



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA DE DOCTORADO

**Utilidad de los Biomarcadores en la Evaluación no Invasiva
de la Fibrosis Hepática en Pacientes con Hepatitis
Crónica C y de la Enfermedad de Hígado Graso
no Alcohólico en Pacientes Obesos**

D^a Iria Cebreiros López

2015

*La verdadera ciencia enseña,
por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.*

Miguel de Unamuno

A mis padres, por creer en mí y por enseñarme la importancia del esfuerzo y la constancia.

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento no podría ir dirigido a otra persona si no al director de esta tesis. Gracias Pepe por pensar en mí para llevar a cabo este trabajo, y por la dedicación que has demostrado al guiarme durante todo su desarrollo. Pero sobre todo gracias por tu confianza, tu apoyo, tu comprensión y tus palabras de ánimo cuando me hicieron tanta falta. Gracias por la infinita paciencia que siempre has demostrado conmigo, por hacerme fácil lo que yo veía difícil y por tu total disponibilidad cada vez que fue necesaria. Gracias por todos los conocimientos que me has transmitido, y por despertar en mí la inquietud y el entusiasmo necesarios para intentar crecer profesionalmente cada día. Gracias por tu amistad.

Mil gracias a Tina, por implicarse de manera personal conmigo desde el primer día, y porque sin su ayuda, esta tesis probablemente todavía no estaría finalizada. Gracias por tus lecciones de radiología, pero ante todo, gracias por tu tiempo, tus consejos y tu amistad.

Gracias a la colaboración desinteresada del personal de los Servicios de Radiodiagnóstico, Cirugía General, Anatomía Patológica y Digestivo, sin cuya inestimable ayuda esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a la Dra. Bas, al Dr. Luján y a la Dra. Frutos. Especialmente gracias a esta última, porque su gran implicación permitió la obtención de todas las biopsias.

A todo el personal del Servicio de Análisis Clínicos, gracias. Porque entre todos habéis logrado que me haya sentido como en casa durante los últimos cinco años. Me llevo de aquí grandes amigos. En especial gracias a mis compañeros y amigos residentes, que habéis sido mi familia en Murcia, compartiendo estos años irrepetibles llenos de buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a mis compañeros de docencia, que tan cerca de mí habéis estado este último año, compartiendo buenos y malos momentos. Gracias por vuestros ánimos, y por vuestro cariño y amistad.

Gracias a todos mis amigos, a los gallegos y a los murcianos, que habéis sufrido de cerca mis momentos de desaliento durante el desarrollo de la tesis. Gracias por vuestro apoyo y vuestros ánimos, y por las risas y las lágrimas compartidas. Gracias por estar siempre ahí.

Sin lugar a dudas, todo esto no hubiera sido posible sin mi familia. Gracias a mis padres y a mis hermanos, por su amparo incondicional desde que tengo memoria. Gracias por vuestro amor y cariño constante, y por entender mis ausencias y mis malos momentos. A pesar de la distancia, siempre estáis a mi lado. Gracias por hacerme feliz.

A todos, gracias.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACTPR: Actividad de protrombina

AGL: Ácidos grasos libres

ALP; EC3.1.3.1: Fosfatasa alcalina

ALT; EC 2.6.1.2: Alanino aminotransferasa

Apo A: Apolipoproteína A

ApoA-1: Apolipoproteína A tipo 1

ApoA-2: Apolipoproteína A tipo 2

ApoB: Apolipoproteína B

APRI: AST to Platelet Ratio Index; Índice AST/plaquetas

ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse; Técnica de la Fuerza de Radiación Acústica del Impulso

ARN: Ácido ribonucleico

AST; EC 2.6.1.1: Aspartato aminotransferasa

AUC: Area under curve; Área bajo la curva

CB1: Receptor cannabinoide tipo 1

CB2: Receptor cannabinoide tipo 2

CHC: Carcinoma hepatocelular

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

DAA: Antivirales de acción directa

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EHGNA: Enfermedad por hígado graso no alcohólico

EIA: Enzimoimmunoensayo

Elasto-RM: Elastografía de resonancia magnética

ELF: Test de Fibrosis Hepática mejorado; Enhanced Liver Fibrosis test

ET: Elastografía de transición

FITC: Isocianato de fluoresceína

GGT; EC 2.3.2.2: γ -Glutamilttransferasa

HA: Ácido Hialurónico

HABP: Proteína de unión al ácido hialurónico

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HGF: Factor de crecimiento hepatocitario

HSC: Célula estrellada hepática

HTA: Hipertensión arterial

IDI: Índice de discriminación integrado

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica

IFN- α : Interferón alfa

IFN- γ : Interferón gamma

IGF: Factor de crecimiento derivado de la insulina

IMC: Índice de masa corporal

INR: Razón internacional normalizada

ISI: Índice de sensibilidad internacional

LDL: Lipoproteína de baja densidad

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteasas de la matriz

MTTP: Proteína transferidora de triglicéridos microsomales

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease; Enfermedad por hígado graso no alcohólico

NASH: Non-alcoholic steatohepatitis; Esteatohepatitis no alcohólica

NO: Óxido nítrico

OELF: Test Original de Fibrosis Hepática; Original European Liver Fibrosis test

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PegINF: Interferon pegilado

PIIINP: Péptido aminoterminal del Procolágeno tipo III

RIBA: Recombinant immunoblot assay; Inmunoensayo recombinante

RBV: Ribavirina

RDI: Región de interés

RI: Resistencia a la Insulina

RM: Resonancia magnética

ROC: Receiver operation characteristics

RVS: Respuesta viral sostenida

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SM: Síndrome Metabólico

SREBP-1c: Proteína unida al elemento regulador de esteroides

TC: Tomografía computerizada

TGF- β : Factor de crecimiento transformador beta

TIMPs: Inhibidores tisulares de las metaloproteasas de la matriz

TIMP-1: Inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo 1

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TP: Tiempo de protrombina

TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada

TTPAr: Ratio del tiempo de tromboplastina parcial activada

ULN: Upper limit normal; Límite superior de normalidad

Vc: Velocidad de onda de corte

VCM: Volumen corpuscular medio

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

YKL-40: Chondrex

I. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 La Fibrosis hepática.....	19
1.1.1 Definición e incidencia	19
1.1.2 Mecanismos patogénicos	20
1.1.3 Enfermedades relacionadas.....	39
i. Virus de la hepatitis C.....	40
b. Virología	40
c. Variabilidad Genética	42
d. Epidemiología.....	43
e. Diagnóstico.....	44
f. Historia natural y fisiopatología de la enfermedad	45
g. Tratamiento.....	49
ii. Enfermedad por hígado graso no alcohólico	54
a. Epidemiología.....	54
b. Etiología.....	55
c. Fisiopatogenia	56
d. Histología.....	59
e. Historia natural de la enfermedad	61
f. Diagnóstico.....	62
g. Tratamiento.....	64
1.2 Diagnóstico de la fibrosis hepática	70
1.2.1 Métodos invasivos	71
i. Biopsia hepática	71
1.2.2 Métodos no invasivos	75
i. Examen físico.....	75
ii. Pruebas de imagen.....	76
a. Ecografía.....	76
b. Sonoelastografía.....	79
c. Elastografía de transición.....	83
d. Otras técnicas.....	85
iii. Biomarcadores de fibrosis hepática.....	87
a. Indirectos	88
b. Directos	98
c. Índices derivados de algoritmos matemáticos	110

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	131
2.1 Justificación e hipótesis del estudio	133
2.2 Objetivos	137
III. PACIENTES Y MÉTODOS	139
3.1 Diseño del estudio	141
3.2 Pacientes	141
3.2.1 Criterios de inclusión	142
3.2.2 Criterios de exclusión.....	142
3.2.3 Grupos de estudio	143
3.3 Métodos.....	146
3.3.1 Parámetros de estudio.....	146
i. Variables clínicas	146
ii. Parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico.....	148
iii. Parámetros derivados del estudio anatomopatológico de la biopsia hepática	151
iv. Parámetros de laboratorio	152
3.3.2 Recogida y procesamiento de las muestras.....	153
i. Recogida de las muestras	153
ii. Procesamiento analítico de las muestras.....	154
3.4 Análisis Estadístico.....	167
3.5 Comité Ético y Consentimiento Informado	170
IV. RESULTADOS	171
4.1 PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC.....	173
4.1.1 Objetivo 1	173
4.1.2 Objetivo 2	188
4.1.3 Objetivo 3	207
4.1.4 Objetivo 4.	229
4.2 PACIENTES OBESOS SOMETIDOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA.....	245
4.2.1 Objetivo 1	245
4.2.2 Objetivo 2	258
4.2.3 Objetivo 3	280
4.2.4 Objetivo 4.	288
V. DISCUSIÓN	299
5.1 PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC	301

5.1.1 Objetivo 1	302
5.1.2 Objetivo 2	316
5.1.3 Objetivo 3	328
5.1.4 Objetivo 4	338
5.2 PACIENTES OBESOS SOMETIDOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA	343
5.2.1 Objetivo 1	344
5.2.2 Objetivo 2	362
5.2.3 Objetivo 3	371
5.2.4 Objetivo 4	377
VI. CONCLUSIONES	383
6.1 PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC	385
6.2 PACIENTES OBESOS SOMETIDOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA	387
VII. BIBLIOGRAFÍA	389
VIII. ANEXOS	413
8.1 Anexo 1	415
8.2 Anexo 2	416

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La Fibrosis hepática

1.1.1 Definición e incidencia

La fibrosis hepática puede detectarse en la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas y consiste en el depósito de colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular (MEC) en el parénquima hepático. Es un complejo mecanismo de reparación tisular del hígado ante un daño hepatocelular mantenido (1).

Cuando se produce un daño hepático agudo, tienen lugar una reacción inflamatoria y un proceso de remodelado, que constituyen respuestas homeostáticas cuya finalidad es promover la reparación tisular del hígado dañado. Sin embargo, en las enfermedades hepáticas, cuando la agresión tisular deviene en un proceso crónico, estos fenómenos son el origen de una sucesión de acontecimientos que incluyen la activación de múltiples procesos profibrogénicos que tendrán como resultado el desarrollo progresivo de fibrosis hepática, que en última instancia evolucionará hasta dar lugar a la cirrosis. Es importante comprender que el desarrollo de fibrosis hepática es el resultado de la perduración en el tiempo de un proceso que en su origen era benigno y de naturaleza reparadora. Es la repetición mantenida o perpetuación, lo que acaba provocando que el proceso reparativo termine por tornarse en patológico en sí mismo.

En un reciente estudio, la prevalencia de fibrosis hepática en la población general fue del 7,5%, siendo las causas más frecuentes la enfermedad por hígado graso no alcohólico (62%), la enfermedad hepática alcohólica (24%), la hepatitis crónica por virus C (6%), la hepatitis crónica por virus B (4,5%) y la cirrosis biliar primaria (1%) (2).

En las últimas décadas se han realizado importantes avances en el conocimiento de la historia natural y la patogenia de la fibrogénesis hepática (3). Se han definido los factores que regulan la progresión de la fibrosis en diferentes tipos de hepatopatías crónicas, así como las bases celulares y moleculares responsables del acúmulo de colágeno en el hígado fibrótico. Estudios en pacientes y en modelos experimentales realizados en la década de los noventa demostraron que la fibrogénesis hepática avanzada es un proceso reversible, estimulando el estudio de potenciales tratamientos antifibrogénicos.

Actualmente, la maniobra terapéutica más eficaz para evitar el progreso de la fibrogénesis hepática continúa siendo la eliminación del agente causal. No obstante se han intensificado los esfuerzos en este campo, dando lugar a la identificación en modelos experimentales de diversos agentes con capacidad antifibrogénica. Sin embargo, aún son escasos los estudios clínicos controlados que evalúen su eficacia y seguridad, a pesar del reciente desarrollo de métodos no invasivos para estimar el grado de fibrogénesis (3).

1.1.2 Mecanismos patogénicos

La fibrogénesis hepática es el proceso de reparación del tejido hepático ante una agresión tisular mantenida. La participación de manera activa de diversos tipos celulares y citoquinas profibrogénicas, así como varias rutas celulares interconectadas y un gran número de moléculas mediadoras, hacen que el proceso sea enormemente complejo y dinámico.

