



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Dermatología, Estomatología y
Radiología y Medicina Física.

***Validación de la Técnica Ecográfica de Radiación
Acústica de la Fuerza de Impulso (ARFI) en un
Biomodelo experimental de esteatosis y
perspectiva de aplicación clínica***

D^a Florentina Guzmán Aroca
2013

El contenido de la presente tesis constituye un compendio de trabajos previamente publicados:

1. Guzmán-Aroca F, Reus M, Berná-Serna JD, Serrano L, Serrano C, Gilabert A, Cepero A. **Reproducibility of shear wave velocity measurements by acoustic radiation force impulse imaging of the liver: a study in healthy volunteers.** *J Ultrasound Med* 2011; 30: 975-9.
2. Guzmán-Aroca F, Frutos-Bernal MD, Bas A, Luján-Mompeán JA, Reus M, Berná-Serna JD, Parrilla P. **Detection of non-alcoholic steatohepatitis in patients with morbid obesity before bariatric surgery: evaluation with acoustic radiation force impulse imaging.** *Eur Radiol* 2012; 22: 2525-32.
3. Guzmán Aroca F, Abellán Rivera, Reus Pintado M. **The clinical utility of elastography, a new ultrasound technique.** *Radiologia* 2012; Epub ahead of print.

A mis padres y a mi marido,
en especial a mi madre, porque
ha velado por mi en todo este camino.

AGRADECIMIENTOS

Querría expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis: Doctores Manuel Reus Pintado, Juan de Dios Berná Serna e Ignacio Ayala de la Peña, y al Dr. José Lázaro Abellán Atenza, por orientarme en un nuevo campo y apoyar en todo momento la evolución de la investigación.

Al gran equipo de cirugía su apoyo incondicional, su confianza y su colaboración; en particular a la Dra. Frutos y al Dr. Luján, ya que sin ellos este trabajo no habría sido posible.

Al gran equipo veterinario con el que contamos en la Universidad de Murcia, por su profesionalidad y entusiasmo.

Por último, y no por ello menos importante, me gustaría hacer una mención especial al personal del “Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca” que de alguna manera se ha visto implicado en esta tesis, y en particular al personal de ecografía y admisión.

ABREVIATURAS

ARFI. Acoustic Radiation Force Impulse (Técnica de la Fuerza de Radiación Acústica del Impulso)

AP. Anatomía patológica

US. Ultrasonidos

Vc/SWV. Velocidad de Corte

RDI. Región de Interés

GGT. γ -glutamil transferasa

GOT/AST. Aspartato Aminotransferasa

GPT/ALT. Alanina Aminotransferasa

NAFLD. Enfermedad grasa del hígado de origen no alcohólico

NASH. Esteatohepatitis no alcohólica

TC. Tomografía Computarizada

RM. Resonancia Magnética

IMC. Índice de Masa Corporal

LDL. Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

HDL. High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidad)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción

1.1. Elastasonografía.....	17
1.1.1 Elastografía y bases biofísicas de la técnica ARFI.....	17
1.1.2 Selección del área a estudiar.....	20
1.1.3 Limitaciones de la técnica.....	21
1.1.4 Diferenciación del parénquima hepático normal y la enfermedad hepática difusa..	21
1.2 Enfermedad grasa no alcohólica del hígado.....	25
1.2.1 Concepto.....	25
1.2.2 Patogenia.....	26
1.2.3 Diagnóstico y biomarcadores.....	29
1.3 El pollo como biomodelo experimental de esteatosis.....	33
1.3.1 Experiencia previa y validez interna de la técnica.....	35
1.3.1.1 Introducción.....	35
1.3.1.2 Material y Método.....	36
1.3.1.3 Resultados.....	39
1.3.1.4 Conclusiones.....	40
1.3.1.5 Tabla 1.....	44
1.3.1.6 Figuras	
1.3.1.6.1 Figura 1.....	45
1.3.1.6.1 Figura 2.....	45
1.3.1.7 Bibliografía.....	46
1.4 Obesidad mórbida.....	49
2. Hipótesis de trabajo. Objetivos.....	51

3. Artículo 1: Reproducibility of shear wave velocity measurements by acoustic radiation force impulse imaging of the liver: a study in healthy volunteers

3.1 Denominación de la revista.....	53
3.2 Abstract.....	53
3.3 Dirección URL.....	54

4. Artículo 2: Detection of non-alcoholic steatohepatitis in patients with morbid obesity before bariatric surgery: evaluation with acoustic radiation force impulse imaging

3.1 Denominación de la revista.....	57
3.2 Abstract.....	57
3.3 Dirección URL.....	59

5. Artículo 3: The clinical utility of elastography, a new ultrasound technique.

3.1 Denominación de la revista.....	63
3.2 Abstract.....	63
3.3 Dirección URL.....	63

7. Discusión global de los tres artículos.....65

8. Conclusiones.....75

9. Bibliografía.....79

INTRODUCCIÓN

1.1 Elastosonografía

1.1.1 Elastografía y bases biofísicas de la técnica ARFI (acoustic radiation force impulse)

A principios de los años 90 se desarrolló una técnica que permitía evaluar objetivamente la relación entre las diferentes estructuras tisulares y su elasticidad: la sonoelastografía, inicialmente descrita por Ophir et al (1).

Mediante esta técnica, el tejido se comprime y la elasticidad tisular resultante se refleja en una imagen. Desde su invención, se han descrito múltiples aplicaciones en el estudio de tejidos como el hígado, la mama, la próstata, el tiroides y los vasos sanguíneos (2-6).

Existen dos clases de sonoelastografía bien diferenciadas: la semicuantitativa (*strain elastography*) y la cuantitativa (*shear-wave elastography*):

La sonoelastografía semicuantitativa adquiere los datos correspondientes a la anatomía tisular pre-deformación o compresión. Posteriormente se aplica una pequeña presión, mediante un compresor externo (transductor ecográfico) o una función fisiológica (respiración) y se adquiere otro mapa de la anatomía tisular (postcompresión o deformación). El desplazamiento del tejido deformado se calcula mediante la comparación de estos dos mapas anatómicos y se refleja en un mapa de colores (1,7,8).

La sonoelastografía cuantitativa mide el desplazamiento del tejido independientemente de la presión aplicada, al enviar microimpulsos acústicos con niveles mínimos de energía hacia los diferentes tejidos. De esta manera se crea un mapa tisular relativo al desplazamiento de las estructuras adyacentes. La ventaja de ésta con respecto a la anterior es obvia: No hay necesidad de comprimir con el transductor por lo que existe menos variabilidad intra e interobservador, es decir, mayor reproducibilidad. Dentro de la elastosonografía cuantitativa podemos distinguir tres subgrupos de imágenes: la *cualitativa*, que nos ofrece un mapa de colores de la lesión con respecto al tejido adyacente, la *cuantitativa*, que nos ofrece un valor en kPa o m/s que nos proporciona valores numéricos acerca de la mayor o menor deformidad en una región de interés (RDI) elegida por el observador, y un último subgrupo que combina en una misma imagen las dos anteriores, es decir, sobre un mapa cualitativo de colores se puede medir en una RDI el valor de dureza del tejido (9-12).

Los datos se procesan calculando el módulo de elasticidad del tejido, en función de una serie de parámetros técnicos. Las distintas casas comerciales han integrado los software de elastografía en los equipos de ultrasonidos, poniendo diferentes nombres a esta base física: ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse Imaging*), Shear Wave Point Quantification, Elastografía cuantitativa ShearWave™, etc.

En la presente tesis doctoral se ha usado la técnica ARFI *cuantitativa* para la realización del examen sonográfico y la elastografía, mediante una plataforma Acuson S 2000 (Siemens, Erlangen, Alemania), equipada con una sonda convex multifrecuencia 4-1 MHz.

La técnica ARFI evalúa objetivamente la consistencia o dureza de los tejidos. Esta modalidad diagnóstica añade información estructural a las propiedades morfológicas que nos muestra la ecografía y nos permite alcanzar mejores resultados de sensibilidad y especificidad.

La información básica que se obtiene con la técnica ARFI consiste en la velocidad a la que un impulso acústico predeterminado (velocidad de corte o V_c), atraviesa la RDI (13).

La base física de esta técnica es la siguiente: El transductor envía múltiples micropulsos de 1-262 μ s de duración (ondas sonoras longitudinales) con una frecuencia fija de 2,67 MHz, que provocan una distorsión del tejido con un desplazamiento transversal. A continuación, el transductor emite pulsos de rastreo que recogen a partir de esta distorsión, la velocidad (en m/s) a la que han atravesado los micropulsos iniciales. Esta medida se realiza en una RDI previamente definida por el ecografista (figura 1).

Cada tejido en el organismo tiene unas propiedades mecánicas que lo caracterizan y en base a ello y según la manera y la rapidez a la que el sonido atraviese el tejido, éste se comportará de un modo u otro, devolviendo al explorador una V_c característica. El valor de V_c obtenido para cada tejido es una propiedad intrínseca y reproducible (14-16).

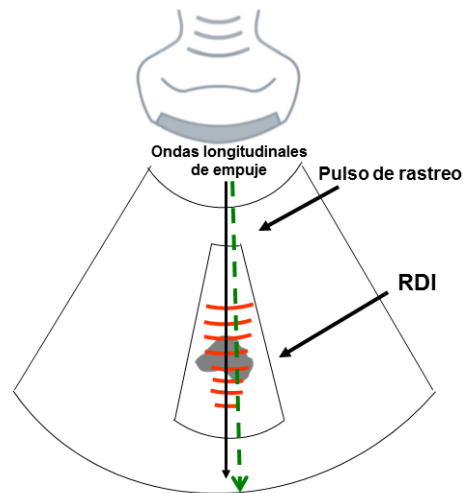


Figura 1: En esta figura se muestra de manera esquemática la base física del proceso de ARFI, anteriormente descrito.

La velocidad de las ondas transversales depende de la elasticidad del tejido y se traducirá en una V_c final, que será el resultado obtenido en la plataforma ecográfica (13).

1.1.2. Selección del área a estudiar

La RDI presenta un tamaño rectangular fijo de 10 mm de largo x 6 mm de ancho, con un espesor de 2 μm (azimut). Esta RDI es elegida por el operador, guiado por la imagen de US durante la exploración.

La profundidad que puede alcanzar la RDI es de 8 cm, lo cual resulta útil cuando se estudia a pacientes con importante panículo adiposo que atravesar.

1.1.3. Limitaciones de la técnica

Es importante tener en cuenta que se necesitan unas condiciones óptimas para realizar la técnica ARFI: ausencia de movimiento del paciente y ausencia de interposición de vasos u otras estructuras diferentes al tejido que vamos a estudiar (hueso, grasa, aire...).

