientes *borderline* con grado 1 de inflamación + EHNA que solamente presentaron grado de inflamación 1. Cuando se analizaron estos grupos, se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de expresión de TGF- β ($p = 0,0056$) (Figura 7).

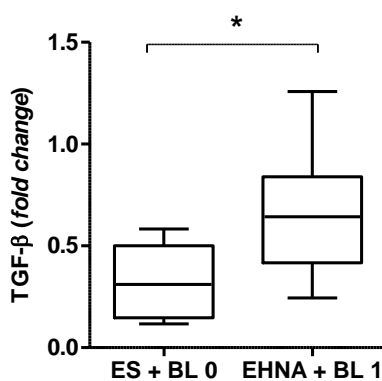


Figura 7: Niveles de expresión de TGF- β por q-PCR en muestras de individuos agrupados según el grado de inflamación: ES + BL 0 (*borderline* con grado de inflamación = 0), EHNA + BL 1 (*borderline* ambos con grado de inflamación = 1). Grado de inflamación lobular por número de focos (0= 0 focos; 1= 2 focos). Los datos se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal de cada caja indica la mediana y las líneas horizontales por fuera representan los percentilos 5 y 95. * $p= 0,0056$.

Teniendo en cuenta esta aproximación, se evaluó la exactitud diagnóstica del TGF- β por medio del valor de corte (*cut-off*), la sensibilidad y la especificidad a través de curvas ROC (Figura 8).

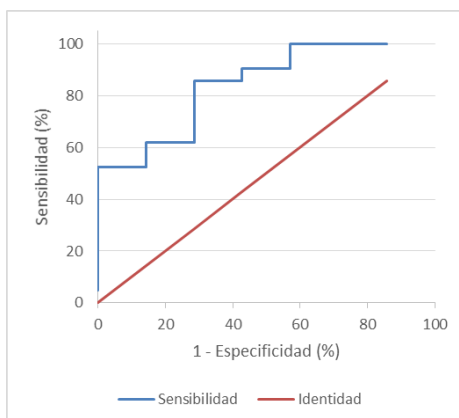


Figura 8: Curva ROC para TGF- β por q-PCR en muestras de individuos agrupados según el grado de inflamación.

El resultado del análisis de la curva ROC con valor 0,840 ($p = 0,0001$) permite inferir que el TGF- β podría ser un marcador complementario con buen valor diagnóstico para EHNA (Tabla 3).

Tabla 3: Exactitud diagnóstica de TGF- β para EHNA en pacientes clasificados como *borderline* según el grado de inflamación.

	AUROC	95% CI	Cut-off	Se%	Es%	VPP	VPN
<i>Borderline</i> +EHNA	0,840	0,668-0,945	0,3514	88,00	71,43	91,7	62,5

Se: sensibilidad; Es: especificidad; VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

De esta manera, según el grado de inflamación, los casos clasificados como *borderline* que presenten un valor de TGF- β mayor al *cut-off* podrían ser clasificados como EHNA y los que se encuentren por debajo como esteatosis simple. Más aun, TGF- β no solo sería útil como marcador complementario en el diagnóstico sino también para el seguimiento de los pacientes y la evolución de la patología.

4.4 Ensayos en las muestras de plasma

4.4.1 Evaluación de marcadores séricos de daño hepático

Se evaluaron marcadores de depósito de matriz extracelular [ácido hialurónico (HA) y el inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz-1 (TIMP-1)], y marcadores de muerte celular citoqueratina-18 (M65) y citoqueratina clivada (M30), y se correlacionaron con la lesión hepática en la cohorte de pacientes adultos con EHGNA.

Se encontró que los niveles séricos de todos los marcadores fueron mayores en los individuos con EHGNA que en los controles (Tabla 4).

Tabla 4: Niveles séricos de TIMP-1, HA, M30 y M65 en pacientes con EHGNA

	Controles	EHGNA	<i>p</i>	Controles + ES	Borderline + NASH	<i>p</i>
TIMP-1*	114,9 (92,5-181,1)	163,8 (89,8-557,3)	0,017	114,9 (92,5-242,3)	166,3 (88,8-557,3)	0,0046
HA*	6,2 (2,5-28,2)	13,6 (2,1-63)	0,02	6,2 (2,9-285,2)	13,7 (2,1-63)	0,02
M30[‡]	92,3 (71,39-121,6)	218,1 (87,3-1470,8)	<0,0001	99,6 (71,2-277,4)	218,1 (133,3-1470,8)	0,0001
M65[‡]	72,5 (0-286,4)	460,2 (106,3-2166,2)	<0,0001	227,5 (0-479,2)	477,6 (106,3-2166,2)	<0,0001

*ng/ml, [‡]U/L. Datos expresados en mediana (min-max). ES: Esteatosis simple

Cuando se evaluó la relación de dichos marcadores con los parámetros histológicos de daño hepático TIMP-1 y M65 no mostraron asociación con ninguno de los parámetros histológicos. Por otro lado, se observó que HA se asocia con la severidad de la fibrosis ($p = 0,03$). Por su parte, M30 mostró asociación con la esteatosis ($p = 0,013$), la inflamación ($p = 0,004$) y la fibrosis ($p = 0,04$) (Figura 9).

