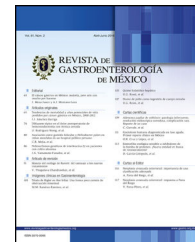




REVISTA DE GASTROENTEROLOGÍA DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

Producción de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide durante el desarrollo de la fibrosis hepática por hepatitis C crónica



D. Rosique-Oramas^a, M. Martínez-Castillo^a, A. Raya^a, Z. Medina-Ávila^a, F. Aragón^a, J. Limón-Castillo^a, A. Hernández-Barragán^a, A. Santoyo^a, E. Montalvo-Javé^b, J.L. Pérez-Hernández^c, F. Higuera-de la Tijera^c, A. Torre^d, D. Kershenobich^d y G. Gutiérrez-Reyes^{a,*}

^a Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM), Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, México

^b Clínica Hepato-Pancreato-Biliar, Servicio de Cirugía General, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, México

^c Departamento de Gastroenterología, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, Ciudad de México, México

^d Unidad de Hepatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México

Recibido el 13 de mayo de 2019; aceptado el 10 de agosto de 2019

Disponible en Internet el 15 de noviembre de 2019

PALABRAS CLAVE

Fibrosis hepática;
Hepatitis C crónica;
IGFBP;
Biomarcadores

Resumen

Introducción y objetivos: El factor de crecimiento tipo insulinoide 1 es modulado por las proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulinoide (IGFBP); dichas proteínas son sintetizadas en el hígado. El objetivo de este trabajo fue evaluar las concentraciones de IGFBP-1 a IGFBP-7 en pacientes con hepatitis C crónica y estudiar la asociación con el grado de fibrosis. **Pacientes y métodos:** Estudio prospectivo, transversal. Se incluyeron pacientes con hepatitis C crónica. El grado de fibrosis se determinó por medio de Fibrotest y Fibroscan, y los pacientes se compararon con un grupo control. Los niveles séricos de IGFBP-1 a IGFBP-7 fueron cuantificados por arreglo en suspensión múltiple. Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, correlación de Spearman y curvas ROC.

Resultados: Al comparar entre pacientes y controles, las concentraciones fueron más altas en las IGFBP-1, -2, -4 y -7 ($p=0.02$, $p=0.002$, $p=0.008$ y $p<0.001$, respectivamente). IGFBP-3 mostró una tendencia a ser menor en los pacientes ($p=0.066$), mientras que las IGFBP-5 e IGFBP-6 tuvieron valores similares entre pacientes y controles ($p=0.786$ y $p=0.244$, respectivamente). De las siete IGFBP, las concentraciones de IGFBP-3 fueron las más altas. De acuerdo con el grado de fibrosis, se encontraron diferencias significativas en IGFBP-5 e IGFBP-7.

* Autor para correspondencia. Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM), Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, México.

Correo electrónico: gabgurey@yahoo.com.mx (G. Gutiérrez-Reyes).

Conclusión: Las IGFBP tienen un papel relevante en el proceso de daño fibrogénico hepático. En especial, la IGFBP-7 participa de manera diferencial en los estadios de fibrosis, por lo que puede ser un potencial biomarcador sérico.

© 2019 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Liver fibrosis;
Chronic hepatitis C;
IGFBPs;
Biomarkers

Production of insulin-like growth factor-binding proteins during the development of hepatic fibrosis due to chronic hepatitis C

Abstract

Introduction and aims: Insulin-like growth factor 1 is modulated by the insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) that are synthesized in the liver. The aim of the present study was to evaluate the concentrations of IGFBPs 1-7 in patients with chronic hepatitis C and study their association with fibrosis stage.

Patients and methods: A prospective, cross-sectional study was conducted that included patients with chronic hepatitis C. The stages of fibrosis were determined through FibroTest and FibroScan and the patients were compared with a control group. Serum levels of IGFBPs 1-7 were quantified through multiple suspension arrays. The Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test, Spearman's correlation, and ROC curves were used for the statistical analysis.

Results: Upon comparing the patients and controls, the highest concentrations were found in IGFBPs 1, 2, 4, and 7 ($p=0.02$, $p=0.002$, $p=0.008$, and $p<0.001$, respectively). IGFBP-3 levels had a tendency to be lower in the patients ($p=0.066$), whereas values were similar between patients and controls for IGFBP-5 and 6 ($p=0.786$ and $p=0.244$, respectively). Of the seven IGFBPs, IGFBP-3 concentrations were the highest. There were significant differences between fibrosis stages for IGFBP-5 and IGFBP-7.

Conclusion: IGFBPs play a relevant role in the fibrotic process in liver damage. IGFBP-7, in particular, differentiates fibrosis stages, making it a potential serum biomarker.