Después de un daño hepático agudo, las células parenquimatosas del hígado, los hepatocitos, se regeneran y sustituyen el tejido necrótico, restableciendo la arquitectura hepática normal. En este proceso se produce un depósito de proteínas de la MEC, en su mayoría colágeno no fibrilar, así como una respuesta inflamatoria. Este colágeno no fibrilar proporciona un sostén para los hepatocitos regenerados y contribuye al mantenimiento de la arquitectura hepática. No obstante, si el agente causal de la lesión del hígado persiste en el tiempo, tal como ocurre en las hepatopatías crónicas, el proceso reparativo para intentar solucionar este daño se produce de forma mantenida, llegando a perpetuarse. Esto conduce por una parte a una disminución de la eficacia del proceso reparativo, y paralelamente a una producción exagerada de MEC, que se depositará de forma desorganizada en el hígado. Además, la población de hepatocitos es sustituida por abundante MEC, compuesta mayoritariamente por colágeno fibrilar, fibronectina y diversos glucosaminoglicanos. Esto da lugar a la formación progresiva de bandas de colágeno, que constituyen la base de la fibrosis, produciendo la alteración gradual de la arquitectura hepática. Estas bandas de colágeno son muy evidentes en estados avanzados de hepatopatía, llegando a unir varios espacios porta, dando lugar a los denominados “puentes de fibrosis”. El desarrollo de estos puentes de fibrosis precede a la formación de

nódulos de regeneración, que en última instancia darán lugar al desarrollo de cirrosis (3;4).

Como se ha dicho, las fuerzas promotoras del desarrollo de la fibrosis hepática son la lesión de las células del hígado (por necrosis o apoptosis) y las reacciones inflamatorias consecutivas a esta lesión. Esto lleva consigo la activación de un tipo especial de células no parenquimatosas situadas en el espacio subendotelial de Disse, en la vecindad de los hepatocitos, denominadas células estrelladas hepáticas (HSC, *hepatic stellate cells*). La identificación de estas células como el principal tipo celular causante de la síntesis excesiva de colágeno en el hígado fibrótico ha supuesto uno de los avances más significativos en el conocimiento de la patogenia de la fibrogénesis hepática (5;6).

Las HSC, también denominadas células de Ito, representan casi el 5-8% de todas las células hepáticas sanas y comprenden alrededor del 1,4% del total del volumen del hígado. Tienen forma de estrella y su citoplasma encierra numerosas gotas de lípidos que contienen retinoides, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres, por lo que también son conocidas como “Células de almacenamiento de grasa o Lipocitos Perisinusoidales”. En condiciones normales su principal función es el almacenamiento y liberación limitada de vitamina A. Sin embargo, en el contexto de las hepatopatías crónicas, las HSC presentan una transformación fenotípica por la que adquieren contractilidad celular, así como la capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias y la mayoría de los elementos que constituyen la MEC (colágenos, elastina, glicoproteínas estructurales, proteoglicanos y ácido hialurónico), lo que supone la matriz del hígado fibrótico. Estas características son típicas de los miofibroblastos, por lo que se dice que la activación de las HSC supone su transdiferenciación en miofibroblastos. Este cambio fenotípico de las HSC será mantenido y amplificado por la remodelación de la MEC y por mecanismos específicos de perpetuación, que se describirán en detalle más adelante (7).

Las citoquinas inflamatorias juegan un papel clave en el desarrollo de la fibrosis, dado que la inflamación persistente casi siempre precede a la fibrosis. Después de una lesión en el hígado, varios tipos de células pueden secretar citoquinas inflamatorias, incluyendo los macrófagos residentes en el hígado, denominados células de Kupffer, los hepatocitos, las

HSC, las células natural killer, los linfocitos y las células dendríticas. La activación y transdiferenciación de las HSC es el resultado de una interacción compleja entre células residentes y no residentes en el hígado.

Las citoquinas son una familia de proteínas que incluyen quimioquinas, interferones, interleuquinas, factores de crecimiento, adipoquinas, y ligandos solubles neurohumorales. Como veremos a continuación, muchas de ellas son mediadores importantes en el desarrollo de fibrosis hepática.

Las adipoquinas son las citoquinas del tejido adiposo. Son péptidos secretados principalmente por los adipocitos y, en menor medida, por las células del estroma, incluyendo los macrófagos, fibroblastos y monocitos infiltrados. La leptina y adiponectina son las principales adipoquinas implicadas en la lesión hepática. La leptina tiene un efecto profibrogénico, ya que modula directamente el fenotipo de las HSC y activa a los macrófagos y células endoteliales para producir factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), que como veremos más adelante, es un importante promotor de la activación de las HSC. Además, también juega un papel en la promoción de la proliferación, migración y metástasis de las células del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma. Por el contrario, se ha comprobado que la adiponectina inhibe la fibrogénesis hepática tanto in vitro como in vivo. Más recientemente, se ha implicado una adipoquina adicional, la grelina, como atenuante de la lesión hepatocelular y la fibrosis. Además, se ha comprobado que los polimorfismos humanos del gen de la grelina pueden influir en la progresión de la fibrosis en pacientes con hepatitis crónica (8).

Por otro lado, los factores de crecimiento más importantes implicados en la activación de las HSC y la síntesis de colágeno son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el TGF- β . El PDGF es una proteína dimérica compuesta por diferentes combinaciones de cuatro cadenas polipeptídicas (A, B, C, y D), que actúa a través de los receptores tipo tirosin-quinasa PDGFR- α y PDGFR- β . Durante la activación de las HSC se produce una sobreexpresión de todas las isoformas de PDGF, que además correlacionan con el grado de fibrosis e inflamación. El TGF- β , que es secretado por una gran variedad de tipos de células, tiene tres isoformas principales (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), siendo el

TGF- β 1, que se produce principalmente por monocitos y macrófagos, la isoforma mayormente implicada en la fibrosis hepática. El TGF- β 1 se almacena como una proteína inactiva, y una vez activado, las señales a través de sus receptores afines promueven la transcripción de genes diana, incluyendo los del procolágeno I y procolágeno III (8;9).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un modulador de la angiogénesis bien caracterizado, también se sobreexpresa durante la activación de HSC y estimula la proliferación celular, la migración, y la producción de colágeno. Otros factores de crecimiento peptídicos relacionados con la fibrosis hepática son el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento insulínico (IFG) tipo 1 (8).

Los cannabinoides endógenos son una familia de moléculas derivadas del ácido araquidónico que actúan como ligandos neurohumorales a través de los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2). La enfermedad hepática crónica se asocia con la regulación al alza de los endocannabinoides y sus receptores, aunque sin embargo los dos receptores CB tienen actividades completamente divergentes. Mientras CB1 media acciones fibrogénicas, CB2 tiene el efecto contrario (8;10).

Además de las citoquinas, existen otros tipos de moléculas implicadas en el desarrollo de la fibrosis en el contexto de las hepatopatías crónicas. Este es el caso de las especies reactivas del oxígeno, unos mediadores bien establecidos. Estos compuestos inestables incluyen radicales superóxido e hidroxilo, peróxido de hidrógeno y productos aldehídicos finales. Estos mediadores son generados a través de la peroxidación lipídica y pueden derivar de hepatocitos, macrófagos, células estrelladas y células inflamatorias. Además, varios sustratos pueden aumentar la producción de especies reactivas del oxígeno, como es el caso del etanol, los ácidos grasos poliinsaturados o el hierro. La vía clásica de generación de especies reactivas de oxígeno en los hepatocitos resulta de la inducción del citocromo P450. Más recientemente, sin embargo, la reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa ha surgido como otra fuente de estrés oxidativo que media vías de activación fibrogénica en las células estrelladas hepáticas, así como en las células de Kupffer (10).

Por otro lado, la propia apoptosis de las células del parénquima hepático ya no se ve como una consecuencia silenciosa de lesión hepática, sino más bien como un importante estímulo inflamatorio que activa a las HSC, que muestran una sorprendente capacidad para fagocitar cuerpos apoptóticos. Esto ha llevado a investigar el bloqueo terapéutico de las apoptosis de los hepatocitos como estrategia antifibrótica potencial.

De todo lo anterior se deduce que las HSC son moduladoras centrales de la inflamación hepática y de la inmunidad, pues tienen un papel regulador de la respuesta inflamatoria frente a la injuria hepática y el posterior desarrollo de la fibrosis. En particular, diversas citoquinas y sus receptores afines están implicados en el desarrollo de la fibrogénesis mediante la activación de las HSC y la perpetuación de esta activación, así como en la interacción con las células inflamatorias para modificar la respuesta inmune durante la lesión.

A continuación se describen de manera detallada los mecanismos de activación de las HSC, que constituyen por tanto el punto clave en la fisiopatogenia de la fibrosis hepática.

Mecanismos de activación de las células estrelladas hepáticas

La activación de las HSC se desarrolla progresivamente en etapas secuenciales, y este paradigma proporciona un marco útil para definir los eventos fibrogénicos después de la lesión hepática. La activación puede dividirse conceptualmente en dos fases: iniciación y perpetuación. La iniciación, también conocida como la etapa preinflamatoria, se refiere a los cambios tempranos en la expresión del gen y el fenotipo, y es el resultado de la estimulación paracrina principalmente a partir de células del parénquima dañado. El mantenimiento de estos estímulos conduce a una fase de perpetuación regulada por estímulos autocrinos y paracrinos. La perpetuación implica al menos seis cambios distintos en el comportamiento de HSC, incluyendo la proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, degradación de la matriz y la pérdida de retinoides. En la **figura 1** se muestran de manera esquemática las diferentes vías de activación de las HSC, distinguiéndose los estímulos que provocan la iniciación del proceso y los que contribuyen a su perpetuación.

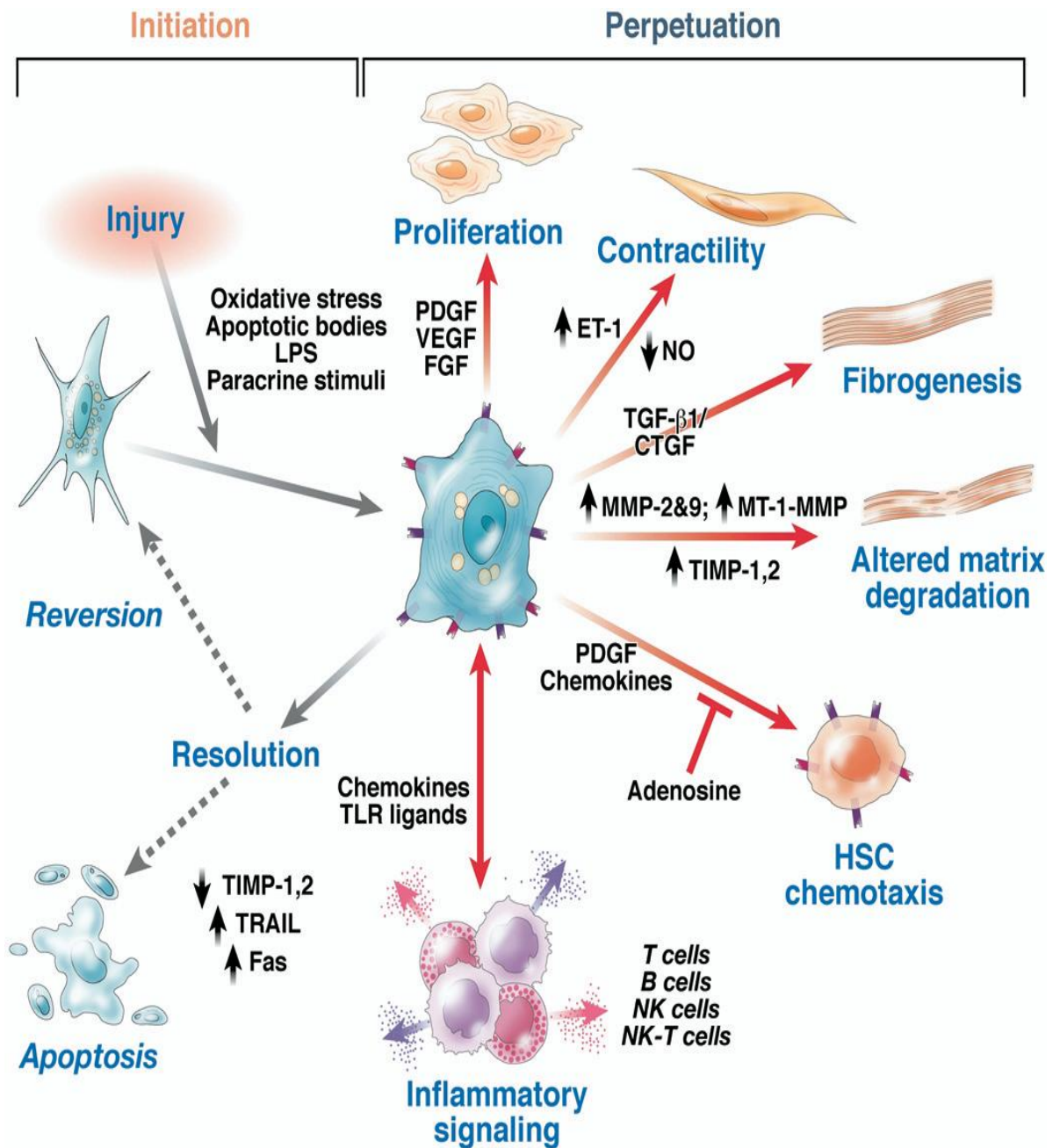


Figura 1: Vías de activación de las HSC. La iniciación está provocada por estímulos solubles que incluyen especies reactivas de oxígeno, cuerpos apoptóticos, lipopolisacárido (LPS) y estímulos paracrinos de las células vecinas, incluyendo los macrófagos hepáticos o células de Kupffer, el endotelio sinusoidal y los hepatocitos. La perpetuación es el paso siguiente, y se caracteriza por una serie de cambios específicos de las HSC, incluyendo la proliferación, contractilidad, fibrogenesis, alteración y degradación de la matriz, quimiotaxis y señalización inflamatoria. Tomada de Friedman (10).

