



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS PROTEÓMICOS
ASOCIADOS AL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

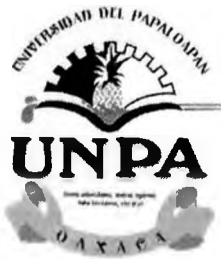
PAOLA LISSETTE MIGUEL ARRIETA

DIRECTOR: DRA. KARLA VIRIDIANA CASTRO CERRITOS

CO-DIRECTOR: DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2023



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 26 de junio de 2023 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Revisión sistemática y meta-análisis de los cambios proteómicos asociados al hígado graso no alcohólico**" presentada por la alumna **Paola Lissette Miguel Arrieta**, con número de matrícula **16090236**, aspirante al título de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de junio de 2023.

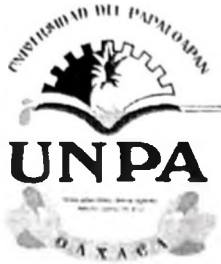
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos
Profesor Investigador Asociado "B"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Edgar García López
Investigador por México UNPA-CONAHCYT
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 27 de junio de 2023
Oficio No. JCIB/004/06/2023

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Paola Lissette Miguel Arrieta** con título final "**Revisión sistemática y meta-análisis de los cambios proteómicos asociados al hígado graso no alcohólico**" aspirante al título de Licenciatura para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar García López (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. José Abad Zavaleta (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú*



Jacqueline Capataz Tafur
Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Hoy

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

c.c.p. Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos. Directora de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Paola Lissette Miguel Arrieta, Alumna, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Agradecimientos

A la Dra. Karla V. Castro Cerritos por formar parte fundamental de este trabajo como directora, por su confianza, dedicación y compromiso.

A mi comité revisor integrado por profesores-investigadores, por su tiempo y conocimientos al encaminar este trabajo: Dr. Miguel Ángel Peña Rico, Dr. Edgar García López, Dr. Paúl Sánchez Ocampo, Dr. José Abad Zavaleta, Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia.

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a mis padres por el amor, educación, apoyo, comprensión y consejos brindados desde temprana edad, hasta la finalización de mi carrera universitaria agradeciendo infinitamente su esfuerzo, y la seguridad de saber que cuento y contaré con su amor y apoyo incondicional.

A todos mis profesores que se esforzaron en transmitir sus conocimientos con amor a su profesión, además de grandes profesionistas, valiosas personas.

A mis amigos que me alentaron desde los primeros semestres, Anahí, Luis A., Juan, Fernando, Ameyalli, Eduardo, Luisa, Margarita, Madeleine, Abiezer, Ángel A. y Marien, que estuvieron junto a mí apoyándome en los momentos difíciles de la carrera; así como a mi compañero y amigo de laboratorio Jair A. que me enseñó que la perseverancia en esta carrera siempre rinde frutos.

I. Índice

Índice de figuras	VII
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	X
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Marco teórico y/o antecedentes	2
2.1 Hígado graso no alcohólico	2
2.2 Diagnostico de la EHGNA	3
2.3 Biomarcadores proteicos para la detección de la EHGNA en plasma	4
2.4 Búsqueda sistemática	6
3. Justificación	7
4. Pregunta general de investigación	8
5. Objetivos	8
5.1 Objetivo general	8
5.2 Objetivos específicos	8
6. Diagrama experimental	9
7. Materiales y métodos	10
7.1 Programas y servidores	10
7.2 Fuentes de información	10
7.3 Herramienta de búsqueda de información	10
7.4 Criterios de elegibilidad	11
7.5 Cribado y extracción de información	12
7.6 Evaluación del riesgo de sesgo	13

8. Resultados.....	15
8.1 Obtención y cribado de los estudios	15
8.2 Estudios seleccionados.....	16
8.3 Características de los estudios seleccionados para el análisis comparativo de estudios proteómicos	17
8.4 Extracción de los datos proteómicos de los estudios seleccionados	19
8.5 Proteínas elevadas en EHGNA en 6 estudios de cohorte	21
8.6 Riesgo de sesgo	22
8.7 Determinación de diferencia de medias estandarizada	24
8.8 Interacción funcional de proteínas incrementadas en EHGNA.....	25
9. Discusión.....	27
10. Conclusión	31
11. Referencias.....	32

II. Índice de figuras

Figura 1. Diagrama experimental de la revisión sistemática	9
Figura 2. Resumen del riesgo de sesgo	14
Figura 3. Diagrama de flujo PRISMA de la revisión sistemática.	16
Figura 4. Coincidencias proteicas incrementadas durante la EHGNA en los 6 estudios seleccionados en <i>Homo sapiens</i>	21
Figura 5. Gráfico de riesgo de sesgo	23
Figura 6. Diagrama de bosque de la proteína afamina.	24
Figura 7. Red de proteínas realizado en el servidor STRING	25
Figura 8. Confianza de la red de proteínas.....	26

III. Índice de tablas

Tabla 1. Herramienta de búsqueda.	10
Tabla 2. Ecuación de búsqueda ajustada a cada base de datos.	11
Tabla 3. Estudios seleccionados derivados del proceso de cribado en la revisión sistemática.	17
Tabla 4. Características de los estudios seleccionados para el análisis comparativo de los datos proteómicos.	18
Tabla 5. Proteínas incrementadas en la EHGNA concurrentes en diversos estudios proteómicos.	20
Tabla 6. Proteínas coincidentes en el estudio con ratones.	22
Anexos	
Anexo 1. Pruebas de normalidad de intensidad de señal de la proteína afamina en estudios de (Niu <i>et al.</i> , 2019).	37
Anexo 2. Datos para el análisis de diferencia de medias estandarizadas.	39
Anexo 3. Tablas de toma de decisiones de riesgo de sesgo	40

Abreviaturas

CTE: Cadena de transporte de electrones.

DT2: Diabetes tipo 2.

EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

I-TRAQ: Siglas en inglés “isobaric tags for relative and absolute quantitation”. Etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta.

LC-MS/MS: Siglas en inglés “liquid chromatography with tandem mass spectrometry”. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

OMS: Obesidad metabólicamente saludable.

PRISMA: Siglas en inglés “preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses”. Es una guía de presentación de informes, diseñada para abordar los problemas en la publicación de revisiones sistemáticas.

SPIDER: Siglas en inglés “sample” (muestra), “phenonemon of interest” (fenómeno de interés), “design” (diseño), “evaluation” (evaluación), “research type” (tipo de investigación).

Resumen

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es un trastorno metabólico que se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos de individuos, independientemente del consumo significativo de alcohol, medicamentos hepatotóxicos, u otras causas conocidas de esteatosis (Bernal *et al.*, 2019). Esta patología no presenta síntomas lo que hace difícil la detección temprana, en sus fases avanzadas el método más certero de diagnóstico es la biopsia hepática, que se considera un método invasivo. Recientemente, han surgido diversas investigaciones del estudio del proteoma plasmático en presencia del hígado graso no alcohólico (HGNA), los biomarcadores plasmáticos son una opción emergente para la detección de etapas tempranas de HGNA debido a la fácil obtención de muestra. En este trabajo se recopiló información mediante una revisión sistemática para determinar las proteínas plasmáticas mayormente afectadas en etapas tempranas de la patología de HGNA. De seis publicaciones que cumplieron los criterios de selección, se obtuvieron 11 posibles marcadores proteicos, de los cuales destaca la proteína afamina plasmática humana (AFM) que se encontró elevada en la mayoría de los estudios analizados, y cuya función se sugiere como de proteína de unión específica para la vitamina E. Por lo tanto, proponemos que los niveles aumentados de esta proteína puedan ser considerados un factor de riesgo y/o potencial marcador de las etapas tempranas de la EHGNA. Las restantes 10 proteínas (ALDOB, HBD, LBP, CRP, FCN3, CA1, PRDX2, CAT, VNN1, ANPEP) participan en procesos relacionados al estrés oxidativo y de respuesta inmune, ambos procesos relacionados a la EHGNA.

En conclusión, la identificación de biomarcadores plasmáticos potenciales para HGNA es un desarrollo prometedor que podría ayudar en la detección temprana y el tratamiento de esta condición. La identificación de AFM como un posible marcador de las primeras etapas de HGNA es particularmente importante, ya que podría ayudar a los médicos a desarrollar mejores estrategias de diagnóstico y tratamiento.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a condition characterized by the accumulation of fat in the liver cells of individuals, regardless of significant alcohol consumption, hepatotoxic drug use, or other known causes of liver disease (Bernal *et al.*, 2019). It is a metabolic disorder that does not typically present any symptoms, which can make it difficult to detect until it reaches advanced stages. In such cases, liver biopsy is considered the most accurate diagnostic method, although it is invasive. Recent studies have focused on the plasma proteome in the presence of NAFLD, as plasma biomarkers are an emerging option for detecting early stages of NAFLD. They offer an easier and less invasive way of obtaining a sample, making it possible to detect the disease earlier. This systematic review aimed to identify the plasma proteins most affected in the early stages of NAFLD. The review analyzed six publications that met the selection criteria and found 11 possible protein markers. Of the 11 possible protein markers identified, human plasma afamin (AFM) was found to be elevated in most of the analyzed studies. AFM is a protein that specifically binds to vitamin E, and its increased levels could be considered a risk factor or potential marker for early stages of NAFLD. The remaining 10 proteins identified, including ALDOB, HBD, LBP, CRP, FCN3, CA1, PRDX2, CAT, VNN1, and ANPEP, are involved in processes related to oxidative stress and immune response, both of which are processes that are associated with NAFLD.

In conclusion, the identification of potential plasma biomarkers for NAFLD is a promising development that could help in the early detection and management of this condition. The identification of AFM as a possible marker for early stages of NAFLD is particularly important, as it could help clinicians in developing better diagnostic and treatment strategies.

1. Introducción

La EHGNA es una enfermedad silenciosa que afecta al 30-40% de la población mundial y se define por la acumulación de triglicéridos a nivel citoplasmático en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de un consumo significativo de alcohol (< 20 g/día), uso de medicamentos hepatotóxicos, alguna infección viral u otra patología hepática preexistente (Ortega *et al.*, 2020). El padecimiento de esta enfermedad es riesgoso ya que al no presentar síntomas en algunos casos puede progresar a etapas más avanzadas de esteatosis finalizando en cirrosis y cáncer hepático, desencadenando un daño mayor en la salud poblacional como se presentó en el año 2019, donde se estima que hubo 485,000 muertes en todo el mundo debido al cáncer de hígado, siendo esta patología la tercera causa principal de muerte por cáncer (Huang *et al.*, 2022).

El hígado al secretar la mayoría de las proteínas del plasma sanguíneo, de algún modo, la presencia de la enfermedad hepática puede afectar el proteoma plasmático y ser detectada (Niu *et al.*, 2019). Las tecnologías proteómicas nos han proporcionado una visión en profundidad del proteoma del plasma sanguíneo, estos cambios los podemos visualizar hoy en día con técnicas analíticas altamente eficientes, como la espectrometría de masas en tándem, especialmente en combinación con cromatografía líquida (LC-MS/MS).

Actualmente, la información disponible respecto a biomarcadores de HGNA está enfocada a etapas avanzadas del espectro de la patología, en fases como esteatohepatitis, fibrosis, y cirrosis; por otro lado, estos biomarcadores se han identificado a partir de distintos tipos de tejidos o muestras sanguíneas, así que no se cuenta con una homogeneidad de resultados, así mismo, se encontraron 3 revisiones sistemáticas relacionadas con el tema, pero sin cumplir el objetivo de revelar proteínas coincidentes en etapas tempranas del HGNA.

2. Marco teórico y/o antecedentes

2.1 Hígado graso no alcohólico

El hígado es un órgano con alta actividad metabólica (Rui, 2014). Participa primordialmente en el mantenimiento de la homeostasis del organismo y realiza otras funciones importantes como la regulación del volumen sanguíneo y de las vías de señalización endócrinas del crecimiento; metabolismo de ácidos grasos; síntesis de proteínas, principalmente la albúmina y factores de coagulación; además de la producción de ácidos biliares, secreción de urea y almacenamiento de compuestos como el glucógeno, vitaminas (A y D), y algunos minerales como el hierro. Es el órgano donde se lleva a cabo la detoxificación o eliminación de xenobióticos y otros compuestos endógenos (Cascales, 2009; Trefts *et al.*, 2017; Alcántara *et al.*, 2017). La síntesis y la descomposición de las proteínas son fundamentales para todas las funciones a nivel celular y de órganos. Como órgano sintético de proteínas, el hígado es responsable del 85-90% del volumen de proteína circulante. El hígado también secreta proteínas de fase aguda, factores de crecimiento y muchos otros péptidos que participan en la regulación sistémica (Trefts *et al.*, 2017).

El hígado graso no alcohólico es la enfermedad hepática más común a nivel mundial y se ha convertido en la primera causa de trasplante hepático en México. Su incidencia ocurre en todos los grupos etarios en población mexicana, especialmente en aquellas personas entre los 40 y 59 años (Ortega *et al.*, 2020). Esta patología se define por la acumulación de triglicéridos a nivel citoplasmático en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de un consumo significativo de alcohol (< 20 g/día), uso de medicamentos hepatotóxicos, alguna infección viral u otra patología hepática preexistente (Ortega *et al.*, 2020). La enfermedad del hígado graso no alcohólico es el resultado de una compleja interacción entre factores ambientales y genéticos; dentro de los ambientales, parece existir desequilibrio entre la cantidad de energía tomada de la dieta y la cantidad utilizada durante el ejercicio cotidiano ocasionando sobrepeso (Academia nacional de medicina UNAM, 2015). La obesidad provoca un desequilibrio en el metabolismo hepático, desencadenando eventos histológicos que se caracterizan por la muerte de las células hepáticas esteatóticas y la liberación anormal de enzimas, lo cual provoca inflamación hepática (Tapia & Martínez, 2021). La EHGNA se clasifica histológicamente en esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica (EHGNA con o sin fibrosis).

2.2 Diagnóstico de la EHGNA

La mayoría de los pacientes con EHGNA son asintomáticos y solo una minoría son sintomáticos con quejas vagas como fatiga, malestar general, malestar abdominal en el cuadrante superior derecho y hepatomegalia, hasta que la afección progresa a etapas avanzadas con cambios inflamatorios en diferentes niveles de fibrosis y cirrosis hepática (Muhammad, 2019). La sospecha de esta patología a menudo comienza por la presencia de esteatosis hepática en la ecografía abdominal durante los controles de salud de rutina o las visitas clínicas por otras enfermedades entre las personas no alcohólicas (Hashimoto *et al.*, 2013). El diagnóstico de la EHGNA requiere la presencia de esteatosis hepática por imagen o histología y la ausencia de un consumo significativo de alcohol. Sin embargo, el diagnóstico por imagen tiene varias limitaciones; es subjetivo, dependiente del operador, muestra poca sensibilidad para la detección de esteatosis leve y es una herramienta pobre para cuantificar la esteatosis (Hashimoto *et al.*, 2013). La tomografía computarizada como la resonancia magnética parecen ser técnicas más objetivas y sensibles para la cuantificación de la esteatosis, pero la resonancia magnética todavía está menos disponible y es mucho más cara (Hashimoto *et al.*, 2013). Respecto a la biopsia hepática se considera el estándar de oro en los pacientes con HGNA para definir la EHGNA, aunque existen desventajas bien reconocidas, como el costo, el error de muestreo, la variabilidad inter/intra observador y el procedimiento (Piazzolla & Mangia, 2020). Además, la alta prevalencia de HGNA hace que la biopsia de rutina para todos los pacientes sea poco práctica. Por lo tanto, está reservado únicamente para pacientes con EHGNA con mayor riesgo de fibrosis avanzada, o pacientes con esteatohepatitis cuando las puntuaciones/métodos de imagen no invasivos dan resultados discordantes y no se pueden excluir otras enfermedades hepáticas crónicas (Papatheodoridi & Cholongitas, 2018). En resumen, no se dispone de métodos confiables ampliamente aceptados además de la biopsia hepática para la diferenciación no invasiva o mínimamente invasiva y la estimación del riesgo de esteatosis simple y EHGNA en la práctica habitual (Piazzolla & Mangia, 2020).