© 2019 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción y objetivo

La familia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) son proteínas con una alta similitud de secuencia con la insulina. El sistema de IGF funciona como un eje regulador endocrino, paracrino y autocrino para la proliferación celular, supervivencia y apoptosis en diferentes tipos celulares¹. De manera general el sistema de IGF consiste en 2 receptores de superficie (IGF1R e IGF2R), 2 ligandos (IGF-1 e IGF-2) y una familia de proteínas de unión al IGF (*insulin-like growth factor binding proteins* [IGFBP]). Estas últimas tienen un papel importante como reguladores fisiológicos de la interacción de los IGF con sus receptores celulares en diferentes órganos, incluyendo el tracto gastrointestinal y el hígado¹. A la fecha se han descrito diferentes tipos de IGFBP, las cuales son producidas principalmente por los hepatocitos y son secretadas al suero. Se ha descrito extensamente que estas proteínas se pueden unir con una alta (IGFBP-1 a IGFBP-6) o baja afinidad (IGFBP-7, entre otras) a los IGF². Los niveles normales de IGF-1 en el suero son aproximadamente de 40 nmol/L; no obstante, el 99% se encuentra asociado a las diferentes IGFBP, principalmente a IGFBP-3².

De manera específica, se conoce que la IGFBP-1, así como IGFBP-3, IGFBP-4 e IGFBP-6 regulan negativamente la capacidad de interacción de IGF con el IGF1R, lo cual se ha

asociado directamente con el crecimiento celular, la diferenciación y el metabolismo, así como con su participación en la disminución de los efectos de IGF en los cánceres de pulmón, mama, colon y próstata¹. Adicionalmente, a estas funciones se ha descrito que las IGFBP tienen algunos mecanismos independientes del IGF, participando en el metabolismo energético y carcinogénesis de acuerdo con el órgano y su interacción con las moléculas de la superficie celular¹.

La fibrosis hepática, que resulta de una lesión hepatocelular crónica, es un proceso dinámico que se caracteriza por un aumento de la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC) las cuales son producidas por las células hepáticas estelares (HSC); además, la fibrosis se considera la etapa final de la mayoría de las enfermedades hepáticas³. En la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) se ha observado un aumento significativo en los niveles de IGFBP-1, principalmente en etapas avanzadas de fibrosis⁴. Al mismo tiempo se ha determinado que las concentraciones séricas de IGFBP-3 son bajas correlacionando con la severidad de la disfunción hepática y un mal pronóstico en hepatocarcinoma⁵. Por otro lado, de manera experimental se ha encontrado que la expresión de IGFBP-7 induce la activación de las HSC y la apoptosis de hepatocitos⁶. En cuanto a la participación de IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6,

existe poca evidencia de sus concentraciones en suero y su asociación con enfermedades hepáticas; no obstante, se ha reportado que estas proteínas pueden inhibir la angiogénesis (IGFBP-4)⁷, regular el papel de TNF- α , el crecimiento de tumores (IGFBP-5)⁸ y promover la migración de células de cáncer de próstata (IGFBP-6)⁹.

Se ha descrito que la fibrosis hepática aun en etapas avanzadas puede ser reversible, lo que ha estimulado considerablemente su investigación con la finalidad de identificar nuevas moléculas para el desarrollo de terapias antifibróticas³. Las IGFBP son producidas en el hígado; sin embargo, existe poca evidencia de su participación en el proceso de daño hepático en humanos, por lo que su estudio puede aportar nuevos conocimientos de la fisiopatología de la fibrosis hepática, lo que permitiría encontrar blancos terapéuticos o complementarios para el diagnóstico de la fibrosis hepática.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar las concentraciones séricas de las distintas IGFBP en pacientes con hepatitis C crónica (HCC) de acuerdo con el grado de fibrosis. Nuestros resultados revelaron concentraciones séricas mayores de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-7 en pacientes con HCC en comparación con el grupo control. Además, se determinó que algunas de estas proteínas presentaron una correlación directa con el grado de fibrosis. Por ello consideramos que las IGFBP son reguladas de manera diferencial y pueden tener una participación importante en el desarrollo de la fibrosis hepática en pacientes con HCC.

Material y métodos

Este fue un estudio transversal. Se incluyeron pacientes del Hospital General de México Eduardo Liceaga, del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán desde enero de 2011 a diciembre de 2015, los cuales fueran vírgenes al tratamiento y que tuvieran la evaluación del grado de fibrosis de acuerdo con el FibroTest y Fibroscan¹⁰. Quedaron divididos de la siguiente manera: F0, F1, F2, F3 y F4; sin embargo, por el número de sujetos en estadios F1 y F2, se decidió agruparlos a ambos en un solo grupo (F1-F2). Se excluyeron aquellos pacientes que tuvieran un consumo riesgoso de alcohol (AUDIT < 8) y que no mostraran concordancia entre los métodos utilizados para el diagnóstico del grado de fibrosis. Así mismo, en este estudio no se incluyeron pacientes con comorbilidades (p. ej., diabetes e hipertensión). Para comparar los datos se utilizaron muestras de sujetos sanos (donadores de sangre) considerados como grupo control, los cuales no tuvieran un consumo riesgoso de alcohol (AUDIT < 8) y la serología para los virus de hepatitis A, B y C fuese negativa.