Fase de Iniciación

Esta fase se refiere a los acontecimientos más tempranos, que hacen a las HSC quiescentes sensibles a una serie de factores de crecimiento. La rápida inducción del receptor del PDGF, el desarrollo de un fenotipo contráctil y fibrogénico, así como la modulación de la señalización del factor de crecimiento son las características esenciales de esta respuesta inicial. Los estímulos que inician esta fase incluyen señales paracrinas como las especies reactivas del oxígeno producidas por los hepatocitos dañados.

Los sucesos iniciadores de la activación de las HSC se producen en un contexto de cambios progresivos en la MEC circundante dentro del espacio subendotelial de Disse. En el contexto de la hepatopatías crónicas, a medida que transcurre el tiempo, la composición de la matriz subendotelial cambia, pasando de estar compuesta fundamentalmente de colágeno tipo IV, heparán sulfato, y laminina (los constituyentes clásicos de una lámina basal), a una composición rica en colágeno formador de fibrillas, en particular los tipos I y III. Un cambio sutil pero importante, es la deposición de una isoforma específica de fibronectina celular a partir de células endoteliales sinusoidales, que tiene un efecto activador sobre las células estrelladas. Esta respuesta es dependiente del TGF- β , sin embargo, la inducción de esta citoquina debe ocurrir primero, ya sea a partir de fuentes autocrinas o paracrinas (10).

En la **figura 2** se observan de forma esquemática los componentes de la MEC, así como los principales cambios cualitativos y cuantitativos asociados al desarrollo de fibrosis hepática en el contexto de las hepatopatías crónicas: cambio en la concentración de MEC, cambios en su composición y redistribución, y cambios en la microestructura.

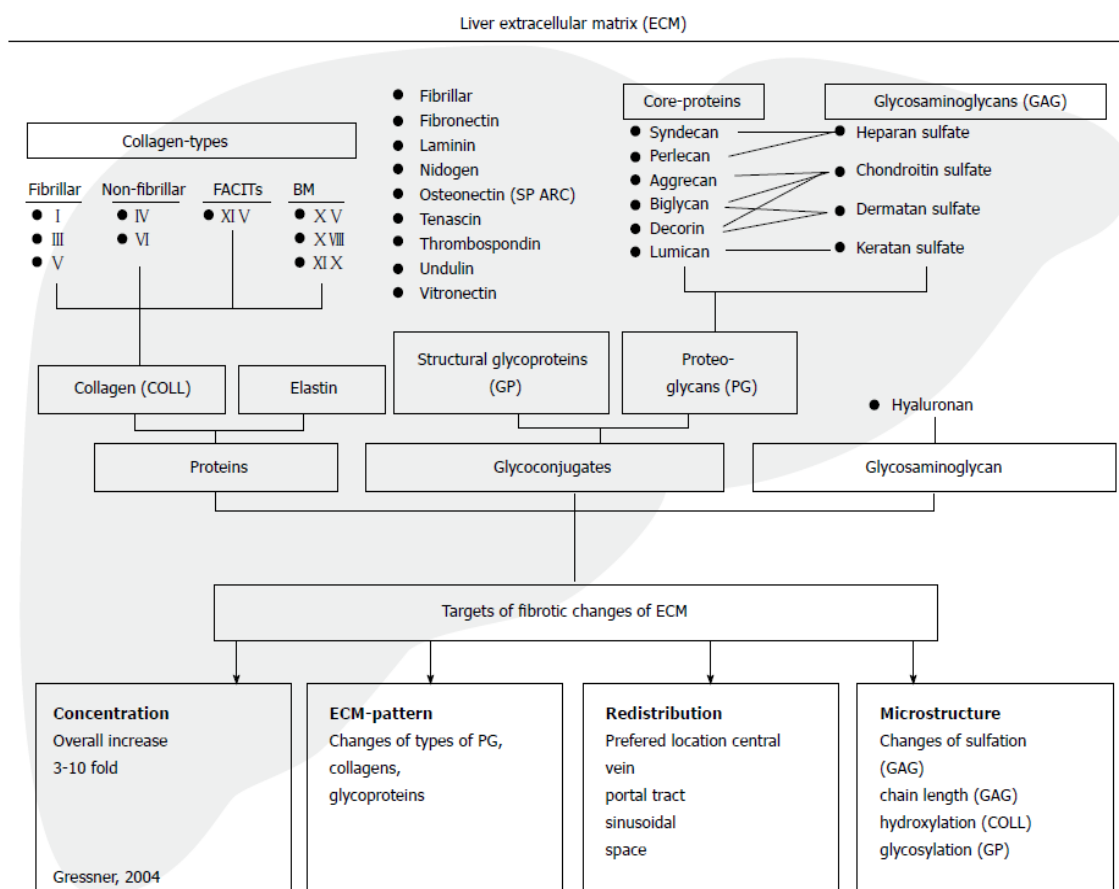


Figura 2: Componentes de la MEC en el hígado fibrótico. En la parte superior de la figura aparece la composición típica de la MEC en el contexto de un hígado fibrótico, y en la parte inferior se indican los principales cambios ocurridos, tanto cualitativos como cuantitativos, con respecto a la MEC de un hígado sano. Tomada de *Gressner y cols* (11).

Estos cambios progresivos en la composición de la MEC, junto con la acumulación creciente de fibrosis, instigan varias vías de retroalimentación positiva que amplifican aún más el desarrollo de fibrosis. En primer lugar, los cambios dinámicos en los receptores de membrana, en particular integrinas, detectan señales de la matriz alterada que provocan la activación y migración de las células HSC, además de su unión a otros receptores de factores de crecimiento. En segundo lugar, la activación de las metaloproteasas de matriz celular conduce a la liberación de factores de crecimiento que pueden estimular el crecimiento celular y la fibrogénesis. Y en tercer lugar, la mayor densidad de la MEC conduce a aumento de la rigidez, que es un importante estímulo para la activación de las HSC, al menos en parte a través de la señalización de integrinas (10).

Además de los cambios cualitativos y cuantitativos de la MEC, existen mecanismos moleculares complejos que subyacen a la activación de las HSC (**figura 3**). Debido a que la activación de las HSC se produce muy rápidamente, la atención se ha centrado en el estudio de las vías de regulación, que responden de manera veloz a los estímulos nocivos, ya sea activando o reprimiendo la transcripción de genes, mediante regulación epigenética, o por control post-transcripcional. Además, también se ha explorado el papel de los microRNAs en la lesión hepática y la activación de las HSC.

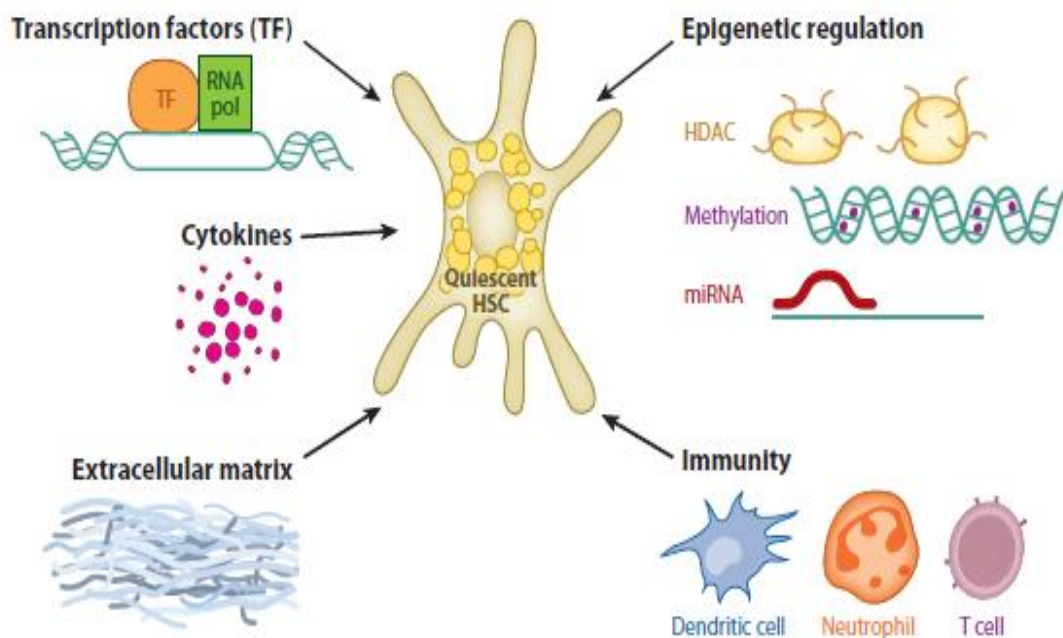


Figura 3: Regulación de la expresión génica de las HSC durante la fibrosis. Tal como se ilustra, sobre la activación de las HSC pueden actuar los factores de transcripción, promoviendo o bloqueando el reclutamiento de la RNA polimerasa y la unión a una secuencia de ADN específica y de ese modo controlar la velocidad de la expresión génica. Por otra parte, los cambios en la expresión de genes también pueden ocurrir sin ninguna modificación en las secuencias de ADN, a través de al menos tres procesos epigenéticos distintos: desacetilación de histonas (HDAC), metilación del ADN y silenciamiento por microRNAs no codificantes. La activación de las células inmunes después de la lesión del hígado es también un importante estímulo para la activación de HSC que se produce principalmente a través de la secreción de moléculas proinflamatorias y fibrogénicas. Las citoquinas y componentes de la matriz extracelular también juegan un papel importante en la iniciación de la fibrosis y la perpetuación de la activación HSC. Tomada de *Hernández-Gea y cols (8)*.

Ha habido un gran progreso en la revelación de los mecanismos moleculares reguladores que controlan la expresión de genes en las HSC durante la fibrosis, y la investigación se ha centrado principalmente en las vías de control de la transcripción. Aunque los factores de transcripción implicados en la regulación de la activación de las HSC es un tema complejo que no vamos a desarrollar, debe mencionarse que los avances recientes han puesto de manifiesto el impacto de las modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación, prenilación, acetilación, y glicosilación, que pueden regular una serie de efectos en la actividad transcripcional, como la afinidad de unión al ADN, la oligomerización y/o la orientación de la degradación de factores de transcripción, represores y activadores (8).

Los cambios en la expresión génica también pueden surgir sin modificaciones en las secuencias de ADN, a través de la regulación epigenética. Las modificaciones epigenéticas consisten en tres procesos principales: modificación de las histonas, metilación del ADN, y silenciamiento por microARNs no codificantes. Por ejemplo, varios estudios han identificado el papel potencial de la modificación de las histonas en la activación de las HSC. La tricostatina A, un inhibidor de la histona desacetilasa, bloquea los cambios morfológicos que se producen durante la activación de las HSC, y reduce la proliferación celular y la transcripción de genes relacionados con el colágeno. Curiosamente, el etanol, cuya ingesta crónica está vinculada a desarrollo de fibrosis hepática, también puede inducir una modificación post-traduccionales de las histonas (8).

Fase de perpetuación

Las HSC que se han activado están preparadas para responder a una serie de citoquinas y factores de crecimiento. Esto va a permitir la generación de la cicatriz fibrótica gracias a los mecanismos que aseguran la perpetuación, que comprenden una mayor proliferación, contractilidad, fibrogénesis, degradación de la matriz, así como la producción de señales proinflamatorias.

Aunque los modelos anteriores sugerían que las vías de activación eran idénticas independientemente de la enfermedad, ahora está claro que existen vías específicas en

función de la etiología, y, por otra parte, que todas las vías de activación mediadas por citoquinas no necesariamente se activan en paralelo.

- *Proliferación*

El aumento del número de células estrelladas durante el daño hepático es reflejo de la actividad de factores mitogénicos, que estimulan su proliferación, así como la migración de las HSC ya activadas. El PDGF es el estímulo proliferativo más potente para las HSC activadas, además de poseer una actividad quimiotáctica (12;13). También son promotores de la activación de las HSC diversas sustancias vasoactivas (trombina, angiotensina II y endotelina-1), citoquinas (proteína quimioatrayente de monocitos 1; MCP-1) y adipoquinas (leptina).