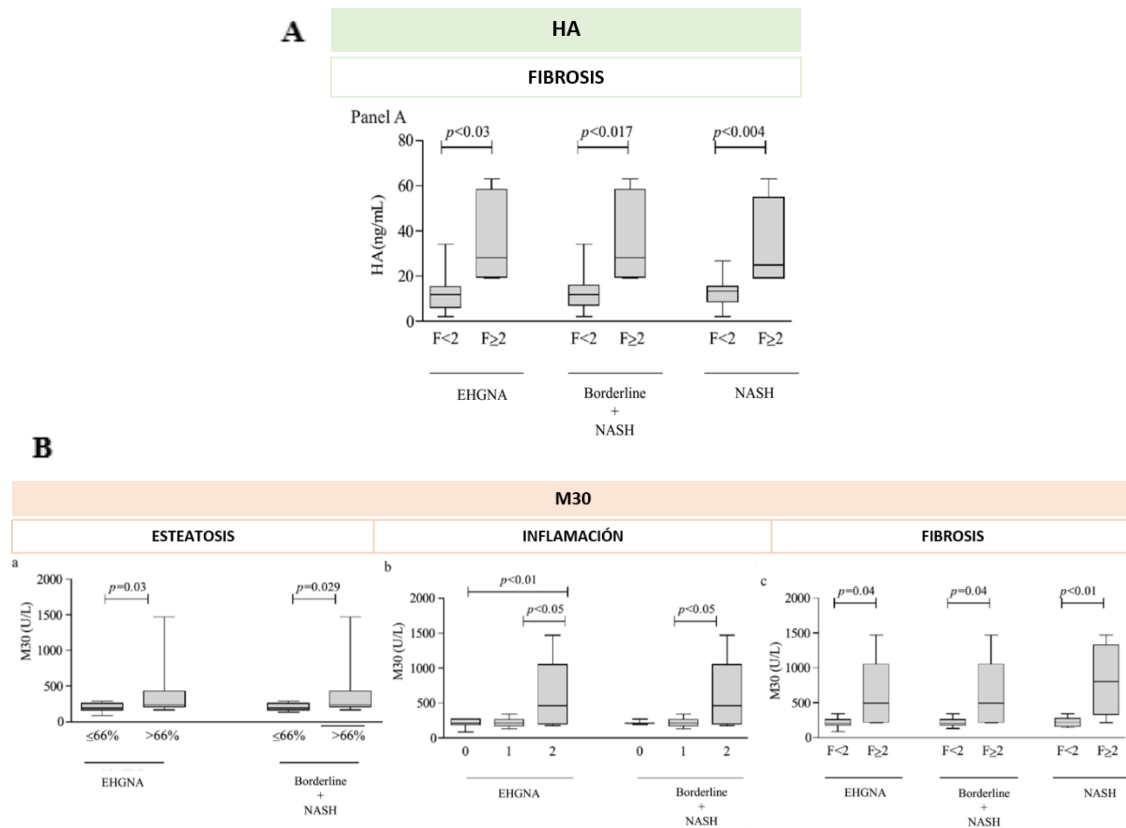


Figura 9: Panel A: Niveles de HA en plasma en relación a la severidad de la fibrosis. Panel B: Niveles plasmáticos de M30 en relación a: a) esteatosis; b) inflamación y c) severidad de la fibrosis. Los resultados se presentan tanto para pacientes con EHGNA, como para los pacientes agrupados en *Borderline* y EHGNA (se excluyen los casos con esteatosis simple) como para los que tienen diagnóstico de EHGNA (NASH). Los datos se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana y las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. Fibrosis significativa: estadios de fibrosis ≥ 2 . Esteatosis: Grado 0, 1 y 2 (<66% de las células) vs score 3 (>66%). Inflamación lobulillar: score 0 (0 foco), 1 (<2 foco), 2 (2-4 foco).

Como se describió previamente, se evaluó el valor diagnóstico para los marcadores que mostraron asociación con el daño a través del área bajo la curva ROC (AUROC). Las tablas 5 y 6 muestran los resultados obtenidos y a su vez describen los valores de sensibilidad (Se), especificidad (Es), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Tabla 5: Valor diagnóstico de HA en relación a la severidad de la fibrosis.

	FIBROSIS SIGNIFICATIVA (F≥2)						
	AUROC	95% CI	Cut-off*	Se%	Es%	VPP	VPN
Pacientes con EHGNA	0,928	0,768-0,99	16,38	100	82,6	60	100
Pacientes <i>borderline</i> + EHNA	0,924	0,766-0,989	17,96	100	83,3	60	100
Pacientes con EHNA	0,929	0,705-0,996	16,17	100	85,7	66,7	100

*ng/ml. Se: sensibilidad; Es: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

Tabla 6: Valor diagnóstico de M30 en relación a la severidad de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis.

	ESTEATOSIS						
	AUROC	95% CI	Cut-off*	Se%	Es%	PPV	NPV
Pacientes con EHGNA	0,709	0,508-0,864	196,38	85,71	57,	66,7	80
Pacientes <i>borderline</i> + EHNA	0,721	0,503-0,883	196,38	85,71	60	75	75

	INFLAMACIÓN						
	AUROC	95% CI	Cut-off*	Se%	Es%	PPV	NPV
Pacientes con EHGNA	0,553	0,355-0,740	343,13	33,33	100	100	84,6
Pacientes con EHNA	0,722	0,503-0,884	343,13	50	100	100	85,7

	FIBROSIS SIGNIFICATIVA (F≥2)						
	AUROC	95% CI	Cut-off*	Se%	Es%	PPV	NPV
Pacientes con EHGNA	0,848	0,663-0,955	284,73	66,67	95,45	80	91,3
Pacientes <i>borderline</i> + EHNA	0,852	0,648-0,962	284,73	66,67	94,44	80	89,5
Pacientes con EHNA	0,844	0,528-0,982	343,13	75	100	100	88,9