Variables antropométricas y analíticas

Se incluyeron como variables antropométricas el sexo y la edad de cada sujeto de estudio, así como la talla (centímetros; medición con estadiómetro), el peso (kilogramos; medición con báscula manual), el índice de masa corporal (IMC) (kg/m²; fórmula peso/talla²). Para el análisis bioquímico se consideraron los niveles de bilirrubina total, bilirrubina directa, aspartato aminotransferasa (AST)

y alanina aminotransferasa (ALT). Además, se elaboró una historia clínica detallada con la cual se investigó en forma intencionada en todos los casos la presencia de datos clínicos de daño hepático.

Determinación de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide

Para la determinación de las IGFBP se obtuvieron muestras sanguíneas de todos los participantes (10 mL) las cuales fueron procesadas para la obtención de suero, el cual se almacenó a -80°C hasta su uso. Las concentraciones de dichas proteínas se determinaron mediante el uso de la tecnología de arreglo en suspensión múltiple (kit HIGFBMAG-53K07, Merck Millipore®) la cual se fundamenta en el uso de anticuerpos que permiten estudiar simultáneamente un número variable de proteínas sin reacción cruzada, reduciendo el error intra- (CV < 10%) e interensayo (CV < 15%). Los datos fueron adquiridos utilizando el equipo Luminex 200 MAGPIX® SYSTEMS (n.º de serie 10294005) siguiendo las especificaciones del proveedor (Merck, Millipore). El software Luminex XPONENT, además, nos permitió tener la sensibilidad de los valores mínimos y máximos de detección para cada proteína.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas fueron descritas mediante frecuencias absolutas y relativas (%), mientras que las variables continuas se describieron como la media \pm desviación estándar. Adicionalmente para el análisis de las variables cualitativas se utilizó Chi-cuadrado, y en el caso de las variables cuantitativas se utilizó un análisis no paramétrico: Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Para el análisis de correlación se utilizó la prueba de Spearman. El análisis de sensibilidad y especificidad se realizó mediante la elaboración de curvas ROC, considerando como valores significativos una $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 22 (IBM).

Consideraciones éticas

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga (DI/16/107/03/082) y por el comité de ética de la Facultad de Medicina, UNAM (FM/DI/15/2015). Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes. El protocolo del estudio cumple con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975.

Resultados

En el grupo de estudio fueron incluidos 120 pacientes. Se encontró un mayor predominio del género femenino en el grupo de HCC, mientras que en el grupo control se observó un mayor número de hombres. Respecto al IMC no se observaron diferencias entre ambos grupos; mientras que los valores de bilirrubina total, bilirrubina directa, AST y ALT fueron significativamente mayores en pacientes con HCC (tabla 1).

Tabla 1 Datos demográficos de los sujetos de estudio

	HCC (n = 120)	CT (n = 103)	p
Género, n (%)			
Hombre	25 (29)	76 (89)	< 0.001
Mujer	95 (71)	27 (11)	
Edad (años)	51 ± 10	37 ± 9	< 0.001
IMC (kg/m²)	27 ± 4	28 ± 4	0.464
Bilirrubina total (mg/dL)	1.37 ± 0.22	0.78 ± 0.03	< 0.001
Bilirrubina directa (mg/dL)	1.21 ± 0.16	0.68 ± 0.03	< 0.001
AST (UI/L)	84 ± 7	30 ± 1	< 0.001
ALT (UI/L)	90 ± 6	28 ± 2	< 0.001

Los datos son expresados como la media ± desviación estándar. Análisis estadístico: Chi-cuadrado y U de Mann-Whitney.

ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; CT: sujetos control; HCC: hepatitis C crónica; IMC: índice de masa corporal.

Cuantificación de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide

Con respecto a las mediciones de las IGFBP en pacientes y controles, se encontró que la concentración (ng/mL) de IGFBP-1 fue mayor en pacientes comparado con los controles (1.35 ± 0.26 y 0.65 ± 0.12 , $p=0.02$); de igual manera IGFBP-2 mostró valores más altos en los pacientes que en los controles (16.26 ± 3.81 vs. 3.91 ± 0.35 , $p=0.002$). El análisis de la IGFBP-3 reveló que fue la proteína con las concentraciones más altas de todas las IGFBP, encontrándose además una tendencia a valores menores en los pacientes (778 ± 36) en comparación con los sujetos sanos (878 ± 40) ($p=0.066$). Las concentraciones en suero de IGFBP-4 también se observaron más aumentadas en los pacientes que en los controles (59 ± 14 vs. 21 ± 1.9 , $p=0.008$). Para IGFBP-5 no se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles (251 ± 26 vs. 241 ± 21 , $p=0.786$); de manera similar IGFBP-6 no mostró diferencias entre pacientes y controles (131 ± 6.6 vs. 122 ± 4.2 , $p=0.244$). Finalmente, en el caso de IGFBP-7 las concentraciones fueron significativamente mayores en los pacientes (57 ± 4.4) en comparación con los controles (33 ± 3.1) ($p < 0.001$).

Estadio de fibrosis y análisis de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide

Los 120 pacientes incluidos fueron divididos de la siguiente manera según el grado de fibrosis: para F0 ($n=35$), F1-F2 ($n=11-14$), F3 ($n=21$) y F4 ($n=39$). Las comparaciones entre las concentraciones de IGFBP y el grado de fibrosis revelaron diferencias significativas. Para IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-6 las diferencias fueron principalmente entre los grados de fibrosis y el grupo control (tabla 2), mientras que en las concentraciones de IGFBP-5 e IGFBP-7 se observaron diferencias entre los grados de fibrosis (tabla 2).