En cambio, otras citoquinas como el Interferón alfa (IFN- α), el IGF y la adiponectina, o sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO) y la relaxina, son potentes inhibidores de la activación de las HSC. La activación y proliferación de las HSC se regula a través de mecanismos moleculares que incluyen diversas vías de señalización intracelular y de transporte iónico, así como a través del estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres.

- *Quimiotaxis*

Además de la proliferación local, las HSC migran hacia la zona de la lesión por quimiotaxis o migración dirigida. Varias sustancias quimiotácticas han sido implicadas, como el PDGF, el IGF tipo 1, la endotelina-1 y la MCP-1, siendo el PDGF el más potente.

En contraste con el PDGF, la adenosina atenúa la quimiotaxis, proporcionando así una vía contrareguladora que fija las células en los sitios de la lesión (10).

- *Pérdida de retinoides*

La activación de las HSC, se acompaña de la pérdida de los acúmulos de retinoides perinucleares. Como se ha comentado anteriormente, las HSC son el depósito del 80% del total de la vitamina A corporal en forma de esteres de retinol y especialmente como retinol libre, en gotas lipídicas. El contenido de estas gotas, cuya composición está

afectada por la dieta, también incluye triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos libres. El comportamiento de las HSC con respecto a estos rasgos adipogénicos tiene múltiples evidencias y paralelismos con los adipocitos.

El cambio morfológico de la pérdida de los retinoides es una condición necesaria para la modificación del citoesqueleto de las HSC activadas y los eventos posteriores, pero no están del todo claros los mecanismos intracelulares que lo permiten.

- *Fibrogénesis*

Paralelamente al proceso de activación de las HSC, éstas comienzan a sintetizar cantidades marcadamente crecientes de MEC. El aumento de la producción de componentes de la MEC por las HSC activadas está regulado principalmente a través de la acción del TGF- β , que se considera el mediador más importante en la fibrogénesis humana (14). El TGF- β , en su forma biológicamente activa, se une a receptores de membrana de las HSC activando diversas cascadas intracelulares. La activación de las principales proteínas transductoras de las vías de señalización del TGF- β , las proteínas SMAD, estimula especialmente la expresión génica de proteínas de la MEC, en particular de los genes que codifican la síntesis de procolágeno I y III. La expresión génica del TGF- β en el hígado de pacientes con hepatopatía crónica es proporcional al grado de fibrosis y se ha comprobado experimentalmente que su inhibición previene la aparición de fibrosis hepática (15).

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es también una señal fibrogénica potente hacia las células estrelladas. Está regulado por la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, y aunque la estimulación de la producción de CTGF se ha considerado tradicionalmente dependiente del TGF- β , es cada vez más probable que exista también una regulación independiente. Además, el TGF- β estimula al CTGF principalmente en los hepatocitos, no en las HSC, una notable excepción a la regla general de que la señalización de citoquinas en la activación de las HSC es normalmente autocrina (10).

- *Contractilidad*

La contracción de las HSC contribuye al aumento de la resistencia portal durante la fibrosis hepática, que presumiblemente es reversible antes del engrosamiento de los septos, la formación de derivaciones intrahepáticas y el desarrollo de la distorsión lobular de la cirrosis, lo que lleva a aumentos fijos en la presión portal.

En estadios tempranos de fibrosis, las HSC activadas rápidamente muestran un fenotipo parecido al de células musculares lisas, caracterizado por un incremento de filamentos contráctiles que incluyen la actina alfa del músculo liso y la miosina, lo cual genera fuerzas dependientes o independientes de calcio que contribuyen a la contractilidad celular. La adquisición de este fenotipo contráctil de las HSC es mediada en parte por receptores que interactúan con la matriz extracelular y que conducen señales de calcio.

La endotelina-1 es el principal agonista que controla la contractilidad de las HSC, además de una larga lista de otros mediadores que incluyen la angiotensina II, la vasopresina, eicosanoides, trombina y agonistas alfa-adrenergicos entre otros. Aunque las HSC, al igual que las células de Kupffer y las células endoteliales, producen óxido nítrico, que es el antagonista fisiológico de la endotelina-1, en la hepatopatía crónica la balanza está inclinada a favor de esta última, aumentando la contractilidad neta y con ello la presión intrahepática y portal.

Las HSC se reconocen como pericitos específicos del hígado, que contribuyen a la angiogénesis en el desarrollo del hígado, la regeneración y la respuesta a la lesión. Después de la hepatectomía parcial, las células estrelladas migran junto con las células endoteliales para establecer conexiones vasculares con los hepatocitos, creando así nuevas ramas sinusoidales. Aunque no está claro en qué medida estas respuestas se solapan, la reparación y la regeneración ocurren simultáneamente en la enfermedad hepática crónica. Además, la fibrosis progresiva y la angiogénesis contribuyen también a la vascularización del tumor, en el que por tanto, las HSC desempeñan un papel vital (10).

A medida que avanza la fibrosis, las bandas de colágeno típicas de la etapa final de la cirrosis contienen gran cantidad de HSC. Estas células impiden progresivamente el flujo

sanguíneo portal mediante la contracción de los sinusoides individuales y del hígado cirrótico, mediada por vías que permiten la interacción con la MEC. Al mismo tiempo, la densidad de las células estrelladas y la cobertura del lumen sinusoidal aumentan.

- *Degradación de la matriz y resolución de la fibrosis*

La evidencia de que la fibrosis es reversible ha intensificado el interés en la comprensión de la regulación de la degradación de la matriz y la resolución de la fibrosis, con la esperanza de que las estrategias terapéuticas pudieran explotar estas vías endógenas que revierten la enfermedad.

Si bien la fibrosis refleja el balance entre la producción y la degradación de la matriz, esta última constituye un evento clave. La disrupción de la MEC en las fases tempranas de la enfermedad hepática y su reemplazo por matriz cicatricial, o bien la disrupción de la matriz normal hepática por invasión tumoral o displasia podría ser denominada como patológica; sin embargo, la reabsorción de exceso de matriz en pacientes con enfermedad hepática crónica podría verse como la oportunidad de revertir la disfunción hepática y la hipertensión portal.

Las enzimas que controlan la degradación de la MEC comprenden una familia de metaloproteinasas de matriz (MMP), conocidas también como matrixinas, que son enzimas dependientes de calcio que degradan específicamente colágenos y sustratos de la MEC no colágenos. Se clasifican en cinco categorías en función de su especificidad de sustrato: colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelinas, tipo membrana y metaloelastasas (8). Para controlar el metabolismo y la remodelación constante de la MEC, las MMP están reguladas en varios niveles: son secretadas como proenzimas inactivas, tienen un control transcripcional complejo, y son moduladas por una familia de inhibidores endógenos de metaloproteasas, conocidas como TIMPs.

Cuatro miembros de las TIMPs pueden unirse reversiblemente al sitio activo de todas las MMPs, presentando diferentes afinidades para MMPs específicas. Por lo tanto, las TIMPs juegan un papel importante en la prevención de la degradación de la matriz acumulada durante la lesión hepática. Además, la TIMP-1 tiene también un efecto antiapoptótico

sobre las HSC, ya que previene la eliminación de las HSC activadas durante la lesión y promueve su supervivencia (10).

En el hígado fibrótico las HSC activadas secretan grandes cantidades de TIMPs, provocando por tanto la inhibición de la actividad de las MMPs. Dado que estas últimas son las principales enzimas encargadas de regular la degradación del colágeno, su inhibición contribuye a la acumulación de colágeno en el contexto de la fibrogénesis.

Los macrófagos hepáticos también regulan la remodelación de la matriz y desempeñan un papel decisivo en su degradación, por aumentar la producción de MMP-13 durante la resolución de la fibrosis hepática (8).

En la hepatopatía crónica se ha comprobado que los niveles de MMP-1 y MMP-13 no varían con la enfermedad, sin embargo TIMP-1 y TIMP-3 aumentan de forma progresiva con el avance de la fibrosis. La expresión de TIMP-1 puede detectarse rápidamente, alrededor de 6 horas después de la lesión del hígado, y puede preceder a la inducción de procolágeno-1 (8).

En cuanto a la resolución de la fibrosis, uno de los aspectos que más ha captado la atención de los investigadores por su potencial terapéutico, se conocen dos vías principales: aclaramiento de las HSC activadas mediante mecanismos de apoptosis o bien reversión de estas al fenotipo quiescente.

La teoría mejor validada para la regresión de la fibrosis hepática espontánea es la referida a la apoptosis. Sin embargo, aunque esta respuesta ha sido bien caracterizada en modelos con roedores, la evidencia en la enfermedad humana es limitada. Aún así, la eliminación de las HSC activadas por apoptosis sigue siendo un destino atractivo para la terapia antifibrótica, ya que supondría utilizar un mecanismo endógeno.

Por otro lado, los datos de estudios in vitro con HSC y cortes de tejido hepático sugieren que las HSC activadas también pueden revertir a un fenotipo quiescente, de manera que esta respuesta también constituye una vía antifibrótica que vale la pena explorar (10).

Estudios más recientes han demostrado que la senescencia de las HSC activadas puede limitar la respuesta fibrogénica al daño tisular. La senescencia celular es una forma

estable de la detención del ciclo celular que está mediada por el acortamiento progresivo de los telómeros y por la activación de una respuesta al daño del ADN. Las HSC senescentes se caracterizan por la expresión de β -galactosidasa, por la inducción de p53, p21 y p16, por regulación a la baja de la producción de MEC y por la regulación positiva de las enzimas que degradan MEC. El sistema inmune, especialmente las células natural killer, juegan un papel importante en la eliminación de estas células senescentes. Aunque las HSC senescentes pueden tener una mayor susceptibilidad a la apoptosis, la relación funcional entre la apoptosis y la senescencia en este tipo de células todavía no está del todo clara (8).

En la **figura 4** se ilustran de manera esquemática los principales mecanismos implicados en la fibrosis hepática.

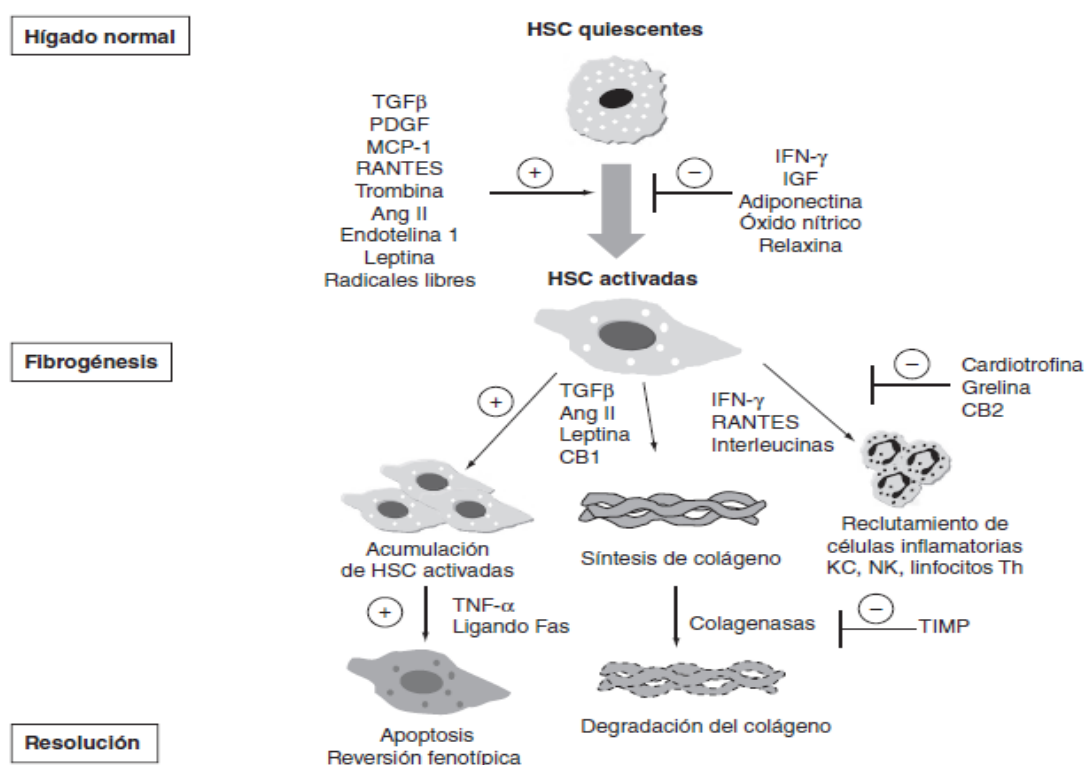


Figura 4: Mecanismos celulares de la fibrosis hepática. El daño hepático estimula la activación de las células hepáticas estrelladas. Las HSC activadas se acumulan y producen grandes cantidades de MEC que se depositan en el parénquima hepático alterando su arquitectura y reclutando células inflamatorias. La fibrosis puede resolverse a través de la degradación del colágeno y de la desaparición de HSC activadas, bien por apoptosis, o bien al producirse una reversión de las HSC activadas hacia HSC quiescentes. En la figura se indican los mecanismos estimuladores (+) e inhibidores (-) de cada uno de los procesos indicados. Tomada de *Odena y cols* (3).