El principal problema que surge cuando el paciente se mueve durante la adquisición del valor “Vc” es que se obtiene el valor nulo “xxx” y es necesario repetir el procedimiento hasta conseguir un valor válido.

Cuando se interponen vasos sanguíneos u otras estructuras con rigidez diferente al tejido que se está estudiando (hueso) lo que obtenemos son datos falseados, ya que los vasos sanguíneos son más elásticos que los órganos internos y los huesos más rígidos.

1.1.4. Diferenciación del parénquima hepático normal y de la enfermedad hepática difusa

El parénquima hepático se define según varios parámetros: ecogenicidad, tamaño, contornos y ecoestructura del parénquima.

El parénquima hepático normal presenta unas características en US y elastografía determinadas. Ecográficamente el hígado normal es: isoecogénico con la cortical renal, presenta una ecoestructura homogénea, una longitud de hasta 15 cm (en un corte

longitudinal medido en la línea media clavicular derecha) y pueden definirse en su interior los vasos sanguíneos y en su porción superior y lateral el diafragma (17).

En cuanto a sus características elastográficas, se han publicado múltiples series en hígados sanos. La serie con mayor número de individuos sanos corresponde a Kim et al (18), en la que se incluyeron a 133 sujetos con hígado sano, obteniendo una media de $1,08 \pm 0,15$ m/s, tras la toma de 5 medidas en el lóbulo hepático derecho (figura 2).

El parénquima hepático patológico puede presentar alguna o todas las siguientes características: una ecogenicidad aumentada con respecto a la cortical renal, una ecoestructura heterogénea, una longitud mayor de 15 cm (en un corte longitudinal medido en la línea media clavicular derecha) y/o una falta de diferenciación entre el parénquima y la pared de los vasos sanguíneos y/o del diafragma, debido a una hiperatenuación de los US sobre el parénquima (17,19).

Las características elastográficas de un hígado patológico, varían según el tipo de patología. Se ha demostrado que tanto la esteatohepatitis no alcohólica, como las inflamaciones alcohólicas y víricas del hígado, ofrecen unas Vc directamente proporcionales a la gravedad de estas patologías. Las Vc más altas se dan en la cirrosis hepática (20-22). Sin embargo existe una disminución de la Vc en hígados con infiltración grasa únicamente o esteatosis simple (figuras 3 y 4) (20).

Las Vc obtenidas en las diferentes patologías hepáticas están en íntima relación con la matriz hepática que conforma la enfermedad. Los altos valores de Vc obtenidos en la

fibrosis hepática se especula que estén en relación con una mayor reticulación de la matriz extracelular hepática. De la misma forma que aumenta la Vc en patologías inflamatorias debido al edema y a las células inflamatorias asociadas (figura 5) (23-25). La disminución de la Vc en la esteatosis simple, podría ser debido a las grandes vacuolas grasas que aumentan el espacio entre las células del hígado y reducen la densidad del tejido, lo que hace que el hígado sea más blando (20).

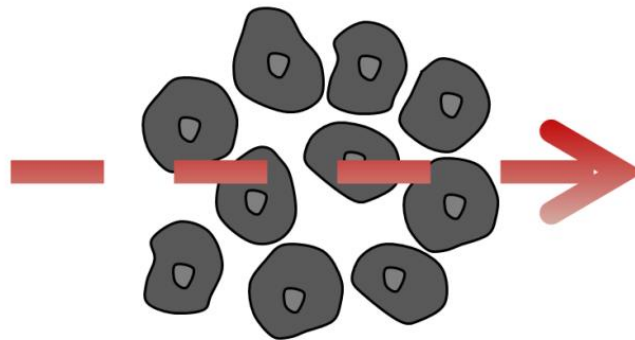


Figura 2: En este dibujo se representan en gris un conjunto de células con disposición normal en un tejido. La flecha representa la velocidad a la que el sonido atraviesa dicho tejido. Vc normal: 1 m/s.

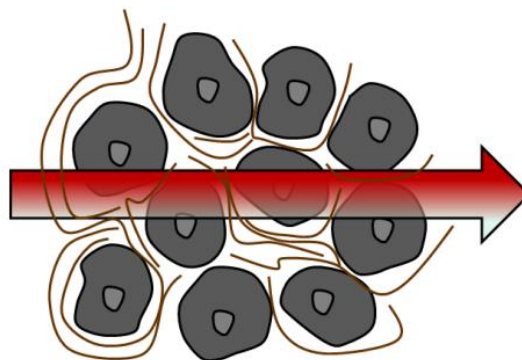


Figura 3: Aquí se muestran en gris el mismo conjunto de células, que ahora presentan en el espacio intersticial unas líneas marrones que representan un estroma de fibrosis. La flecha representa la velocidad a la que el sonido atraviesa dicho tejido, que en este supuesto es mayor. Vc: 1,7 m/s.

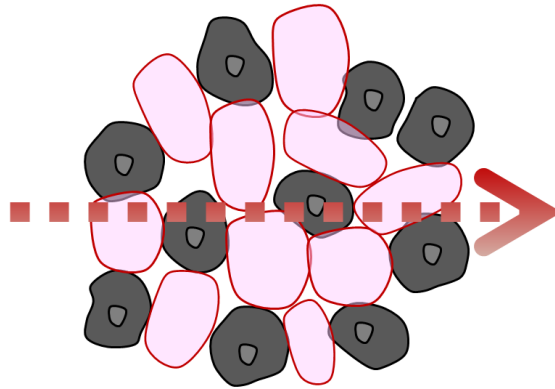


Figura 4: En este dibujo se representan en gris un conjunto de células y entre ellas existen otras rosadas y “vacías”, que las separan y que corresponden con vacuolas grasas. Nótese la menor densidad de tejido. La flecha representa la velocidad a la que el sonido atraviesa dicho tejido, que en este supuesto es menor. $V_c: 0,7 \text{ m/s}$.

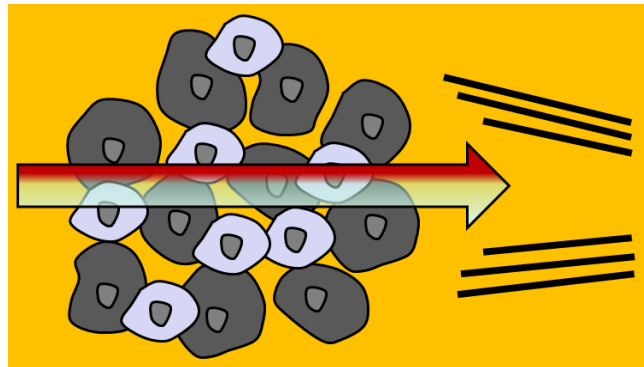


Figura 5: En gris se presenta el mismo conjunto de células, junto con otras más pequeñas entre ellas que corresponden con células inflamatorias y/o partículas depositadas (pej. Hierro/cobre). El intersticio es amarillo, representando edema. Nótese la mayor densidad de tejido en el mismo espacio. La flecha representa la velocidad a la que el sonido atraviesa dicho tejido, que en este supuesto es todavía mayor. $V_c: 2,1 \text{ m/s}$.

1.2 ENFERMEDAD GRASA NO ALCOHÓLICA DEL HÍGADO

1.2.1 Concepto

El hígado graso o esteatosis hepática es un cuadro que se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado y, que en general, se diagnostica de forma casual durante rastreos ecográficos de abdomen (hígado hiperecogénico), realizados para la evaluación de diferentes patologías.

Normalmente el hígado contiene 5 g de contenido de grasa por cada 100 g de peso, por lo tanto el diagnóstico de *hígado graso* se establece cuando el órgano tiene más de un 5% de su peso total con contenido lipídico.

La acumulación de grasa mantenida en el hígado puede producir inflamación hepática y desencadenar cirrosis. La prevalencia del hígado graso es del 30% de la población. La esteatohepatitis, que forma parte de espectro del hígado graso, presenta un prevalencia entre el 5-17% (26,27).

En la literatura, se hace una distinción entre la hepatopatía de origen no alcohólico (NAFLD) y la de origen alcohólico (ALD). Aunque ambas tengan mecanismo fisiopatológicos diferentes, la lesión final hepática es la misma (cirrosis).

En la fase inicial de la enfermedad, la acumulación de grasa en los hepatocitos lleva al desarrollo de hígado graso (esteatosis), que se caracteriza por un exceso en el depósito

de triglicéridos. NAFLD se asocia a menudo con elementos del síndrome metabólico, es decir, una constelación clínica que incluye obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperlipidemias, y abarca un espectro de trastornos hepáticos desde la esteatosis hepática simple a la más ominosa condición conocida como esteatohepatitis (NASH). Parecen existir mecanismos fisiopatológicos comunes entre la esteatosis no alcohólica (asociada a obesidad y síndrome metabólico) y el hígado graso alcohólico, de manera que, si se mantiene el consumo de alcohol, la esteatosis puede progresar a la hepatitis y fibrosis, lo que puede conducir a cirrosis hepática. Del mismo modo, NAFLD puede conducir a un daño hepático progresivo y desencadenar fibrosis y cirrosis.

La condición de hígado graso ha sido durante mucho tiempo considerada benigna, sin embargo, cada vez es más evidente que se trata de una condición potencialmente patológica y que precede al desarrollo de la esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica y a la cirrosis (20,23).

1.2.2 Patogenia

Está descrito que la acumulación de grasa en el hígado puede deberse a diferentes causas: aumento del transporte de ácidos grasos de los órganos periféricos hasta el hígado, aumento de la síntesis hepática de ácidos grasos, deterioro hepático por la oxidación de ácidos grasos, aumento de la síntesis de triglicéridos en el hígado, y/o disminución de la exportación de los triglicéridos del hígado (28,29).

a. Aumento de la absorción hepática de ácidos grasos:

Los niveles de ácidos grasos aumentan significativamente en el hígado tras el consumo de alcohol, así como en personas con obesidad y síndrome metabólico. El alcohol puede aumentar la absorción hepática de ácidos grasos por el aumento de flujo sanguíneo hepático. Además, los estudios con hepatocitos aislados han sugerido que el alcohol puede aumentar directamente la absorción de ácidos grasos independientemente de la circulación de la sangre. Esto podría deberse a un efecto directo del alcohol sobre las propiedades físicas de la membrana plasmática hepática.

b. Deterioro de la oxidación de ácidos grasos:

El alcohol y el exceso de ácidos grasos han demostrado inhibir la oxidación de ácidos grasos en el hígado. Diversos mecanismos han sido propuestos para este efecto. Una mayor proporción de NADH/NAD⁺ como resultado de reacciones Redox, ha sido implicado en el desarrollo de hígado graso mitocondrial a través de la inhibición de la beta oxidación de ácidos grasos y del ciclo del ácido tricarboxílico. Sin embargo, la normalización del estado redox no atenúa los cambios producidos por el alcohol en el hígado graso, lo que sugiere que otros mecanismos también pueden contribuir a esta condición.

c. Deterioro de transporte de ácidos grasos en mitocondrias:

El transporte de los ácidos grasos libres del citosol a la mitocondria es necesaria para la beta oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. Este transporte se realiza principalmente a través de una enzima, la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1) situada en la membrana externa de la mitocondria. La ingesta crónica de etanol ha demostrado la reducción de la

actividad de la CPT-1, que puede afectar el transporte de ácidos grasos en la mitocondria que a su vez, puede desembocar en una reducción de la oxidación de ácidos grasos.