Correlación de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide y los grados de fibrosis

Posteriormente, se realizó la prueba de Spearman para determinar la correlación de las IGFBP y los grados de

fibrosis. Los resultados mostraron una correlación entre las concentraciones de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-7 y el grado de fibrosis. En el caso de IGFBP-1 la asociación fue leve con los grados de fibrosis, mostrando una r de 0.185 ($p=0.015$). Para IGFBP-2 la asociación fue moderada con los grados de fibrosis, con una r de 0.537 ($p < 0.001$). En el caso de IGFBP-4, de acuerdo con los grados de fibrosis se observa un incremento en F1-F2; F3 y F4 en referencia a los sujetos control; al correlacionar IGFBP-4 con el grado de fibrosis se obtuvo una r de 0.445 ($p < 0.001$), siendo una correlación moderada. En IGFBP-7 se encontró un aumento 2 veces mayor en pacientes que en controles. Al evaluarlo por el grado de fibrosis, se halló un aumento gradual en la concentración de esta proteína, obteniendo diferencias significativas entre F0 contra F3 ($p < 0.001$), F0 contra F4 ($p < 0.001$), F1-F2 contra F3 ($p=0.002$) y F3 contra F4 ($p=0.005$). Al correlacionar la IGFBP-7 con los grados de fibrosis, se obtuvo una r de 0.364 siendo significativa ($p=0.001$) y teniendo una asociación moderada.

Sensibilidad y especificidad de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide en el estadio final de la fibrosis

Con la finalidad de evaluar la sensibilidad y especificidad de las IGFBP para el diagnóstico de los grados de fibrosis, en especial en etapas F3 y F4, se construyeron las curvas ROC y se calculó el área bajo la curva (figs. 1 y 2). Para el estadio F3 los resultados significativos fueron en IGFBP-2, IGFBP-6 e IGFBP-7; (fig. 1 y tabla 3).

En el caso de F4 el área bajo la curva mostró resultados significativos para IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-7 (fig. 2 y tabla 4).

Discusión

En nuestro estudio se encontró que el 71% de los pacientes fueron mujeres y el restante 29% hombres, lo cual coincide con la característica de la población de estudio¹¹. En cuanto al IMC, el promedio en los dos grupos se ubicó dentro del rango de sobrepeso ($25-29.9 \text{ kg/m}^2$) de acuerdo con lo descrito por la Organización Mundial de la Salud. Es importante

Tabla 2 Concentraciones de IGFBP de acuerdo con el grado de fibrosis

IGFBP (ng/mL)	F0 (n = 35)	F1-F2 (n = 11-14)	F3 (n = 21)	F4 (n = 39)	CT (n = 103)	p
1	0.9 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1 ± 0.5	1.4 ± 0.5	0.65 ± 0.12	F4vsCT**
2	8.8 ± 8.4	10 ± 5	26 ± 9	18 ± 7	3.9 ± 3.5	F0vsCT* F1-F2vsCT* F3vsCT** F4vsCT**
3	695 ± 202	620 ± 350	844 ± 304	756 ± 391	878 ± 406	NS
4	25 ± 17	88 ± 76	37 ± 30	77 ± 29	21 ± 19	F1-F2vsCT* F3vsCT* F4vsCT**
5	97 ± 71	237 ± 186	107 ± 36	324 ± 292	241 ± 118	F4vsCT* F0vsF4** F1-F2vsF3**
6	136 ± 53	112 ± 68	168 ± 81	126 ± 59	122 ± 42	F3vsCT**
7	20 ± 10	42 ± 30	91 ± 23	60 ± 42	33 ± 31	F3vsCT** F4vsCT** F0vsF3** F0vsF4* F1-F2vsF3* F3vsF4*

Datos expresados como la media ± desviación estándar. Análisis estadístico: U de Mann-Whitney.

CT: sujetos control; IGFBP: proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulinoide; NS: no significativo.

* p < 0.05.