En las últimas dos décadas, se han realizado numerosos esfuerzos de investigación para desarrollar métodos no invasivos precisos, fácilmente disponibles y rentables en la EHGNA. Los biomarcadores plasmáticos son los principales representantes de las modalidades diagnósticas no invasivas, tratando de responder a las principales preguntas diagnósticas en EHGNA.

(Papatheodoridi & Cholongitas, 2018). Un biomarcador es una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o una respuesta a una exposición o intervención (Geyer *et al.*, 2017).

2.3 Biomarcadores proteicos para la detección de la EHGNA en plasma

El análisis clínico de sangre es el procedimiento de diagnóstico más extendido en medicina, y los biomarcadores sanguíneos se utilizan para categorizar a los pacientes y respaldar las decisiones de tratamiento. La mayoría de los estudios de búsqueda de biomarcadores de la EHGNA han propuesto múltiples biomarcadores plasmáticos, por ejemplo, los niveles de la proteína PAI1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1) se han visto aumentados en diversos estudios en presencia de la EHGNA. PA1 es una glicoproteína plasmática de cadena única de 52 kDa que se sintetiza en el hígado y las células endoteliales (Kitchens *et al.*, 2007) y es el principal inhibidor de la fibrinólisis, es miembro de la superfamilia de inhibidores de proteinasas y su nombre se debe a su capacidad de inhibir a los activadores del plasminógeno.

Por parte de Holzberg *et al.* (2016), estudios han demostrado que PAI1 está asociado con HGNA de manera independiente del peso corporal, índices de resistencia a la insulina y marcadores inflamatorios. Con resultados similares, un estudio de Long *et al.* (2020) menciona que incluso después de la exclusión de factores clínicos y metabólicos, solo PAI1 podía predecir EHGNA.

La adiponectina también ha sido sugerida como un factor de riesgo independiente para HGNA o disfunciones hepáticas. En comparación con los controles sanos, los niveles de adiponectina son inferiores en más del 50 % en los pacientes con EHGNA. La adiponectina es una proteína que consta de 244 aminoácidos y caracterizada por un peso molecular de 28 kDa, es una citoquina secretada por los tejidos adiposos (adipoquina) (Khoramipour *et al.*, 2021). La adiponectina es secretada por los adipocitos que regulan el metabolismo energético del organismo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina (Palomer *et al.*, 2005). En el estudio de Long *et al.* (2020) se menciona que las adiponectinas están involucradas en la patogenia de la EHGNA y está estrechamente relacionado con la gravedad de la EHGNA. Del mismo modo en el estudio de Ajmera *et al.* (2017) se encontró una asociación de la disminución de adiponectina y esteatosis significativa que contrasta estudios previos que sugieren una

asociación inversa con la gravedad de EHGNA, confirmando asociaciones inversas de adiponectina previamente documentadas con esteatosis hepática.

Por otro lado, la espectrometría de masas se ha convertido en una tecnología poderosa en la investigación biológica y ahora está lista para permitir la caracterización del proteoma plasmático en gran profundidad. El desarrollo de la espectrometría de masas junto con tecnologías altamente eficientes ha favorecido la identificación de nuevos biomarcadores de la EHGNA (Piazzolla & Mangia, 2020). El análisis proteómico, permite la identificación y cuantificación de cientos de proteínas de manera simultánea con alta precisión, a través de la identificación de la secuencia aminoacídica de los péptidos derivados de la digestión de proteínas (Geyer *et al.*, 2017).

Se han encontrado revisiones sistemáticas asociadas a la enfermedad de HGNA, entre ellas, tres son relacionadas a los biomarcadores; en el caso de Ladaru *et al.* (2016), fue la revisión más completa, incluso encontramos 2 publicaciones coincidentes con esta revisión, presentó diferentes biomarcadores provenientes de diferentes tipos de muestras como plasma/suero, lípidos, y tejido hepático, solamente se identificó la presencia de las proteínas, no realizó ningún tipo de comparación cuantitativa entre ellas, debido a su heterogeneidad no se logró efectuar un análisis más profundo; la segunda revisión sistemática fue por parte de Alkhouri & Feldstein, (2016), realizando una recopilación de herramientas diagnósticas no invasivas en etapas avanzadas de HGNA, entre ellas se mencionan los biomarcadores; la tercera revisión sistemática fue realizada por Liu *et al.* (2018), quienes recopilaron biomarcadores de microRNAs en fases de fibrosis y esteatohepatitis.

Diversos estudios proteómicos individuales han sido publicados con el propósito de encontrar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la EHGNA, una búsqueda rápida en la base de datos de PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los términos “((Proteomics) AND (Non alcoholic fatty liver disease)) AND (“2000”[Date - Entry]: “3000”[Date - Entry])” genera 366 resultados del año 2000 a la fecha. En promedio, cada estudio proteómico llega a identificar hasta 1500 proteínas, de las cuales alrededor de 96 proteínas coincidentes en los estudios se muestran alteradas en la EHGNA, por lo que la cantidad de información generada en dichos estudios es considerable.

La cantidad de información requiere la búsqueda de las incidencias de cambios proteómicos de algunas proteínas para proponerlas como biomarcadores de EHGNA, por eso la relevancia de realizar una revisión sistemática y su respectivo meta-análisis.

2.4 Búsqueda sistemática

La revisión sistemática es un método objetivo y reproducible para encontrar respuestas a una determinada pregunta de investigación, recopilando todos los estudios disponibles relacionados con esa pregunta, revisando y analizando sus resultados (Ahn & Kang, 2018).

Las revisiones sistemáticas surgen debido al incremento exponencial de la información, diseñadas para encontrar estudios relacionados, analizar críticamente los resultados y extraer los que puedan ser útiles (Villasís *et al.*, 2020). Existen dos tipos de revisiones sistemáticas (cualitativas o cuantitativas/meta-análisis). Las revisiones cualitativas presentan la evidencia en forma “descriptiva” y sin análisis estadístico, también conocidas como revisiones sistemáticas (revisiones sistemáticas sin meta-análisis). Las revisiones cuantitativas también pueden presentar la evidencia de forma descriptiva, pero la gran diferencia versus la revisión cualitativa radica principalmente en el uso de técnicas estadísticas para combinar “numéricamente” los resultados frente a un estimador puntual, también denominado “meta-análisis” (Aguilera, 2014). El meta-análisis es el término utilizado para describir el análisis estadístico de la combinación de los resultados de dos o más estudios originales (Villasís *et al.*, 2020).

Como toda investigación, para llevar a cabo cualquier revisión sistemática es necesario iniciar con la elaboración de un protocolo, el proceso consta de 5 fases. 1. Formulación de la pregunta de búsqueda; 2. Realizar la búsqueda en las bases de datos más importantes; 3. Comprobación de la validez de los estudios hallados con criterios de inclusión y exclusión; 4. Extracción de los datos; 5. Análisis de los resultados (Molina, 2013).

3. Justificación

El hígado graso no alcohólico ha llegado a ser la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica a nivel mundial y se ha convertido en la primera causa de trasplante hepático en México, al ser una patología asintomática es un punto de partida para la progresión a etapas más agresivas como fibrosis o cirrosis, actualmente no se cuenta con una técnica de diagnóstico no invasiva precisa para diagnosticar esta patología. Teniendo en cuenta la función del hígado al secretar proteínas plasmáticas, la detección de un biomarcador plasmático para detectar la EHNA puede ser una alternativa más segura y accesible. En los últimos años, han surgido diversos estudios independientes de los cambios en el proteoma plasmático en presencia de la patología del HGNA que llevan a proponer biomarcadores plasmáticos, entre ellos se encontraron revisiones sistemáticas enfocadas a etapas avanzadas de HGNA y utilizando diferentes fuentes de muestras, por esto último, los resultados no presentaron homogeneidad así mismo no se lograron realizar comparaciones entre los diferentes biomarcadores; en esta revisión se buscó la mayor homogeneidad posible, desde la etapa temprana de la patología, tipo de muestra, tipo de biomarcador, y tipo de análisis proteómico, para lograr analizar los resultados con mayor precisión.

En este trabajo, se pretende recopilar, evaluar y contrastar la información generada de dichos estudios. El objetivo final es sugerir una o más proteínas que puedan ser utilizadas como biomarcadores para el diagnóstico temprano de esta patología hepática.

4. Pregunta general de investigación

¿Cuáles son los cambios proteómicos asociados al HGNA en etapas tempranas?

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar proteínas relacionadas con el desarrollo de HGNA mediante una revisión sistemática y meta-análisis.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar una revisión sistemática de la literatura existente que sobre los cambios proteómicos observados en plasma de pacientes diagnosticados con EHGNA.
- Determinar mediante un meta-análisis las proteínas más fuertemente alteradas (incrementadas o disminuidas) en pacientes diagnosticados con EHGNA.

6. Diagrama experimental

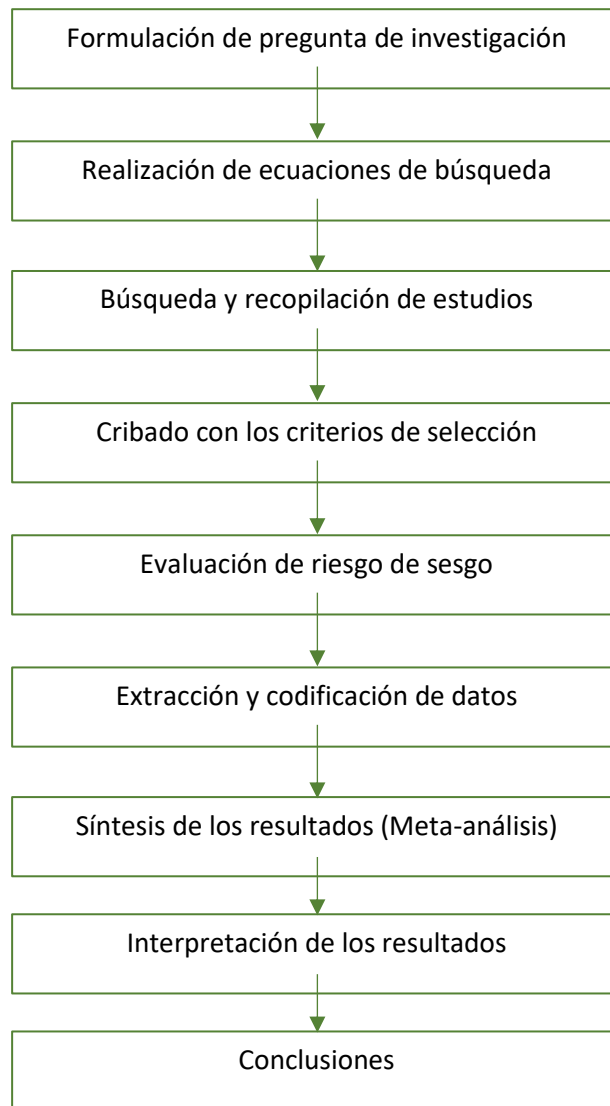


Figura 1. Diagrama experimental de la revisión sistemática

7. Materiales y métodos

7.1 Programas y servidores

Para realizar la búsqueda de información, revisión sistemática y meta-análisis se hicieron uso de los siguientes buscadores y herramientas bioinformáticas.

1. Servidor PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/>)
2. Servidor Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/search>)
3. Servidor Google Scholar (https://scholar.google.com.mx/#d=gs_asd&t=1672776846194)
4. Servidor rayyan (<https://www.rayyan.ai/>)
5. Programa RevMan 5.4 (Review Manager Cochrane)
6. Programa SPSS 21 (International Business Machines (IBM))
7. Servidor STRING
(https://stringdb.org/cgi/input?sessionId=bPXEbnc9i9LI&input_page_show_search=on)
8. Servidor Uniprot (<https://www.uniprot.org>)
9. Servidor Human Annotated and Predicted Protein Interactions (HAPPY)
(<http://discovery.informatics.uab.edu/HAPPI/index.php>)

7.2 Fuentes de información

La búsqueda se concentró en 3 bases de datos, PubMed, Science Direct, y Google Scholar. La última vez que se ingresó la ecuación de búsqueda en los servidores fue el 31 de diciembre del 2022 a las 12:41 pm.

7.3 Herramienta de búsqueda de información

La herramienta elegida para la búsqueda de información fue la herramienta SPIDER (Methley *et al.*, 2014), la ecuación de búsqueda que se usó en las fuentes de información fue planteada a partir de esta herramienta. La ecuación de búsqueda funge como un primer filtro en el cúmulo de información. Se usaron sinónimos, operadores booleanos y términos MeSH.

Tabla 1. Herramienta de búsqueda.

S	Muestra	Plasma OR Serum
PI	Fenómeno de interés	NAFLD OR simple steatosis
D	Diseño	Cohort
E	Evaluación	LC-MS/MS OR LC-MS
R	Tipo de resultado	Biomarker AND (Proteomics OR proteins)

Tabla 2. Ecuación de búsqueda ajustada a cada base de datos.

Base de datos	Ecuación de búsqueda
PubMed	((((Plasma OR Serum)) AND (NAFLD OR simple steatosis)) AND (LC-MS OR LC-MS/MS)) AND (Biomarker AND (Proteomics OR proteins))) AND (("2009/01/01"[Date - Publication] : "2022"[Date - Publication]))
Science Direct	"Plasma" OR "Serum" AND "NAFLD" AND "LC-MS" AND "Biomarker" Year: 2009-2022 Title, abstract, keywords: "Biomarker" AND "NAFLD" Research articles
Science Direct (español)	"Plasma" OR "Suero" AND "Biomarcadores" OR "proteínas" AND "HGNA" OR "EHGNA" AND "LC-MS/MS" Title, abstract, keywords: "Biomarcadores" AND "HGNA" OR "EHGNA"
Google Scholar	"Plasma" OR "Serum" + "NAFLD" + "LC-MS/MS" OR "LC-MS" + "Biomarker" + "Proteomics OR proteins" + "Research articles"
Google Scholar (español)	"Plasma" OR "Suero" + "Biomarcadores" OR "proteínas" + "HGNA" OR "EHGNA" + "LC-MS"

7.4 Criterios de elegibilidad

Los estudios que arrojaron las bases de datos fueron evaluados para determinar si cumplían con la información y especificaciones necesarias que se requieren. Los textos útiles para la revisión sistemática fueron diseños de estudios que nos proporcionaron información descriptiva. La temporalidad se consideró en un intervalo de 13 años, desde el 2009.

Criterios de inclusión:

1. Organismo: Humanos y ratones
2. Tipo de muestra: Plasma o suero
3. Tamaño mínimo de muestra: 3 por grupo
4. Tipo de análisis proteómico: LC-MS/MS, SELDI-TOF, I-TRAQ
5. Estudios con repositorios públicos disponibles
6. Diseños de estudios de cohorte
7. Patología en estado inicial del espectro del HGNA (esteatosis simple)

Criterios de exclusión:

1. Documentos duplicados
2. Tipo de publicación (revisiones, posters, manuales, etc.)
3. Información de la metodología principal no mencionados ni especificados
4. Patología del HGNA no presente cuando se toma la muestra (en el caso que sea la cohorte patológica)
5. Patología del espectro del HGNA avanzada
6. El análisis proteómico no incluya espectrometría de masas
7. Inconsistencias en la metodología y los resultados
8. Análisis proteómico en la patología del HGNA enfocado a respuesta a un tratamiento

7.5 Cribado y extracción de información

Los archivos se descargaron en formato reducido (.txt) e ingresados en el servidor rayyan con fin de realizar su cribado. Para la codificación de protocolos se tomó en cuenta la fecha de publicación, diseño de estudio, tipo de muestra, tamaño de muestra, tipo de análisis proteómico, identificación de la patología, recolección de muestra, proteínas diferenciales, tratamiento de la muestra, aplicación de la técnica de identificación proteica, país y los datos de razón de cambio de las proteínas correspondientes. La razón de cambio se consideró como la intensidad de la proteína en la muestra patológica entre la intensidad de la muestra control. Las proteínas que presentaban una razón de cambio mayor e igual a 1.2 (aumentadas en la patología) o menor e igual a 0.8 (disminuidas en la patología) fueron extraídas de esos documentos para realizar posteriormente la comparación con otros estudios seleccionados.