El etanol puede inhibir la actividad de la CPT-1 por desencadenar una cascada de acontecimientos a partir de la activación de un elemento regulador de esteroides (SREBP), hasta la regulación de acetil-co-A carboxilasa (ACC), y el posterior aumento de la producción de malonyl Co-A cuya misión es inhibir la actividad de la CPT-1. Como alternativa, el etanol puede inhibir la actividad de la CPT-1 por otra cascada de activación, a partir de la inhibición de la actividad de los receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPAR- α), la inhibición de la Co-A malonyl descarboxilasa (MCD) y el posterior aumento de la producción de malonyl Co-A.

d. Aceleración de la síntesis de novo de ácidos grasos:

Se ha demostrado que el consumo crónico de etanol y las enfermedades metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina, estimulan la lipogénesis en el hígado a través de una mayor transcripción de genes de enzimas lipogénicas. Los SREBPs son una familia de factores de transcripción que son clave para el colesterol y los reguladores de la síntesis de ácidos grasos, que ejercen su efecto directamente por la activación de la expresión de más de 30 genes en el hígado.

e. El aumento de la esterificación de ácidos grasos libres en triglicéridos:

En el hígado de los alcohólicos y las personas con obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico, el aumento de la oferta de ácidos grasos libres y la disminución de la

capacidad del hígado para oxidar estos compuestos, puede dar lugar a su esterificación y almacenamiento como triglicéridos, dando lugar al en hígado graso.

f. Disminución de la exportación de triglicéridos del hígado:

Los triglicéridos son generalmente exportados desde el hígado por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) Estas partículas, son el resultado de un complejo proceso que da lugar a la unión entre triglicéridos, colesterol, fosfatidilcolina y apolipoproteínas. La inhibición de este proceso en cualquiera de sus niveles puede dar lugar a la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos y, por consiguiente, al desarrollo de hígado graso.

1.2.3. Diagnóstico y biomarcadores

Un método no invasivo para el diagnóstico de factores de riesgo del hígado graso, son los biomarcadores, es decir, la utilización de sangre, orina, saliva o pelo. No obstante es preciso completar estos estudios con técnicas de imagen no invasivas que confirmen el diagnóstico y permitan un tratamiento precoz de la esteatosis y de la esteatohepatitis.

La evaluación bioquímica del hígado se realiza mediante pruebas de función hepática a través de muestras sanguíneas. Los parámetros que se evalúan de forma rutinaria son: GOT (aspartato aminotransferasa) y GPT (alanina aminotransferasa), proteínas totales, albúmina y las globulinas γ (γ -glutamyl transferasa o GGT), bilirrubina total, fosfatasa alcalina, y el tiempo de protrombina normalizado (INR).

El FibroMax (Biopredictive, Francia) es un procedimiento no invasivo que consta de un panel de marcadores capaces de predecir enfermedad hepática avanzada. Consta de cinco pruebas: FibroTest (para evaluar el grado de la fibrosis); ActiTest (para evaluar el grado de actividad, inflamación y necrosis); SteatoTest (para diagnosticar esteatosis hepática); NashTest (para diagnosticar la esteatohepatitis no alcohólica) y el AshTest (para diagnosticar la esteatohepatitis no alcohólica grave) (31).

FibroMax combina la medición de 10 parámetros indirectos ajustado por edad, sexo, peso y altura: α 2-macroglobulina, la haptoglobina, la apolipoproteína A1, bilirrubina total, GGT, ALT, AST, glucosa en ayunas, triglicéridos y colesterol total.

Por otra parte, las leptinas y las adiponectinas han sido descritas como posibles herramientas de screening para el diagnóstico de NAFLD, de manera aislada o en combinación con otros factores de riesgo. Ambas hormonas son importantes reguladoras de la obesidad y la resistencia a la insulina y están implicadas en el desarrollo de esteatosis hepática, inflamación y fibrosis en pacientes con NAFLD. Los niveles séricos elevados de leptina y disminuidos de adiponectina son una constante en pacientes con NAFLD y NASH, comparados con pacientes controles (32).

En cuanto a las técnicas de imagen, los US son la técnica de elección tras la anamnesis y exploración física, en pacientes con sospecha o evidencia de enfermedad hepática, simultáneamente a las pruebas analíticas dirigidas al establecimiento de la causa del proceso y antes de cualquier otra intervención diagnóstica o terapéutica. Esto es así por su inocuidad, bajo coste, accesibilidad y reconocida utilidad (30). La ecografía es rentable

y está ampliamente disponible, pero está limitada por la variabilidad interobservador e intraobservador (33) y no se considera lo suficientemente precisa para la cuantificación de esteatosis.

El diagnóstico de esteatosis es relativamente fácil de realizar a partir de una amplia semiología ecográfica bien definida. Por el contrario, la aportación de la US a la determinación del estadio histológico en pacientes con una enfermedad crónica sin los indicios habituales de disfunción hepática ni hipertensión portal es menos evidente, siendo ésta quizá la indicación más solicitada en el momento actual y de especial importancia, pues aproximadamente el 25% de los pacientes sometidos a biopsia hepática en el estudio de una hipertransaminasemia mantenida, en estas circunstancias, tienen ya una cirrosis hepática no sospechada.

Otras técnicas de imagen son la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM). Aunque la TC se considera una técnica fiable para evaluar la esteatosis, su uso es limitado por la exposición a la radiación. Además, es menos sensible que la ecografía y resonancia magnética (34). Dentro de la RM, existe una modalidad llamada “elastografía de resonancia magnética (Elasto-RM)”, que produce imágenes codificadas a color conocidas como elastogramas que indican la elasticidad de los tejidos. La medición de manera directa de la grasa y el agua y, en general, las señales de protones, se considera la forma más inocua para la cuantificación de la grasa hepática (35). El problema de esta técnica es que es costosa, poco disponible, mal tolerada por parte de algunos pacientes y proporciona una imagen estática, a diferencia de otras técnicas.

Por último, otra técnica no invasiva que puede ser utilizada para establecer de manera cuantitativa el grado de esteatosis hepática y su componente inflamatorio y/o fibrótico es el Fibroscan®. Esta técnica se basa en la adquisición de pulsos de eco, que recogen la propagación de una onda de corte a través de la porción del tejido a estudio y miden su velocidad, que está directamente relacionada con el la rigidez del tejido (o módulo de elasticidad). Los resultados se expresan en kilopascales (36).

La sonda se aplica en la línea media axilar, entre las costillas y sobre la silueta hepática. El explorador debe mantener la posición de la sonda (perpendicular al plano cutáneo) y obtener 10 determinaciones válidas. La pantalla mostrará tres valores que debemos tener en cuenta. La ratio o relación entre el número de mediciones válidas y el número total de mediciones, el rango intercuartil (RIC) o variación del total de mediciones validas con respecto a su valor mediano y la rigidez o valor mediano de las 10 determinaciones válidas, expresado en kPa (figura 6 y 7). Esta técnica, a diferencia de los US, no presenta correlación con una imagen y presenta limitaciones en pacientes obesos y/o con ascitis (37,38).



Figura 6: En esta imagen se muestra un FibroScan® modelo 402. A la derecha se visualiza la sonda que usa y en la pantalla aparece el valor obtenido en KPa.

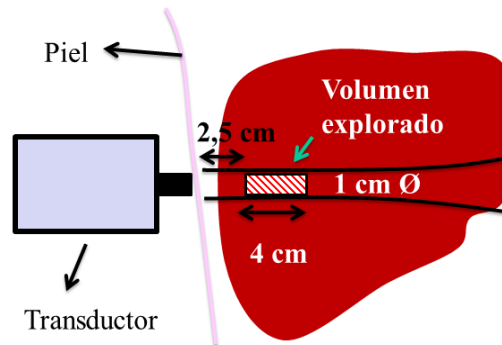


Figura 7: Este dibujo ilustra la adquisición de la medida en el FibroScan®. A la izquierda se observa la sonda. A la derecha se presenta el hígado. Como vemos, la muestra de tejido que estudia el FibroScan® es de 4 x 1 x 1 cm (T x AP x L) y la muestra se toma siempre a 2.5 cm por debajo de la piel. Este último dato limitaría el estudio a pacientes con escaso panículo adiposo.

En la actualidad, el diagnóstico de NAFLD requiere de los resultados de la histología hepática. De modo que la biopsia hepática se considera el estándar de referencia para detectar y poner de manifiesto las lesiones en las células hepáticas (39).

Sin embargo, la biopsia hepática tiene varias desventajas, incluyendo el error de muestreo, la variabilidad intra e inter observador, la escasa aceptación del paciente y las complicaciones potenciales que incluyen la hemorragia y la muerte (40)

1.3 EL POLLO COMO BIOMODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATOSIS

A diferencia de los mamíferos, el hígado es de forma exclusiva, el sitio primario para la síntesis de ácidos grasos de novo en las aves, y por tanto el sitio primario de lipogénesis. Debido a que el sistema linfático del pollo es rudimentario, la principal ruta de absorción de grasas es mediante la formación de micelas mixtas; los quilomicrones son absorbidos directamente hacia la sangre portal para ser transportados al hígado, lugar para la síntesis y

posterior depósito en los tejidos. Por tanto, el hígado es el primer tejido expuesto a una dieta grasa. Esta es una característica que predispone a las aves a una condición patológica denominada síndrome del hígado graso (41).

Entre las distintas estrategias para aumentar el valor nutricional de los alimentos se ha estudiado el efecto de la alimentación de las aves de corral mediante una dieta rica en ácido linoleico y ácidos grasos polinsaturados sobre la histopatología hepática, nivel de lípidos en plasma, en el tejido muscular y en la yema de huevo, observándose un aumento de la lipidosis hepática asociada a esta dieta por un mecanismo no conocido en relación con un aumento de la actividad metabólica del hígado o estrés crónico (42).

En base a estos factores predisponentes, se utiliza el pollo como modelo de hígado graso.