Por otro lado, ya dejando aparte las etapas de activación de la HSC, es importante mencionar que, a pesar de que estas juegan un papel relevante en el desarrollo de la fibrosis hepática, cada vez está más claro que hay más tipos celulares implicados en el desarrollo de fibrosis en el hígado dañado. Los miofibroblastos son el prototipo de células mesenquimales que regulan la reparación después de una lesión en una amplia gama de tejidos, incluyendo hígado, riñón, piel, pulmón y médula ósea, así como el sistema nervioso central. Los miofibroblastos se definen principalmente por su capacidad para producir MEC y por presentar actividad contráctil. Como hemos visto, en las hepatopatías crónicas, el desarrollo de fibrosis hepática comienza con la activación de las HSC, que conlleva su transformación fenotípica a miofibroblastos, pero aunque estas constituyen la fuente principal de la población fibrogénica en el hígado, la contribución de otras células, que se enumeran a continuación, es cada vez más evidente. Aunque la contribución relativa de cada tipo celular varía, estas diferencias probablemente reflejan la distinta contribución a la progresión de la enfermedad y entre las diferentes etiologías del daño hepático (8;9).

- ✓ *Fibroblastos portales*: Debido a su ubicación en el tejido conectivo de las áreas portales, el reclutamiento y la activación de los fibroblastos residentes en miofibroblastos es especialmente relevante en enfermedades asociadas con la isquemia y la colestasis. La atención se está centrando en la identificación, purificación y análisis de esta población fibrogénica, cuya contribución a la fibrosis es especialmente importante en las enfermedades biliares.
- ✓ *Células derivadas de la médula ósea y fibrocitos circulantes*: Varios estudios han demostrado que, después de una lesión del hígado, la médula ósea proporciona células tipo miofibroblasto que pueden participar en la progresión de la fibrosis hepática. Sin embargo, la contribución de estas células a la producción de colágeno durante la lesión hepática parece ser limitada.
- ✓ *Células de transición epiteliales-mesenquimales*: Las células epiteliales pueden contribuir a la sustitución de las células hepáticas muertas o dañadas a través de un proceso biológico conocido como transición epitelial-mesenquimal. Este

proceso permite a una célula epitelial migrar y acumularse en el tejido intersticial y adquirir un fenotipo de célula mesenquimal, con capacidad migratoria, invasividad, resistencia a la apoptosis, y producción de MEC. Las células de transición epiteliales-mesenquimales se han asociado no sólo con la regeneración de tejidos y fibrosis, sino también con el desarrollo embrionario y la progresión del cáncer.

En la **figura 5** puede observarse esquemáticamente la contribución de otros tipos celulares, además de las HSC, al desarrollo de la fibrosis hepática.

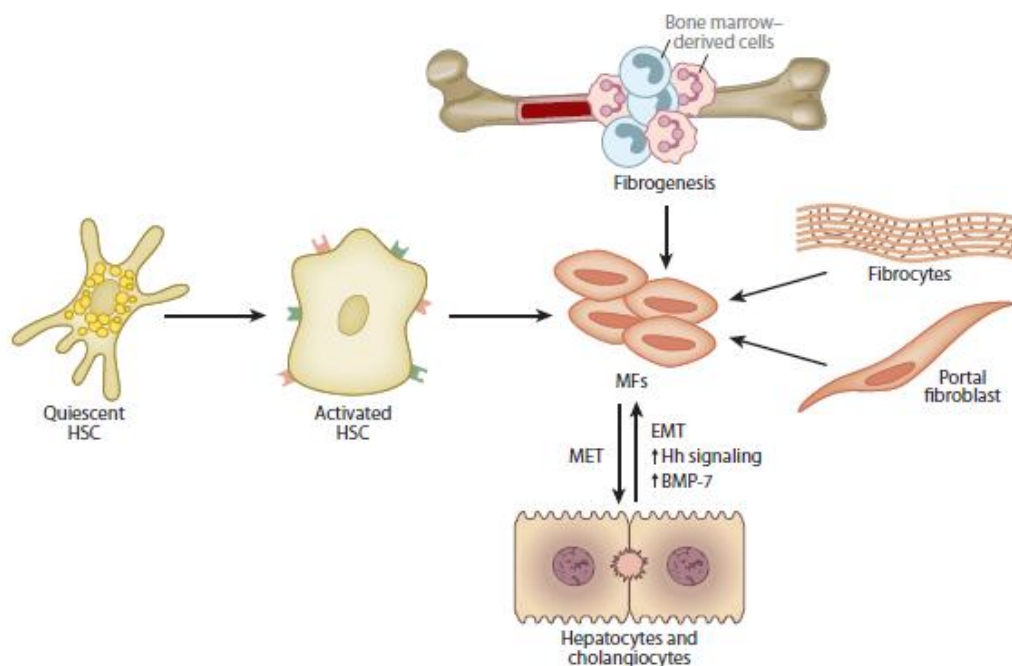
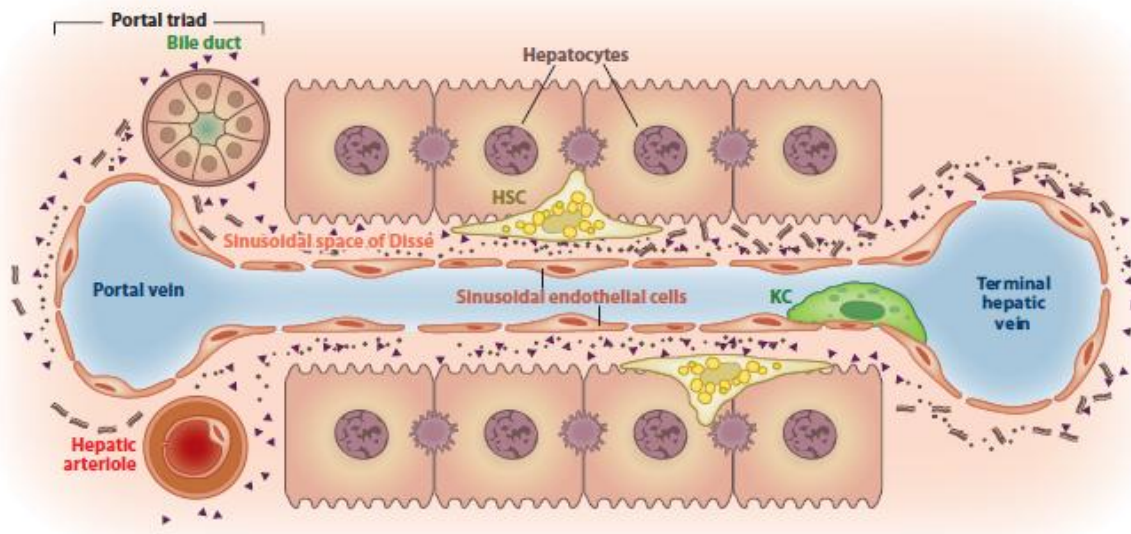


Figura 5: Contribución de las HSC y otros tipos celulares fibrogénicos al desarrollo de la fibrosis hepática. Tomada de *Hernández-Gea y cols (8)*.

El desarrollo de la fibrosis hepática y todas las alteraciones que la producen y la acompañan, se traducen en la modificación de una matriz subendotelial de baja densidad a una fibrilar rica en colágeno, lo que afecta al comportamiento de los hepatocitos, las células del endotelio vascular y las HSC. La acumulación progresiva de fibra colágena en el hígado provoca la desestructuración de su arquitectura y una modificación del sistema vascular hepático (**figura 6**).

a Normal liver



b Fibrotic liver

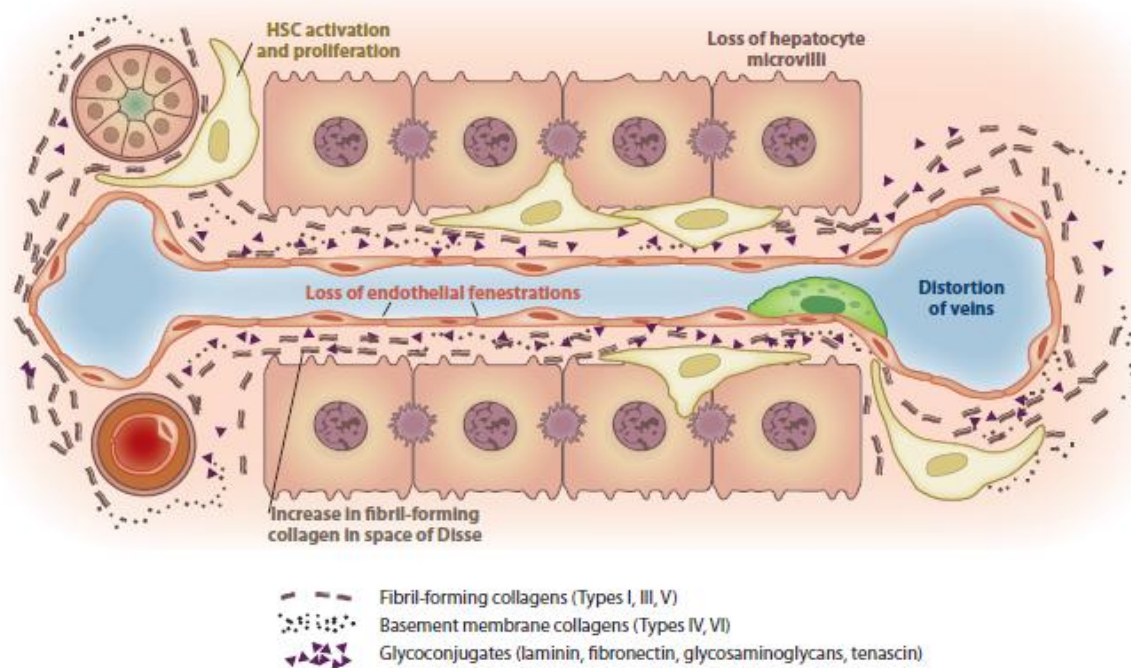


Figura 6: Alteración celular y de la MEC en la fibrosis hepática. El parénquima hepático normal contiene células epiteliales, los hepatocitos, y células no parenquimatosas: células del endotelio sinusoidal fenestrado, HSC y macrófagos o células de Kupffer. La imagen superior (a) refleja un hígado sano: los sinusoides se separan de los hepatocitos por una matriz de tipo membrana basal de baja densidad limitando el espacio de Disse, que asegura el intercambio metabólico. En la figura inferior (b) se representa un hígado fibrótico: tras la lesión, las HSC se activan y secretan grandes cantidades de MEC, dando como resultado el engrosamiento progresivo de los septos. La deposición de MEC en el espacio de Disse conduce a la pérdida de las fenestraciones endoteliales y las microvellosidades de hepatocitos, lo que resulta tanto en el deterioro del intercambio metabólico bidireccional normal entre el flujo venoso portal y los hepatocitos, como en el desarrollo de la hipertensión portal. Tomada de *Hernández-Gea y cols (8)*.

Según persiste el daño, la fibrosis se va convirtiendo en un fenómeno cada vez menos reversible, por el refuerzo de las uniones covalentes entre las proteínas de la MEC. Si el daño hepático desaparece, el mismo sistema que lleva a la formación de la fibrosis produciría la remodelación de la MEC y la eliminación del exceso de proteínas y de células, con el posible restablecimiento de la arquitectura tisular normal. Por el contrario, la progresión de la enfermedad con la fibrogénesis sostenida conduce a la cirrosis, que no es simplemente la acumulación de MEC en fase terminal, sino más bien se caracteriza por una distorsión importante del parénquima hepático y la arquitectura vascular. La principal característica patológica de la cirrosis es la formación de nódulos de parénquima regenerativo rodeados de septos fibróticos, que pueden incorporar vénulas hepáticas terminales y espacios porta cuando los nódulos son especialmente grandes, es decir, en la cirrosis macronodular. Las derivaciones porto-sistémicas y la oclusión venosa ocurren a menudo, lo que lleva a un deterioro de la función hepática y el desarrollo de hipertensión portal. La formación de septos fibrosos vascularizados que enlazan los espacios porta y las venas centrales es estimulada por la angiogénesis y contribuye a la derivación porto-sistémica (8).