7.6 Evaluación del riesgo de sesgo

Se evaluaron 6 dominios:

- a) Sesgo por confusión. Se refiere a que la variable asociada a la patología, en este caso las proteínas asociadas a EHGNA, estén causalmente ligadas al estudio y se encuentren en otras condiciones como obesidad o diabetes, por lo tanto, en el caso de que el grupo control presente estas condiciones, y así mismo las proteínas, tendríamos resultados discordantes, por eso fue necesario conocer este punto, en el caso de que ocurra se pueda manejar.
- b) Sesgo en la selección de los participantes en el estudio. Esto ocurre cuando se eligen o descartan participantes para obtener una respuesta deseada, o cuando no se cuenta con los participantes suficientes; en el caso de los estudios observacionales como los estudios de cohortes, los participantes son personas que padecen la patología y no son inducidas a la patología, por lo tanto no se puede establecer una población y luego inducirla, así que se trabaja con los pacientes que se llegan a conseguir y voluntarios, los estudios observacionales presentan esta desventaja, en consecuencia, concuerda el sesgo esperando con el obtenido en este dominio.
- c) Sesgo de mala clasificación o sesgo de la clasificación no diferencial. Son errores introducidos por los investigadores al medir las variables, en este caso son la identificación de patología y grupo control, para asegurarse que estos pacientes se encuentren en el grupo adecuado, la identificación de la patología se realizó por resonancia magnética en el grupo de los niños y en el resto de los casos fue por histología, también se realizaron pruebas de laboratorio y antropométricas.
- d) Sesgo en la medición del resultado. Se refiere a si el método utilizado fue el apropiado o si puede diferir entre grupos, en esta revisión, todo se cuantificó usando LC-MS, y el protocolo fue igual para ambos grupos de un estudio.
- e) Sesgo en la selección del resultado informado. Se menciona que el resultado haya sido obtenido de múltiples mediciones, y que los datos hayan sido obtenidos a partir de un plan de análisis establecido, los estudios realizaron a partir de varios pacientes, se obtuvieron siguiendo un protocolo, además en algunos casos se realizó el muestreo por triplicado.

- f) Sesgo del método estadístico. Los estudios realizaron métodos estadísticos apropiados a la naturaleza de los datos y se aplicaron a ambos grupos. Los sesgos se explican a detalle de cada estudio en anexo 3.

Bell et al., 2010	+	+	+	+	+	+	Sesgo por confusión
Cheng et al., 2022	+	+	+	+	+	+	Sesgo en la selección de participantes en el estudio
Malecki et al., 2020	+	+	+	+	+	+	Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial
Miller et al., 2014	+	+	+	+	+	+	Sesgo en la medición del resultado
Niu et al., 2019	+	+	+	+	+	+	Sesgo en la selección del resultado informado
Niu et al., 2019a	+	+	+	+	+	+	Sesgo de método estadístico

Figura 2. Resumen del riesgo de sesgo. Evaluación de los revisores sobre cada dominio de riesgo de sesgo para cada estudio incluido.

Los gráficos se realizaron en el programa RevMan 5.4 (Review Manager Cochrane), dentro del software, se seleccionó “archivo”, seguido de “nuevo”, se registraron los campos con los datos del autor de revisión que se solicitaron y se guardó; el ingreso de información se efectuó con los siguientes pasos:

- En la sección de “Estudios y referencias”, se registró la información de identificación de las publicaciones resultantes de la revisión sistemática.
- En la sección de “Tablas”, se ajustó los dominios y se seleccionó la decisión de “bajo riesgo de sesgo”, “poco claro riesgo de sesgo”, o “alto riesgo de sesgo”, mientras se justificó la opción seleccionada describiendo la forma en que se aplicó el protocolo, si se sesgó o se realizó de manera uniforme.
- En la sección de “Datos y análisis”, se agregó datos resultantes de los estudios que contaban con esa información, se ingresó medias de las intensidades de señal, desviaciones estándar y la cantidad de pacientes que participaron por cada grupo (control o HGNA); con esta información se obtuvo la diferencia de medias estandarizadas del meta-análisis. Los datos usados se encuentran en el anexo 2.
- En la sección de “figuras”, se seleccionó “agregar nueva figura”, se desplegó una ventana de opciones, y se seleccionó “Gráfico de riesgo de sesgo” para los gráficos de riesgo de sesgo, o “Diagrama de bosque” para el gráfico con datos estadísticos de la diferencia de medias estandarizadas.

8. Resultados

8.1 Obtención y cribado de los estudios

La pregunta de investigación a contestar fue ¿Cuáles son los cambios proteómicos asociados al HGNA en etapas tempranas? Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar las proteínas más comúnmente alteradas en la EHGNA, debido a esto se planteó una ecuación de búsqueda que incluye los términos “PROTEOMICS”, “NAFLD” y “LC-MS”, como se describe en la sección de materiales y métodos. Se obtuvieron un total de 307 resultados desde el año 2009 al 31 de diciembre del 2022, extraídos de las bases de datos PubMed, Science Direct, y Google Scholar. El proceso de cribado se realizó como se indica en la figura 3. Los estudios duplicados fueron identificados por el servidor rayyan, eliminando de este modo 32 publicaciones. La primera fase de exclusión se realizó en base la lectura de título y resumen. La mayor parte de estudios excluidos se debió a que estaban enfocados a un tratamiento, es decir, se evaluaba el efecto de alguna intervención terapéutica, excluyendo de este modo a 107 publicaciones. Otro criterio importante fue la técnica de identificación de las proteínas que debía ser basada en un método de espectrometría de masas, ya que proporciona un mayor grado de certeza de la identidad de una proteína, por lo tanto, se eliminaron 33 publicaciones que no cumplían este criterio. El tercer grupo de artículos descartados se debió a que la patología de HGNA se encontraba en una fase avanzada como esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis, así que, estos estudios no podían ser aptos para etapas iniciales de EHGNA, por lo tanto 28 estudios fueron descartados. Un cuarto grupo de 11 artículos no fueron considerados debido a que el estudio no incluía análisis proteómico. Como quinto grupo se encontraron 32 artículos que se eliminaron por tipo de publicación, se trataba de carteles, boletines, y revisiones.

En la segunda fase, se descartaron 52 estudios en los que el tipo de muestra no correspondía a plasma o suero, otros 5 no contaban con repositorio de datos disponibles, finalmente 1 estudio descartado se excluyó debido a una inconsistencia, como fue el caso de dos publicaciones realizadas por el mismo autor, donde se presentaban los mismos datos de intensidad de señal, así que se optó por solo usar un documento, se seleccionó el que contaba con una versión más extensa.

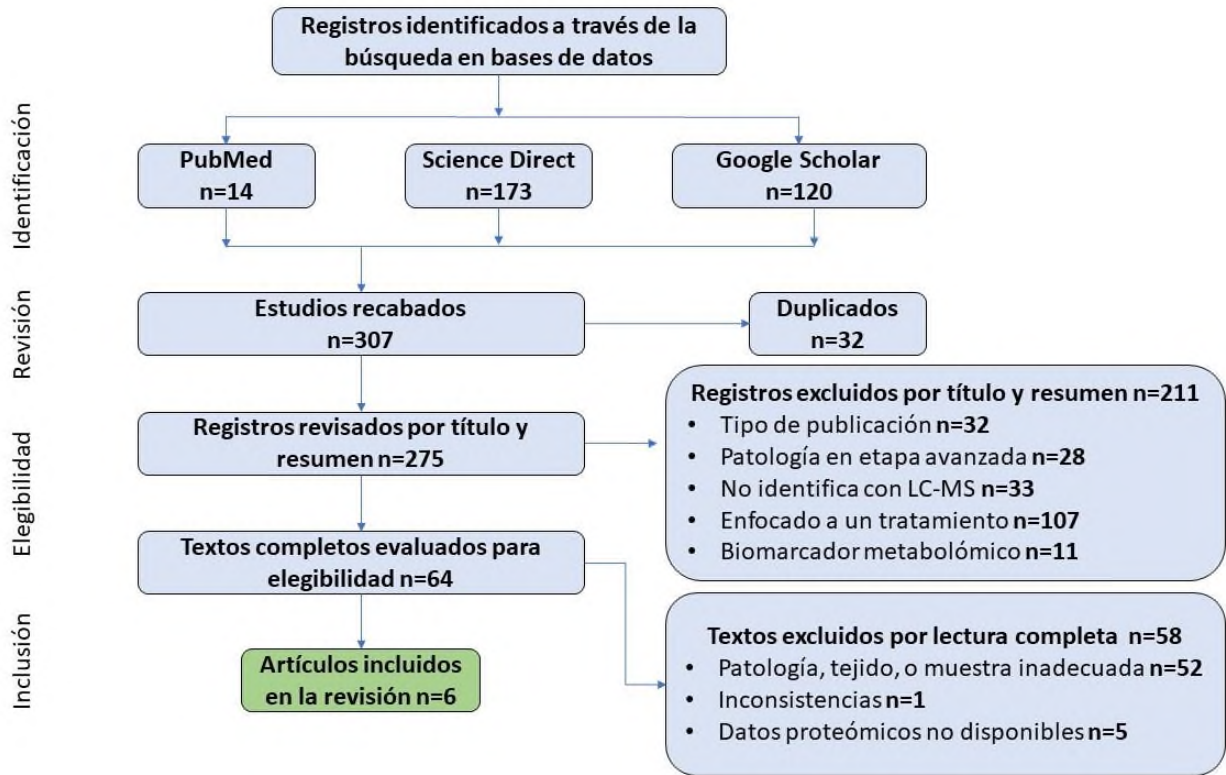


Figura 3. Diagrama de flujo PRISMA de la revisión sistemática.

8.2 Estudios seleccionados

Derivado del proceso de cribado, se obtuvieron 6 documentos que cumplieron los criterios de inclusión planteados en la sección de materiales y métodos, tales artículos se describen en la tabla 3. Las características de los estudios realizados se muestran en la tabla 4, donde se puede observar que 6 de ellos son reportados en humanos, y la mayor parte se realizaron con muestras de suero. Además, se incluyó 1 publicación realizada en ratones. Respecto a su nacionalidad se incluyen países de Europa, Asia y América.

Tabla 3. Estudios seleccionados derivados del proceso de cribado en la revisión sistemática.

N	Título	Cita	Estudios ID
1	Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease	(Niu <i>et al.</i> , 2019)	E1 E1b
2	Serum proteome profiling reveals differentially expressed proteins between subjects with metabolically healthy obesity and nonalcoholic fatty liver disease	(Cheng <i>et al.</i> , 2022)	E2
3	Serum proteome assessment in nonalcoholic fatty liver disease in children: a preliminary study	(Małeck <i>et al.</i> , 2020)	E3
4	Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease	(Bell <i>et al.</i> , 2010)	E4
5	The serum proteome of nonalcoholic fatty liver disease: A multimodal approach to discovery of biomarkers of nonalcoholic steatohepatitis	(Miller <i>et al.</i> , 2014)	E5
6	Integrated Liver and Plasma Proteomics in Obese Mice Reveals Complex Metabolic Regulation	(Stocks <i>et al.</i> , 2022)	E6

8.3 Características de los estudios seleccionados para el análisis comparativo de estudios proteómicos

En cada estudio se verificó el método de diagnóstico de la patología, se observó que, en 5 de 6 estudios en humanos, se utilizaron de 10-24 pacientes por grupo con EHGNA diagnosticados por métodos como la histología, mientras que en el trabajo realizado en 16 niños se identificó la EHGNA por medio de resonancia magnética. En todos los pacientes patológicos se realizaron pruebas bioquímicas y antropométricas, así mismo se descartaron las muestras de pacientes que presentaban otras enfermedades. En suma, estos estudios incluyen a 87 pacientes diagnosticados con EHGNA y 81 voluntarios sin la patología de HGNA. En el caso de los ratones son 7 ratones ob/ob con 4 meses de edad presentando esteatosis simple y 7 ratones del tipo silvestre como control.

En cada estudio se identificaron proteínas de las cuales de 500 a 1700 se observaron diferencialmente en los pacientes con EHGNA, la mayoría de las proteínas alteradas son proteínas aumentadas en el grupo patológico, poco comúnmente se mencionan las proteínas disminuidas en las muestras patológicas. De acuerdo con los criterios de elegibilidad se consideraron las

proteínas que presentaron una razón de cambio mayor e igual a 1.2 y menor e igual a 0.8 quedando de esta manera desde 14 a 360 proteínas por estudio.

Tabla 4. Características de los estudios seleccionados para el análisis comparativo de los datos proteómicos. Los estudios fueron del tipo cohorte, la técnica analítica de identificación fue LC-MS/MS, la especie usada en los estudios fue *Homo sapiens*. Solo en el estudio E6 se usaron muestras de ratones*.

Estudio ID	Muestra	Grupo control	Grupo patológico	Proteínas identificadas	País
E1	Plasma	10 pacientes obesos sin HGNA	10 pacientes obesos con HGNA	684	Dinamarca
E1b	Plasma	08 pacientes con diabetes tipo 2	10 pacientes con diabetes tipo 2 y HGNA	684	Dinamarca
E2	Suero	23 pacientes con OMS sin HGNA	20 pacientes con obesidad y HGNA	981	China
E3	Suero	14 pacientes sin obesidad y sin HGNA	16 pacientes obesos con HGNA	297	Polonia
E4	Suero	16 pacientes obesos sanos	24 pacientes obesos con HGNA	1700	USA
E5	Suero	10 pacientes sanos	7 pacientes con HGNA	556	Escocia
E6	Plasma*	07 ratones tipo silvestre	7 ratones macho ob/ob (4 semanas) esteatosis	592	Suecia

8.4 Extracción de los datos proteómicos de los estudios seleccionados

Para realizar la comparación entre las proteínas, se normalizaron los datos de cuantificación de cada proteína y razón de cambio. Los estudios E1, E1b de Niu *et al.* (2019) y E6 de Stocks *et al.* (2022), no contaban con datos de razón de cambio, pero tenían disponibles sus repositorios de datos complementarios con las intensidades de señal de las muestras proteómicas por cada grupo, a partir de estos datos se obtuvieron los datos de razón de cambio. En el caso del estudio E4 de Bell *et al.* (2010), los datos que se tenían eran de razón de cambio en escala LOG2, por lo que se aplicó un antilogaritmo de base 2. El estudio E3 de Małecki *et al.* (2020), fue el estudio que incluía razón de cambio e intensidad de señal por lo que no se realizó ningún procedimiento adicional a estos datos. Los demás estudios como el estudio E2 de Cheng *et al.* (2022), y el E5 de Miller *et al.* (2014) solo contaban con los datos de razón de cambio. Los datos fueron estandarizados para realizar su comparación de razón de cambio. Se extrajeron los datos de razón de cambio mayor e igual a 1.2 y menor e igual a 0.8 tomando en cuenta que la razón de cambio fuera expresada como abundancia de la proteína en la muestra patológica/ abundancia en la muestra control, de estas se aislaron las proteínas coincidentes en al menos 3 estudios y se comprobó su identidad mediante la búsqueda de sus números de identificación, en la base de datos HAPPY.

Tabla 5. Proteínas incrementadas en la EHGNA concurrentes en diversos estudios proteómicos.