** p < 0.005.

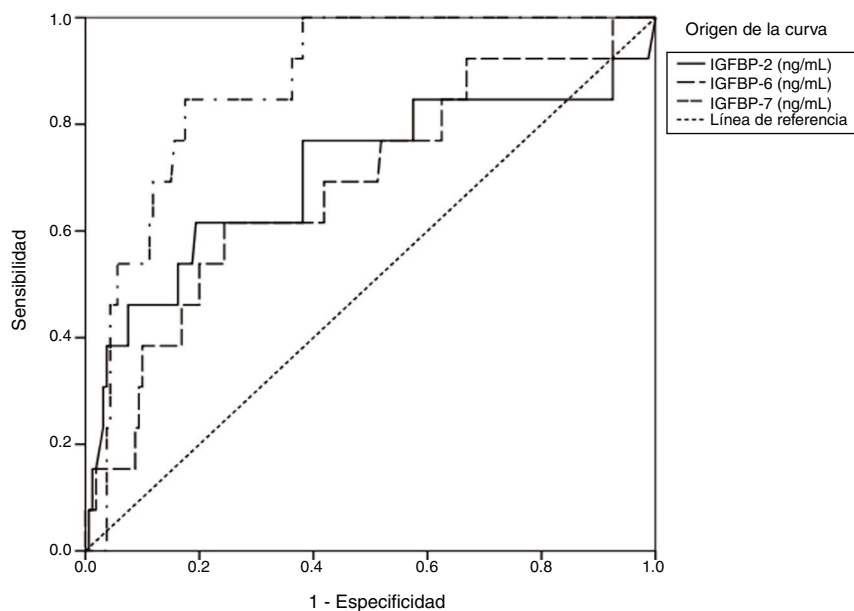


Figura 1 Curva ROC. Análisis de sensibilidad y especificidad de las IGFBP en la etapa F3 de fibrosis en pacientes con hepatitis C crónica.

tener en cuenta que la población mexicana se encuentra dentro de los países con este problema de salud. A pesar de que no se hallaron evidencias clínicas ni datos bioquímicos de daño hepático (AST y ALT), es importante considerar en estudios posteriores un análisis más fino para descartar la posible esteatosis hepática en ambos grupos de estudio. No obstante, nuestros datos reflejan diferencias significativas entre los grupos comparados, demostrando que las

diferencias en las concentraciones de las IGFBP y los grados de fibrosis por VHC son resultado de la enfermedad hepática crónica.

La fibrosis y la cirrosis hepática (estadio final) alteran la producción de proteínas del sistema IGF, alterando el metabolismo y la producción de proteínas ocasionando supresión de sus funciones correctas en el organismo^{1,2}. Diversos estudios consideran que IGFBP-1 es una proteína sensible a la

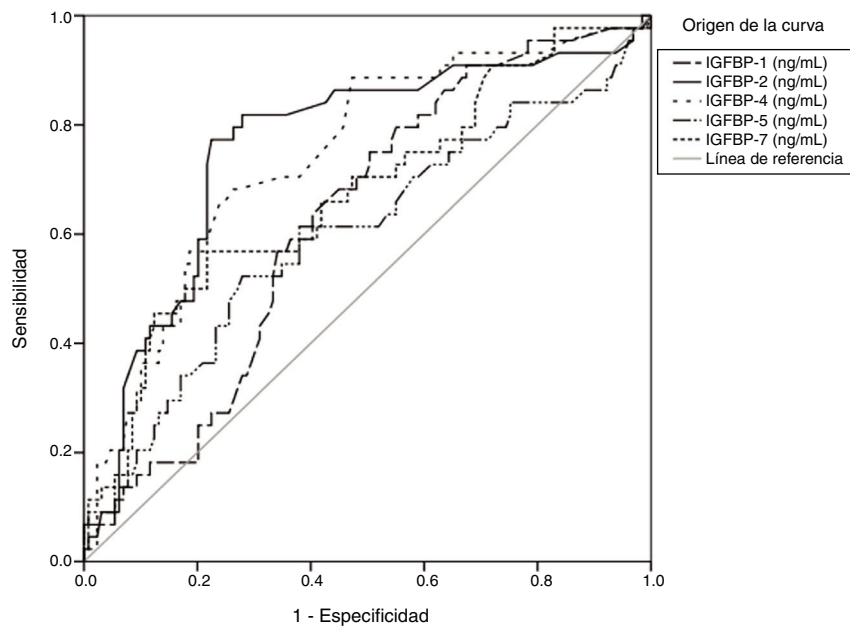


Figura 2 Curva ROC. Análisis de sensibilidad y especificidad de IGFBP en la etapa F4 de fibrosis en pacientes con hepatitis C crónica.

Tabla 3 Datos estadísticos del área bajo la curva de las IGFBP-2, IGFBP-6 e IGFBP-7 en la etapa F3

Variables	Área	EE	p	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
IGFBP-2	0.708	0.093	0.013	0.525	0.891
IGFBP-6	0.687	0.080	0.025	0.530	0.845
IGFBP-7	0.877	0.037	< 0.001	0.804	0.949

EE: error estándar; IC: intervalo de confianza; IGFBP: proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulinoide.

insulina con participación en el desarrollo de enfermedades metabólicas en pacientes con o sin enfermedad hepática, como la resistencia a la insulina o el síndrome metabólico¹². Además, IGFBP-1 se ha identificado como un posible biomarcador para la enfermedad hepática alcohólica (EHA), ya que se describió un incremento de la expresión de esta proteína¹³; en NALFD se reportó una disminución de las concentraciones séricas debido a la interacción con la insulina¹²; sin embargo, Hagström et al. reportaron valores altos en pacientes con fibrosis avanzada⁴. También altas concentraciones se han relacionado con el hepatocarcinoma, aunque su papel todavía es controversial¹⁴.