Mientras que la fibrosis hepática es generalmente asintomática, la progresión a cirrosis confiere un riesgo de morbilidad y mortalidad significativas. Entre las enfermedades digestivas, la cirrosis es la causa no neoplásica más común de mortalidad, y además un número importantes de muertes se deben al hepatocarcinoma, que se presenta generalmente como el siguiente estadio en el contexto de la cirrosis. Una vez que se ha desarrollado la cirrosis, su historia natural típicamente incluye la progresión de una fase compensada a una fase descompensada, caracterizándose esta última por el desarrollo de hipertensión portal e insuficiencia hepática. La hipertensión portal es una complicación grave de la cirrosis que conduce ya sea a la muerte o a la necesidad de un trasplante de hígado.

1.1.3 Enfermedades relacionadas

En la presente tesis doctoral nos centraremos en dos de los principales factores etiológicos de fibrosis hepática en nuestro medio, la enfermedad por hígado graso no

alcohólico (EHGNA), que supone aproximadamente el 62% de las hepatopatías crónicas, y la hepatitis provocada por el virus de la hepatitis C, la más frecuente entre las hepatitis virales, causantes de alrededor del 6% de las hepatopatías.

Aunque el proceso básico de generación de fibrosis hepática es común en ambas enfermedades, existen rutas específicas según el agente etiológico.

i. Virus de la hepatitis C

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) representa un importante problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que en la actualidad existen cerca de 180 millones de personas infectadas en el mundo, con 3 millones de nuevas infecciones por año (16). Aproximadamente un 70% de las infecciones agudas por VHC evolucionan a una hepatitis crónica C. En ausencia de terapia, el 20% de los portadores del VHC desarrollan cirrosis hepática en una media de 20 años, con tasas de mortalidad entre el 2 y 5% anual, fundamentalmente debido a una insuficiencia hepática o al desarrollo de hepatocarcinoma (17;18). Además, los últimos estadios de la enfermedad hepática debida a la infección por VHC representan actualmente la principal causa de trasplante hepático en países occidentales (19).

b. Virología

El VHC pertenece a la familia Flaviviridae, género hepacivirus. Estructuralmente, es un virus con envoltura y de 50-60 nm de diámetro, cuyo genoma está constituido por una cadena de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de aproximadamente 9,6 kilobases y de polaridad positiva.

El genoma del VHC no presenta fase de integración en el núcleo de la célula huésped, y todo su ciclo se realiza en el citoplasma. Por esta razón, la persistencia de la infección por el VHC requiere de la generación continua de nuevas moléculas de ARN viral, de manera que los tratamientos que consiguen bloquear eficientemente la replicación viral pueden erradicar la infección (20).

La replicación del VHC ocurre mayoritariamente dentro de los hepatocitos. Los mecanismos moleculares específicos que se producen durante la replicación viral eran

prácticamente desconocidos hasta hace muy poco tiempo, ya que no existía un modelo de cultivo in vitro que permitiera la propagación eficiente del virus. Sin embargo, recientemente se han conseguido avances en el conocimiento de la organización genómica y el ciclo de replicación del VHC gracias al desarrollo de replicones y partículas virales infectivas en sistemas de cultivos de tejidos.

Las partículas del virus circulan en sangre unidas preferentemente a las lipoproteínas LDL (lipoproteína de baja densidad), VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) y HDL (lipoproteína de alta densidad). No se conoce con exactitud el mecanismo de entrada del virus, pero se sabe que tiene lugar una interacción entre glicoproteínas de la envoltura del virus y diferentes moléculas de la membrana del hepatocito que actúan como receptores. Esta interacción provoca cambios en la estructura de la membrana del hepatocito, que finalmente permite la endocitosis de la partícula viral (21).

A continuación el virus libera su ARN, cuya traducción dará lugar a una poliproteína que se procesa por las proteasas virales y celulares, formando las proteínas virales. Estas proteínas virales, junto al ARN viral y diversos factores celulares, forman un complejo de replicación asociado a membranas, dentro del cual se realiza la replicación del ARN vírico. La cadena positiva de ARN-VHC se utiliza como molde para la síntesis de la cadena de ARN negativa, y esta servirá a su vez como molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas de ARN que formaran parte de la nueva progenie viral. Las nuevas copias de la cadena positiva interaccionarán con proteínas del core formando la nucleocápside, que adquirirá su envuelta en el lumen del retículo endoplasmico. Se cree que los viriones son exportados fuera de la célula a través de los sistemas celulares de excreción. En la **figura 7** se puede observar de forma esquematizada el ciclo de vida del VHC.

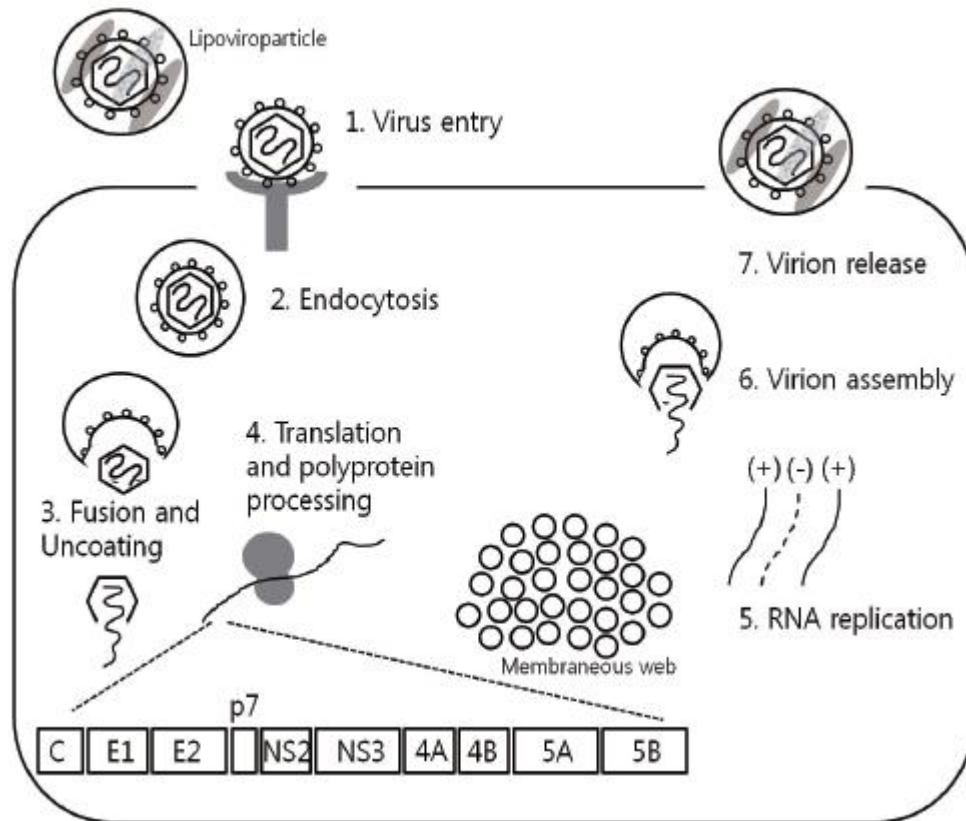


Figura 7: Ciclo de vida del VHC. Tomado de *Kim y cols* (22).

Los recientes avances en el conocimiento molecular del ciclo de replicación del VHC han permitido el descubrimiento y desarrollo de fármacos que bloquean de forma específica proteínas del VHC que son claves para su replicación. Estos fármacos se conocen con el nombre de DAA (Antivirales de acción directa), y en general han demostrado una extraordinaria actividad antiviral solos o en combinación con interferón pegilado/ribavirina (pegINF/RBV) aumentando de forma significativa las tasas de respuesta viral sostenida (RVS) hasta un 80-100% y reduciendo, en muchos casos, el tiempo de duración del tratamiento (23).

c. Variabilidad Genética

El VHC, como en el caso de otros virus ARN, posee una gran heterogeneidad genética. La alta tasa de producción diaria de viriones, la elevada población viral existente y la alta tasa de mutación favorecen la variabilidad genética. Las regiones no codificantes se

encuentran relativamente conservadas, mientras que las regiones de envuelta, tienen las tasas de mutación más altas.

La continua generación de cambios en el genoma viral y la selección por competición de aquellas variantes con mayor eficiencia replicativa dan lugar a una rápida diversificación de las poblaciones virales circulantes y a una alta capacidad de adaptación.

Existen distintos niveles de variabilidad: genotipos, subtipos y cuasiespecies. El sistema de clasificación actualmente aceptado es el propuesto por *Simmonds y cols.* (24;25) donde el VHC se clasifica en seis genotipos (del 1 al 6), con homología del 60-70%, y dentro de cada uno de estos, en subtipos (se designan con una letra, que seguirá al número que nombra al genotipo), con homología del 78-88%.

La distribución de los genotipos varía en el mundo. Los genotipos 1, 2 y 3 se presentan de manera cosmopolita, mientras que otros genotipos se localizan en zonas geográficas particulares. En España y Europa el genotipo más frecuente es el 1, particularmente el subtipo 1b, donde suponen el 70% y casi el 50%, respectivamente.

Los diferentes genotipos se han asociado con la tasa de respuesta al tratamiento con interferón y también a la combinación de interferón y rivabirina. Las mejores respuestas se producen en los infectados por los genotipos 2 y 3, que se han distribuido con mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes con antecedentes de adicción a drogas por vía parenteral. Así pues, los pacientes infectados con virus de los genotipos 1, 4 y 5 responden peor al tratamiento. Por esto, la determinación del genotipo del VHC es imprescindible para establecer el inicio y la duración del tratamiento antiviral.

d. Epidemiología

Los estudios de prevalencia se comenzaron a llevar a cabo cuando fue posible la demostración de anticuerpos frente al virus, en los años 90. Se estima que en la actualidad existen cerca de 180 millones de personas infectadas en el mundo y que la enfermedad presenta una prevalencia del orden del 2,5%, lo que significa, en términos de población global, entre tres y cuatro millones de nuevas infecciones anuales. Según estimaciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud), la mayoría de los infectados

se encuentran en el continente asiático (92 millones), seguido de África (28 millones) y de América (12,5 millones). En Europa el número de individuos afectados que se calcula es de unos 9 millones.

La prevalencia global en España oscila entre el 1 y el 2,6%, lo que supondría un número de personas infectadas entre 480.000 y 760.000. Se aprecian, también, amplias diferencias geográficas, con una mayor afectación en las comunidades más urbanizadas (2,5% en Madrid y 2,6% en Cataluña) y menor en las menos urbanizadas (1,6% en Asturias).

La principal vía de transmisión del VHC es la parenteral, a través de transfusiones de sangre o hemoderivados y del uso de jeringuillas contaminadas. Actualmente, debido a la implementación del cribado para la infección por VHC en bancos de sangre, la infección postransfusional prácticamente ha desaparecido, siendo el principal factor de riesgo la adicción a drogas por vía parenteral. Aunque la transmisión sexual es posible, es mucho menos efectiva. La transmisión vertical es muy poco frecuente (inferior al 5%). El hecho del que el VHC comparta con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) las vías de transmisión explica el hecho de que exista una alta frecuencia de coinfección VIH/VHC.

Teniendo en cuenta las vías de transmisión descritas para el VHC, las principales poblaciones de riesgo de infección por VHC son los adictos a drogas por vía parenteral, pacientes en hemodialisis, personal sanitario, receptores de transfusiones anteriores a 1992, recién nacidos de madres infectadas, especialmente de aquellas que presenten una carga viral elevada, personas con relaciones sexuales de alto riesgo y pacientes con requerimientos de sangre y/o derivados de forma reiterada.

e. Diagnóstico

Las pruebas de laboratorio disponibles para el diagnóstico del VHC se pueden clasificar en dos grandes grupos: pruebas indirectas o directas. Las pruebas indirectas se basan en métodos serológicos que estudian la respuesta inmune específica frente al VHC mediante la detección de anticuerpos circulantes frente al virus. Las pruebas directas detectan distintos componentes del virus, así como la presencia de replicación viral y permiten clasificarlo en los diferentes genotipos y subtipos genéticos.

El diagnóstico del VHC se puede aplicar en diferentes situaciones diagnósticas, bien como cribado en la población de bajo riesgo, como serían los donantes de sangre, en el diagnóstico clínico en aquellos pacientes con factores de riesgo para el VHC, o en los que clínicamente está indicado por las alteraciones analíticas o clínicas.

El diagnóstico de la infección por el VHC se realiza inicialmente por una prueba de cribado, como son las pruebas de enzimoimmunoensayo (EIA), seguidas por técnicas suplementarias para confirmar la infección. Estas pruebas suplementarias incluyen tanto las técnicas serológicas de detección de anticuerpos específicos, como las moleculares para detectar, cuantificar y tipar el ARN viral. Deberán ser aplicados en función de la población estudiada y de los síntomas clínicos.