En experimentos previos se ha podido comprobar que el uso de dietas aterogénicas para inducir arteriosclerosis (43), conlleva el desarrollo de hígado graso, lo que permite usar este biomodelo experimental para ensayos terapéuticos de ambas enfermedades (44,45)

En concreto, tras un periodo de inducción de 3-6 meses se ha observado una importante esteatosis macrovesicular e inflamación moderada que predomina en el parénquima hepático (41).

Además, el pollo es adecuado para pequeñas y prolongadas investigaciones de laboratorio. Por lo tanto, el modelo de pollo es económico y la técnica ofrece ventajas sobre los modelos mamíferos.

1.3.1 Experiencia previa y validez interna de la técnica

Con todos estos datos que se conocen del biomodelo aviar de esteatosis, se decidió llevar a cabo un estudio experimental en el que se evaluara la validez interna de la técnica ARFI, lo que dio lugar al siguiente artículo: "Assessment of liver steatosis in chicken by using acoustic radiation force impulse imaging: preliminary results."(46). El artículo se redacta a continuación en español, ya que merece la pena reseñar este paso previo.

1.3.1.1 Introducción

La enfermedad grasa del hígado de origen no alcohólico (NAFLD) es un problema de salud emergente en los países desarrollados. La prevalencia de esta patología es del 20-30% en la población general [1-5]. NAFLD pertenece a un espectro continuo de enfermedades que incluyen la esteatosis simple (esteatosis no alcohólica o NAFL) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). NASH se caracteriza por la presencia de inflamación hepática y potencialmente puede llegar a producir cirrosis [5-9]. Es importante por ello distinguir entre NAFL y NASH. La biopsia hepática es todavía el estándar de referencia para establecer el diagnóstico diferencial entre estas dos condiciones. Sin embargo, es una técnica invasiva con poca aceptación entre los pacientes por las potenciales complicaciones que pueden producirse. Además de esto, la validez de la biopsia es limitada por existir variabilidad intra e interobservador, así como errores de muestreo [10-12]. En la actualidad las líneas de investigación se centran en los métodos alternativos a la biopsia, especialmente en los que valoran la elasticidad tisular.

Recientemente se está dando a conocer una nueva técnica de ultrasonografía (US) con elastografía incorporada, llamada "radiación acústica de la fuerza de impulso" (ARFI).

ARFI es una técnica de imagen que proporciona información de las características mecánicas de los tejidos usando pulsos acústicos de alta intensidad y corta duración, que generan un desplazamiento local del tejido [13-15]. En nuestro conocimiento no existen artículos en la literatura que apliquen la técnica ARFI para cuantificar el grado de esteatosis hepática. La hipótesis del presente estudio es que la imagen ARFI puede ser usada como método para cuantificar la esteatosis hepática. El objetivo de este estudio es evaluar la técnica ARFI como una herramienta no invasiva para la detección y cuantificación de los diferentes grados de esteatosis hepática en un modelo animal.

1.3.1.2 Material y Método

Animales

El estudio incluyó 20 pollos White Leghorn con tres semanas de vida (Pollos Pujante, Murcia, España) mantenidos bajo condiciones controladas. Cada habitación disponía de aire acondicionado y termostato, ofreciendo mínimas variaciones en cuanto a la temperatura y humedad (aproximadamente 23°C y 60% respectivamente). Los pollos fueron aleatoriamente asignados a dos grupos (durante las primeras tres semanas de vida recibieron una dieta estándar). Cada grupo estaba constituido por 10 animales. No hubo restricción hídrica. Los dos grupos de animales recibieron una de estas dietas, previamente establecidas (18):

- Grupo con SD (Dieta estándar): Estaba compuesta por pienso estándar (4,8% de contenido en grasa). Este fue el grupo sano/control. La cantidad semanal de esta dieta se fue incrementando conforme crecían los animales.
- Grupo con HD (Dieta Hiperlipémica): Compuesta por un 3% de colesterol, 20% de aceite de palma y un 77% de pienso estándar (grupo hiperlipémico).

Estos experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, de acuerdo con las guías para el cuidado ético de los animales de experimentación de la Unión Europea

Técnica ARFI

Todos los estudios ecográficos fueron efectuados por el mismo radiólogo (MR) con más de 20 años de experiencia en ecografía. Para la realización del examen sonográfico se utilizó una plataforma Acuson S 2000 (Siemens, Erlangen, Alemania), equipada con una sonda sectorial multifrecuencia 4-1 MHz. La técnica ARFI forma las imágenes a partir de una serie de pulsos acústicos constantes de corta duración (~ 262 ms) y 2,67 MHz de frecuencia que producen una excitación mecánica de tejido y provocan un desplazamiento transversal del mismo [16] que se registra como ondas de US [14]. La velocidad de propagación transversal es proporcional a la raíz cuadrada de la elasticidad de los tejidos [13, 14].

El examen se realizó en el lóbulo hepático derecho, con el animal sin sedación ni ayuno, en decúbito supino, sobre la mesa de exploración. Se estudió el cuadrante abdominal superior derecho, tras la retirada de las plumas. Todos los exámenes se realizaron en un área libre de vasos, en el lóbulo hepático derecho, a una profundidad entre 2,3 y 2,5 cm de la piel. La velocidad de onda de corte (SWV o Vc) se midió en una región de interés (RDI) rectangular elegida por el examinador (Figura 1). El resultado de esta velocidad de corte se mide en metros por segundos (m/s). La medida SWV es una propiedad de los tejidos intrínseca y reproducible [14-15]. La SWV definitiva para cada animal fue la media de tres medidas exitosas.

Análisis de sangre

A las 24 horas siguientes a la realización del examen con ultrasonido todos los pollos fueron sacrificados. Para ello se mantuvo al animal en ayunas durante doce horas, se les anestesió con una combinación de ketamina+xilacina (1ml/Kg) y finalmente se procedió a la eutanasia con pentobarbital intraperitoneal (50 mg/Kg) [18]. A continuación, se extrajo una muestra de sangre (1ml) de la vena axilar. En todos los casos las muestras de plasma se vertieron en tubos con citrato de trisodio 10 mM. El suero fue separado y analizado para la determinación de colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos. Para las medidas se utilizó un analizador D-2400 y P800 (Hitachi Ltd., Tokio, Japan). Se usó el método descrito por Kostner [19] para la precipitación del HDL.

Análisis semicuantitativo de la esteatosis hepática

Los depósitos lipídicos en el hígado fueron evaluados en 10 portas (x400 aumentos) para cada animal (100 portas para cada grupo). La clasificación semicuantitativa de la grasa hepática asigna una puntuación según el nivel de lípidos por campo, acorde a la clasificación histológica de Brunt et al [19]: El grado 0 corresponde a un hígado normal, con ausencia de lípidos o depósitos menores al 5%; el grado 1 corresponde a depósitos de lípidos menores al 33%; el grado 2 corresponde a depósitos de lípidos entre 33-66%; y el grado 3 corresponde a depósitos de lípidos mayores al 66%.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS for Windows, Chicago, IL, USA). Los resultados han sido expresados como media \pm desviación estándar, con el rango (mínimo-máximo) entre paréntesis.

La correlación entre los diferentes parámetros a estudio, fue evaluada mediante análisis descriptivo. Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se verificó que los valores obtenidos de Vc y LDL-Colesterol seguían una distribución normal.

Las variables cuantitativas con distribución normal fueron analizadas usando el estadístico t de Student. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis fue usado para determinar la significancia estadística en el análisis histológico semicuantitativo. La diferencia de medias entre los dos grupos fue evaluada mediante la t de Student. La relación entre las variables cuantitativas Vc y LDL-Col, así como entre Vc y los resultados macroscópicos, se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

La referencia a la significación estadística se hizo mediante la presentación del valor p para un riesgo del 5%, considerando, por lo tanto, como estadísticamente significativo cualquier medida obtenida con un valor de $p < 0,05$.

1.3.1.3 Resultados

La técnica ARFI se realizó de manera satisfactoria en todos los pollos seleccionados para el estudio. La media de las Vc obtenidas en el grupo alimentado con pienso estándar (SD) fue de $0,9 \pm 0,1$ m/s (rango 0,8–1,3 m/s) y de $1,9 \pm 0,2$ m/s (rango 1,3–2,2 m/s), en el grupo con dieta hiperlipémica (HD). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$). La tabla 1 muestra el perfil lipídico obtenido en los animales. Los pollos con dieta hiperlipémica (HD) muestran un marcado incremento en los valores de lípidos, en relación con los pollos alimentados con pienso estándar (SD), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Los hallazgos observados en el análisis semicuantitativo de la esteatosis mostraron que todos los animales que componían el grupo SD presentaron un grado 0 en la clasificación de Brunt para la esteatosis hepática, mientras que los pollos que correspondían al grupo HD se distribuyeron de la siguiente manera: Grado 1 (n=1), Grado 2 (n=3) y Grado 3 (n=6), con diferencias entre grupos estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (figura 13).

El presente estudio mostró una buena correlación entre los valores de LDL y las Vc obtenidas (0,60, $p < 0,05$). También se observó una fuerte correlación entre la Vc y el análisis semicuantitativo de la esteatosis ($r = 0,85$, $p < 0,001$). Esto implica que a mayor Vc mayor LDL en sangre y mayor esteatosis hepática.

1.3.1.4 Conclusiones

Durante la última década, NAFLD se ha convertido en una patología común y es una de las causas más importantes de enfermedad crónica del hígado [21-22]. Los principales factores de riesgo son la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hiperlipidemia [3, 7, 9]. NAFLD es además, un trastorno complejo que implica predisposición genética y factores ambientales. Como resultado de esta complejidad, los modelos animales proporcionan las herramientas necesarias para superar la confusión de variables, como la heterogeneidad genética, las diferencias de género, y los factores ambientales, incluyendo la dieta y el estilo de vida [23].

Para el estudio de la esteatosis hepática y la esteatohepatitis se han propuesto varios modelos animales [18, 24]. Los estudios en animales son una herramienta valiosa para

comprender la fisiopatología de la enfermedad y sus características histológicas, así como para la experimentación de nuevos tratamientos. La mayoría de los estudios se llevan a cabo en roedores y los métodos de inducción de la enfermedad son muy variados. El presente estudio utiliza pollos sometidos a dieta hiperlipémica como modelo de NASH [18].

El sistema linfático en los pollos es rudimentario y el hígado es el primer órgano que está expuesto en una dieta de lípidos. La principal vía de absorción de grasas es la formación de micelas. Los quilomicrones son absorbidos directamente en el sistema portal para el transporte de sangre al hígado antes de una nueva síntesis y posterior deposición en los tejidos. Esa característica predispone a las aves a la deposición de grasa en el hígado y sus complicaciones: esteatosis, esteatohepatitis y cirrosis [18]. El modelo animal de esteatohepatitis utilizado en este estudio es económico y fácilmente reproducible.