N	Gen	Proteína	Estudio ID	Razón de cambio*	Función
1	AFM	Afamina	E1	1.2	Transporte de vitamina E.
			E1b	1.4	
			E2	1.5	
			E3	1.2	
			E5	1.6	
2	HBD	Subunidad delta de hemoglobina	E1	1.3	Transporte de oxígeno.
			E1b	1.2	
			E5	2.7	
3	LBP	Proteína de unión a lipopolisacáridos	E1	1.3	Inmunidad; se une a la fracción de lípido A de los lipopolisacáridos bacterianos.
			E1b	1.2	
			E5	1.3	
4	CRP	Proteína C-reactiva	E1	2.7	Inmunidad; promueve aglutinación, inflamación capsular bacteriana, y fagocitosis.
			E1b	3.1	
			E5	1.7	
5	FCN3	Ficolina-3	E1	1.5	Inmunidad; activación de la vía del complemento de lectina.
			E1b	1.3	
			E2	1.4	
6	CA1	Anhidrasa carbónica 1	E1	1.2	Cataliza la hidratación reversible del CO ₂ .
			E1b	1.3	
			E5	1.6	
7	ALDOB	Fructosa-bisfosfato aldolasa B	E1	3.3	Cataliza de la degradación de carbohidratos.
			E1b	1.9	
			E5	1.3	
8	PRDX2	Peroxirredoxina-2	E1	1.2	Cataliza de la reducción de H ₂ O ₂ .
			E1b	1.3	
			E5	2.3	
9	CAT	Catalasa	E1	1.5	Cataliza la degradación de H ₂ O ₂ .
			E1b	1.4	
			E5	1.8	
10	VNN1	Pantetinasa	E1	1.5	Hidrólisis de uno de los enlaces carboamida en la D-panteteína.
			E1b	1.3	
			E5	1.6	
11	ANPEP	Aminopeptidasa N	E1	2.3	Hidrólisis de proteínas por proteasas gástricas y pancreáticas.
			E1b	1.2	
			E5	2.4	

*razón de cambio (media de la expresión de la proteína en los pacientes con EHGNA/ media de la expresión de la proteína en grupo control)

8.5 Proteínas elevadas en EHGNA en 6 estudios de cohorte

De las proteínas que mostraron una expresión incrementada en razón de cambio (HGNA/Control), se seleccionaron las proteínas coincidentes en al menos 3 estudios. Se obtuvieron 11 proteínas cuyas características se muestran en la tabla 5. En la figura 4 se pueden observar las coincidencias en los diversos estudios en humanos. De ellas la proteína afamina coincidió en 5 distintos trabajos, mientras que otras 10 proteínas (Subunidad delta de hemoglobina, Proteína de unión a lipopolisacáridos, Proteína C-reactiva, Ficolina-3, Anhidrasa carbónica 1, Fructosa-bifosfato aldolasa B, Peroxirredoxina-2, Catalasa, Pantetinasa, y Aminopeptidasa N) coincidieron en 3 estudios en humanos.

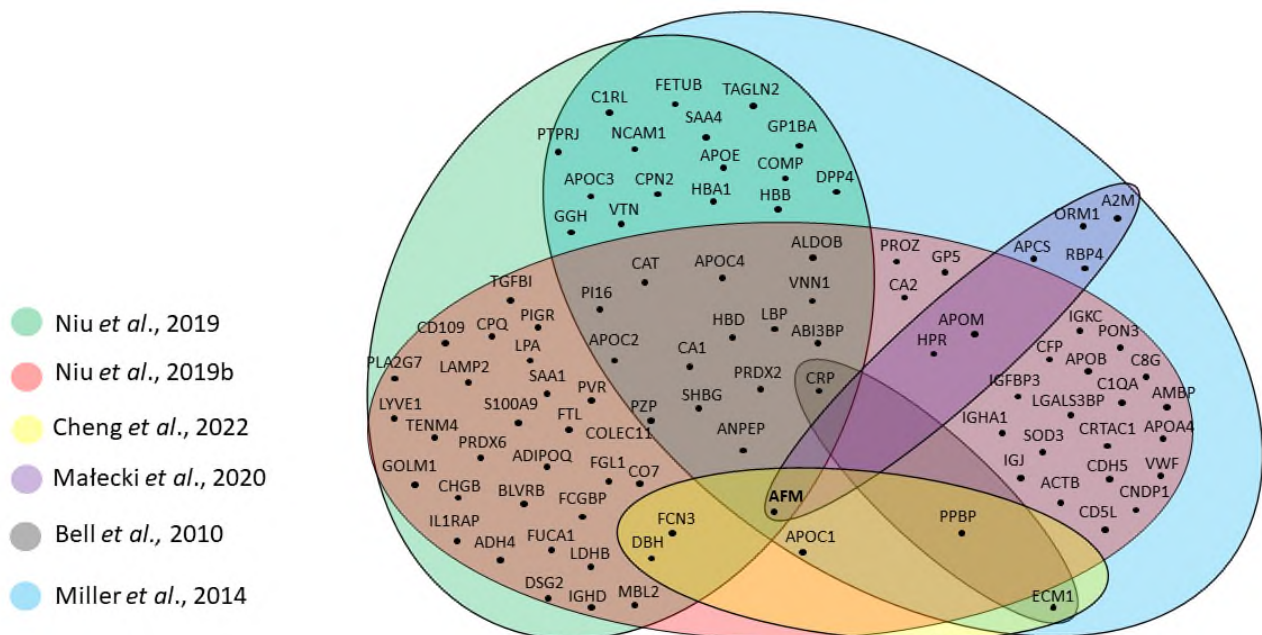


Figura 4. Coincidencias proteicas incrementadas durante la EHGNA en los 6 estudios seleccionados en *Homo sapiens*. Se seleccionaron aquellas proteínas que mostraron una razón de cambio mayor a 1.2 en al menos 3 estudios.

Tabla 6. Proteínas coincidentes en el estudio con ratones.

Proteína	Razón de cambio (EHGNA/control)
Proteína de unión a lipopolisacáridos	2.0
Proteína C-reactiva	1.3
Catalasa	3.0
Aminopeptidasa N	1.9
Fructosa-bisfosfato aldolasa B	76.0
Afamina	0.7

De los estudios obtenidos solo uno era de una especie diferente y al no contar con más publicaciones de ratones para comparar con este estudio, nos limitamos a comparar los datos proteómicos de este con las 11 proteínas seleccionadas en estudios humanos. En ratones 7 distintas proteínas se mostraron alteradas, de ellas la afamina, aunque contrario a lo observado en humanos, su expresión no fue tan elevada en esta especie durante la patología. Mientras que la proteína ALDOB mostró una razón de cambio muy alta. El resto de las proteínas, presentaron una razón de cambio similar a las proteínas de los estudios anteriores.

Se observó en los resultados de las proteínas alteradas en la etapa temprana de la EHGNA, dentro los márgenes mayor e igual a 1.2, y menor e igual a 0.8 de razón de cambio, la mayoría de proteínas presentaban un aumento de expresión, por lo que se encontraron más datos proteómicos que contaban con una razón de cambio mayor e igual a 1.2, que menor e igual a 0.8; de las proteínas con una expresión disminuidas recopiladas, se les realizó una comparación, de las cuales debían coincidir como mínimo en 3 estudios, pero ninguna proteína con razón de cambio menor e igual a 0.8 cumplió con los requerimientos, por lo tanto no se reportó en esta revisión sistemática ninguna proteína con una disminución de expresión como potencial biomarcador.

8.6 Riesgo de sesgo

Evaluar los resultados fue el principal objetivo, pero también fue importante conocer la fiabilidad de procedencia de estos datos, si se encontraron presentes sesgos en alguna parte de la realización metodológica de estos trabajos, por esa razón se realizó una evaluación de riesgo de sesgo a los 6 estudios en humanos. De acuerdo con los tipos de estudios, se ajustaron 6 dominios para verificar si en alguno de los pasos se sesgaba para favorecer alguna característica, como se explica en la sección de materiales y métodos. De la información obtenida en 6 estudios, en la

figura 5, las barras ponderan un 100%, el color verde representa un bajo riesgo de sesgo, el color amarillo un poco claro riesgo de sesgo, y el color rojo un alto riesgo de sesgo.

En el dominio de sesgo de confusión, se presenta un bajo riesgo de sesgo aproximadamente del 70%, por consecuente, al ser etapas tempranas de HGNA, es probable que las proteínas estén asociadas a patologías que antecedan a la EHGNA, por lo tanto, los grupos controles y patológicos presentaban obesidad, o diabetes como está descrito en la tabla 4, para mantener estas proteínas en proporciones similares en ambos grupos. El dominio de sesgo de la selección de participantes en el estudio presentó un riesgo de sesgo poco claro, debido al tipo de diseño de estudio, teniendo en cuenta que esta es la desventaja en estudios observacionales, la disponibilidad de pacientes con esta patología en una etapa específica complica la selección de una población representativa y se trabaja con los pacientes que se logran obtener, un porcentaje de riesgo de sesgo bajo en estudios de cohortes en este trabajo en específico sería inconsistente. El riesgo de sesgo de mala clasificación de la patología HGNA es el dominio que contiene los 3 tipos de riesgos, un 50% de riesgo de bajo riesgo de sesgo, debido a que se clasificó la esteatosis por medio de biopsia hepática, y el resto por otras técnicas y valoraciones. El dominio de riesgo de sesgo en la medición del resultado informado fue un 80% de bajo riesgo de sesgo, en consecuencia, a que se usó el mismo protocolo para ambos grupos y se usó una técnica apropiada para la cuantificación. Se obtuvo un 100% de bajo riesgo de sesgo en la selección de resultado informado debido a que se realizaron análisis de muestras por triplicado y en otros casos se programaban aleatoriamente las muestras en el cromatógrafo. Del mismo modo el dominio de riesgo de sesgo del método estadístico corresponde a un bajo riesgo de sesgo, los datos cumplían con la normalidad y significancia estadística.

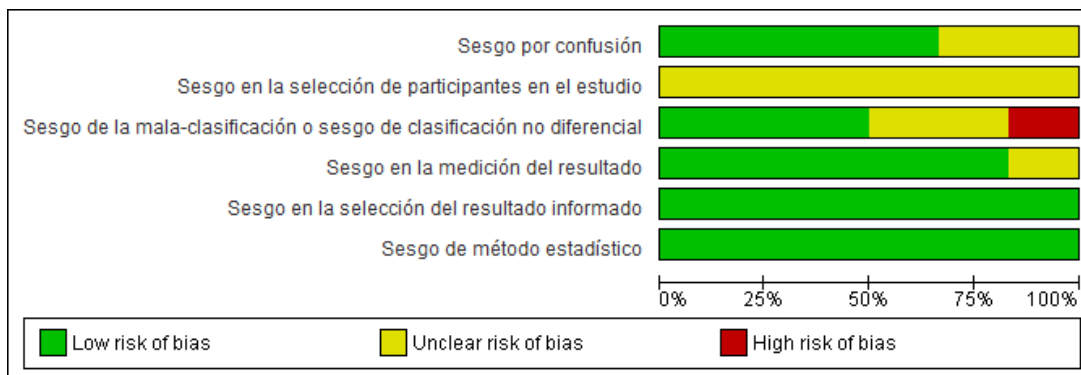


Figura 5. Gráfico de riesgo de sesgo. Evaluación de los revisores sobre cada elemento de riesgo de sesgo presentado como porcentajes en todos los estudios incluidos.

8.7 Determinación de diferencia de medias estandarizada

Los datos de los estudios seleccionados poseen distintos grados de significancia estadística y riesgo de sesgo, el meta-análisis nos permite ponderar los resultados y estimar la magnitud de estos, especialmente en el caso de la proteína afamina que se ha encontrado a esta proteína en diabetes tipo 2 (DT2) y obesidad, enfermedades que anteceden a la EHGNA. En este caso, para efectuar el meta-análisis fueron necesarios los datos de intensidad de señal y desviación estándar de las proteínas coincidentes, sin embargo, no se encontraron estos datos disponibles en todos los casos.

Con los datos que 3 estudios proporcionaron se realizó el meta-análisis de la proteína afamina; el diagrama de bosque toma en cuenta las medias, las desviaciones estándar y la cantidad de pacientes, también pondera los riesgos de sesgo, si el sesgo es marcado, le disminuye valor al estudio.

En los estudios seleccionados, la proteína afamina mostró un cambio significativo, contó con una razón de cambio ≥ 1.2 ; en la figura 6, el diagrama de bosque muestra que en 3 estudios se presentó una diferencia de medias estandarizadas global de 1.43 desviaciones estándar (z) con un intervalo de confianza del 95% y una heterogeneidad moderada.

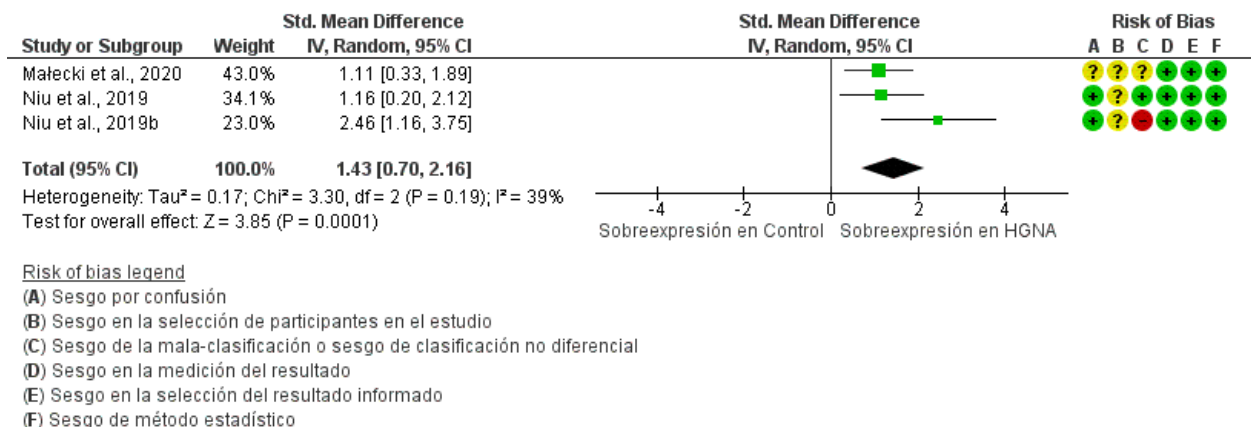


Figura 6. Diagrama de bosque de la proteína afamina.

8.8 Interacción funcional de proteínas incrementadas en EHGNA

Las proteínas obtenidas de las comparaciones fueron ingresadas al servidor STRING para conocer las posibles interacciones funcionales entre ellas. En la figura 7 se puede observar que, presentan distintos grados de interacciones entre ellas, sin embargo, la afamina, aminopeptidasa y pantetinasa no presentan relación directa con el resto de las proteínas. Las asociaciones que arroja el servidor están destinadas a ser específicas y significativas, es decir, las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida; esto no significa necesariamente que estén físicamente vinculados entre sí (Szklarczyk *et al.* 2019).

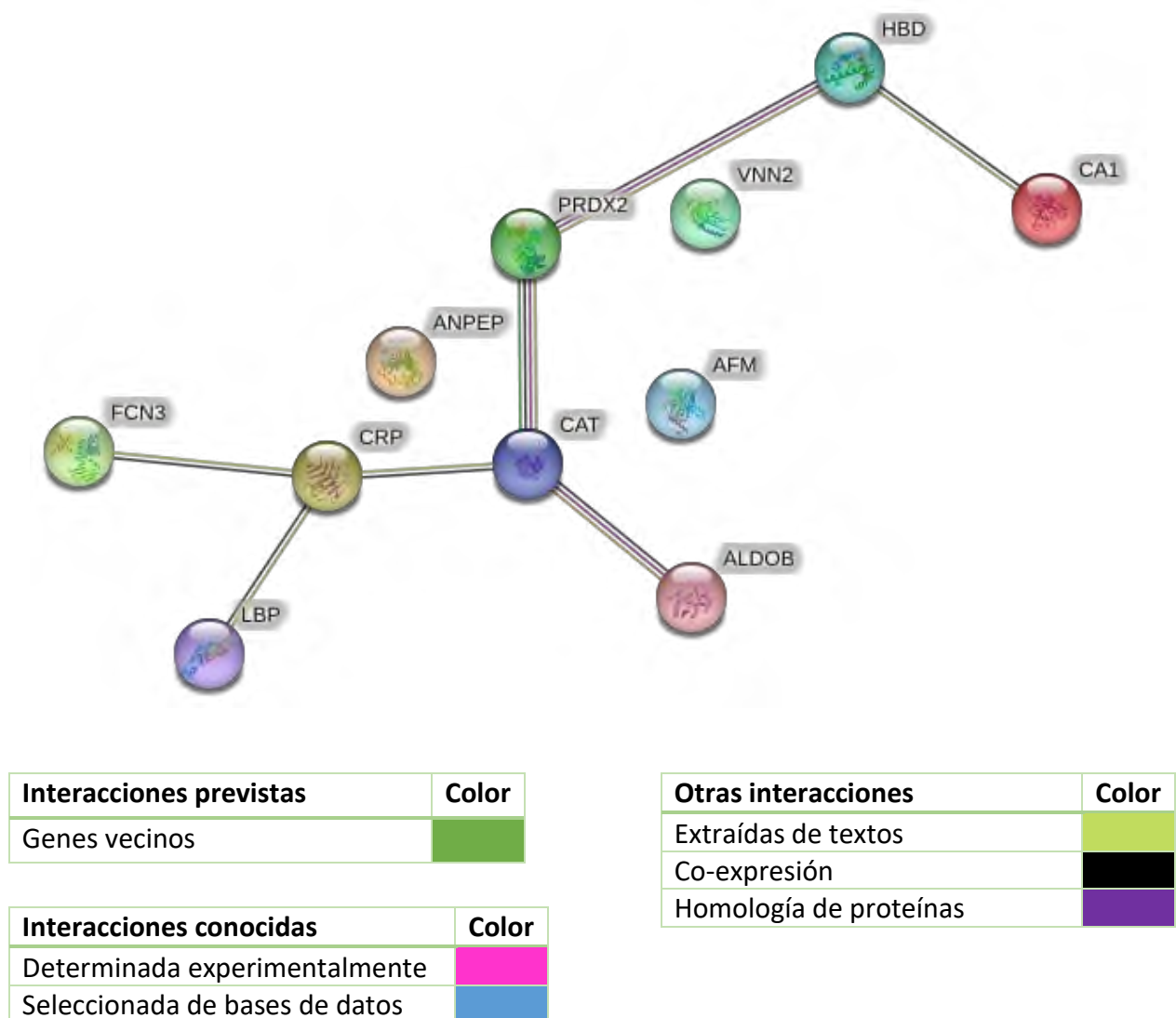


Figura 7. Red de proteínas realizado en el servidor STRING. Las líneas de colores indican asociaciones proteína-proteína.