- *Pruebas de cribado.* El EIA es la primera técnica que debe usarse para el diagnóstico serológico. En la actualidad se emplean los de tercera generación. En este caso varios antígenos virales específicos se exponen al suero del paciente. Puede presentar falsos positivos, sobre todo en pacientes con enfermedades autoinmunes, y falsos negativos en presencia de estados de inmunosupresión.
- *Pruebas complementarias o de confirmación.* Estas pruebas son más específicas que las EIA ya que identifican la reactividad frente a cada antígeno de forma individualizada, pero menos sensibles, por lo que nunca deben ser utilizadas como método de cribado. Son técnicas de inmunoblot, conocidas como RIBA (recombinant immunoblot assay). Suelen emplearse para detectar falsos positivos en cribados poblacionales de baja prevalencia.
- *Pruebas moleculares.* Se dividen a su vez en cualitativas y cuantitativas. Las pruebas cualitativas informan de la presencia o ausencia de RNA del VHC, mientras que las cuantitativas miden la carga viral y determinan el genotipo. Este tipo de pruebas generalmente se usan para evaluar la enfermedad, establecer un pronóstico sobre la eficacia del tratamiento y para monitorizar la respuesta a éste.

f. Historia natural y fisiopatología de la enfermedad

La infección aguda por el VHC transcurre generalmente, en más del 90% de los casos, como una infección asintomática con incrementos moderados de los niveles de las

transaminasas. Tras la infección, el 15-25% de los pacientes experimenta una curación espontánea, aunque no quedan protegidos frente a una nueva exposición. Sin embargo, la mayoría de los enfermos (60-80%) permanecen infectados y desarrollan una hepatitis crónica. La enfermedad progresa muy lentamente, con pocos o ningún síntoma, marcando su evolución el aumento de la fibrosis que se acumula en el hígado.

La hepatitis crónica C evoluciona a cirrosis en el 20% de los pacientes, generalmente de forma lenta y gradual. Sin embargo la infección no siempre produce una enfermedad progresiva. *Poynard y cols. (26)*, en un estudio prospectivo en 2235 pacientes con infección crónica por VHC, estiman que el tiempo medio para el desarrollo de cirrosis fue de 30 años. Los autores diferencian tres patrones evolutivos: Fibrosantes lentos (31% de los pacientes), con un tiempo de progresión a cirrosis no menor a 50 años, Fibrosantes intermedios (36% de los pacientes), y Fibrosantes rápidos (33%) con un tiempo de progresión de menos de 20 años.

La progresión de la enfermedad varía en función de la coexistencia de diferentes factores de riesgo asociados, tanto dependientes del paciente (consumo de alcohol, coinfección por el virus de la hepatitis B o el VIH...) como dependientes del virus.

Por otro lado, la infección por VHC constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) en países occidentales, siendo la causa de un tercio del total de este tipo de tumores. El CHC suele aparecer en pacientes en fases avanzadas de la enfermedad, generalmente cirróticos; anualmente entre el 1 y el 4% de los pacientes con cirrosis desarrollará un CHC. A menudo la supervivencia se ve marcada no tanto por la existencia del tumor, sino por el deterioro de la función hepática y la aparición de complicaciones.

Actualmente, las fases avanzadas de la enfermedad hepática causada por la infección por VHC representan la principal indicación de trasplante hepático en países occidentales (19).

El VHC, si bien es capaz de infectar otras células, tiene como diana principal el hepatocito, por lo que se conoce como un virus hepatotrofo. Esto explica que la patología que produce se centre fundamentalmente en el hígado.

Tal como se ha comentado anteriormente, la patogenia de la fibrosis hepática es distinta según el agente etiológico subyacente. En el caso de la hepatopatía por VHC, los linfocitos T citotóxicos, aunque ineficientes para controlar la infección, participan en la patogénesis viral de forma directa destruyendo las células infectadas, e indirectamente produciendo factores solubles como citoquinas y quimioquinas que contribuyen al proceso inflamatorio y a la inmunopatología (27;28).

El primer paso en el proceso de la enfermedad hepática ocurre con el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T citotóxicos, lo cual rápidamente induce apoptosis hepatocelular (29). Una vez estos linfocitos son activados producen citoquinas como el Interferón gamma (IFN- γ), que vía quimioquinas, inducen el reclutamiento al hígado de grandes cantidades de células inflamatorias que tienen el potencial de amplificar el daño hepático iniciado por los linfocitos T citotóxicos (29;30). Esta gran cantidad de células inflamatorias da lugar a la formación de un foco necroinflamatorio que va a estimular el acúmulo de colágeno en la zona periportal y una mayor necrosis hepatocitaria, aumentando con ello la severidad de la hepatopatía. Además, diversas proteínas del virus activan directamente la respuesta inflamatoria y el depósito de colágeno por parte de las HSC (31).

Por otra parte, los mecanismos patogénicos de las células inflamatorias no específicas de antígeno podrían involucrar la producción local de mediadores proinflamatorios y citotóxicos como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), proteasas como perforina, peróxido de hidrógeno, anión superóxido y óxido nítrico.

Histológicamente, el patrón de daño hepático característico de la hepatopatía por VHC es típicamente necroinflamatorio, caracterizado por inflamación (portal, de interfase o periportal) y necrosis o apoptosis hepatocitaria. Esto suele acompañarse de inflamación o hepatitis lobulillar con necrosis aislada o confluyente. Todos estos hallazgos morfológicos se presentan en grados variables de severidad. Se ha descrito la clásica triada de

inflamación nodular por la formación de cúmulos o folículos linfoides, lesión ductal con preservación de la membrana basal, condensaciones citoplasmáticas que semejan cuerpos de Mallory y esteatosis, esta última presente en cerca de 80% de los casos de hepatitis C crónica genotipo 3 y hasta en 50% de otros genotipos (32). La progresiva activación de las HSC y de los miofibroblastos favorece el inicio y progresión de la fibrosis a nivel portal y periportal, con posterior formación de nódulos regenerativos y puentes fibrosos (33;34).

En la hepatopatía crónica producida por el VHC la determinación del grado de fibrosis cobra una especial importancia. En primer lugar, y de manera común al resto de hepatopatías, la evolución de la fibrosis marca la progresión del daño hepático, lo cual implica que el conocimiento preciso del estadio de fibrosis permitirá al clínico cuantificar el grado de hepatopatía, pudiendo establecer un pronóstico para cada paciente. Así mismo, los controles periódicos de la fibrosis permitirán controlar la evolución de la enfermedad. En segundo lugar, y ya de manera específica para la hepatopatía crónica por VHC, en estos pacientes la determinación del grado de fibrosis tiene implicaciones importantes de cara a la prescripción del tratamiento antiviral. Aunque en principio todos los pacientes con infección crónica por VHC son posibles candidatos para la terapia antiviral a no ser que presenten contraindicaciones, la realidad clínica es bien distinta. Las terapias antivirales presentan diversos y en ocasiones graves efectos adversos, se ajustan a regímenes terapéuticos prolongados que exigen una buena adherencia y presentan tasas de respuesta muy variables en función del tipo de paciente. Todos estos inconvenientes, aunque tienden a ser cada vez menores con los antivirales de últimas generaciones, hacen imprescindible una evaluación precisa de cada paciente antes de iniciar el tratamiento. Además de esto, el elevado coste económico de los tratamientos ha justificado la elaboración de protocolos precisos que indican a que pacientes tratar, para asegurar el tratamiento a los pacientes en los que referirá mayores beneficios y posponerlo en aquellos con hepatopatías leves y poco evolutivas. En este punto es donde la determinación del grado de fibrosis desempeña un importante rol, pues la mayoría de las guías clínicas recomiendan iniciar la terapia antiviral con un grado de fibrosis significativo. Por ello, la monitorización periódica de la fibrosis es una herramienta

imprescindible en la valoración de la indicación del tratamiento, y una vez comenzado este, en el control de la eficacia del mismo. Por otro lado, el control evolutivo de la fibrosis hepática en este tipo de pacientes es crucial para la detección de cirrosis, momento en el cual los pacientes son incluidos en programas periódicos de cribado para monitorizar las complicaciones relacionadas con hipertensión portal y CHC.

g. Tratamiento

El tratamiento contra el VHC constituye un importante problema médico y social para el que no se han encontrado soluciones plenamente satisfactorias. La raíz de estos problemas está en la imperfección de los tratamientos disponibles actualmente, que, además de extremadamente costosos, no son totalmente eficaces y con demasiada frecuencia ocasionan importantes efectos adversos. Sin embargo, junto a estos defectos, el tratamiento de la hepatitis crónica C, especialmente con los antivirales más novedosos, hace posible la curación de muchos pacientes, evitando por tanto todos los inconvenientes asociados a la enfermedad, además del enorme gasto sanitario relacionado.

En los últimos años un enorme esfuerzo investigador ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos, algunos de los cuales ya se están introduciendo en la práctica clínica y otros muchos se encuentran en fase de desarrollo. La disponibilidad de nuevos fármacos ya está determinando cambios muy sustanciales en los conceptos y en la praxis del tratamiento de la hepatitis C y determinará muchos más éxitos terapéuticos. No obstante, el tratamiento de estos pacientes aun constituirá un gran reto terapéutico durante algunos años.

El tratamiento antiviral contra la hepatitis C crónica tiene como objetivo producir una respuesta virológica sostenida (RVS), definida como niveles indetectables de ARN del VHC veinticuatro semanas después de finalizar el tratamiento. La RVS se asocia con una reducción de la mortalidad relacionada con causas hepáticas y de las tasas de CHC.

La terapia clásica, y hasta hace poco la única opción disponible, contra el VHC consiste en la combinación de PegINF+RBV. Ninguno de los dos fármacos actúa de forma directa sobre el virus, su actividad se basa en la potenciación del sistema inmunitario para lograr

una respuesta más efectiva. La respuesta a esta biterapia, sobre todo en los pacientes infectados por los genotipos 1 y 4, es limitada; la eficacia oscila entre el 20-80%, dependiendo de la raza, la etapa de la enfermedad, el genotipo y la presencia de polimorfismos de un único nucleótido localizados en el gen promotor del interferón $\lambda 3$.

Los principales avances en la terapia contra el VHC se han hecho en los últimos años y esto ha dado lugar a una mejora significativa en las tasas de RVS. El progreso en el conocimiento de la estructura molecular de las proteínas del VHC ha fomentado enormemente el desarrollo de nuevos fármacos, comúnmente conocidos como agentes antivirales de acción directa (DAA). La experiencia con antirretrovirales contra el VIH ha proporcionado un marco valioso para el desarrollo de los DAA contra el VHC. En teoría, cada paso del ciclo de replicación del VHC es un objetivo potencial para la terapia antiviral, sin embargo, los buenos resultados con inhibidores de la proteasa del VIH sugirieron la proteasa del VHC como un candidato ideal.

En 2011 aparecieron telaprevir y boceprevir, ambos pertenecientes a la primera generación de inhibidores de la proteasa. Fueron aprobados para el tratamiento de los pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1. Su asociación a la terapia estándar con PegINF+RBV en triple terapia, permite alcanzar la curación del alrededor del 75% de los pacientes con genotipo 1 naive y alrededor del 50% de los que no hayan presentado respuesta al tratamiento estándar previo. Aunque el coste económico de la triple terapia es bastante superior con respecto a la terapia clásica, es obvio que suponen un incremento significativo de las tasas de éxito. Sin embargo, el hecho de que se asocia a PegINF+RBV hace que la terapia siga siendo susceptible de desarrollar resistencias y además siguen teniendo un espectro de acción limitado con respecto a los genotipos y continúan presentando efectos adversos importantes (35).

Muy recientemente se ha aprobado en nuestro país la financiación de dos nuevos antivirales directos contra el VHC, simeprevir y sofosbuvir. Simeprevir es un inhibidor de la proteasa de segunda generación. Tiene un espectro de acción más amplio sobre los diferentes genotipos del VHC, aunque no se considera pangnotípico. Presenta altas tasas de RVS, comparables o mayores que las obtenidas con la triple terapia con boceprevir o

telaprevir, frente al genotipo 1 del VHC cuando se usa en combinación con PegINF+RBV, y además muestra una alta actividad antiviral contra los genotipos 2, 4, 5, y 6. Sin embargo no se ha observado ningún efecto frente al genotipo 3 (36).

Otra estrategia para inhibir la replicación viral es el desarrollo de inhibidores de la polimerasa que interfieren con la replicación viral, y este es el caso de Sofosbuvir. Este fármaco ha demostrado una eficacia extraordinaria en el tratamiento de adultos infectados con los genotipos 1 y 4 en combinación con PegINF+RBV, y para el tratamiento de adultos infectados con los genotipos 2 y 3 en los regímenes libres de interferón. Además, los ensayos clínicos mostraron que varios de los factores generalmente asociados con un fracaso al tratamiento no tuvieron ningún efecto sobre la eficacia de Sofosbuvir; únicamente el género masculino y la presencia de cirrosis son predictivos de un resultado desfavorable (36).