NAFLD abarca un amplio espectro de lesiones que incluyen esteatosis simple, NASH, fibrosis y cirrosis [5-9]. La fibrosis es uno de los factores que condicionan la progresión de las lesiones hepáticas en NAFLD. La biopsia hepática se considera actualmente el estándar de referencia para evaluar la fibrosis hepática. Sin embargo, es un procedimiento invasivo y doloroso, con raras pero potencialmente mortales complicaciones, limitando su aceptación en los pacientes generalmente asintomáticos, como son los pacientes con esteatosis hepática. La detección y cuantificación de la esteatosis hepática de manera no invasiva es fundamental; es especialmente importante para identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar cirrosis, en particular los pacientes con esteatohepatitis. Los métodos convencionales de imagen como la ecografía, la tomografía computarizada y la

resonancia magnética (RM) no diferencian la esteatosis simple de la esteatohepatitis [25, 26].

Un artículo recientemente publicado [24] informa que en ratas con esteatosis no alcohólica, la elastografía RM puede ser útil en la detección precoz de la esteatohepatitis, mostrando mayor elasticidad antes del desarrollo de fibrosis.

Datos del presente estudio muestran que el 100% del grupo de pollos SD obtuvo una puntuación de 0 en la clasificación histológica de Brunt, mientras que el 90% de los animales del grupo HD mostró un grado 2 y 3 con un solo pollo calificado con una puntuación de 1. Con la técnica de ARFI también se observó una fuerte correlación entre los grados de esteatosis y la velocidad de corte media: generalmente, SWV aumenta con el grado de esteatosis, especialmente en la esteatosis severa (puntuación 3). La dieta hipercolesterolémica e hipertrigliceridémica se han asociado con un deterioro severo de la histología hepática (acumulación de grasa inflamación y balonamiento celular), sin llegar a observar fibrosis en la tinción Verhoeff van Gieson [18]. También se observó un aumento en todos los parámetros lipídicos en los pollos del grupo HD, en comparación con las de los pollos del grupo SD.

Es importante la estimación precisa del grado de fibrosis hepática para la determinación del pronóstico y tratamiento. La Elastografía transitoria (FibroScan) es actualmente un método utilizado para cuantificar la fibrosis hepática [27, 28]. La técnica ARFI también es un procedimiento eficaz para evaluar fibrosis en pacientes con hepatopatía crónica [16,17]. Sin embargo, el valor de estas técnicas de imagen, especialmente para el diagnóstico de la fibrosis moderada, es discutible. La eficacia de

estas técnicas puede ser limitada por factores tales como el grado de inflamación del hígado y la esteatosis. Lupsor et al [17] informaron de que la SWV está fuertemente correlacionada con la fibrosis, moderadamente con la actividad necro-inflamatoria y no con esteatosis. Vispo et al [29] describieron una sobreestimación de la fibrosis usando la elastografía transitoria en pacientes con inflamación hepática extensa.

En la literatura revisada, no existe ningún estudio relacionado con el empleo de técnica ARFI como herramienta para valorar el grado de esteatosis hepática. Las velocidades medidas usando ARFI variaron de 0,8 a 2,2 m / s. Las velocidades más bajas ($\leq 1,3$ m / s) obtenidas correspondieron al grupo SD, que obtuvo una puntuación de 0 en la clasificación histológica de Brunt. Sólo un pollo en el grupo HD presentó una puntuación de 2, con una SWV de 1,3 m / s, mientras que el 90% de los pollos de este grupo tuvieron una SWV de 1,6 a 2,2 m / s. Por lo tanto, la técnica ARFI, puede discriminar entre animales con un hígado normal y aquellos con esteatosis hepática. Encontramos una fuerte correlación entre SWV y el grado de esteatosis. Sobre la base de las SWVs obtenidas en este estudio se ha podido establecer siguiente clasificación: $<1,3$ m/s (normal), para el grado 0; entre 1,4 y 1,7 m/s (esteatosis hepática intermedia), para grados 1-2, y entre 1,8 y 2,2 m/s (esteatosis hepática grave), para el grado 3. Además, estos resultados muestran que el grado de esteatosis influye en las propiedades mecánicas de los tejidos. Cuanto mayor sea el grado de esteatosis, mayor es el SWV. Estos datos también sugieren que los pollos incluidos en los grados 1-2 pueden corresponder a esteatosis simple, mientras que los animales del grado 3 corresponderían con esteatohepatitis. Consideramos por lo tanto que tanto la inflamación como la esteatosis pueden influir en la elasticidad del hígado, aunque la inflamación puede tener también una importante repercusión.

Estos son los resultados preliminares de nuestra investigación en un modelo animal de esteatohepatitis, que pone de manifiesto la utilidad de la técnica ARFI para detectar y cuantificar la esteatosis hepática. Esta técnica puede ser un interesante biomarcador del grado de esteatosis y podría ayudar en la detección temprana de la esteatohepatitis. Futuros estudios son necesarios para determinar el papel de esta herramienta no invasiva en la detección temprana de la esteatohepatitis.

1.3.1.5 Tabla 1

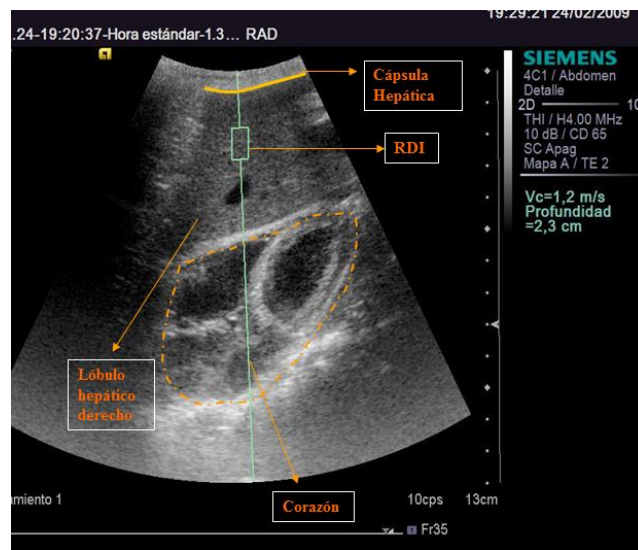
Perfil lipídico de los dos grupos de animales. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (rango)

Grupo	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
Dieta estándar	89 \pm 2,5 (86,5–91,5)	37,14 \pm 7,3 (29,84–44,44)	70,02 \pm 0,33 (69,69–70,35)	11,57 \pm 0,75 (12,28–13,78)
Dieta hiperlipémica	840,57 \pm 13,34 (826,67–853,91)	223.28 \pm 12.57 (210,71–235,85)	204.13 \pm 10.62 (193,51–214,75)	816,85 \pm 15,25 (801,59–832,11)

1.3.1.6. Figuras

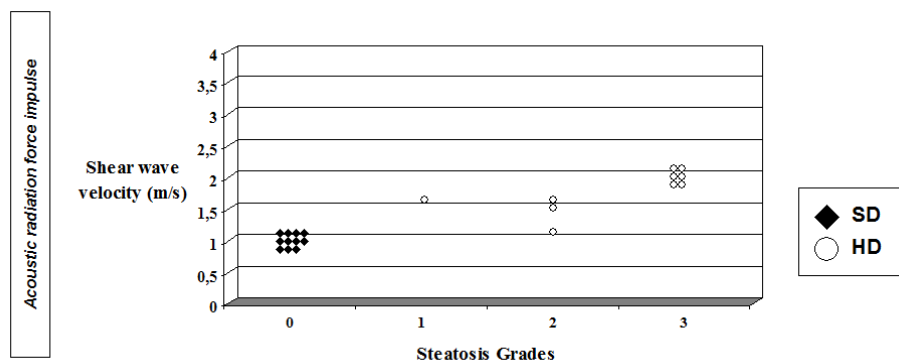
1.3.1.6.1 Figura 1

Imagen ecográfica que muestra un corte transversal del hígado (lóbulo hepático derecho) y del corazón. En el centro se visualiza la RDI en una zona del parénquima hepático exenta de vasos. A la derecha se observan los parámetros obtenidos (Vc de 1,2 m/s a una profundidad de 2,3 cm).



1.3.1.6.2 Figura 2

Gráfico que muestra los diferentes grados de esteatosis según la clasificación de Brunt y la distribución de los animales de ambos grupos. SD (grupo con alimentación estándar) y HD (grupo con dieta hiperlipémica).



1.3.1.7 Bibliografía

1. Ruhl C, Everhart J. Epidemiologic of nonalcoholic fatty liver. Clin Liver Dis. 2004; 8;501–19.
2. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology. 2004;40:1387-95.
3. Adams LA, Angulo P, Lindor D. Nonalcoholic fatty liver disease. 2005;172:899-905.
4. Imhof A, Kratzer W, Boehm B, Meitinger K, Trischler G, Steinbach G et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver and characteristics in overweight adolescents in the general population. Eur J Epidemiol. 2007;22:889-97.
5. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. Clin Sci (Lond) 2008. 115;141-50.
6. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. Lancet. 1997;349:825-32.
7. Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol. 2007 (Supl):S186-S190.
8. Farrel GC, Larter CZ . Nonalcoholic fatty lever disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology.2006;43(2Suppl 1):S99–S112.
9. Garcia-Compean D, Jazquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. World J Gastroenterol. 2009;21:280–288.
10. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. N Engl J Med.2001; 344:495-500.

11. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2614-8.
12. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;128:343-50.
13. Sarvazyan A, Rudenko O, Swanson S, Fowlkes J, Emelianov S. Shear wave elasticity imaging: a new ultrasonic technology of medical diagnostics. *Ultrasound Med Biol.* 1998; 24:1419-35.
14. Nightingale K, Soo M, Nightingale R, Trahey G. Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound Med Biol.* 2002;28:227-235.
15. Zhai L, Palmeri ML, Bouchard RR, Nightingale RW, Nightingale KR. An integrated indenter-ARFI imaging for tissue stiffness quantification. *Ultrasound Imaging.* 2008; 30:95-111.
16. Friedrich-Rust M, Wunder K, Kriener S, Sotoudeh F, Richter S, Bojunga J et al. Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. *Radiology.* 2009;252:595-604.
17. Lupsor M, Badea R, Stefanescu H, Sparchez Z, Branda H, Serban A et al. Performance of a new elastographic method (ARFI technology) compared to unidimensional transient elastography in the noninvasive assessment of chronic hepatitis C. Preliminary results. *J Gastrointest Liver Dis.* 2009;18:303-10.