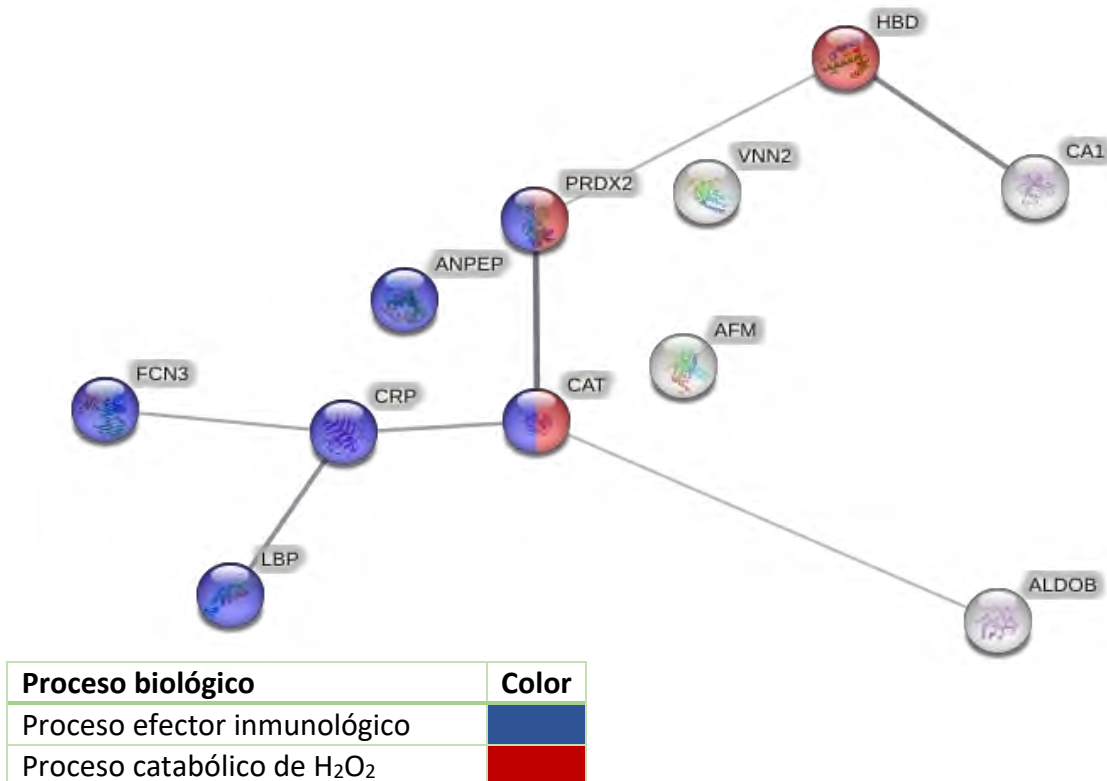


Figura 8. Confianza de la red de proteínas.

En la figura 8, se realizó un estudio de confianza de los datos de la asociación proteica, donde el grosor de la línea que une 2 proteínas indica el grado de confianza de los datos. La falta de la red de unión como es el caso de AFM, VNN2 Y ANPEP, indican que no hay una asociación comprobada entre ellas y otra proteína de las mostradas en la imagen. La red designó dos procesos biológicos principales, uno de ellos es el proceso catabólico de peróxido de hidrógeno donde se encuentra HBD. El segundo proceso es inmunológico donde se encuentra LBP, CRP, FCN3, ANPEP. Mientras que las proteínas PRDX2, y CAT participan en ambos procesos. Las proteínas unidas en la red muestran asociaciones por medio de estudios que mencionan sus interacciones en publicaciones de PubMed en distintos procesos (catabólico e inmunológico) pero solo las interacciones de CAT-ALDOB muestran publicaciones relevantes donde son mencionadas en artículos de la patología de HGNA.

9. Discusión

Con el fin de encontrar posibles biomarcadores séricos/plasmáticos de la EHGNA, en este trabajo se realizó una recopilación de proteínas con expresiones coincidentes en 6 distintos estudios. La comparación del grupo patológico y el grupo control se tomó en cuenta bajo los criterios de razón de cambio, que representa el cambio en la expresión de una proteína en la patología, comparada con el grupo control; y diferencia de medias estandarizadas (en el caso de la proteína afamina). Se obtuvieron un total de 11 biomarcadores potenciales en la primera etapa de la patología de HGNA, agrupados en 2 procesos a) catabolismo de peróxido de hidrógeno y b) el proceso de inmunidad. Del mismo modo, los registros de Uniprot, arrojaron 4 actividades las cuales son: transporte, inmunidad, catálisis e hidrólisis. La comparación proteómica inicial se realizó de diseños de estudio de cohortes, con muestras sanguíneas humanas, se seleccionaron las proteínas que mostraron una razón de cambio igual o superior al 1.2 en al menos 3 distintos estudios. La proteína afamina (AFM) se encontró significativamente incrementada en 5 estudios. La afamina es una proteína humana de unión a vitamina E en plasma que se expresa principalmente en el hígado y se secreta en la circulación (Cheng *et al.*, 2022). Esta proteína se ha sugerido previamente como biomarcador potencial de EHGNA en publicaciones de Bell *et al.* (2010) y Niu *et al.* (2019).

Trabajos previos han revelado que la afamina plasmática se asocia con la DT2, el síndrome metabólico y el síndrome de ovario poliquístico; los ratones transgénicos que sobre expresan la afamina humana también muestran un aumento de peso y un aumento de las concentraciones sanguíneas de lípidos y glucosa (Cheng *et al.*, 2022). Por otra parte, se ha registrado asociación de afamina con DT2, en estudios que incluyeron 1,398 casos prevalentes y 585 incidentes de diabetes tipo 2 (Kollerits *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta la relación de la DT2 y la proteína afamina, en esta revisión se realizó una comparación, un grupo con DT2 y otro con obesidad, ambos sin EHGNA, con los valores obtenidos de intensidad de señal de dos cohortes extraídos de la publicación de Niu *et al.* (2019), se obtuvo la razón de cambio de 1.018 de la proteína afamina en condiciones DT2 sin HGNA /Obesidad sin HGNA, la razón de cambio fue ligeramente mayor en el grupo de DT2 pero no lo suficiente para ser una cambio considerable como en los grupos de EHGNA. En conjunto estos datos sugieren que la proteína se encuentra aumentada en DT2, pero su sobre expresión significativa se encuentra en la patología de HGNA.

En un estudio realizado por Pitkänen *et al.* (2022), con 483 pacientes de los cuales 146 presentaban HGNA; 45 padecían gastritis, intolerancia a la lactosa u otras patologías, pero sin EHGNA u otras enfermedades hepáticas; y 292 controles sanos emparejados en edad y sexo. Las concentraciones medias de afamina se observaron significativamente más altas en pacientes con HGNA (83.6 mg/L) vs pacientes sin enfermedad hepática (61.6 mg/L) vs controles sanos. (63.9 mg/L).

En el estudio de Miller *et al.* (2014), se presentó un comportamiento particular de expresión de afamina en muestras de controles, esteatosis y esteatohepatitis, la afamina aumenta en esteatosis simple, en esteatohepatitis disminuye y vuelve a aumentar en esteatohepatitis con fibrosis. En el caso de Cheng *et al.* (2022), en muestras de grupos control, esteatosis y esteatohepatitis, se presenta un fenómeno similar, por medio de un inmunoensayo ELISA se pudo observar como la proteína afamina está mayormente expresada en esteatosis simple, pero en la siguiente etapa que es esteatohepatitis disminuye su expresión, en ambos estudios, las muestras control mostraron la menor concentración de afamina. Se sugiere que la proteína afamina presenta un comportamiento conforme el espectro patológico aumenta, al menos en estas dos publicaciones, por lo que se debería someter a más estudios para confirmarlo, así que, esta proteína conforme a su abundancia no solo podría ser un biomarcador en etapas tempranas si no también un marcador a través del espectro de HGNA.

La proteína ALDOB (Fructosa bisfosfato aldolasa B) es una enzima glicolítica en la vía del catabolismo de la fructosa que también desempeña un papel en la gluconeogénesis y la lipogénesis. La evidencia de estudios en animales y humanos sugiere que la ingesta de fructosa añadida en la dieta cuando se consume en exceso es un factor principal de EHGNA y sus consecuencias nocivas (Niu *et al.*, 2019). También se observa un aumento de los niveles de ALDOB en plasma en el modelo EHGNA de ratón. Este aumento podría ser consecuencia del daño celular, ya que los hepatocitos inflamados por acumulación excesiva de grasa pueden filtrar ALDOB. Dado que ALDOB ya es visible en la EHGNA temprana, puede ser más sensible que las enzimas hepáticas AST y ALT que se presentan en el espectro avanzado de la patología (Niu *et al.*, 2019). La proteína ANPEP no solo modula el desarrollo y las actividades de las células relacionadas con el sistema inmunitario, sino que también regula las funciones de los mediadores inflamatorios (Lu *et al.*, 2020). Por lo tanto, es importante en la patogenia de varios trastornos inflamatorios donde

también se encuentra sobre expresada, sus genes estaban principalmente implicados en la remodelación de la matriz extracelular (Bièche *et al.*, 2005), sin embargo, no se sabe nada en concreto sobre el posible papel de ANPEP en la enfermedad hepática (Niu *et al.*, 2019).

El estrés oxidativo a nivel celular se considera un contribuyente clave en la progresión del hígado graso simple a NASH que posteriormente inducen, inflamación y fibrosis (Takaki *et al.*, 2013). Las alteraciones en el metabolismo de los lípidos conducen a la acumulación de lípidos hepáticos, lo que afecta a diferentes generadores de especies reactivas de oxígeno (EROs), incluidas las mitocondrias, el retículo endoplásmico y NADPH oxidasa. La función mitocondrial se adapta a la EHGNA principalmente a través de la regulación de la cadena de transporte de electrones (CTE) y la oxidación de ácidos grasos, que estimula la sobreproducción de EROs. La β -oxidación de ácidos grasos parece producir más EROs en las enfermedades metabólicas hepáticas. El estrés del retículo endoplásmico y las alteraciones de la NADPH oxidasa también se asocian con HGNA, pero el grado de su contribución al estrés oxidativo en HGNA sigue sin estar claro. El aumento de la generación de EROs induce cambios en la sensibilidad a la insulina y en la expresión y actividad de enzimas clave involucradas en el metabolismo de los lípidos. De este modo, la interacción entre la señalización redox y la señalización inmunitaria innata forma una red compleja que regula las respuestas inflamatorias (Ze *et al.*, 2020).

En este contexto, las proteínas CAT, PRDX2, y HBD presentan una relación con el estrés oxidativo. Las EROs en los hepatocitos se producen en las mitocondrias, los microsomas y los peroxisomas; en particular, el H_2O_2 se produce en el proceso de oxidación β peroxisomal cuando la oxidación β mitocondrial se satura por un exceso de ácidos grasos o se daña (Shin *et al.*, 2018). La catalasa juega un papel en los mecanismos de defensa antioxidante celular al suprimir la acumulación de H_2O_2 . El grado de actividad antioxidante de la catalasa depende del tipo de tejido, y la catalasa mostró una excelente capacidad para degradar el H_2O_2 del hígado (Ho *et al.*, 2004). Debido a que el estrés oxidativo se inicia durante una etapa temprana de la esteatosis, se ha observado una actividad de catalasa consistentemente alta; se demostró recientemente que la eliminación de catalasa causa fácilmente esteatosis en ratones al promover la acumulación excesiva de lípidos. Esto sugiere que la catalasa juega un papel protector como antioxidante en el hígado con EHGNA, dado que el estrés oxidativo es un objetivo terapéutico o preventivo importante para los pacientes con HGNA; por otro lado, un estudio de Shin *et al.* (2018) en humanos mostró que la

expresión de catalasa difiere según la etapa de EHGNA, que aumenta principalmente en la etapa temprana de esteatosis y disminuye en la etapa terminal de EHGNA. Aunque esto puede deberse a que muchas células se destruyen y se vuelven no funcionales; el mecanismo exacto de la catalasa en la regulación de HGNA requiere un análisis más profundo. La proteína PRDX2 es capaz de regular el estado redox intracelular mediante la eliminación de peróxidos y especies reactivas de oxígeno desempeñando un papel en la protección celular contra el estrés oxidativo al desintoxicar los peróxidos oxidativos (Juárez *et al.*, 2018), que se cree que son los estímulos principales que desencadenan varias vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo (Bing *et al.*, 2019). En el caso de la proteína HBD, la hemoglobina subunidad delta participa en el transporte de oxígeno desde el pulmón a los distintos tejidos periféricos, del mismo modo, los resultados obtenidos del servidor STRING muestran una relación con el estrés oxidativo. La hemoglobina es el componente más común en los eritrocitos y actúa como transportador de dióxido de carbono y oxígeno a través de la red vascular hacia las células del cuerpo, además, realiza otras actividades celulares, incluida la detección de oxígeno, el transporte de oxígeno intracelular, la regulación del metabolismo del hierro, la eliminación de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno. Se ha encontrado que los pacientes con HGNA tienen concentraciones séricas de hemoglobina significativamente más altas que los controles sanos, la posible explicación de las asociaciones observadas entre el aumento de hemoglobina y la EHGNA puede estar relacionada con la acumulación excesiva de hierro con respecto a los requisitos fisiológicos; el metabolismo hepático del hierro es complicado, sin embargo, su efecto se puede atribuir a un aumento de una proteína llamada hepcidina, que se encarga de retener el exceso de hierro, reduciendo así el estrés oxidativo (Juárez *et al.*, 2018). Los glóbulos rojos están expuestos a más estrés oxidativo que cualquier otro tipo de célula debido a la abundancia de hierro hemo y oxígeno. La autooxidación de la hemoglobina produce una gran cantidad de EROs que pueden dañar los lípidos, las proteínas, y el citoesqueleto de la membrana, y pueden disminuir la deformabilidad de los glóbulos rojos si las EROs no se eliminan a tiempo (Ma *et al.*, 2019). Se sugiere un papel protector de la hemoglobina en presencia de esteatosis, pero cuando aparece inflamación y necrosis en el hígado, el efecto protector desaparece (Xu *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que el estado de la grasa hepática puede ser el factor fisiológico que vincula a la afamina con componentes del síndrome metabólico y la biodisponibilidad de afamina. Aunque

no se han aclarado las funciones biológicas de la afamina, se le ha vinculado en respuesta al estrés oxidativo al actuar como vehículo y transportador de α -tocoferol, que tiene importantes capacidades antioxidantes (Pitkänen *et al.* 2022); un estudio clínico realizado para el tratamiento de HGNA, reveló una mejora significativa en la esteatohepatitis no alcohólica después de la terapia con vitamina E, dado que el estrés oxidativo se considera un contribuyente clave para el desarrollo de EHGNA (Takaki *et al.*, 2013). La regulación ascendente de afamina en el suero podría ser el resultado de una mayor expresión o secreción de afamina en el hígado, a su vez la elevada actividad de la afamina podría mediar en la aparición de esteatosis hepática y otras anomalías metabólicas relacionadas con EHGNA (Cheng *et al.*, 2022). Es tentador especular que la deficiencia funcional de vitamina E y otros antioxidantes puede representar un mecanismo patogénico potencial que conduce a EHGNA. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de afamina en pacientes esteatósicos podría reflejar el equilibrio deteriorado entre el estrés oxidativo y la defensa antioxidante disponible en el hígado humano (Pitkänen *et al.* 2022).