*U/L. Se: sensibilidad; Es: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

Para la evaluación de daño hepático, se asume que el AUROC de un marcador debe ser $\geq 0,8$ para ser considerado un test menos invasivo comparable con la biopsia hepática³⁰. En base a este criterio, HA demostró tener un buen desempeño (AUROC: 0,929, NPV: 100) para fibrosis significativa, tanto en el subgrupo *borderline* + EHNA (AUROC: 0,924, NPV: 100) como en la EHNA (AUROC: 0,929, NPV: 100) (Tabla 6). Por el otro lado, a pesar de la asociación de M30 con esteatosis y severidad de la inflamación, los valores de AUROC fueron bajos, pero demostraron tener buen desempeño para predecir fibrosis en

EHNA (AUROC: 0,848, NPV: 91,3) (Tabla 6). Asimismo, se calcularon los valores de corte (HA: 16,4 ng/ml, M30: 284,7 U/L) y se determinó que casos serían correctamente clasificados utilizando los marcadores en forma individual, simultánea o secuencial (Tabla 7 y 8). En el caso de HA y M30 se consideraron correctamente clasificados como verdaderos positivos + verdaderos negativos, por su parte, en el análisis simultáneo se consideraron los casos con resultados concordantes para ambos marcadores según el valor de *cut-off* de cada marcador, y finalmente para el análisis en forma secuencial, se evaluó el resultado para HA y los casos positivos fueron reevaluados teniendo en cuenta el valor de M30, y considerando concordancia de los resultados de ambos marcadores.

Tabla 7: Casos correctamente clasificados por evaluación plasmática de HA y M30.

	HA [*]	M30 [*]	HA+M30 [†]	HA→M30 [‡]
EHGNA	79%	88%	71%	78%
<i>borderline</i> + EHNA	83%	90%	79%	85%
EHNA	83%	94%	77%	82%

^{*}verdaderos positivos+verdaderos negativos, [†] casos con resultados concordantes para ambos marcadores según el valor de *cut-off* de cada marcador, [‡]aplicación de HA and M30 en forma secuencial. Casos considerados positivos según el *cut-off* para HA reevaluados teniendo en cuenta el valor de M30.

Tabla 8: Porcentaje de pacientes que NO evitarían la biopsia hepática mediante la evaluación de HA y M30

	HA [*]	M30 [*]	HA+M30 [†]	HA→M30 [‡]
EHGNA	38%	-	29%	22%
<i>borderline</i> + EHNA	37%	-	21%	15%
EHNA	39%	-	23%	18%

^{*}casos con valores plasmáticos de HA mayores al *cut-off*, [†]casos con resultados discordantes para ambos marcadores, [‡] aplicación de HA and M30 en forma secuencial. Casos considerados positivos según el *cut-off* para HA reevaluados teniendo en cuenta el valor de M30

Los resultados demuestran que un elevado porcentaje de pacientes podrían evitar la biopsia hepática mediante la evaluación de HA y que el porcentaje aún es mayor cuando se utilizan los marcadores de forma simultánea

y/o secuencial, 71% y 78%, respectivamente. Asimismo, M30 no sería un buen marcador a utilizar en forma individual dado que presenta un VPN menor a HA pero sería útil para utilizarlo en forma simultánea o secuencia con como complemento de HA.

Por lo tanto, la evaluación de HA y M30, conjuntamente o secuencialmente, puede ser suficiente para predecir fibrosis significativa en pacientes con EHGNA, así como para evaluar la progresión de la misma en casos previamente clasificados por biopsia hepática.

5. Discusión

Actualmente, debido al aumento a nivel mundial del sobrepeso y la obesidad la Enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) se ha transformado en una de las principales causas de enfermedad hepática crónica³¹. Tal como se mencionó previamente, el diagnóstico de los distintos estadios de la enfermedad requiere de la evaluación histopatológica en el contexto clínico apropiado. La biopsia hepática es una herramienta fundamental que permite el diagnóstico de certeza ya que brinda información sobre el grado de esteatosis y sobre los cambios en la arquitectura global del hígado debidos a la inflamación y a la fibrosis. Sin embargo, a pesar de ser la técnica patrón dista de ser ideal. Esto se debe, por un lado, a que es dependiente de la toma de muestra, del observador que realice la caracterización histológica¹⁴ y a que el sistema de nomenclatura para realizar la caracterización histológica (NAS; *Non alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score*) describe casos como *borderline*; y por otro lado, a que es un procedimiento complejo que presenta complicaciones en aproximadamente 0,5% de los pacientes^{12,13}. Para intentar resolver estos problemas y planteando como hipótesis que ***existen marcadores moleculares y séricos vinculados a la patogenia de la EHGNA que se correlacionan con el daño hepático y su progresión***, en el presente trabajo realizamos 1) la determinación y cuantificación del perfil de expresión de ARNm de citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio en biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA para identificar patrones o marcadores que permitan establecer el diagnóstico de EHNA en los casos *borderline* y así contar con una herramienta complementaria a la caracterización histológica; y 2) la cuantificación de

marcadores de depósito de matriz extracelular y de marcadores de apoptosis en muestras de plasma concomitantes a la biopsia hepática para evaluar la asociación con la lesión hepática y analizar su valor diagnóstico como métodos menos invasivos que puedan reemplazar o minimizar el uso de la biopsia hepática.