18. Ayala I, Castillo AM, Adáñez G, Fernández-Rufete A, Pérez BG, Castells MT. Hyperlipidemic chicken as a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Biol Med.* 2009; 234:10-6.
19. Kostner GM, Molinari E, Pichler P. Evaluation of new HDL2/HDL3 quantitation method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chem Acta.* 1985;148:139-47.
- 20 Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Unalp A, Behling CE, Lavine JE et al. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology.* 2009;49:809-20.
21. Cassidy FH, Yokoo T, Aganovic L, Hanna RF, Bydder M, Middleton MS et al. Fatty liver disease: MR imaging techniques for the detection and quantification of liver steatosis. *Radiographics.* 2009;29:231-60.
22. Vizzutti F, Arena U, Nobili V, Tarquini R, Trappoliere M, Laffi G et al. Non-invasive assessment of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2009;8(2):89-94.
23. London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis.* 2007;11:55-74.
24. Salameh N, Larrat B, Abarca-Quinones J, Pallu S, Dorvillius M, Leclercq I et al. Early detection of steatohepatitis in fatty rat liver by using MR elastography. *Radiology.* 2009;253:90-7.
25. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol.* 2002;123:745-50.

26. Schwenzer NE, Springer F, Schraml SN, Machann J, Schick F. Noninvasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol.* 2009;51:433-45.
27. de Lédinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;41:175-9.
28. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography(FibroScan): a prospective study. *Gut.* 2006;55:403-8.
29. Vispo E, Barreiro P, Del Valle J, Maida I, de Ledinghen V, Quereda C et al. Overestimation of liver fibrosis staging using transient elastography in patients with chronic hepatitis C and significant liver inflammation. *Antivir Ther.* 2009;14:187-93.

1.4. OBESIDAD MÓRBIDA

La obesidad, definida como un índice de masa corporal $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, se estima que afecta a cerca de 1.700 millones de personas en todo el mundo (47). El índice de masa corporal (IMC) es calculado como el peso en Kg, dividido entre el cuadrado de la altura en metros. Cuando el IMC es mayor o igual a 40 kg/m^2 , pasa a llamarse obesidad mórbida y en los Estados Unidos la padecen cerca de un 5% de la población (47).

El aumento de la prevalencia de la obesidad está asociado con un aumento en la incidencia de patologías asociadas, tales como diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hipertensión, síndrome de apnea-hipopnea del sueño, enfermedad cardíaca, accidente

cerebrovascular, asma, problemas óseos degenerativos, varias formas de cáncer, depresión (48-50), así como esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica. La esteatohepatitis no alcohólica es una entidad que determina fibrosis hepática (cirrosis) en un 2% (51,52). Estas comorbilidades son responsables de más 2,5 millones de muertes al año en todo el mundo (48).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2 Hipótesis de trabajo. Objetivos

La técnica ARFI valora no sólo la imagen ecográfica, sino que también evalúa la elasticidad de los tejidos, por lo que debería proporcionar información útil para diferenciar los hígados sanos, de los que presentan NAFLD, NASH y cirrosis, a partir de sus características elásticas y su imagen. Dado que la técnica ARFI se encuentra previamente validada internamente en un modelo experimental de esteatosis, es necesario:

1. Verificar la reproducibilidad interobservador.
2. Conocer los valores de Vc normales en pacientes con hígados sanos.
3. Aplicar la técnica en pacientes con patología hepática y correlacionar con los hallazgos en anatomía patológica.
4. Disponer de un algoritmo diagnóstico que permita una clasificación de los diferentes grados de NAFLD.
5. Conocer las limitaciones de la técnica y cómo solventarlas.

La mayor parte de los trabajos publicados previamente, se han centrado en los puntos 3 y 4, y en menor medida en el 2 y el 5. Esta tesis pretende seguir el “método científico”, sustentado en dos pilares fundamentales: el método hipotético deductivo experimental y la reproducibilidad.

De esta manera se pretende poner a prueba la fiabilidad de la técnica, definir los parámetros normales y establecer un método diagnóstico útil en la práctica clínica diaria.

ORIGINAL RESEARCH

Reproducibility of Shear Wave Velocity Measurements by Acoustic Radiation Force Impulse Imaging of the Liver

A Study in Healthy Volunteers

Florentina Guzmán-Aroca, MD, Manuel Reus, MD, Juan D. Berná-Serna, MD, Laura Serrano, MD, Cristina Serrano, MD, Amparo Gilabert, MD, Angela Cepero, MD

ARTÍCULO 1

Reproducibility of Shear Wave Velocity Measurements by Acoustic Radiation Force Impulse Imaging of the Liver. A Study in Healthy Volunteers.

Florentina Guzmán-Aroca, MD, Manuel Reus, MD, Juan D. Berná-Serna, MD, Laura Serrano, MD, Cristina Serrano, MD, Amparo Gilabert, MD, Angela Cepero, MD

From Department of Radiology, Virgen de la Arrixaca University Hospital, 30120, El Palmar, Murcia, Spain.

3.1 Denominación de la revista

Journal of Ultrasound in Medicine

3.2 Abstract

Objectives: The purposes of this study were to investigate interobserver reproducibility using acoustic radiation force impulse imaging and to develop an acoustic radiation force impulse scoring system.

Methods: Fifty healthy volunteers with normal liver function test values were selected for the study. Shear wave velocity measurements, expressed in meters per second, were taken in a deep portion of liver segment 6. Two observers with different levels of experience performed the measurements independently and blindly.

Results: All of the measurements taken by the 2 observers were valid, even in volunteers with a body mass index of greater than 28 kg/m². The results point to very good interobserver reproducibility of shear wave velocity measurements, with an intraclass coefficient correlation of 0.86 (P < .001).

Conclusions: The results of this study show that shear wave velocity measurements using the acoustic radiation force impulse technique and a standardized protocol are accurate and reproducible.

Key Words: acoustic radiation force impulse imaging. Healthy volunteers. Liver. Liver Fibrosis.

3.3 Dirección URL

Disponible en

<http://www.jultrasoundmed.org/content/30/7/975.full.pdf+html?sid=81ec73b0-8f90-4c7f-b153-2b4a132acff1>

Eur Radiol
DOI 10.1007/s00330-012-2505-3

ULTRASOUND

Detection of non-alcoholic steatohepatitis in patients with morbid obesity before bariatric surgery: preliminary evaluation with acoustic radiation force impulse imaging

F. Guzmán-Aroca · M. D. Frutos-Bernal · A. Bas ·
J. A. Luján-Mompeán · M. Reus ·
Juan de Dios Berná-Serna · P. Parrilla

ARTÍCULO 2

Detection of non-alcoholic steatohepatitis in patients with morbid obesity before bariatric surgery: preliminary evaluation with acoustic radiation force impulse imaging

F. Guzmán-Aroca¹, MD Frutos-Bernal², A. Bas³, J. A. Luján-Mompeán², M. Reus¹, Juan de Dios Berná-Serna¹ and P. Parrilla²

¹ Department of Radiology, Virgen de la Arrixaca University Hospital, 30120 El Palmar, Murcia, Spain e-mail: jdberna@gmail.com.

² Department of Surgery, Virgen de la Arrixaca University Hospital, 30120 El Palmar, Murcia, Spain.

³ Department of Pathology Virgen de la Arrixaca University Hospital, 30120 El Palmar, Murcia, Spain.

4.1 Denominación de la revista

European Radiology

4.2 Abstract

Objective: To investigate the utility of acoustic radiation forced impulse (ARFI) imaging, with the determination of shear wave velocity (SWV), to differentiate non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) from non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in patients with morbid obesity before bariatric surgery.

Methods: Thirty-two patients with morbid obesity were evaluated with ARFI and conventional ultrasound before bariatric surgery. The ARFI and ultrasound results were compared with liver biopsy findings, which is the reference standard. The patients were classed according to their histological findings into three groups: group A, simple steatosis; group B, inflammation; and group C, fibrosis.

Results: The median SWV was 1.57 ± 0.79 m/s. Hepatic alterations were observed in the histopathological findings for all the patients in the study (100 %), with the results of the laboratory tests proving normal. Differences in SWV were also observed between groups A, B and C: 1.34 ± 0.90 m/s, 1.55 ± 0.79 m/s and 1.86 ± 0.75 m/s ($P < 0.001$), respectively. The Az for differentiating NAFLD from NASH or fibrosis was 0.899 (optimal cut-off value 1.3 m/s; sensitivity 85 %; specificity 83.3 %).

Conclusion: The ARFI technique is a useful diagnostic tool for differentiating NAFLD from NASH in asymptomatic patients with morbid obesity. KEY POINTS : • Acoustic radiation force impulse imaging provides ultrasonic shear wave velocity measurements. • SWV measurements were higher in patients with inflammation or fibrosis than NAFLD. • ARFI differentiates NAFLD from NASH in patients with morbid obesity. • Results suggest that ARFI can detect NASH in asymptomatic morbidly obese patients.

4.3 Dirección URL

Disponible en

http://download.springer.com/static/pdf/814/art%253A10.1007%252Fs00330-012-2505-3.pdf?auth66=1360778540_041efe204cce718ed73a81129d1b7cf7&ext=.pdf



RADIOLOGÍA HOY

La elastografía: una nueva aplicación de la ecografía. ¿Cuál es su utilidad clínica?

F. Guzmán Aroca, D. Abellán Rivera y M. Reus Pintado*

Servicio de Radiodiagnóstico, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

Recibido el 23 de marzo de 2012; aceptado el 10 de septiembre de 2012

ARTÍCULO 3

The clinical utility of elastography, a new ultrasound technique.

5.1 Denominación de la revista

Radiología

5.2 Abstract

Sonoelastography combines elastography and B mode ultrasonography to show parameters related to the structural organization of tissues in real time. Thus, this noninvasive technique shows us the mechanical characteristics of each tissue. The different elastography techniques (qualitative and quantitative, in ultrasonography or magnetic resonance imaging) are based on the hypothesis that soft tissues are more deformable than stiff tissues and that these differences can be captured in images. Elastography adds a new perspective to conventional ultrasonography: it reflects the stiffness of the tissues, and this information, together with the anatomic information from B mode imaging and the vascular information from Doppler, is key for the diagnosis. This article aims to provide a brief summary of what elastography is, the different types of elastography, and the range of possible applications of this technique.