10. Conclusión

En este trabajo se presentaron 11 proteínas como biomarcadores potenciales en la patología de HGNA en etapas tempranas (esteatosis simple), destacaron proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo entre ellas la afamina que se mostró comúnmente elevada en los estudios analizados. Basados en el resultado del meta-análisis proponemos que los niveles elevados de afamina pueden ser considerados un factor de riesgo y/o indicador de las etapas tempranas de la EHGNA.

11. Referencias

1. Academia nacional de medicina UNAM (2015) *Enfermedad por hígado graso no alcohólico*.
2. Aguilera, E.R. (2014) *¿Revisión sistemática, revisión narrativa o metaanálisis?*, *Rev Soc Esp Dolor*.
3. Ahn, E. and Kang, H. (2018) 'Introduction to systematic review and meta-analysis', *Korean Journal of Anesthesiology*, 71(2), pp. 103–112. Available at: <https://doi.org/10.4097/kjae.2018.71.2.103>.
4. Ajmera, V. *et al.* (2017) 'Novel Plasma Biomarkers Associated with Liver Disease Severity in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 65(1), p. 65. Available at: <https://doi.org/10.1002/HEP.28776>.
5. Alcántara, H.R., Delgado, C.B.A. and Sosa, G.M. (2017) 'Bioquímica Hepática'. Edited by B.A. Delgado Coello, p. 190. Available at: https://www.uv.es/jcastell/5_Regulacion_hepatica_del_metabolismo.pdf (Accessed: 26 April 2022).
6. Alkhouri, N. and Feldstein, A.E. (2016) 'Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet?', *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), pp. 1087–1095. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2016.01.013>.
7. Bell, L.N. *et al.* (2010) 'Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease', *Hepatology*, 51(1), pp. 111–120. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.23271>.
8. Bernal, R.R. *et al.* (2019) 'Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico', *Revista de Gastroenterología de México*, 84(1), pp. 69–99. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.RGMX.2018.11.007>.
9. Bieche, I. *et al.* (2005) 'Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection', *Virology*, 332(1), pp. 130–144. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.11.009>.
10. Bing, B. *et al.* (2019) 'Peroxiredoxin2 downregulation enhances hepatocellular carcinoma proliferation and migration, and is associated with unfavorable prognosis in patients', *Oncology Reports*, 41(3), p. 1539. Available at: <https://doi.org/10.3892/OR.2019.6977>.

11. Cascales, A.M. (2009) 'Señales que regulan la expresión de genes en la regeneración hepática', *Real Academia Nacional de Farmacia*, pp. 309–348. Available at: <https://core.ac.uk/download/pdf/230317155.pdf>.
12. Cheng, Q. *et al.* (2022) 'Serum proteome profiling reveals differentially expressed proteins between subjects with metabolically healthy obesity and nonalcoholic fatty liver disease', *Journal of Proteomics*, 260. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104556>.
13. Geyer, P.E. *et al.* (2017) 'Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics', *Molecular Systems Biology*, 13(9), p. 942. Available at: <https://doi.org/10.15252/MSB.20156297>.
14. Hashimoto, E., Taniai, M. and Tokushige, K. (2013) 'Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(S4), pp. 64–70. Available at: <https://doi.org/10.1111/JGH.12271>.
15. Ho, Y.S. *et al.* (2004) 'Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury', *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), pp. 32804–32812. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M404800200>.
16. Holzberg, J.R. *et al.* (2016) 'Plasminogen activator inhibitor-1 predicts quantity of hepatic steatosis independent of insulin resistance and body weight', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(6), pp. 819–823. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001096>.
17. Huang, D.Q. *et al.* (2022) 'Changing global epidemiology of liver cancer from 2010 to 2019: NASH is the fastest growing cause of liver cancer', *Cell Metabolism*, 34(7), pp. 969-977.e2. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.05.003>.
18. Juárez, H.E. *et al.* (2018) 'Association Between Serum Hemoglobin Levels and Non Alcoholic Fatty Liver Disease in a Mexican Population', *Annals of Hepatology*, 17(4), pp. 577–584. Available at: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.0920>.
19. Khoramipour, K. *et al.* (2021) 'Adiponectin: Structure, Physiological Functions, Role in Diseases, and Effects of Nutrition', *Nutrients*, 13(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/NU13041180>.
20. Kitchens, C.S., Konkle, B.A. and Kessler, C.M. (2007) 'Consultative hemostasis and thrombosis', *Consultative Hemostasis and Thrombosis* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2401-9.X1000-0>.

21. Kollerits, B. *et al.* (2017) 'Plasma concentrations of afamin are associated with prevalent and incident type 2 diabetes: A pooled analysis in more than 20,000 individuals', *Diabetes Care*, 40(10), pp. 1386–1393. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc17-0201>.
22. Ladaru, A. *et al.* (2016) 'Candidate proteomic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease (steatosis and non-alcoholic steatohepatitis) discovered with mass-spectrometry: A systematic review', *Biomarkers*. Taylor and Francis Ltd, pp. 102–114. Available at: <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1118542>.
23. Liu, C.H. *et al.* (2018) 'miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis', *Journal of hepatology*, 69(6), pp. 1335–1348. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2018.08.008>.
24. Long, J. *et al.* (2020) *Advance of research in the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis*. Available at: <http://www.huayinlab.com/NewsDetail.aspx?id=1261> (Accessed: 24 July 2022).
25. Lu, C., Amin, M.A. and Fox, D.A. (2020) 'CD13/aminopeptidase N is a potential therapeutic target for inflammatory disorders', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 204(1), p. 3. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1900868>.
26. Ma, Q. *et al.* (2019) 'Interactions between human hemoglobin subunits and peroxiredoxin 2', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 24(6), pp. 1085–1096. Available at: <https://doi.org/10.2741/4770>.
27. Małeckı, P. *et al.* (2020) 'Serum proteome assessment in nonalcoholic fatty liver disease in children: a preliminary study', *Expert Review of Proteomics*, 17(7–8), pp. 623–632. Available at: <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1810020>.
28. Methley, A.M. *et al.* (2014) 'PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews', *BMC Health Services Research*, 14(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S12913-014-0579-0>.
29. Miller, M.H. *et al.* (2014) 'The serum proteome of nonalcoholic fatty liver disease: A multimodal approach to discovery of biomarkers of nonalcoholic steatohepatitis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 29(10), pp. 1839–1847. Available at: <https://doi.org/10.1111/jgh.12614>.
30. Molina, A.M. (2013) 'Lectura crítica en pequeñas dosis La revisión sistemática'.

31. Muhammad, A. (2019) 'Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, an Overview', *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 18(2), p. 42. Available at: [/pmc/articles/PMC6601444/](#) (Accessed: 16 March 2023).
32. Niu, L., Geyer, P.E., Wewer, A.N.J., *et al.* (2019) 'Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease', *Molecular systems biology*, 15(3). Available at: <https://doi.org/10.15252/MSB.20188793>.
33. Ortega, C.M.J. *et al.* (2020) 'Prevalencia del hígado graso no alcohólico y su asociación con alteraciones bioquímicas en una población mexicana asintomática', *Acta Médica Grupo Ángeles*, 18(2), pp. 127–132. Available at: <https://doi.org/10.35366/93885>.
34. Palomer, X., Pérez, A. and Blanco, V.F. (2005) 'Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular', *Medicina Clínica*, 124(10), pp. 388–395. Available at: <https://doi.org/10.1157/13072576>.
35. Papatheodoridi, M. and Cholongitas, E. (2018) 'Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts', *Current pharmaceutical design*, 24(38), pp. 4574–4586. Available at: <https://doi.org/10.2174/1381612825666190117102111>.
36. Piazzolla, V.A. and Mangia, A. (2020) 'Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH', *Cells*. NLM (Medline). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9041005>.
37. Pitkänen, N. *et al.* (2022) 'Afamin predicts the prevalence and incidence of nonalcoholic fatty liver disease', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 60(2), pp. 243–251. Available at: <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0837>.
38. Rui, L. (2014) 'Energy metabolism in the liver', *Comprehensive physiology*, 4(1), p. 177.
39. Shin, S.K. *et al.* (2018) 'Catalase and nonalcoholic fatty liver disease', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 470(12), pp. 1721–1737. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00424-018-2195-Z/FIGURES/4>.
40. Stocks, B. *et al.* (2022) 'Integrated Liver and Plasma Proteomics in Obese Mice Reveals Complex Metabolic Regulation', *Molecular and Cellular Proteomics*, 21(3). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100207>.
41. Szklarczyk, D. *et al.* (2019) 'STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets', *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D607–D613. Available at: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1131>.

42. Takaki, A., Kawai, D. and Yamamoto, K. (2013) 'Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)', *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 20704-20728, 14(10), pp. 20704–20728. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS141020704>.
43. Tapia, A.J. and Martínez, V.S.E. (2021) *La importancia del diagnóstico temprano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA)*, *Ciencia y Nutrición Revista digital REDCieN*.
44. Trefts, E., Gannon, M. and Wasserman, D.H. (2017) 'The liver', *Current biology : CB*, 27(21), p. R1147. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.09.019>.
45. Villasís, K.M.Á. *et al.* (2020) 'Systematic review and meta-analysis as a support tools for research and clinical practice', *Revista Alergia Mexico*, 67(1), pp. 62–72. Available at: <https://doi.org/10.29262/ram.v67i1.733>.
46. Xu, L. *et al.* (2009) 'Haemoglobin and non-alcoholic fatty liver disease: further evidence from a population-based study', *Gut*, 58(12), pp. 1706–1707. Available at: <https://doi.org/10.1136/GUT.2009.186668>.
47. Ze, C. *et al.* (2020) 'Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 152, pp. 116–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.02.025>.

Anexos.

Anexo 1. Pruebas de normalidad de intensidad de señal de la proteína afamina en estudios de (Niu *et al.*, 2019).

10 pacientes obesos sin EHGNA y 10 pacientes obesos con EHGNA_01/03/2019 Niu L; Geyer PE; Wewer Albrechtsen NJ.

Proteína afamina en el estudio E1 (Niu *et al.*, 2019).

Estadísticos de grupo

	Cohorte	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Intensidad de señal	Obesos control	10	5660000000.00	824526800.319	260738268.086
	Obesos HGNA	10	6956000000.00	1270426000.294	401743975.963

Pruebas de normalidad

	Cohorte	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Intensidad de señal	Obesos control	0.164	10	0.200*	0.949	10	0.653
	Obesos HGNA	0.139	10	0.200*	0.948	10	0.642

*. Este es un límite inferior de la significancia verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	0.556	0.466	-2.706	18	0.014	-1296000000.000	478939105.385	-2302213722.436	-289786277.564
No se han asumido varianzas iguales			-2.706	15.439	0.016	-1296000000.000	478939105.385	-2314309658.660	-277690341.340

08 pacientes con diabetes tipo 2 y 10 pacientes con diabetes tipo 2 y EHGNA_01/03/2019 Niu L; Geyer PE; Wewer Albrechtsen NJ.

Proteína afamina en el estudio E1b (Niu *et al.*, 2019).

Estadísticos de grupo

	Cohorte	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Señal	DT2	8	5762500000.00	841711691.394	297590022.394
	DT2 HGNA	10	8319000000.00	1093998273.409	345952630.026

Pruebas de normalidad

	Cohorte	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Señal	DT2	0.225	8	0.200*	0.876	8	0.173
	DT2 HGNA	0.257	10	0.061	0.823	10	0.028

*. Este es un límite inferior de la significancia verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	2.192	0.158	-5.435	16	0.000	-2556500000.000	470334920.562	-3553565490.508	-1559434509.492
No se han asumido varianzas iguales			-5.602	15.990	0.000	-2556500000.000	456336546.477	-3523938039.746	-1589061960.254

Anexo 2. Datos para el análisis de diferencia de medias estandarizadas.

Proteína	Estudio	Razón de cambio	Número de acceso	Base de datos	Intensidades de señal					
					Media control	DE control	Media HGNA	DE HGNA	(n) control	(n) HGNA
Afamina	E1	1.2	P43652	UniProt	5,660,000,000	824,526,800	6,956,000,000	1,270,426,000	10	10
	E2	1.5	P43652	UniProt	-	-	-	-	23	20
	E3	1.2	P43652	UniProt	4,060,000,000	716,000,000	4,790,000,000	569,000,000	14	16
	E5	1.7	PII00019943.1	Mascot	-	-	-	-	10	7
	E1b	1.4	P43652	UniProt	5,762,500,000	841,711,691	8,319,000,000	1,093,998,273	8	10

De los cinco estudios en los que la proteína afamina resultó coincidente, se extrajo la información disponible para poder efectuar el meta-análisis, las publicaciones contaban con libre acceso a sus repositorios de datos, pero no era información totalmente completa en algunos casos, solo tres estudios reportaron los datos de intensidad de señal, los demás únicamente contaban con datos de razón de cambio.

Anexo 3. Tablas de toma de decisiones de riesgo de sesgo

Estudio E1 de (Niu *et al.*, 2019).