Con respecto al primer punto, si bien datos bibliográficos indican la participación de diversas poblaciones celulares y sus citoquinas en la patogenia de la EHGNA los resultados del estudio de IFN- γ , IL-10 e IL-17 no demostraron resultados promisorios en comparación con los observados para TGF- β . La superfamilia de TGF- β son algunos de los péptidos más pleiotrópicos y multifuncionales conocidos. Son secretados por muchos tipos de células y están implicados en una amplia gama de funciones celulares, que regulan críticamente la homeostasis y reparación de los tejidos, las respuestas inmunitarias e inflamatorias, la deposición de la matriz extracelular, la diferenciación celular y el crecimiento ³². La función de TGF- β varía e incluso puede ser opuesta en diferentes células y en diferentes etapas del desarrollo y la enfermedad. Un ejemplo es la dicotomía de las funciones de TGF- β en las enfermedades hepáticas. TGF- β contribuye a todas las etapas del desarrollo de la enfermedad hepática crónica, desde lesiones hepáticas causadas por inflamación y fibrosis a cirrosis y carcinoma hepatocelular. TGF- β tiene efectos citostáticos y apoptóticos sobre los hepatocitos, y consecuentemente es crítico para controlar la masa del hígado durante el desarrollo y la regeneración del hígado. La pérdida de señalización de TGF- β en el hígado se asocia con frecuencia a trastornos hiperproliferativos y cáncer. Sin embargo, los niveles elevados de TGF- β , como

consecuencia de la lesión y el daño hepáticos, activan las células estrelladas hepáticas, promueven la transdiferenciación de los miofibroblastos y estimulan la producción de matriz extracelular. Todo lo anterior conduce a la fibrosis y la cirrosis en las que se desarrollan el carcinoma hepatocelular y la insuficiencia hepática ³³. El trabajo de Yang y col. sobre un modelo animal de EHNA en ratones transgénicos deficientes en receptores para TGF- β demostró el papel de TGF- β a nivel hepático y la promoción de esteatosis hepática, el daño, la infiltración de células inflamatorias, la producción de citoquinas inflamatorias, la activación de células estrelladas y la fibrosis. Sumado a esto, TGF- β también participó en la producción de especies reactivas del oxígeno y apoptosis de hepatocitos, en el metabolismo lipídico mediante la regulación de la expresión génica implicada en la lipogénesis y la β -oxidación de ácidos grasos e influyó en la resistencia a la insulina sistémica y la ganancia de peso corporal ³⁴. En este contexto, el análisis de la expresión a nivel hepático de TGF- β en la EHNA podría poner en evidencia las distintas etapas fisiopatológicas por las que atraviesa en hígado durante la progresión de la esteatosis simple al EHNA (NASH). Los resultados de este trabajo demuestran que los niveles de expresión hepática de TGF- β aumentaron con la progresión de la patología desde los estadios más tempranos hacia los más severos. Los pacientes clasificados como *borderline*, a pesar de mostrar perfiles heterogéneos de expresión de TGF- β , presentaron una relación entre el nivel de TGF- β y el grado de inflamación. La cuantificación por q-PCR de la expresión de TGF- β en muestras de biopsias hepáticas podría ser un marcador complementario con buen valor diagnóstico para EHNA [AUROC 0,840 (p = 0,0001)]. En asociación con el grado de

inflamación, los casos clasificados como *borderline* que presenten un valor de TGF- β mayor al valor de corte (*cut-off*) podrían ser clasificados como EHNA y los que se encuentren por debajo, como esteatosis simple.

Con respecto al segundo punto evaluado en el presente trabajo y reiterando los riesgos asociados con un procedimiento invasivo sumado a los costos de atención al paciente que se realiza la biopsia hepática que podrían ser onerosos en los países subdesarrollados, la emergencia de marcadores y pruebas no invasivas confiables que puedan predecir con precisión la presencia de una enfermedad avanzada es una necesidad imperiosa de cumplir, y para tal fin múltiples estrategias han sido evaluadas al respecto. En primer lugar, en base a su sencillez se propuso como posible marcador no invasivo la relación entre AST y las plaquetas (APRI) y la relación entre las transaminasa AST-ALT (AAR); sin embargo, estos índices basados en enzimas no demostraron ser adecuadas como como única prueba para realizar el diagnóstico de los distintos estadios histológicos de la EHNA ni para evaluar alternativamente la severidad de la fibrosis³⁵. Por su parte, otros autores han combinado pruebas bioquímicas y clínica (ej. Fib-4, BARD, NFS, Fibrotest) para predecir la severidad del daño hepático, particularmente de la severidad de la fibrosis, mientras que otros los han combinado con marcadores séricos específicos de fibrosis (ej. NASH Test, Fibrometer, LINKI). Sin embargo, estos sistemas de cálculo son complejos y de poca operatividad para ser realizados en forma rutinaria; asimismo, se ha descrito que las técnicas no invasivas de imágenes como ultrasonido, tomografía computada, resonancia magnética y espectroscopia de resonancia

magnética de protones permiten establecer el diagnóstico de esteatosis hepática pero no puede discriminar consistentemente esteatosis simple de EHNA ³⁵⁻³⁷.