En nuestros resultados las concentraciones de IGFBP-1 fueron mayores en los sujetos con HCC; de acuerdo con el grado de fibrosis, solo se encontraron diferencias con el grado severo de la fibrosis y los sujetos control; así mismo, solo se determinó una asociación leve de esta proteína con los grados de fibrosis. No obstante, estudios en pacientes con cirrosis hepática de diferente etiología (hepatitis C, hepatitis B, NAFLD, EHA y hepatitis autoinmune) han mostrado que IGFBP-1 aumenta, y así también como en la fibrosis avanzada (F3, F4)⁴. En el caso de IGFBP-2 se ha relacionado con un biomarcador para la enfermedad metabólica, diabetes y la resistencia a la insulina¹⁵. En nuestro estudio las concentraciones de IGFBP-2 fueron 5 veces mayores en pacientes

con un aumento gradual de acuerdo con el grado de fibrosis, pero sin diferencias significativas entre los estadios de fibrosis. Sin embargo, es importante considerar que esta proteína tiene una asociación moderada con los grados de fibrosis; de igual forma tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de los estadios finales de la fibrosis, lo que sugiere su participación en el desarrollo de la fibrosis ocasionado por VHC.

De manera interesante, IGFBP-3 presentó los niveles séricos más altos al compararlos con las otras IGFBP. Sin embargo, las concentraciones mostraron una tendencia a ser menores entre pacientes y controles. IGFBP-3 ha sido la proteína más estudiada debido a la alta afinidad que tiene hacia el IGF-1; se ha descrito como un biomarcador de disfunción hepática de acuerdo con la escala de Child-Pugh, siendo los valores menores en pacientes con estadio Child Pugh C¹⁶. En pacientes cirróticos por diferentes etiologías, se ha encontrado una disminución en las concentraciones de IGFBP-3 y un aumento de IGF-1¹⁷. También se considera que están asociadas con alto riesgo de cáncer hepático y con mal pronóstico⁵. Aleem et al. concluyen que esta proteína es mejor predictor que IGF-1 para el desarrollo de hepatocarcinoma en pacientes cirróticos por VHC¹⁸. Miller et al. realizaron el proteoma sérico en pacientes con NAFLD, y al comparar con sujetos control encontraron disminuida la

Tabla 4 Valores estadísticos del área bajo la curva de las IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-7 en F4

Variables	Área	EE	p	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
IGFBP-1	0.627	0.045	0.012	0.538	0.717
IGFBP-2	0.760	0.045	0.000	0.672	0.847
IGFBP-4	0.744	0.043	0.000	0.659	0.828
IGFBP-5	0.600	0.053	0.049	0.496	0.703
IGFBP-7	0.674	0.049	0.001	0.579	0.770

EE: error estándar; IC: intervalo de confianza; IGFBP: proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulinoide.

IGFBP-3, así mismo con el grado de fibrosis siendo capaz de distinguir entre los diferentes estadios de fibrosis¹⁹. Chishima et al. en 2017 estudiaron el eje GH-IGFI-IGFBP3 en pacientes con NAFLD y HcC y la relación con la severidad histológica de NAFLD. Los niveles de IGFBP-3 fueron más bajos en pacientes con cirrosis ocasionada por NAFLD; sin embargo, los niveles no disminuyeron de acuerdo con el grado de fibrosis en pacientes con HcC¹⁷; nuestros resultados concuerdan con este estudio.

Por otro lado, IGFBP-4 se ha asociado con la progresión de cáncer de pulmón, encontrando una alta expresión de esta proteína en tejido pulmonar y mostrando una disminución en la supervivencia²⁰. En nuestro estudio la concentración de IGFBP-4 fue 2 veces mayor en pacientes en comparación con los controles, pero sin diferencias significativas de acuerdo con el grado de fibrosis. La asociación de esta proteína con el grado de fibrosis es moderada. De igual forma tiene una sensibilidad y especificidad alta para F4. Por otra parte, estudios experimentales han demostrado una regulación al alza de esta proteína junto con la IGFBP-1 e IGF-1 por AMPc, IL-6, IL-1b y TNF- α ²¹. En el caso de IGFBP-5 se ha estudiado en modelos animales de colestasis intrahepática progresiva, lo que sugiere un posible papel en la patogénesis de la colangiopatía crónica, mientras que los mismos autores reportaron en células estelares humanas (LX-2) que la IGFBP-5 incrementa la expresión de marcadores profibróticos, por lo que concluyen que tiene un papel en la progresión de la fibrosis hepática²². En nuestro estudio las concentraciones de IGFBP-5 fueron similares entre pacientes y controles. Sin embargo, al clasificarlos por el grado de fibrosis, observamos diferencias entre F0 vs. F4 y F1-F2 comparado con F3. Estos hallazgos concuerdan con Colak et al., los cuales demuestran que IGFBP-5 desempeña un papel importante en muchas etapas de la fisiopatología de la fibrosis hepática²³. En nuestro estudio encontramos que esta proteína, al igual que IGFBP-4, tiene una sensibilidad y especificidad moderada que puede ser utilizada para el diagnóstico de F4. Dentro de las funciones de la IGFBP-5 incluyen mejorar la transdiferenciación de las HSC en miofibroblastos, mejorando la supervivencia de estas células mediante efectos antiapoptóticos sobre las HSC activadas, aumentando la expresión de genes profibróticos como colágena 1a1, TIMP-1 y MMP-1²¹. Mientras que IGFBP-6 es capaz de inducir quimiotaxis de células T y monocitos, pero no de células B. También aumenta el estrés oxidativo y un factor tardío de la activación de neutrófilos²⁴. Sin embargo, hay pocos estudios de la IGFBP-6 en enfermedades hepáticas. En nuestro estudio las concentraciones de IGFBP-6 fueron iguales en pacientes y

controles. Pero al analizar por el grado de fibrosis pudimos observar diferencias entre los pacientes en F3 y los sujetos control.