Métodos	LC-MS/MS
Participantes	10 pacientes obesos con tolerancia normal a la glucosa sin EHGA como control 10 pacientes obesos con tolerancia normal a la glucosa y con EHGA como grupo patológico
Resultado	Razón de cambio de la proteína afamina esteatosis/control de 1.2

Sesgo	Decisión del autor	Apoyo de decisión
Sesgo por confusión	Bajo riesgo	Los 10 controles presentaron obesidad así mismo que el grupo patológico de HGNA por lo tanto si hay biomarcadores de obesidad, quedan eclipsados debido a que ambos grupos presentan obesidad.
Sesgo en la selección de participantes en el estudio	Riesgo poco claro	Dado que la patología de HGNA está altamente relacionada con la obesidad, se seleccionó un control con pacientes obesos. Los controles fueron emparejados por edad y sexo. Pacientes seleccionados de la consulta externa del Departamento de Medicina, Gentofte Hospital, University of Copenhagen, Hellerup, Dinamarca, desde septiembre de 2011 hasta mayo de 2013.
Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial	Bajo riesgo	Los sesgos de información debido a la clasificación errónea, se abordaron con tres evaluaciones distintas, para la cohorte patológica, el diagnóstico fue por histología, solo se realizó esta prueba en los pacientes patológicos y no en los controles. La segunda evaluación fueron los criterios de exclusión, en el caso del grupo patológico un consumo máximo de

		<p>alcohol, en mujeres más de 7 unidades por semana y en hombres más de 14 unidades por semana; tratamiento con fármacos esteatogénicos dentro de los 3 meses previos a la inclusión; anemia; enfermedad inflamatoria intestinal; aumento de creatinina (>150micromol/L); albuminaria y otras enfermedades crónicas.</p> <p>Para el grupo control, sin signos de enfermedad hepática u otras enfermedades crónicas (según historial del paciente, mediciones bioquímicas y evaluación por ultrasonido), sin antecedentes de familiares con diabetes.</p> <p>Se realizó la tercera evaluación para ambas cohortes con pruebas antropométricas y datos clínicos.</p>
<p>Sesgo en la medición del resultado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>El método usado para medir resultados fue LC-MS/MS, apropiado debido a su sensibilidad, fiabilidad y eficiencia para detectar y cuantificar compuestos o sustancias. La medición o determinación del resultado de cada grupo de muestras (patológica y control) fue siguiendo el mismo protocolo para ambos.</p> <p>Se realizó en 3 fases, recolección de muestras; pretratamiento de muestra; e identificación de la muestra. La recolección de la muestra se realizó con una recolección de plasma en ayunas y se distribuyó en una placa de 96 pocillos para el análisis proteómico.</p> <p>En el pretratamiento Las proteínas se desnaturalizaron, redujeron, alquilaron y digirieron utilizando la canalización automatizada de perfiles de proteoma de plasma y los péptidos se purificaron.con el kit PreOmics "iST" (PO 00001, PreOmics GmbH).</p> <p>Para el análisis de identificación de las muestras, los</p>

		<p>péptidos purificados se analizaron en medición por triplicado de forma aleatoria mediante LC-MS/MS.</p> <p>Las muestras se midieron con instrumentación LC-MS que consiste en un sistema EASY-nLC 1200 acoplado a una fuente de iones de nanoelectrospray y un Q Exactive HF Orbitrap (todo Thermo Fisher Scientific). Los péptidos purificados se separaron en columnas de HPLC de 40 cm (ID: 75 μm; empaquetadas internamente en la punta con resina ReproSil-Pur C18-AQ de 1.9 μm (Dr. Maisch GmbH)). Para cada análisis de LC-MS/MS, se inyectaron alrededor de 0.5 μg de péptidos para los gradientes de 45 min y 1 μg para las fracciones del conjunto de datos de plasma profundo. Los péptidos se cargaron en buffer A (0.1 % de ácido fórmico, 5 % de DMSO (v/v)) y se eluyeron con un gradiente lineal de 35 min de 3 a 30 % de buffer B (0.1 % de ácido fórmico, 5 % de DMSO, 80 % de (v/v) acetonitrilo), seguido de un aumento de 7 min al 75 % de buffer B, un aumento de 1 min al 98 % de buffer B, y un lavado de 2 min con 98 % de buffer B a un caudal de 450nl/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C, mediante un elemento Peltier que contenía un horno desarrollado internamente.</p> <p>Los espectros de MS se adquirieron con un método de escaneo MS/MS dependiente de datos Top15 (método topN) para la biblioteca y con el método de escaneo BoxCar para muestras de estudio. El valor objetivo para los espectros de MS de barrido completo fue de 3×10^6 cargas en el rango de 300 a 1650 m/z rango con un tiempo máximo de inyección de 55 ms y una resolución de 120 000 200 m/z. La fragmentación de los iones precursores se</p>
--	--	---

		realizó mediante disociación de colisión de mayor energía con una energía de colisión normalizada de 27 eV. Los escaneos MS/MS se realizaron a una resolución de 15 000 - 200 m/z con un valor objetivo de control automático de ganancia (AGC) de 5×10^4 y un tiempo máximo de inyección de 25 ms.
Sesgo en la selección del resultado informado	Bajo riesgo	El resultado numérico evaluado (razón de cambio), fue obtenido a partir de las medias de intensidad de señal esteatosis/control. El valor de razón de cambio para ser considerado adecuado debió ser igual o superior a 1.2, así mismo ser igual o inferior a 0.8 en condiciones esteatosis/control. La media se obtuvo a partir de 10 datos numéricos de intensidades de señal del grupo esteatosis y 10 datos numéricos de intensidades de señal del grupo control, se obtuvo la razón de cambio de todas las proteínas que se encontraban en el documento de información suplementaria, y fueron registradas las proteínas que presentaban diferencias proteómicas adecuadas a la revisión, estos cálculos fueron realizados en una hoja de Microsoft Excel por la autora de la revisión.
Sesgo de método estadístico	Bajo riesgo	De las medias de las intensidades de señal, se determinó su normalidad, se realizó la prueba de T student de dos muestras para determinar los cambios significativos entre los grupos de enfermedad y control.

Estudio E1b de (Niu *et al.*, 2019).

Métodos	LC-MS/MS
Participantes	08 pacientes con diabetes tipo 2 como grupo control 10 pacientes con diabetes tipo 2 y EHGNA como grupo patológico
Resultados	Razón de cambio de la proteína afamina (esteatosis/control) de 1.4

Sesgo	Decisión del autor	Apoyo de decisión
Sesgo por confusión	Bajo riesgo	Los 08 controles presentaron diabetes tipo 2 (DT2), al igual que el grupo patológico, para evitar que la expresión de proteínas se viera afectada por la influencia de factores metabólicos.
Sesgo en la elección de participantes en el estudio	Riesgo poco claro	Dado que la patología de HGNA está relacionada con DT2, se seleccionó un control con pacientes con DT2. Los controles fueron emparejados por edad y sexo. Pacientes seleccionados de la consulta externa del Departamento de medicina, Gentofte Hospital, University of Copenhagen, Hellerup, Dinamarca, desde septiembre de 2011 hasta mayo de 2013.
Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial	Alto riesgo	Los sesgos de información debido a la clasificación errónea, se abordaron con tres evaluaciones distintas; para la cohorte patológica, el diagnóstico fue por histología, solo se realizó esta prueba en los pacientes patológicos y no en los controles. La cohorte control sin signos de enfermedad hepática u otras enfermedades crónicas (según historial del paciente, mediciones bioquímicas y evaluación por ultrasonido), sin antecedentes de familiares con diabetes. La segunda evaluación fueron los criterios

		<p>de exclusión, como un consumo máximo de alcohol en mujeres más de 7 unidades por semana y en hombres más de 14 unidades por semana; tratamiento con fármacos esteatogénicos dentro de los 3 meses previos a la inclusión; anemia; enfermedad inflamatoria intestinal; aumento de creatinina (>150micromol/L); albuminaria y otras enfermedades crónicas. Se realizó la tercera evaluación para ambas cohortes con pruebas antropométricas y datos clínicos.</p> <p>Según el grado de EHGNA activity score 4 (2-4), la cohorte de HGNA está en el límite de esteatosis hepática y podría iniciar a dar positivo en NASH.</p>
<p>Sesgo en la medición del resultado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>El método usado para medir resultados fue LC-MS/MS, apropiado debido a su sensibilidad, fiabilidad y eficiencia para detectar y cuantificar compuestos o sustancias. La medición o determinación del resultado de cada grupo de muestras (patológica y control) fue siguiendo el mismo protocolo para ambos.</p> <p>Se realizó en 3 fases, recolección de muestras; pretratamiento de muestra; e identificación de la muestra. La recolección de la muestra se realizó con una recolección de plasma en ayunas y se distribuyó en una placa de 96 pocillos para el análisis proteómico. En el pretratamiento, las proteínas se desnaturalizaron, redujeron, alquilaron y digirieron utilizando la canalización automatizada de perfiles de proteoma de plasma, los péptidos se purificaron con el kit PreOmics "iST" (PO 00001, PreOmics</p>

		<p>GmbH).</p> <p>Para el análisis de identificación de las muestras, los péptidos purificados se analizaron en medición por triplicado de forma aleatoria mediante LC-MS/MS. Las muestras se midieron con instrumentación LC-MS que consiste en un sistema EASY-n LC 1200 acoplado a una fuente de iones de nanoelectrospray y un Q Exactive HF Orbitrap (todo Thermo Fisher Scientific). Los péptidos purificados se separaron en columnas de HPLC de 40 cm (ID: 75 µm; empaquetadas internamente en la punta con resina ReproSil-Pur C18-AQ de 1.9 µm (Dr. Maisch GmbH)). Para cada análisis de LC-MS/MS, se inyectaron alrededor de 0.5 µg de péptidos para los gradientes de 45 min y 1 µg para las fracciones del conjunto de datos de plasma profundo. Los péptidos se cargaron en buffer A (0.1 % de ácido fórmico, 5 % de DMSO (v/v)) y se eluyeron con un gradiente lineal de 35 min de 3 a 30 % de buffer B (0.1 % de ácido fórmico, 5 % de DMSO, 80 % de (v/v) acetonitrilo), seguido de un aumento de 7 min al 75 % de buffer B, un aumento de 1 min al 98 % de buffer B, y un lavado de 2 min con 98 % de buffer B a un caudal de 450 nl/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C mediante un elemento Peltier que contenía un horno desarrollado internamente.</p> <p>Los espectros de MS se adquirieron con un método de escaneo MS/MS dependiente de datos Top15 (método topN) para la biblioteca y con el método de escaneo BoxCar para muestras de estudio. El valor objetivo para los espectros de MS de barrido completo fue de 3×10^6</p>
--	--	---

		<p>cargas en el rango de 300 a 1650 m/z, rango con un tiempo máximo de inyección de 55 ms y una resolución de 120000 a 200 m/z. La fragmentación de los iones precursores se realizó mediante disociación de colisión de mayor energía con una energía de colisión normalizada de 27 eV. Los escaneos MS/MS se realizaron a una resolución de 15 000 - 200 m/z con un valor objetivo de control automático de ganancia de 5×10^4 y un tiempo máximo de inyección de 25 ms.</p>
<p>Sesgo en la selección del resultado informado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>El resultado numérico evaluado (razón de cambio), fue obtenido a partir de las medias de intensidad de señal esteatosis/control. El valor de razón de cambio para ser considerado adecuado debió sobrepasar el valor de 1.2 o ser menor a 0.8 en condiciones esteatosis/control. La media de cada grupo se obtuvo a partir de 10 datos numéricos de intensidades de señal del grupo HGNA y 08 datos numéricos de intensidades de señal del grupo control, se obtuvo la razón de cambio de todas las proteínas que se encontraban en el documento de información suplementaria, y fueron registradas las proteínas que presentaban diferencias adecuadas a la revisión, estos cálculos fueron realizados en una hoja de Microsoft Excel por la autora de la revisión.</p>
<p>Sesgo de método estadístico</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>De las medias de las intensidades de señal, se determinó su normalidad, y se realizó la prueba de T student de dos muestras para determinar los cambios significativos entre los grupos de enfermedad y control.</p>

Estudio E2 de (Cheng *et al.*, 2022).

Métodos	iTRAQ labeling LC MS/MS
Participantes	23 pacientes con obesidad metabólicamente saludable sin EHGNA como grupo control 20 pacientes con HGNA (esteatosis simple) y obesidad como grupo patológico
Resultados	Razón de cambio de la proteína afamina (esteatosis/control) de 1.5

Sesgo	Decisión del autor	Apoyo de decisión
Sesgo por confusión	Bajo riesgo	Los 23 controles presentaban obesidad metabólicamente saludable al igual que el grupo patológico (pero sin presentar la patología de HGNA), por lo tanto, es poco probable que los biomarcadores proteicos que aparezcan con una razón de cambio significativo sean por obesidad porque en ambos grupos está presente la obesidad.
Sesgo en la selección de participantes en el estudio	Riesgo poco claro	De los pacientes con obesidad que fueron sometidos a una cirugía laparoscópica de bypass gástrico en el departamento de cirugía hepatocelular Drum Tower ubicado en Nanjing China, fueron seleccionados 70 sujetos diagnosticados con MHO Y EHGNA (23 MHO, 20 EHGNA leve, y 27 EHGNA grave).
Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial	Bajo riesgo	Los sesgos de información debidos a la clasificación errónea se abordaron con tres evaluaciones distintas. La primera evaluación involucra a ambos grupos, el diagnóstico fue por histología, se realizó esta prueba en los pacientes y en los controles. La segunda evaluación constó con criterios de inclusión y exclusión para pacientes patológicos y controles, con edad mínima de 18 años; IMC > 30kg/m ² ; sin antecedentes de hipertensión o diabetes. Los pacientes obesos con evidencia de hepatitis viral,

		<p>hemocromatosis, consumo de alcohol >20g/d en mujeres y >30g/d en hombres, y personas que abusen de las drogas fueron excluidas. La tercera evaluación involucra los datos clínicos y antropométricos de los participantes en el estudio.</p>
<p>Sesgo en la medición del resultado</p>	<p>Riesgo poco claro</p>	<p>El método usado para medir resultados fue iTRAQ labeling LC MS/MS, apropiado debido a su sensibilidad, fiabilidad y eficiencia para detectar y cuantificar compuestos o sustancias. La determinación del resultado de cada grupo de muestras (patológica y control) fue siguiendo el mismo protocolo para ambos. Se realizó en 3 fases, recolección de muestras; pretratamiento de muestra; e identificación de la muestra.</p> <p>La fase de recolección de la muestra se realizó con una recolección de sangre venosa de todos los participantes después de un ayuno nocturno antes de la cirugía. Se extrajeron aproximadamente 5 mL de sangre en un tubo que se incubó a temperatura ambiente durante 40 min y se centrifugó a 1000× g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante que contenía proteínas séricas se recogió y almacenó a -80 °C hasta su análisis.</p> <p>Para el pretratamiento, muestras de suero de ocho pacientes (incluidos cuatro sujetos MHO y cuatro sujetos HGNA (esteatosis)) se diluyeron con buffer de equilibrio y se inyectaron en una columna de eliminación de IgG y albúmina de inmunoafinidad ProteoPrep® (PROTIA-1KT, Sigma, EE.UU.). Las soluciones de proteína de baja abundancia resultantes se concentraron usando una unidad de filtro centrífugo de 10 kDa. La concentración de proteína de cada solución de muestra se cuantificó utilizando un kit BCA y las muestras se almacenaron por separado a -80 °C. El eluato de suero empobrecido se diluyó con buffer de disolución y luego se redujo con TCEP y se alquiló con MMTS. La tripsina se utilizó para digerir proteínas en péptidos en condiciones</p>

		<p>especiales.</p> <p>En la identificación de la muestra, los péptidos recolectados se marcaron usando un iTRAQ Reagent-8 Plex Multiplex Kit (AB SCIEX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el experimento iTRAQ, cuatro muestras de suero de pacientes obesos 1-4 se etiquetaron con etiquetas iTRAQ 113, 114, 115, 116, y cuatro muestras de suero de pacientes HGNA 1-4 se etiquetaron con etiquetas iTRAQ 117, 118, 119, 121. Las ocho muestras etiquetadas se mezclaron, se secaron en un SpeedVac y se fraccionaron en 48 fracciones mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Finalmente, se adquirieron los datos de MS utilizando un NanoLC-2D junto con un sistema TripleTOF5600+ (ABSCIEX).</p> <p>Solo se ocuparon 4 muestras aleatorias del grupo control y 4 muestras del grupo HGNA, los pacientes del grupo control padecen obesidad metabólicamente saludable y los pacientes del grupo patológico presentan obesidad con esteatosis hepática. (Incluye imágenes de histología de ambos grupos).</p> <p>Debido a que solo se usaron 4 muestras aleatorias de esteatosis y no las de todo el grupo patológico se presenta un sesgo poco claro.</p>
<p>Sesgo en la selección del resultado informado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>Los datos MS/MS originales se enviaron para su análisis mediante el software ProteinPilot y se buscaron contra <i>Homo sapiens</i> en la base de datos UniProt. En el análisis del grupo HGNA versus el grupo obeso, se calcularon las razones de cambio de las proteínas utilizando su media promedio en cada grupo. Para identificar proteínas expresadas de forma significativamente diferencial en suero entre los grupos obesos y EHGNA, las proteínas con una razón de cambio mayor o igual a 1.20 y un valor de $p < 0.05$ mediante la prueba T se definieron como reguladas al alza, las</p>

		<p>proteínas con una razón de cambio menor o igual 0.83 y un valor de $p < 0.05$ mediante la prueba T se definieron como reguladas a la baja. Los resultados de western blot confirmaron posteriormente una alta expresión de afamina en el grupo HGNA con una respuesta similar en las muestras utilizadas para iTRAQ.</p>
<p>Sesgo de método estadístico</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Solo las proteínas con un valor de p válido se seleccionaron para su posterior análisis. Se empleó la prueba T de Student de dos muestras para determinar las proteínas cambiadas significativamente entre los dos grupos. Las variables continuas se presentan como la media \pm desviación estándar.</p>

Estudio E3 de (Małecki *et al.*, 2020).