Varios autores han explorado el potencial de TIMP-1 y HA como una herramienta no invasivas para la predicción de fibrosis en muchas enfermedades hepáticas ³⁸⁻⁴². Estos biomarcadores son considerados como parte de un panel denominado ELF test, que incluye TIMP-1, HA, y el péptido amino terminal del procolágeno III ^{39,43,44}. Esta prueba demostró un buen desempeño diagnóstico para predecir las etapas avanzadas de la fibrosis; sin embargo, su disponibilidad es limitada lo cual representa una dificultad para los países en desarrollo ⁴⁵. En nuestro trabajo, si bien se encontró que los niveles séricos de todos los marcadores evaluados fueron mayores en los individuos con EHGNA que en los controles, TIMP-1 no mostró asociación con los parámetros histológicos de daño hepático, mientras que HA lo hizo en relación con la fibrosis. Es remarcable que los niveles de HA de nuestra cohorte adulta demostró estar relacionados con la progresión de la fibrosis hepática como marcador único, no como componente de un panel. Propiamente, HA demostró estar fuertemente asociado con etapas de fibrosis significativas con una buena precisión diagnóstica en los casos con EHGNA e incluso en los casos con "NASH definitiva" o cuando se agrupan los casos en "*borderline* + NASH definitiva". Es importante destacar que estos resultados con concordantes con los observados por otros autores ^{46,47,48,49}.

En relación a M30, recientemente dicho marcador fue ampliamente validado como un marcador único de EHNA y reconocido como la prueba no invasiva más prometedora en el contexto de la EHGNA ^{8,39,50-54}. En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de M30 estuvieron significativamente elevados

en pacientes con EHNA con respecto a controles y demostraron asociación con el daño hepático. De hecho, el resultado más relevante fue que resultó ser un biomarcador de fibrosis con una alta precisión diagnóstica, que concuerda con el trabajo pionero de Feldstein y col. en la población caucásica^{53,55}. Sin embargo, es importante destacar que el rendimiento de M30 mejoró cuando se combinó en un algoritmo con HA.

La evaluación de HA y M30 puede ser suficiente para predecir fibrosis significativa así como para evaluar la progresión de la fibrosis en los casos de EHNA previamente clasificados, de acuerdo con la biopsia hepática, como Borderline o EHNA. Además, si estos marcadores se aplicaran secuencialmente, se podría lograr una mejor clasificación de los casos (Tabla 5 y 6). Se elegiría HA como el ensayo de primera línea según su precisión diagnóstica, y entonces los casos con valores de HA elevados con respecto al *cut-off* podrían reevaluarse de acuerdo al *cut-off* de M30. En consecuencia, solo aquellos casos que presenten resultados discordantes entre marcadores no evitarían la biopsia hepática.

Finalmente, se debe mencionar que el presente estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el limitado número de casos dificulta la validación de la utilidad de los marcadores séricos. Sin embargo, los resultados obtenidos similitudes con los informados en otras cohortes mayores de individuos adultos con EHGNA. En segundo lugar, solo unos pocos pacientes mostraron fibrosis severa que podría haber sido un factor limitante de la capacidad de los marcadores para distinguir entre la fibrosis leve y la moderada/severa. En tercer lugar, dado que no tomamos en cuenta el tamaño y la fragmentación de la

biopsia, no se pueden descartar errores de muestreo y de estadificación de la fibrosis en las muestras analizadas. De todos modos, si se asume que idealmente, un marcador no invasivo de fibrosis hepática debe ser específico del hígado, fácil de realizar, confiable, reproducible y de bajo costo; las moléculas aquí propuestas poseen estas características. Los biomarcadores no invasivos propuestos en el presente trabajo para el seguimiento de la progresión de la fibrosis en la EHGNA muestran algunas ventajas, como un costo menor que los métodos físicos o patentados (Fibrotest TM, Fibromax TM), simpleza de realización e interpretación y factibilidad para que se lleven a cabo en un centro de atención primaria de un país en desarrollo.

6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo permitieron identificar herramientas relacionadas a la patogenia con resultados promisorios que, por un lado, permitan mejorar y complementar la caracterización histológica de las biopsias hepáticas y el diagnóstico de EHNA; y por el otro, clasificar y evaluar la severidad de la fibrosis mediante técnicas no invasivas.

En el primer caso, según el grado de inflamación, los casos clasificados como *borderline* que presenten un valor de TGF- β mayor al *cut-off* podrían ser clasificados como EHNA y los que se encuentren por debajo como esteatosis simple.

Por el otro lado, la evaluación de los niveles plasmáticos de HA y M30 demostraron ser pruebas sencillas que pueden ser suficientes para predecir la severidad de la fibrosis y para evaluar la progresión de la misma incluso en un centro de atención primaria. Sería útil estudiar cohortes más grandes en nuestra región, quizás en un proyecto multicéntrico, para validar y confirmar nuestros hallazgos. Si estos parámetros son validados en un futuro próximo, serían tan fáciles de evaluar e interpretar, como lo son actualmente AST y ALT, por lo que este enfoque podría ser beneficioso en gran medida a los pacientes afectados por esta patología.