Por último, diversos estudios señalan que la IGFBP-7 (IGFBP-Pr1), una proteína de baja afinidad a IGF, contribuye en la fibrogénesis hepática²⁵. Esta proteína ha sido ampliamente estudiada en modelos experimentales de fibrosis²⁶. Se ha demostrado su participación en la activación y transdiferenciación de las HSC y aumento en la producción de MEC *in vitro*²⁶. Además de la importancia de la IGFBP-Pr1 en el desarrollo de la fibrosis hepática, el uso de un anticuerpo anti-IGFBP-Pr1 se ha asociado con la prevención del desarrollo de fibrosis, debido a la supresión de la activación de las HSC por las vías de señalización TGF- β 1/Smad3 y ERK/MAPK^{25,26}. En nuestro estudio encontramos un aumento significativo entre pacientes y un aumento gradual de acuerdo con el grado de fibrosis, siendo mayor en F3. Además, encontramos que IGFBP-7 tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de F3 y F4, lo cual sustenta su posible participación como marcador sérico en la fibrosis hepática. En biopsias de tejido fibrótico y cirrótico, se demostró que IGFBP-7 es una molécula involucrada en la progresión de la fibrogénesis hepática⁶. Estudios *in vitro* encontraron que IGFBP-7 induce fibrosis hepática por activación de las HSC y apoptosis de hepatocitos, mecanismo dependiente de Smad 2/3²⁷. También actúa como un iniciador de la fibrosis hepática al inducir inflamación y depósito de proteínas de MEC a través de la vía de señalización ERK1/2²⁸. Además, promueve la fibrosis incrementando la expresión de TGF- β 1, que aumenta la expresión de genes como Egr1, MAP2K2 (MEK2) y MAPK3 (ERK1) mientras que disminuye la expresión génica PTEN, Hhip²⁵. Li et al. encontraron una mutua regulación entre IGFBP-7 y TGF- β 1 en HSC, lo que probablemente acelera la progresión de la fibrosis hepática²⁹. La inhibición de IGFBP-7 atenúa la fibrosis al restablecer el balance MMP2/TIMP2 y MMP9/TIMP1 concomitante con la inhibición de la activación de las HSC y los mecanismos profibrogénicos³⁰.

Este estudio es la primera evidencia respecto a la regulación de las IGFBP-1 a IGFBP-7 y su correlación con las etapas del proceso fibrótico en pacientes con HcC, quedando como perspectivas evaluar el papel específico de cada una de estas proteínas, a excepción de la IGFBP-7, y su relación con la fisiopatología de la enfermedad. No obstante, nuestros datos obtenidos tienen gran relevancia en el campo del desarrollo de métodos de diagnóstico y/o posibles blancos terapéuticos que permitan revertir el proceso fibrótico en enfermedades hepáticas crónicas.

Conclusión

La expresión sérica de las IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-7 es regulada de manera diferencial en la HCC. Con base en nuestros resultados, sugerimos fuertemente que IGFBP-7 puede participar en la modulación y recambio de proteínas de la MEC y regular la progresión de la enfermedad hepática crónica y el desarrollo de fibrosis hepática, por lo que consideramos que las IGFBP pueden ser candidatos a biomarcadores séricos de la fibrosis hepática.

Financiación

El presente estudio fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número SALUD-2016-272579 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) con número TA200515.

Conflicto de intereses

Los autores no expresan ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Al programa de Becas posdoctorales DGAPA-UNAM.