Métodos	Nano-LC MS/MS
Participantes	14 pacientes con IMC, ecografía hepática y actividad de aminotransferasa normales como grupo control 16 pacientes obesos con HGNA (esteatosis simple)
Resultados	Razón de cambio de la proteína afamina en condiciones esteatosis/control de 1.2

Sesgo	Decisión del autor	Apoyo de decisión
Sesgo por confusión	Riesgo poco claro	Los pacientes que se valoraron como grupo control contaban con IMC, ecografía hepática y actividad de aminotransferasa normales; el grupo patológico cuenta con obesidad y con HGNA.
Sesgo en la elección de participantes en el estudio	Riesgo poco claro	El grupo patológico estuvo formado por pacientes con diagnóstico de EHGNA, que acudieron a consulta externa de hepatología en la clínica del departamento Infectious diseases and child neurology. El grupo control estuvo formado por niños hospitalizados en el departamento de infectious diseases and child neurology due to headaches. Un grupo de 30 pacientes (19 niños y 11 niñas) participaron en el estudio de los cuales 14 niños se agruparon como control y 16 niños obesos con HGNA se agruparon como grupo patológico.
Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial	Riesgo poco claro	Los sesgos de información debido a la clasificación errónea, se abordaron con evaluaciones distintas. Se realizó una identificación de la patología y la falta de EHGNA en el grupo control, posteriormente se realizaron pruebas de laboratorio y finalmente una

		<p>entrevista detallada de los niños con sus padres para descartar riesgos.</p> <p>Para la evaluación de la patología (el grupo control pasó por un proceso distinto), se realizaron exámenes de ultrasonido utilizando una máquina Samsung HS40 (convex probe CA2-8AD: 2-8 MHz, linear probe LA3-16AD: 3-16 MHz and phased array probe PN2-4: 2-4 MHz). Los resultados de los exámenes de ultrasonido se evaluaron retrospectivamente de acuerdo con la escala del indicador de hígado graso por ultrasonido semicuantitativo no invasivo (US-FI). Los parámetros evaluados en la escala fueron contraste hígado/riñón (leve - 2 puntos, grave - 3 puntos, parámetro esencial). Según los valores de corte establecidos para la población pediátrica, se diagnosticó EHGNA ≥ 2 puntos.</p> <p>El peso del paciente se midió en una balanza digital electrónica (150 kg de capacidad y 10 g de precisión).</p> <p>En el caso de los controles ingresaron por razones diagnósticas: realización de resonancia magnética, sin otras enfermedades crónicas (información basada en entrevista médica y exámenes de laboratorio realizados). Los miembros del grupo de control tenían un IMC, una ecografía hepática y una actividad de aminotransferasa normales.</p> <p>Para la selección de ambos grupos se excluyeron las enfermedades hepáticas (no HGNA para el grupo patológico): VHB BsAg, (anti-HBc), VHC (anti-VHC), EBV (antígeno antiviral de la cápside de las clases BV, IgM e IgG) e infecciones por CMV (anti-CMV IgM e IgG), hepatitis autoinmune (IgG sérica total,</p>
--	--	--

		<p>aminotransferasas, ANA - anticuerpos antinucleares y anti-SMA - anticuerpos anti-músculos lisos), hemocromatosis (hierro sérico, ferritina, saturación de transferrina), deficiencia de alfa-1-antitripsina (nivel de alfa-1-antitripsina), enfermedad celíaca (IgA y anticuerpos IgG antitransglutaminasa), enfermedad de Wilson (ceruloplasmina y nivel de cobre sérico), fibrosis quística (cribado de recién nacidos, pruebas de sudor), trastornos metabólicos congénitos (cribado de recién nacidos y análisis de ácidos orgánicos en orina por cromatografía de gases-espectrometría de masas).</p> <p>El riesgo de ingesta de fármacos hepatotóxicos (incluyendo altas dosis de paracetamol, un fármaco comúnmente utilizado en pediatría) y el alcohol, un problema importante, especialmente en el grupo de adolescentes, cualquier cantidad de alcohol durante el año anterior se evaluó mediante una entrevista detallada con el paciente y el padre.</p> <p>Todas las condiciones utilizadas en el diagnóstico diferencial se consideraron criterios de exclusión. De acuerdo al diagnóstico no invasivo, los niños contaban con HGNA leve (esteatosis simple) pero al no ser diagnosticado por medio de biopsia puede ser sujeto a variaciones de la patología (esteatosis-esteatohepatitis).</p>
<p>Sesgo en la medición del resultado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>El método usado para medir resultados fue LC-MS/MS, apropiado debido a su sensibilidad, fiabilidad y eficiencia para detectar y cuantificar compuestos o sustancias. La medición o determinación del resultado de cada grupo de muestras (patológica y control) fue siguiendo el mismo protocolo para ambos. Las proteínas fueron reducidas,</p>

		alquiladas y digeridas con tripsina. Cada muestra se preparó para la digestión por duplicado. Para cada serie, 1.5 µg del digerido de proteínas se sometieron a análisis nano-LC MS/MS (cromatografía nanolíquida-espectrometría de masas en tándem) con un espectrómetro de masas Dionex UltiMate 3000 RSLC y Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).
Sesgo en la selección del resultado informado	Bajo riesgo	Las proteínas expresadas diferencialmente (valor $p < 0.05$, ≥ 2 péptidos únicos con $>99\%$ de confianza) se sometieron al análisis en software. El resultado numérico evaluado (razón de cambio), fue obtenido a partir de las medias de los grupos (esteatosis/control). El valor de razón de cambio para ser considerado adecuado debió ser igual o sobrepasar el valor de 1.2 ó ser igual o menor a 0.8 en condiciones esteatosis/control.
Sesgo de método estadístico	Bajo riesgo	El análisis estadístico se realizó en STATISTICA (versión 13, TIBCO Software Inc., Palo Alto, EE. UU.). Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (DE). Se utilizaron pruebas T-Student o Mann-Whitney para comparar variables continuas, cuando correspondía. Se aplicó la prueba de Pearson Chiquare a las variables categóricas. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para probar si las muestras se originan en la misma distribución. Las proteínas expresadas diferencialmente (valor $p < 0,05$, ≥ 2 péptidos únicos con $>99\%$ de confianza) se sometieron al análisis en el software Perseus 1.4.1.3 (http://coxdocs.org/doku.php?id=perseus:start) utilizando la prueba exacta de Fisher de cola derecha, para identificar funciones estadísticamente enriquecidas, vías

		<p>de señalización y categorías de enfermedades. Los análisis multivariados se llevaron a cabo mediante análisis de componentes principales no dirigido y agrupamiento jerárquico. Las correlaciones se realizaron utilizando la prueba de correlación de rangos de Spearman. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.</p>
--	--	---

Estudio E4 de (Bell *et al.*, 2010).

Métodos	LC/MS-MS
Participantes	16 pacientes obesos sanos como grupo control 24 obesos con EHGNA (esteatosis simple) como grupo patológico

Sesgo	Decisión del autor	Apoyo de decisión
Sesgo por confusión	Bajo riesgo	Los pacientes que se valoraron como grupo control fueron diagnosticados con obesidad al igual que el grupo patológico así que las proteínas expresadas en el grupo control como en el patológico (HGNA) no serán biomarcadores de la obesidad debido a que se encuentra en ambos grupos. La diferencia en ambos grupos es la patología de HGNA.
Sesgo en la selección de participantes en el estudio	Riesgo poco claro	Los individuos incluidos en este estudio fueron seleccionados de sesenta y nueve sujetos con sospecha de EHGNA que se sometieron a una biopsia de hígado de los cuales 24 pacientes se diagnosticaron con esteatosis simple. Las muestras de suero de los 16 sujetos de control obesos se originaron en un conjunto previo de estudios en los que se excluyó la enfermedad hepática subyacente mediante ultrasonido hepático y parámetros bioquímicos.
Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial	Bajo riesgo	Los sesgos de información debido a la clasificación errónea, se abordaron con evaluaciones distintas. La primera evaluación fue una biopsia que constó de un diagnóstico histológico de HGNA evaluado por un hepatólogo experimentado, solo al grupo patológico ya que el grupo control excluyó la patología por medio de ultrasonido hepático. La segunda evaluación se realizó con pruebas de laboratorio a ambos grupos, revelando que los pacientes del grupo HGNA carecían de un consumo significativo de alcohol,

		<p>hepatitis viral, enfermedad hepática autoinmune y hemocromatosis. Los controles obesos tenían bioquímicas hepáticas normales, sin evidencia física de enfermedad hepática y carecían de resistencia a la insulina significativa y síndrome metabólico.</p>
<p>Sesgo en la medición del resultado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>La sangre se recogió, centrifugó dividió en alícuotas y se almacenó en viales de plástico (NUNC, Rochester, NY) a 80 °C hasta su uso.</p> <p>Para la segunda fase se realizó un pretratamiento donde las proteínas fueron extraídas de <100 microlitros de suero con un buffer de lisis (8M urea y 10 Mm DTT, (dithiothreitol)). Las proteínas de alta abundancia fueron eliminadas con columnas SepproTip, y la concentración se determinó con un ensayo de Bradford. Los extractos de proteínas fueron reducidos y alquilados con DTT, yodoacetamida, trietilfosfina, y yodoetanol. Las mezclas proteicas fueron digeridas con tripsina y filtradas a través de un filtro spin 0.45 micrómetros. Después fue aplicado al sistema HPLC y se agregó lisozima de pollo a cada muestra en una cantidad constante como referencia interna para evaluar las variaciones técnicas antes de la digestión trípica.</p> <p>Para la tercera fase se realizó la identificación donde se inyectaron péptidos tríplicos (<20 microgramos) en un sistema de nano-HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con una columna capilar C18 en orden aleatorio. Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 5 %-45 % de acetonitrilo durante 120 minutos a una velocidad de flujo de 500 nL/min y el efluente se electropulverizó en el espectrómetro de masas LTQ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los datos se recopilaron en el modo "Triple Play" (MS scan, Zoom scan y MS/MS scan). Los datos adquiridos fueron filtrados y analizados</p>

		<p>por el algoritmo del propietario. Las búsquedas en bases de datos contra la base de datos International Protein Index (IPI) (Instituto Europeo de Bioinformática, 2005), y la base de datos no redundante de <i>Homo sapiens</i> (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2005), se realizaron utilizando X!Tandem21 y SEQUEST22.</p>
<p>Sesgo en la selección del resultado informado</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>Los datos de las medias de las intensidades de las proteínas se encontraban en LOG2, por lo que se aplicó un antilog2, de estos datos, se realizó el cálculo de razón de cambio del grupo patológico y el control (esteatosis/control), las proteínas con un valor de razón de cambio superior o igual a 1.2 y las proteínas con razón de cambio inferior o igual a 0.8, fueron las seleccionadas.</p>
<p>Sesgo de método estadístico</p>	<p>Bajo riesgo</p>	<p>Se utilizó ANOVA (análisis de varianza) para detectar cambios significativos en la expresión de proteínas entre los grupos de pacientes. Para eliminar el sesgo técnico, se utilizó la aleatorización del orden de medición y la "normalización por cuantiles". La normalización se realizó en una escala log2 (una unidad de diferencia en esta escala logarítmica equivale a 2-razón de cambio).</p> <p>Del modelo ANOVA se obtuvo un valor P. El valor P es una estimación de la FPR (tasa de falsos positivos). El valor P se transformó en un valor q, un número que estima la FDR (tasa de descubrimiento falso). El umbral del valor P se fijó para controlar la FDR en 5 % (0.05). Una proteína con un "cambio significativo" o "expresión diferencial" se definió como una diferencia en la expresión de proteínas entre dos grupos de pacientes cualesquiera con un valor q de 0.05.</p>

Estudio E5 de (Miller *et al.*, 2014).

Métodos	iTRAQ labeling LC MS/MS
Participantes	10 pacientes que no presentan obesidad ni HGNA como grupo control 07 pacientes con esteatosis simple como grupo patológico
Resultados	Razón de cambio de la proteína afamina, en condiciones esteatosis/control de 1.6

Sesgo	Decisión del autor	Apoyo de decisión
Sesgo por confusión	Riesgo poco claro	Los 10 controles no presentan obesidad, ni ningún estado de la patología de HGNA, son controles sanos.
Sesgo en la selección de participantes en el estudio	Riesgo poco claro	Pacientes identificados con EHGNA por biopsia hepática en una temporalidad de alrededor 3 meses.
Sesgo de la mala-clasificación o sesgo de clasificación no diferencial	Bajo riesgo	Los sesgos de información debido a la clasificación errónea, se abordaron con tres evaluaciones distintas. La primera evaluación solo involucra al grupo patológico, el diagnóstico fue por biopsia, la evaluación histológica fue realizada por un solo hepatohistopatólogo que desconocía detalles clínicos. La segunda evaluación consta de criterios de inclusión, en el caso del grupo patológico los pacientes con pruebas negativas de hepatitis viral; enfermedad hepática autoinmune; hemocromatosis; y enfermedad hepática alcohólica fueron incluidos. Los controles saludables fueron excluidos en presencia de cualquier característica del síndrome metabólico; ingesta de alcohol en mujeres >14 unidades/semana y hombres >21 unidades/semana.

		Como tercera evaluación se cuenta con una tabla de datos demográficos, antropométricos y clínicos.
Sesgo en la medición del resultado	Bajo riesgo	<p>El método usado para medir resultados fue iTRAQ labeling LC MS/MS, apropiado debido a su sensibilidad, fiabilidad y eficiencia para detectar y cuantificar compuestos o sustancias. La medición o determinación del resultado de cada grupo de muestras se realizó en 3 fases, recolección de muestras; pretratamiento de muestras; e identificación de las muestras.</p> <p>Se recogió suero de pacientes identificados con EHGNA dentro de los 3 meses posteriores a la biopsia hepática. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min y luego se dividió en alícuotas en viales de 100 µL y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Las muestras se procesaron y almacenaron a -80 °C dentro de las 4h posteriores a la recolección. De los controles no se menciona sobre la recolección de muestras.</p> <p>Como pretratamiento se realizó el agotamiento de la mayoría de proteínas séricas muy abundantes, se llevó a cabo utilizando columnas de agotamiento Genway Seppro immuno-affinity.</p> <p>Se utilizaron muestras de suero agrupadas para el estudio iTRAQ. 31 muestras de suero de pacientes individuales se agruparon en cuatro grupos específicos de enfermedades (esteatosis simple, esteatohepatitis no alcohólica sin fibrosis, esteatohepatitis no alcohólica con fibrosis temprana y control). Volúmenes iguales de cada individuo contribuyeron al grupo final para cada estado de enfermedad y luego se etiquetaron con los reactivos iTRAQ. El fraccionamiento fuera de línea con</p>

		<p>unacolumna Gemini C18 high pH reverse phase HPLC, se realizó antes del análisis con un espectrómetro de masas q-TOF (6520 Accurate Mass QTOF, Agilent).</p> <p>Cabe mencionar que solo se evaluaron los datos de esteatosis simple y control para la recolección de datos en esta revisión sistemática.</p>
Sesgo en la selección del resultado informado	Bajo riesgo	<p>La identificación de proteínas se basó en al menos dos o más péptidos, y la identificación de MASCOT logró identidad sobre homología. La razón de cambio observado entre la enfermedad y el control tenía que alcanzar significación estadística. La validación de los biomarcadores candidatos se realizó con kits ELISA de Quantikine, R&D Systems, USCN Life Science Inc, AssayPro, Abnova, Genway y CircuLex según los manuales del fabricante. Las muestras clínicas utilizadas en los estudios de validación incluyeron todas las muestras utilizadas en los estudios iTRAQ. De los datos de razón de cambio significativo, se seleccionaron los datos de las proteínas mayor o igual a 1.2 y menor o igual a 0.8</p>
Sesgo de método estadístico	Bajo riesgo	<p>Todos los análisis comparativos se realizaron utilizando la prueba T de Student. Se fijó un umbral significativo de 0.05. Los valores del área bajo la curva característica operativa del receptor (AUROC) se presentan con intervalos de confianza del 95 %.</p>