7. Bibliografía

- 1 Lavine, J. & Schwimmer, J. in *Clin Liver Dis* Vol. 8 549-558 (2004).
- 2 Roberts, E. Non-alcoholic Steatohepatitis in Children. *Clin Liver Dis* **11**, 155-172 (2007).
- 3 A, K., P, K., M, G., A, M. & S, S. Profile of Clients Tested HIV Positive in a Voluntary Counseling and Testing Center of a District Hospital, Udupi, South Kannada. *Indian J Community Med* **33**, 156-159, doi:10.4103/0970-0218.42051 (2008).
- 4 Williams, C. D. *et al.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* **140**, 124-131, doi:S0016-5085(10)01416-2 [pii]10.1053/j.gastro.2010.09.038 (2011).
- 5 Bays HE *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6**, 343-368 (2008).
- 6 El-Zayadi, A. Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. *World J Gastroenterol* **14**, 4120-4126 (2008).
- 7 Saito T, Misawa K & S., K. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. . *Intern Med.* **46**, 101-103 (2007).
- 8 Wieckowska, A. *et al.* In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **44**, 27-33 (2006).
- 9 Faouzi S *et al.* Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**, 49077-49082 (2001).
- 10 Maher, J., Leon, P. & Ryan, J. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **48**, 670-678 (2008).
- 11 Xiong Ma *et al.* A High-Fat Diet and Regulatory T Cells Influence Susceptibility to Endotoxin-Induced Liver Injury. *Hepatology* **46** (2007).
- 12 Bravo, A., Sheth, S. & Chopra, S. Liver biopsy. *N Engl J Med.* **344**, 495-500 (2001).
- 13 Thampanitchawong, P. & Piratvisuth, T. Liver biopsy: complications and risk factors. *World J Gastroenterol.* **5**, 301-304 (1999).
- 14 Ratziu, V. *et al.* Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **128**, 1898-1906 (2005).
- 15 Kleiner, D. *et al.* Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Hepatology. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **41**, 1313-1321 (2005).
- 16 Ekstedt, M. *et al.* Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* **61**, 1547-1554, doi:10.1002/hep.27368 (2015).
- 17 Friedman, S. Liver fibrosis: from bench to bedside. *J Hepatol.* **38**, S38-53 (2003).
- 18 Gressner, A. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* **292**, 447-452 (1998).

- 19 Powell, E. *et al.* Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* **31**, 828-833 (2000).
- 20 Gressner, A. & Weiskirchen, R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med.* **10**, 76-99 (2006).
- 21 Plebani, M. & Basso, D. Non-invasive assessment of chronic liver and gastric diseases. 2007. *Clin Chim Acta.* **381**, 39-49 (2007).
- 22 Goto, T. *et al.* Mechanical stretch induces matrix metalloproteinase 1 production in human hepatic stellate cells. *Pathophysiology.* **11**, 153-158 (2004).
- 23 Rust, C. & Gores, G. Apoptosis and liver disease. *Am J Med.* **108**, 567-574 (2000).
- 24 Bantel, H. & Schulze-Osthoff, K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ.* **10**, S48-58 (2003).
- 25 Canbay, A., Friedman, S. & Gores, G. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* **39**, 273-278 (2004).
- 26 Fischer, R., Baumert, T. & Blum, H. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol.* **13**, 4865-4872. (2007).
- 27 Cohen, G. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* **326**, 1-16 (1997).
- 28 Caulin, C., Salvesen, G. & Oshima, R. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology* **138**, 1379-1394 (1997).
- 29 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
- 30 Afdhal, N. & Nunes, D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol.* **99**, 1160-1174 (2004).
- 31 Vernon, G., Baranova, A. & Younossi, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* **34**, 274-285, doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x (2011).
- 32 Morikawa, M., Derynck, R. & Miyazono, K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **8**, doi:10.1101/cshperspect.a021873 (2016).
- 33 Fabregat, I. *et al.* TGF-beta signalling and liver disease. *The FEBS journal* **283**, 2219-2232, doi:10.1111/febs.13665 (2016).
- 34 Yang, L. *et al.* Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology* **59**, 483-495, doi:10.1002/hep.26698 (2014).
- 35 Arora, A. & Sharma, P. Non-invasive Diagnosis of Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of clinical and experimental hepatology* **2**, 145-155, doi:10.1016/S0973-6883(12)60103-0 (2012).
- 36 European Association for the Study of the Liver . Electronic address, e. e. e., European Association for the Study of, D. & European Association for the Study of, O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **64**, 1388-1402, doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004 (2016).

- 37 Lykiardopoulos, B. *et al.* Development of Serum Marker Models to Increase Diagnostic Accuracy of Advanced Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The New LINKI Algorithm Compared with Established Algorithms. *PLoS One* **11**, e0167776, doi:10.1371/journal.pone.0167776 (2016).
- 38 Alkhoury, N. & Feldstein, A. E. Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet? *Metabolism: clinical and experimental* **65**, 1087-1095, doi:10.1016/j.metabol.2016.01.013 (2016).
- 39 Alkhoury, N. & McCullough, A. J. Noninvasive Diagnosis of NASH and Liver Fibrosis Within the Spectrum of NAFLD. *Gastroenterology & hepatology* **8**, 661-668 (2012).
- 40 Dvorak, K. *et al.* Use of non-invasive parameters of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in daily practice--an exploratory case-control study. *PLoS One* **9**, e111551, doi:10.1371/journal.pone.0111551 (2014).
- 41 Leroy, V. *et al.* Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* **99**, 271-279 (2004).
- 42 Mizuno, M. *et al.* Classification of patients with nonalcoholic fatty liver disease using rapid immunoassay of serum type IV collagen compared with that using liver histology and other fibrosis markers. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, doi:10.1111/hepr.12710 (2016).
- 43 Guha, I. N. *et al.* Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* **47**, 455-460, doi:10.1002/hep.21984 (2008).
- 44 Parkes, J. *et al.* Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut* **59**, 1245-1251, doi:10.1136/gut.2009.203166 (2010).
- 45 Martínez, S. M., Crespo, G., Navasa, M. & Forns, X. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 325-335 (2011).
- 46 Suzuki, A. *et al.* Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* **25**, 779-786 (2005).
- 47 Kaneda, H., Hashimoto, E., Yatsuji, S., Tokushige, K. & Shiratori, K. Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology* **21**, 1459-1465, doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04447.x (2006).
- 48 Lesmana, C. R. *et al.* Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of digestive diseases* **10**, 201-206, doi:10.1111/j.1751-2980.2009.00386.x (2009).
- 49 Yoneda, M. *et al.* Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **40**, 371-378, doi:10.1016/j.dld.2007.10.019 (2008).
- 50 Cusi, K. *et al.* Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **60**, 167-174, doi:S0168-8278(13)00596-5 [pii]10.1016/j.jhep.2013.07.042 (2014).