Referencias

- Pollak MN. Insulin, insulin-like growth factors, insulin resistance, and neoplasia. *Am. J Clin Nutr.* 2007;86:820s-2s.
- Boers W, Aarass S, Linthorst C, et al. Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis - Gremelin and insulin-like growth factor-binding proteins. *J Biol Chem.* 2006;281:16289-95, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M600711200>.
- Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology.* 2006;43 Suppl. 1:S82-8, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20974>.
- Hagström H, Stal P, Hultcrantz R, et al. IGFBP-1 and IGF-I as markers for advanced fibrosis in NAFLD - a pilot study. *Scand J Gastroenterol.* 2017;52:1427-34, <http://dx.doi.org/10.1080/00365521.2017.1379556>.
- Yan JJ, Yang XZ, Li L, et al. Low expression levels of insulin-like growth factor binding protein-3 are correlated with poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13:3395-402, <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.5934>.
- Guo XH, Liu LX, Zhang HY, et al. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 contributes to hepatic fibrogenesis. *J Dig Dis.* 2014;15:202-10, <http://dx.doi.org/10.1111/1751-2980.12126>.
- Wright RJ, Holly JM, Galea R, et al. Insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-4 on human granulosa cell steroidogenesis. *Biol Reprod.* 2002;67:776-81, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.101.001511>.
- Hwang JR, Huh JH, Lee Y, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) inhibits TNF- α -induced NF-kappa B activity by binding to TNFR1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;405:545-51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.064>.
- Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:915-28, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2536>.
- Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2589-600, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01466.x>.
- Stalnikowicz DK, Violante MD, Gallardo LMAD, et al. Tin hepatitis C as a public health problem in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2011;53 Supl. 1:S61-7.
- Petaja EM, Zhou Y, Havana M, et al. Phosphorylated IGFBP-1 as a non-invasive predictor of liver fat in NAFLD. *Sci Rep.* 2016;6:24740, <http://dx.doi.org/10.1038/srep24740>.
- Li HH, Doiron K, Patterson AD, et al. Identification of serum insulin-like growth factor binding protein 1 as diagnostic biomarker for early-stage alcohol-induced liver disease. *J Transl Med.* 2013;11:266, <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-266>.
- Dai B, Ruan B, Wu J, et al. Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits cancer cell invasion and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:5645-54.
- Shin M, Kang HS, Park JH, et al. Recent Insights into insulin-like growth factor binding protein 2 transcriptional regulation. *Endocrinol Metab-Enm.* 2017;32:11-7, <http://dx.doi.org/10.3803/EnM.2017.32.1.11>.
- Correa CG, Colombo BD, Ronsoni MF, et al. Circulating insulin-like growth factor-binding protein 3 as prognostic biomarker in liver cirrhosis. *World J Hepatol.* 2016;8:739-48, <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v8.i17.739>.
- Chishima S, Kogiso T, Matsushita N, et al. The Relationship between the growth hormone/insulin-like growth factor system and the histological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Intern Med.* 2017;56:473-80, <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.56.7626>.
- Aleem E, Elshayeb A, Elhabachi N, et al. Serum IGFBP-3 is a more effective predictor than IGF-1 and IGF-2 for the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HCV infection. *Oncol Lett.* 2012;3:704-12, <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2011.546>.
- Miller MH, Walsh SV, Atrih A, et al. The serum proteome of nonalcoholic fatty liver disease: a multimodal approach to discovery of biomarkers of nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29:1839-47, <http://dx.doi.org/10.1111/jgh.12614>.
- Xiao Y, Zhu S, Yin W, et al. IGFBP-4 expression is adversely associated with lung cancer prognosis. *Oncol Lett.* 2017;14:6876-80, <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.7014>.
- Leibach A, Scharf JG, Ramadori G. Regulation of insulin-like growth factor-1 and of insulin-like growth factor binding protein-1, -3 and -4 in cocultures of rat hepatocytes and Kupffer cells by interleukin-6. *J Hepatol.* 2001;35:558-67.
- Sokolovic A, Sokolovic M, Boers W, et al. Insulin-like growth factor binding protein 5 enhances survival of LX2 human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;3:3, <http://dx.doi.org/10.1186/1755-1536-3-3>.
- Colak Y, Senates E, Ozturk O, et al. Serum concentrations of human insulin-like growth factor-1 and levels of insulin-like growth factor-binding protein-5 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012;24:255-61, <http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e32834e8041>.
- Conese M, d'Oria S, Castellani S, et al. Insulin-like growth factor-6 (IGFBP-6) stimulates neutrophil oxidative burst, degranulation and chemotaxis. *Inflamm Res.* 2018;67:107-9, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-017-1107-6>.
- Guo X, Zhang H, Zhang Q, et al. Screening for and validation of a hepatic fibrosis-related pathway induced by insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1. *Eur J Gastro-*

- enterl Hepatol. 2016;28:762–72, <http://dx.doi.org/10.1097/Meg.0000000000000631>.
26. Liu LX, Huang S, Zhang QQ, et al. Insulin-like growth factor binding protein-7 induces activation and transdifferentiation of hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol*. 2009;15:3246–53, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.3246>.
 27. Zhang Y, Zhang QQ, Guo XH, et al. IGFbPrP1 induces liver fibrosis by inducing hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis via Smad2/3 signaling. *World J Gastroenterol*. 2014;20:6523–33, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6523>.
 28. Guo Y, Zhang Y, Zhang Q, et al. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBPrP1) contributes to liver inflammation and fibrosis via activation of the ERK1/2 pathway. *Hepatol Int*. 2015;9:130–41, <http://dx.doi.org/10.1007/s12072-014-9578-9>.
 29. Li XQ, Zhang QQ, Zhang HY, et al. Interaction between insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 and transforming growth factor beta 1 in primary hepatic stellate cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2017;16:395–404, [http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872\(17\)60013-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872(17)60013-4).
 30. Ren JJ, Huang TJ, Zhang QQ, et al. Insulin-like growth factor binding protein related protein 1 knockdown attenuates hepatic fibrosis via the regulation of MMPs/TIMPs in mice. *Hepatobiliary Pancreatic Dis int*. 2019;18:38–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hbpd.2018.08.008>.