5.3 Dirección URL

Disponible en

[http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/eop/S0033-8338\(12\)00246-9.pdf](http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/eop/S0033-8338(12)00246-9.pdf)

**DISCUSIÓN GLOBAL
DE LOS TRES ARTÍCULOS**

6. Discusión global de los tres artículos

La esteatosis no alcohólica (NAFLD) y el espectro de enfermedades que conlleva (NASH y cirrosis) es un trastorno complejo que implica factores medioambientales y predisposición genética. Como resultado de esta complejidad, los modelos animales proporcionan las herramientas necesarias para superar la confusión de variables, como la heterogeneidad genética, las diferencias de género, y los factores ambientales, incluyendo la dieta y el estilo de vida (41-43). Aún se desconoce mucho sobre la fisiopatología de la esteatosis en los seres humanos, dada la dificultad de estudiar todos los factores que intervienen en las poblaciones humanas (29). Además estos animales también pueden presentar alteraciones hepáticas compatibles con esteatosis, esteatohepatitis e incluso cirrosis, al ser alimentados con una dieta rica en lípidos, dado su sistema linfático rudimentario (41).

La biopsia hepática es actualmente considerada el estándar de referencia para evaluar la fibrosis, la inflamación y la infiltración grasa hepática. Sin embargo, es un procedimiento invasivo, con raras pero potenciales complicaciones mortales, lo que limita su aceptación (37,38). Además, la eficacia de la biopsia en el diagnóstico de la fibrosis está cuestionada por la variabilidad interobservador (la discordancia entre muestras puede alcanzar el 50 % y una tasa de falsos negativos del 24-50%, sobre todo en casos de cirrosis macronodular) (27).

Así mismo existen marcadores biológicos de esteatosis hepática, que buscan establecer el estado de fibrosis y de actividad inflamatoria equivalente a la información que suministra la biopsia hepática (39). La desventaja reside en que estos métodos

aumentan su sensibilidad cuanto mayor sea el grado de inflamación o fibrosis hepática. Esto significa el aumento de falsos negativos en estadios incipientes y reversibles. Estudios realizados demuestran que no existen diferencias significativas entre concentraciones de enzimas hepáticas analizadas (GOT/GTP), mientras que se les da un valor significativo a los valores del LDL-Colesterol, como uno de los marcadores biológicos de esteatosis (31,32).

Existen otras técnicas de diagnóstico no invasivas como la ecografía, en la que el diagnóstico de esteatosis es relativamente sencillo. El problema de la ecografía es que es altamente operador dependiente y el diagnóstico y caracterización del hígado graso se basa únicamente en la ecogenicidad hepática (30,33,34). Por lo tanto, la evaluación de la esteatosis es principalmente cualitativa. Sin embargo, la ecografía es muy útil en el diagnóstico de estadios finales de una hepatitis de cualquier origen (cirrosis). Aproximadamente el 25% de los pacientes sometidos a biopsia hepática en el estudio de una hipertransaminasemia mantenida, tienen ya una cirrosis hepática no sospechada y que es diagnosticada con ecografía (27). De esta manera se pueden diagnosticar hígados en estadios finales de enfermedad (cirrosis), pero no en los iniciales, cuando todavía no existe fibrosis.

Por otra parte la Tomografía Computarizada (TC) y la elastografía por Resonancia Magnética (elasto-RM), constituyen técnicas de imagen alternativas a la ecografía, que, sin embargo, plantean el inconveniente de la radiación y el coste, respectivamente (34,35).

Por último, otra técnica diagnóstica no invasiva es la elastografía de transición (FibroScan®). El problema de esta técnica es que aporta la mediana de la elasticidad del

tejido (tomado al azar) sin la obtención de imagen; además de presentar limitaciones en pacientes obesos y/o con ascitis (36-38).

Es en este punto donde cobra importancia la existencia de ARFI: una técnica que conjuga la inocuidad y bajo coste de los US, con los datos que aporta el conocimiento cuantitativo de la elasticidad de los tejidos, más que demostrado con la elastografía de transición.

En un estudio previo se (46) se ha analizado la “validez interna” de la técnica ARFI en un biomodelo experimental controlado, y se han correlacionado los resultados obtenidos con la anatomía patológica (técnica estándar de referencia).

En el primer trabajo se analiza la precisión o fiabilidad de la técnica interobservador (grado de reproducibilidad de un estudio o de un procedimiento de medida) y se precisan los valores de Vc normales en hígados sanos ($0,94 \pm 0,17$; rango 0,84-1,2), tomando de referencia una población de 50 individuos (grupo control).

Por otra parte, la esteatosis hepática simple, por sí sola, es una entidad benigna; sin embargo actualmente existe evidencia de que evoluciona a NASH y a fibrosis hepática (50,51). Durante la última década, la NASH se ha convertido en una patología común y es una de las causas más importantes de enfermedad crónica hepática (22, 26). En el tercer trabajo, se pone de manifiesto que las alteraciones hepáticas visualizadas en anatomía patológica son muy frecuentes en pacientes con obesidad mórbida, en ausencia de

sintomatología (en nuestro caso del 100%). Estos hallazgos abarcan la infiltración grasa, los cambios inflamatorios y la fibrosis.

Hasta ahora, la determinación de alteraciones hepáticas previa a la cirugía bariátrica en pacientes con obesidad mórbida, venía determinada únicamente por datos analíticos. Sin embargo los datos obtenidos en el tercer trabajo muestran que todos los pacientes, aun teniendo unos resultados analíticos normales, presentaron alteraciones hepáticas en anatomía patológica y de ellos, el 65,2% (n=20), alteraciones distintas de la esteatosis simple.

La ecografía, anteriormente cuantificaba el grado de esteatosis hepática en pacientes con obesidad mórbida. No obstante, la cuantificación de la Vc es fundamental para discriminar hígados ecográficamente normales, o con esteatosis simple, de aquellos que presentan un componente inflamatorio o fibrosis (hallazgos compatibles con NASH y su espectro de patología). Además de esto, la ecografía presenta la gran desventaja de la subjetividad propia de la técnica. La cuantificación de estos hallazgos, ha sido posible tras la medida de la Vc en el tejido, que aumentaba considerablemente en la fibrosis ($1,86 \pm 0,75$ m/s) y en la inflamación ($1,86 \pm 0,75$ m/s), y disminuía sensiblemente, conforme aumentaba la cantidad de infiltración grasa ($1,34 \pm 0,90$ m/s). El aumento de la Vc en la fibrosis ya ha sido probado en un estudio reciente de Boursier J et al (22) en 2010, donde se analiza el hígado de 101 pacientes con enfermedad hepática crónica. Se ha especulado que el aumento de la reticulación de la matriz extracelular hepática y la infiltración por edema y células inflamatorias podrían ser factores que contribuyen a la mayor rigidez observada (23-25).

Por el contrario, la asociación entre la inflamación y la velocidad de corte, aún no ha sido comprobada. La mayor celularidad encontrada en los hígados con inflamación (infiltrados linfocitarios) podría ser una causa de aumento de la Vc, por existir una mayor densidad de tejido.

La disminución de la Vc conforme aumenta la infiltración grasa hepática, podría deberse a que las grandes vacuolas grasas aumentan el espacio entre las células hepáticas, disminuyendo la densidad del tejido, lo que hace que el hígado sea más blando, como ya han planteado Yoneda et al (20).

La ecografía convencional nos permite clasificar los hígados según su morfología y ecogenicidad, mientras que la técnica ARFI añade un parámetro funcional (la elasticidad del tejido en ese momento) que nos permite definir unos parámetros de elasticidad normal o anormal, incluso con ecografía normal.

En el segundo trabajo se pone de manifiesto la relación positiva y directa que existe entre el grado de esteatosis detectado en ecografía, con las cifras de colesterol total y el LDL-colesterol, de manera que los parámetros séricos aumentan, conforme aumenta el % de esteatosis encontrado en la anatomía patológica. La obtención de parámetros serológicos como el colesterol total o el LDL-Colesterol, constituirían un buen parámetro para la detección y seguimiento de la esteatosis hepática, pero por sí solo no ayuda a diferenciar la esteatosis simple de la inflamación o fibrosis.

Los métodos convencionales de imagen como la ecografía o TC no distinguen una esteatosis simple, de una esteatohepatitis. En cuanto a la elasto-RM, permite la detección precoz de la NASH y la fibrosis, pero es una técnica de poca disponibilidad y alto coste (34,35). Además existe la gran limitación del perímetro abdominal de estos pacientes, la mayoría de ellos, mayor que el diámetro del gantry. Aunque, para obviar la limitación del gantry se puede usar la RM abierta (35). En el segundo trabajo, la determinación de la Vc con la técnica ARFI, ha demostrado una alta sensibilidad (89.47%) y una gran especificidad (76.92%) en la detección de inflamación y fibrosis, con el consiguiente aumento de los valores de Vc en ambos casos.

La detección de inflamación y fibrosis hepática, previo a cirugía bariátrica, es fundamental para identificar no sólo a pacientes con mayor riesgo de desarrollar cirrosis, sino a los que presentan cualquier alteración hepática, ya que ésta es determinante en la evolución postquirúrgica de los pacientes (53,54). Como la histología hepática normalmente no está disponible antes de la cirugía, la valoración de la Vc durante el estudio ecográfico previo, puede ayudar en la evaluación clínica de la patología del hígado en pacientes obesos en el que no existen otros indicios de daño hepático.

La medida de la Vc, junto con la valoración de los hallazgos ecográficos convencionales, permitiría diferenciar hígados con esteatosis simple ($Vc \leq 1,3 \text{ m/s}$), de otros hígados con esteatohepatitis o fibrosis ($Vc > 1,3 \text{ m/s}$). Tomando como base nuestros resultados, el algoritmo propuesto en la figura 6 del artículo 3, podría ser extrapolado a la práctica clínica.

La combinación de estas técnicas: ecografía convencional y ARFI, podría servir para el diagnóstico precoz de la lesión hepática, ya que hemos observado varios pacientes con fibrosis incipiente y sin esteatosis, que presentaban una Vc elevada con un hígado ecográficamente normal. Esto es probablemente porque la esteatosis es reemplazada gradualmente por la deposición de matriz extracelular que da lugar a la fibrosis.

La detección temprana y monitorización de patología hepática (NASH) es fundamental para evitar la evolución a cirrosis y realizar un tratamiento precoz de la misma.

En resumen, en el segundo trabajo se analiza la “validez externa” o grado en que los resultados de un estudio son generalizables a otras poblaciones distintas a la estudiada en un primer momento (biomodelo animal). De esta manera se podría aplicar el algoritmo diagnóstico diseñado a otras poblaciones distintas de los pacientes con obesidad mórbida, como método de diagnóstico precoz de NASH.