- 51 Feldstein, A. *et al.* Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* **50** (4):1072-8 (2009).
- 52 Feldstein, A. E. *et al.* Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children. *Am J Gastroenterol* **108**, 1526-1531, doi:ajg2013168 [pii]10.1038/ajg.2013.168 (2013).
- 53 Diab, D. *et al.* Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **6**, 1249-1254 (2008).
- 54 Wieckowska, A. & Feldstein, A. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* **28**, 386-395 (2008).
- 55 Yilmaz, Y. *et al.* Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **13**, 837-844 (2007).

Anexo 1: Tablas suplementarias

Tabla 1: Secuencia de iniciadores para la cuantificación de citoquinas

Citoquina	Secuencia	TM (°C)	Longitud del amplicón (ARN)
IFN-γ	Pfw: GAGTGTGGAGACCATCAAGGA Prv: GTATTGCTTTGCGTTGGACA	58	127
TGF-β	Pfw: CTTCCAGCCGAGGTCCTT Prv: CCCTGGACACCAACTATTGC	58	91
IL-10	Pfw: GCTGTCATCGATTTCTTCCC Prv: ACAAAGCCATGAGTGAGTTTGA	58	111
IL-17	Pfw: AACGATGACTCCTGGGAAGAC Prv: CCTGGATTTTCGTGGGATTGTG	60	99

Pfw: *primer/iniciador forward primer*, Prv: *primer/iniciador reverse*

Tabla 2 Secuencia de iniciadores de los genes endógenos

Diana	Secuencia	TM (°C)	Longitud del amplicón (ARN)
HPRT	Pfw: ATGGGAGGCCATCACATTGT Prv: ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA	61	77
β-actin	Pfw: CCACACTGTGCCCATCTACG Prv: CCGTGGTGGTGAAGCTGTAG	62	131

Pfw: *primer/iniciador forward primer*, Prv: *primer/iniciador reverse*

Tabla 3: Eficiencia de amplificación de las citoquinas estudiadas

Citoquina	Eficiencia (%)
IFN-γ	92,27
TGF-β	91,25
IL-10	99,35
IL-17	100,17

Anexo 2: Figuras suplementarias

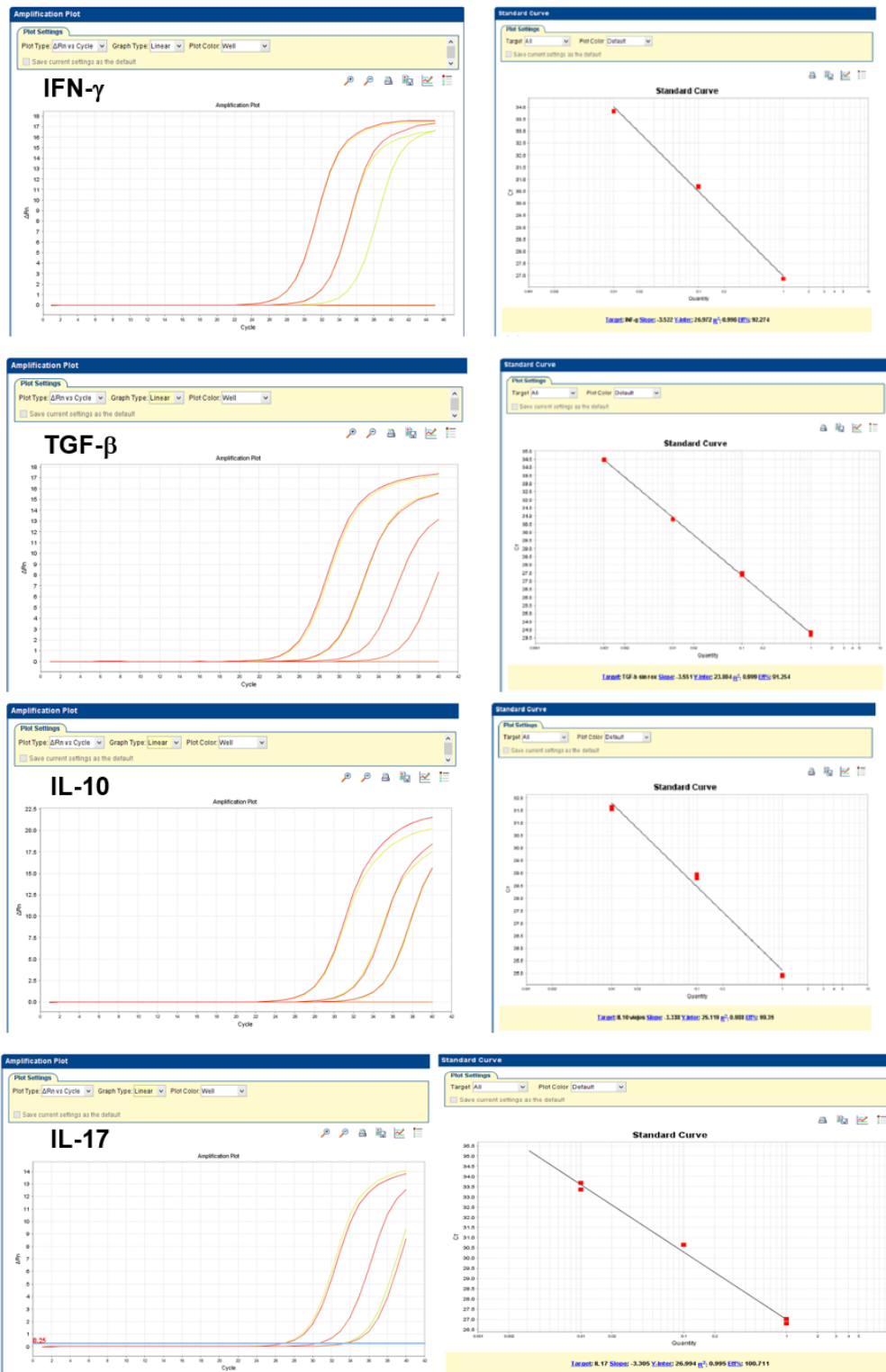
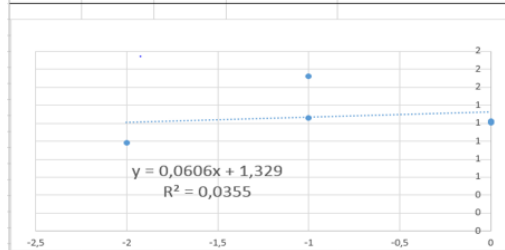


Figura 1: Curvas de Amplificación por q-PCR para IFN- γ , TGF- β , IL-10 e IL17, curva estándar relativa a partir de una concentración 2 ng/ μ l de ADNc obtenido de PBMC estimuladas con OKT3/IL-2; diluciones seriadas 1:10. IFN- γ : Threshold de 0,6; TGF- β : Threshold de 0,4; IL-10: Threshold de 0,225; IL-17: Threshold de 0,25.

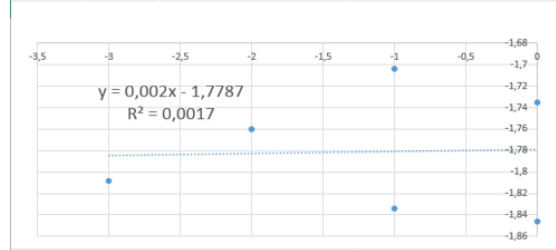
A: IFN- γ

Cantidad	log cantidad	Ct INF γ	HPRT1	delta Ct (IFN-HPRT)
1	0	26,8715191	25,6457634	1
1	0	26,8731804	25,66392517	1,2093
0,1	-1	30,6976452	28,9774704	2
0,1	-1	30,689724	29,42683601	1,2629
0,01	-2	33,8168144	32,83201599	1



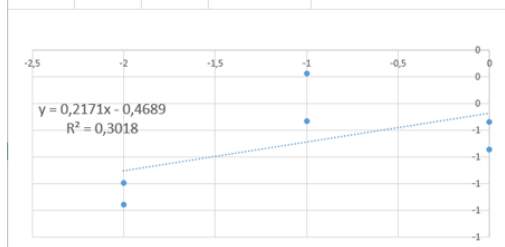
B: TGF- β

Cantidad	log cantidad	Ct TGF β	HPRT1	delta Ct (IFN-HPRT)
1	0	23,69	25,42499924	-1,734999237
1	0	23,83	25,67630005	-1,846300049
0,1	-1	27,41	29,11335945	-1,703359451
0,1	-1	27,49	29,32362556	-1,833625565
0,01	-2	30,79	32,54982758	-1,759827576
0,001	-3	34,47	36,27809525	-1,808095245



C: IL-10

Cantidad	log cantidad	Ct IL10-v	HPRT1	delta Ct (IFN-HPRT)
1	0	24,8919163	25,42499924	-1
1	0	24,9354858	25,67630005	-0,7408
0,1	-1	28,9403934	29,11335945	0
0,1	-1	28,7968521	29,32362556	-0,5268
0,01	-2	31,5593204	32,54982758	-1
0,01	-2	31,6185417	32,77039337	-1



D: IL-17

Cantidad	log cantidad	Ct IL-17	HPRT1	delta Ct (IFN-HPRT)
1	0	27,01	24,90089226	2
1	0	26,8	25,51630211	1,2837
0,1	-1	30,65	28,51439285	2
0,1	-1	30,65	28,53785896	2
0,01	-2	33,68	31,53196907	2
0,01	-2	33,35	31,84191322	1,5081

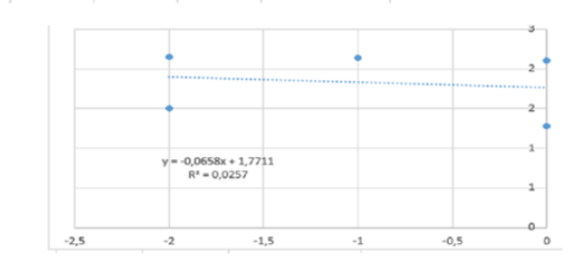


Figura 2: Curvas de regresión lineal para la validación en la cuantificación por el método $\Delta\Delta Ct$ para las citoquinas estudiadas. **A,** IFN- γ ; **B,** TGF- β ; **C,** IL-10; **D:** IL17.