Por último en el tercer trabajo se discuten las diferentes aplicaciones de la sonoelastografía no sólo en el hígado sino en otros muchos órganos, aportando ejemplos prácticos en músculo-esquelético y tiroides. La elastosonografía aportaría la rigidez de los tejidos como tercer pilar de la ecografía, junto con información anatómica del modo-B y la vascular del modo-Doppler. En este trabajo se propone la realización de “mapas elastográficos” del organismo, tanto en sonoelastografía cualitativa (mapas de color), como en sonoelastografía cuantitativa (Velocidad de corte o kPa), para asignar valores de referencia a tejidos sanos y, de esta manera, normalizar la técnica.

Tanto los trabajos aportados en esta tesis, como el trabajo realizado previamente en animales (46), pretenden demostrar de manera certera, que la técnica sonoelastográfica ARFI, es un método fiable, reproducible, no invasivo y barato, para el diagnóstico de patología hepática difusa, siendo extensible a otros órganos del ser humano.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El desarrollo de esta memoria ha conducido a los siguientes avances en el conocimiento:

1. Se ha verificado la reproducibilidad, precisión o fiabilidad interobservador de la técnica ARFI, obteniendo un coeficiente de correlación intraclase de 0,86.
2. Se han propuesto unos valores de Vc normales en pacientes con hígados sanos ($0,94 \pm 0,17$; rango 0,84-1,2).
3. En nuestros pacientes obesos, la técnica ARFI ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad (85% y 83,3% respectivamente), en la detección de hígados con fibrosis y/o esteatohepatitis, que la ecografía simple o los datos de laboratorio.
4. Se ha elaborado un algoritmo diagnóstico que permite una clasificación de los diferentes grados de NAFDL, de manera que se distinga esteatosis simple (benigna) de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) mediante la conjunción de US y ARFI.
5. Se propone la realización de “mapas elastográficos” tanto cualitativos como cuantitativos de los diferentes órganos, para solventar los problemas de variabilidad interobservador de la técnica.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

1. Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging*. 1991;13:111-34.
2. Kirk GD, Astemborski J, Mehta SH, Spoler C, Fisher C, Allen D et al. Assessment of liver fibrosis by transient elastography in persons with hepatitis C virus infection or HIV-hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis*. 2009;48:963-72.
3. Gheonea IA, Stoica Z, Bondari S. Differential diagnosis of breast lesions using ultrasound elastography. *Indian J Radiol Imaging*. 2011;21(4):301-5.
4. Mansor M, Okasha H, Esmat S, Hashem AM, Attia KA, Hussein Hel-D. Role of ultrasound elastography in prediction of malignancy in thyroid nodules. *Endocr Res*. 2012;37:67-77.
5. Barr RG, Memo R, Schaub CR. Shear wave ultrasound elastography of the prostate: initial results. *Ultrasound Q*. 2012;28:13-20.
6. Itokawa F, Itoi T, Sofuni A, Kurihara T, Tsuchiya T, Ishii K et al. EUS elastography combined with the strain ratio of tissue elasticity for diagnosis of solid pancreatic masses. *J Gastroenterol*. 2011;46:843-53.
7. Yamakoshi Y, Sato J, Sato T. Ultrasonic Imaging of internal vibration of soft tissue under forced vibration. *IEEE Trans Ultrason Ferroel Freq Cont* 1990;37:45-53.

8. Parker KJ, Huang SR, Musulin RA, Lerner RM. Tissue response to mechanical vibrations for 'sonoelasticity imaging'. *Ultrasound Med Biol* 1990;16:241-6.
9. Dickinson RJ, Hill CR. Measurement of soft tissue motion using correlation between A-scans. *Ultrasound Med Biol* 1982;8:263-71.
10. Wilson LS, Robinson DE. Ultrasonic measurement of small displacements and deformations of tissue. *Ultrasonic Imaging* 1982;4:71-82.
11. Krouskop TA, Dougherty DR, Vinson FS. A pulsed Doppler ultrasonic system for making noninvasive measurements of the mechanical properties of soft tissue. *Journal of Rehabilitation Research & Development* 1987;24:1-8.
12. Faria SC, Ganesan K, Mwangi I, Shiehorteza M, Viamonte B, Mazhar S, et al. MR imaging of liver fibrosis: current state of the art. *Radiographics*. 2009;29:1615-35.
13. Tissue Strain Analytics Virtual Touch Tissue Imaging and Quantification. Acuson S2000 Ultrasound System. Siemens. [Consultado: 9 de Julio de 2002]. Disponible en:
<http://healthcare.siemens.com/ultrasound/obgyn/acuson-s3000-ultrasound-system/technical-specifications>.
14. Zhai L, Palmeri ML, Bouchard RR, Nightingale RW, Nightingale KR. An integrated indenter-ARFI imaging system for tissue stiffness quantification. *Ultrason Imaging*. 2008; 30: 95-111.
15. Mauldin FW Jr, Zhu HT, Behler RH, Nichols TC, Gallippi CM. Robust principal component analysis and clustering methods for automated

- classification of tissue response to ARFI excitation. *Ultrasound Med Biol.* 2008; 34: 309-25.
16. Fierbinteanu-Braticevici C, Andronescu D, Usvat R, Cretoiu D, Baicus C, Marinoschi G. Acoustic radiation force imaging sonoelastography for noninvasive staging of liver fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 5525-32.
 17. Zwiebel WJ Sonographic diagnosis of diffuse liver disease. *Semin Ultrasound CT MR.* 1995; 16:8-15.
 18. Horster S, Mandel P, Zachoval R, Clevert DA. Comparing acoustic radiation force impulse imaging to transient elastography to assess liver stiffness in healthy volunteers with and without valsalva manoeuvre. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010; 46: 159-68.
 19. Mazhar SM, Shieh morteza M, Sirlin CB. Noninvasive assessment of hepatic steatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009; 7: 135-40.
 20. Yoneda M, Suzuki K, Kato S, Fujita K, Nozaki Y, Hosono K et al. Nonalcoholic fatty liver disease: US-based acoustic radiation force impulse elastography. *Radiology.* 2010;256:640-7.
 21. Sporea I, Badea R, Sirli R, Lupsor M, Popescu A, Danila M et al. How efficient is acoustic radiation force impulse elastography for the evaluation of liver stiffness? *Hepat Mon.* 2011;11:532-8.
 22. Boursier J, Isselin G, Fouchard-Hubert I, Oberti F, Dib N, Lebigot J et al. Acoustic radiation force impulse: a new ultrasonographic technology for the widespread noninvasive diagnosis of liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22:1074-84.

23. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology*. 2011; 259:749-56.
24. Salameh N, Larrat B, Abarca-Quinones J, Pallu S, Dorvillius M, Leclercq I, et al. Early detection of steatohepatitis in fatty rat liver by using MR elastography. *Radiology*. 2009;253:90-7.
25. Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M et al. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:1147-54.
26. Cassidy FH, Yokoo T, Aganovic L, Hanna RF, Bydder M, Middleton MS et al. Fatty liver disease: MR imaging techniques for the detection and quantification of liver steatosis. *Radiographics*. 2009;29:231-60.
27. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-tetri BA. Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107:1103-9.
28. Spahr L, Rubbia-Brandt L, Hadengue A. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: the same disease! I. Diagnosis and mechanisms. *Rev Med Suisse*. 2005;1:2026-8, 2030-1.
29. Spahr L, Hadengue A. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: the same disease! I. Diagnosis and mechanisms. *Rev Med Suisse*. 2005;1:2026-8, 2030-1.
30. Macías Rodríguez MA, Rendón Unceta P, Navas Relinque C, Tejada Cabrera M, Infantes Hernández JM, Martín Herrera L. Ultrasonography in

- patients with chronic liver disease: its usefulness in the diagnosis of cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2003;95:258-64, 251-7.
31. Lassailly G, Caiazzo R, Hollebecque A, Buob D, Leteurtre E, Arnalsteen L et al. Validation of noninvasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest, and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:499-506.
 32. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Zvibel I, Goldiner I, Blendis L, Morali G et al. The association between adipocytokines and biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease-induced liver injury: a study in the general population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012;24:262-9.
 33. Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *Am J Roentgenol.* 2007; 189:1449. 320-3.
 34. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol.* 2011;21:87-97.
 35. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL. Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology.* 2011;259:749-56.
 36. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29:1705-13.

37. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 2006;55:403-8.
38. Nightingale K, Palmeri M, Trahey G. Analysis of contrast in images generated with transient acoustic radiation force. *Ultrasound Med Biol*. 2006;32:61-72.
39. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344: 495-500.
40. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-21.
41. Ayala I, Martín Castillo A, Adánez G, Fernández-Rufete A, García Pérez B, Castells MT. Hyperlipidemic Chicken as a Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis *Ex Biol Med (Maywood)*. 2009; 234:10-6.
42. Martín Castillo A, Castells MT, Adánez G, Sánchez-Polo MT, García Pérez B, Ayala I. Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens. *Biomed Pharmacother*. 2010; 64: 275-81.
43. Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Castells MT, Valdés M. Use of the Chicken as Experimental Animal Model in Atherosclerosis. *Avian and Poultry Biology Reviews*. 2005; 16: 151-9.
44. García Pérez B, Ayala I, Castells MT, Sánchez Polo MT, García Partida P, Valdés M. Effects of nifedipine, verapamil and diltiazem on serum

- biochemical parameters and aortic composition of atherosclerotic chickens. *Biom Pharmacother.* 2005; 59: 1-7.
45. García Pérez B, Ayala I, Castells MT, Madrid JF, Ortega MR, Ortega JV et al. Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem. *Histol Histopathol.* 2003; 18: 1027-33.
46. Guzmán Aroca F, Ayala I, Serrano L, Berná-Serna JD, Castell MT, García-Pérez B et al. Assessment of liver steatosis in chicken by using acoustic radiation force impulse imaging: preliminary results. *Eur Radiol.* 2010;20:2367-71.
47. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292:1724-37.
48. World Health Organization. World Health Report 2002. Disponible en: <http://www.who.org>. Accessed January 13, 2004.
49. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 1999; 282:1523-9.
50. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, USA. Overweight, obesity, and health risk: National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. *Arch Intern Med.* 2000;160: 898-904.
51. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B et al. Nonalcoholic Fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)* 2012 Nov;91:319-27.

52. Angulo P. Non alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-31.
53. Werven JR, Schreuder TC, Aarts EO, Nederveen AJ, Meijer JW, Berends FJ et al. Hepatic steatosis in morbidly obese patients undergoing gastric bypass surgery: assessment with open-system 1H-MR spectroscopy. *Am J Roentgenol.* 2011;196:736-42.
54. Nguyen NT, Masoomi H, Laugenour K, Sanaiha Y, Reavis KM, Mills SD et al. Predictive factors of mortality in bariatric surgery: Data from the Nationwide Inpatient Sample. *Surgery.* 2011;150:347-51.