Por otro lado, desde que se inició la monoterapia con interferon de la hepatitis C hace más de 20 años se puso de manifiesto que la respuesta al tratamiento no era idéntica en todos los pacientes, sino que variaba en función de una serie de factores. La adición de ribavirina a mediados de los años 90 o, algo más tarde, la utilización de interferón pegilado no determinaron cambios sustanciales de los factores determinantes de la respuesta al tratamiento. Entre estos factores predictores de la respuesta a la terapia antiviral se encuentran factores dependientes del virus, como son el genotipo y la carga viral, y por otro lado, factores dependientes del hospedador, como son la raza, el grado de fibrosis hepática, la presencia de comorbilidades o diversos factores genéticos. Con el paso del tiempo se han ido identificando otros factores predictivos, jugando la genómica un papel decisivo en los últimos años con la identificación de los polimorfismos genéticos de IL28B.

Diversos estudios basados en la técnica GWAS (genome-wide association studies) han puesto de manifiesto que la constitución genética individual es un componente esencial en la respuesta al tratamiento de la hepatitis crónica C, así como en la eliminación espontánea del virus tras la infección. Se ha confirmado la influencia de algunos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en la mayor posibilidad de aclaramiento viral y

de RVS. *Ge y cols.* (37) demostraron en el año 2009 la existencia de un polimorfismo en el cromosoma 19q13 (rs12979860) en la región de la Interleuquina 28B (IL28B) que codifica para el IFN- λ -3 con una fuerte asociación con los pacientes que desarrollaban RVS. Estos autores objetivaron que la probabilidad de alcanzar la RVS con el tratamiento estándar en aquellos pacientes con genotipo CC en la mencionada región del cromosoma 19, doblaba la posibilidad de la misma frente a los pacientes con genotipo CT o TT. Además, analizaron la distribución poblacional de este genotipo CC a nivel mundial, encontrando una presencia muy marcada del mismo en aquellos grupos étnicos con mayor probabilidad conocida de RVS, como son los asiáticos, hispanos y europeos-americanos, y una menor presencia del mismo en afroamericanos, donde el genotipo CT/TT es más prevalente. No obstante, la presencia de genotipo CC se correlacionaba con una mayor tasa de RVS independientemente de la etnia. Estos hallazgos han sido corroborados posteriormente por otros autores (38-40).

Si bien la utilidad pronóstica de este marcador es unánime en el caso de pacientes infectados por el VHC genotipo 1, los datos disponibles para los genotipos 2 y 3 son contradictorios. Los infectados con genotipos diferentes al 1 son generalmente más susceptibles al tratamiento, lo cual limita la ventaja que confiere el ser portador del genotipo favorable de IL28B. Este hecho explica la discrepancia entre autores, ya que por definición, la detección de esta asociación más débil requiere cohortes de gran tamaño para aumentar la potencia estadística.

La detección del polimorfismo de la IL28 como factor predictor del tratamiento ha tenido mucha importancia en relación con las nuevas terapias antivirales. Aquellos pacientes con genotipo CT o TT, a priori “no respondedores” y por tanto con peor probabilidad de RVS con la terapia antiviral clásica, se consideran, valorando obviamente el resto de características clínicas, candidatos a las nuevas terapias que implican una mayor tasa de efectividad.

Por otro lado, estudios más recientes han abordado la influencia del polimorfismo de la IL28 en otras cuestiones relacionadas con la enfermedad, como son la tasa de progresión de la misma o la probabilidad de desarrollar cirrosis o hepatocarcinoma (41-43).

A pesar de las notables mejoras de los últimos tratamientos incluidos, el elevado coste económico sigue restringiendo en gran medida su uso en la práctica clínica habitual y condiciona a los clínicos a priorizar la terapia en los pacientes con mayor probabilidad de obtener beneficios, asegurando una asignación eficiente de los recursos disponibles. Por ello, todos estos nuevos antivirales deben prescribirse de acuerdo a protocolos bien definidos. Como ya se ha comentado, ante la decisión de qué enfermos tratar cobra especial relevancia conocer su afectación hepática, definida por el grado de fibrosis, y así mismo esto servirá, en caso de comenzar el tratamiento, para monitorizar la respuesta al mismo. Aquí radica la importancia de disponer de métodos exactos y precisos para la detección del grado de fibrosis hepática, que como veremos se detallarán más adelante.

Un concepto importante a tener en cuenta en el momento presente, es el de que el tratamiento de la hepatitis C es un proceso que se encuentra en plena evolución. La investigación tiene como objetivo diseñar nuevos antivirales que puedan administrarse sin interferón y que cubran todos los genotipos, con el mejor perfil de efectos adversos posible. Además de los ya disponibles, numerosos fármacos se encuentran en distintas fases de investigación, algunos de ellos con resultados muy prometedores en cuanto a efectividad, simplicidad y tolerancia.

Por otra parte, muchos de los pacientes con hepatitis crónica C presentan lesiones hepáticas leves y poco evolutivas, por lo que tienen escasas probabilidades de desarrollar una enfermedad grave a corto o medio plazo. Teniendo en cuenta estas premisas, es razonable pensar que diferir el tratamiento por algún tiempo puede ser una opción perfectamente válida en muchos casos. Esta opción no exime de la obligación de controlar de cerca la evolución de cada paciente no tratado, lo que puede llevarse a cabo con razonable fiabilidad, simplicidad y bajo costo gracias la aplicación de los procedimientos no invasivos actualmente disponibles para monitorizar la evolución de la enfermedad hepática, como es el caso de los biomarcadores, cuyo estudio se desarrollará en profundidad en la presente tesis doctoral.

ii. Enfermedad por hígado graso no alcohólico

El término de “Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA)”, en la literatura anglosajona conocida como «non-alcoholic fatty liver disease» (NAFLD), engloba un amplio espectro de lesiones que van desde la esteatosis hepática simple, pasando por la esteatohepatitis con cambios necroinflamatorios («non-alcoholic steatohepatitis» o NASH) asociados a un grado variable de fibrosis, que pueden progresar a cirrosis hepática e incluso a CHC (44). Desde el punto de vista histológico, las lesiones se asemejan a las típicas de la hepatopatía alcohólica, si bien por definición, la EHGNA se desarrolla en pacientes sin un consumo tóxico de alcohol y no asociado a otras enfermedades hepáticas. Esta terminología fue introducida por el Dr. Ludwig en el año 1980, el cual la definió como “un síndrome clínico patológico que afecta básicamente a personas obesas, mujeres diabéticas, que niegan el consumo de alcohol, pero que presentan unas lesiones hepáticas similares a las producidas por el alcohol” (45).

Aunque la enfermedad fue descrita hace años, hace poco tiempo que la EHGNA ha comenzado a acaparar la atención de los médicos por su alta prevalencia en las sociedades occidentales como la nuestra. Más recientemente se ha observado que la EHGNA no solo puede causar el desarrollo de una hepatopatía crónica, sino dar lugar a frecuentes alteraciones en el metabolismo lipídico y a un incremento del riesgo cardiovascular.

a. Epidemiología

La prevalencia de la EHGNA no es bien conocida y probablemente está infravalorada dado que una gran parte de los pacientes están asintomáticos y frecuentemente no muestran alteraciones analíticas relevantes, y a la necesidad de la práctica de una biopsia hepática para el diagnóstico definitivo. De manera que, entre los estudios publicados hasta el momento, existen defectos metodológicos relevantes que introducen sesgos significativos, por un lado por enfocarse a grupos seleccionados de pacientes, en general subpoblaciones hospitalarias de obesos, diabéticos, etc., y por otro lado por utilizar técnicas diagnósticas de imagen como la ecografía, que no es excesivamente sensible, pues precisa de la infiltración grasa de al menos la tercera parte del parénquima hepático

para dar un resultado positivo. Con todas estas limitaciones, se estima que la prevalencia en la población general es del 20-30% en los países occidentales (46). En países orientales, donde la prevalencia de la entidad era baja, se está experimentando un notable aumento de esta, que ya ronda el 30% (47), lo que pone de manifiesto la occidentalización en los hábitos y costumbres de estos países.

Como regla general, la prevalencia aumenta con la edad, no obstante, también se ha descrito la EHGNA en población infantil con una prevalencia del 3-11%, pero que puede ascender hasta un 46% en niños obesos (48).

Por otro lado, aunque tal como se definió en un principio, la enfermedad afectaba fundamentalmente a mujeres, en la actualidad se sabe que afecta por igual a ambos sexos (49).

b. Etiología

La etiología de la EHGNA es probablemente múltiple, estando aún lejos de conocerse todos los agentes participantes. Se admite que influyen factores ambientales y genéticos. Entre los primeros se encuentra el denominado estilo de vida occidental, caracterizado por el binomio de dieta abundante y sedentarismo. Un aporte hipercalórico, con exceso de hidratos de carbono, grasas saturadas y alimentos con procesamiento industrial, unido a un escaso gasto energético, conducen a la mayoría de los sujetos a una ganancia ponderal. Tanto en población adulta como infantil, el sobrepeso y la obesidad se asocian a la EHGNA de manera muy importante. Otro elemento posiblemente implicado es la microbiota intestinal, que también es un reflejo de la dieta, actuando como facilitador de la permeabilidad intestinal y del paso de endotoxinas (50).

Las causas que provocan la EHGNA se clasifican de forma general en primarias y secundarias. Las primarias, que son las más prevalentes, están constituidas básicamente por los diferentes componentes que conforman el Síndrome Metabólico (SM), es decir, obesidad, diabetes, dislipemia e hipertensión arterial, así como por la resistencia a la Insulina (RI). Las secundarias, menos frecuentes, están relacionadas principalmente con el consumo de ciertos fármacos, trastornos metabólicos, trastornos nutricionales y la exposición a ciertos tóxicos. En la práctica clínica la mayoría de los pacientes con EHGNA

presentan obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o dislipemia como factor etiológico, siendo frecuente la asociación de diversos de estos factores y, dentro de éstos, los predictores más importantes de fibrosis son la edad, la obesidad y la DM2. De hecho, se considera a la EHGNA el componente hepático del SM, por lo que se cree que su prevalencia irá en aumento y en paralelo a la epidemia de obesidad.

Sin embargo, ni todos los pacientes con EHGNA son obesos, ni todas las razas exhiben la misma prevalencia de esta entidad, e incluso, en determinados individuos parece haber un componente familiar. Estos datos fundamentan la implicación de factores genéticos. Se han relacionado varias mutaciones y polimorfismos con una sobreexpresión de genes proinflamatorios, proapoptóticos y profibrogénicos, lo que podría condicionar la variabilidad en las manifestaciones clínicas, así como la progresión y el curso de la enfermedad.

c. Fisiopatogenia

El hígado desempeña un papel central en el metabolismo lipídico, captando ácidos grasos libres (AGL) del plasma, que si no son aprovechados como fuente energética mediante oxidación, son almacenados o exportados tras la síntesis de lípidos y lipoproteínas. En la EHGNA, tienen lugar una serie de alteraciones de factores locales y sistémicos, que controlan el equilibrio entre el aflujo, la oxidación y la exportación de lípidos, lo que conduce a la acumulación hepática de triglicéridos. Es un proceso complejo, y solo parcialmente conocido, del que seguidamente se describen los datos más relevantes.

La RI, definida como la disminución de la capacidad celular de responder a la acción de la insulina, debida a la inflamación crónica asociada a la obesidad, es la alteración metabólica más común asociada a la patogénesis de la EHGNA (51). La obesidad, fundamentalmente del tipo visceral, provoca una inflamación crónica con aumento de TNF- α e interleuquina-6, que hacen disminuir la secreción de hormonas antilipogénicas como la adiponectina, aumentan el estrés oxidativo y provocan RI a nivel hepático, lo que conlleva el acúmulo de grasa en el hígado (52).

Por otra parte, la hiperinsulinemia y la hiperglucemia, que suelen acompañar a la RI, también pueden promover la lipogénesis de novo de AGL, al sobreexpresar factores de

transcripción lipogénicos tales como la proteína unida al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) o la proteína unida al elemento de respuesta a los carbohidratos (53). Los AGL que no son incorporados a los triglicéridos deben ser metabolizados mediante oxidación en las mitocondrias, peroxisomas y microsomas (**figura 8A**). Sin embargo, la activación de SREBP-1c aumenta el malonil-CoA, el cual inhibe la oxidación de los AGL. El resultado neto de estas tres alteraciones es la mayor disponibilidad hepática de AGL como sustrato para la síntesis de triglicéridos (54), **que** quedarán finalmente empaquetados y almacenados como vacuolas de triglicéridos en los hepatocitos, o, después de su unión a la apolipoproteína B (apoB) mediada por la proteína transferidora de triglicéridos microsomales (MTTP), serán lanzados hacia el torrente sanguíneo en forma de VLDL.

Dado que SREBP-1c inhibe la formación de MTTP, la RI al sobreexpresar SREBP-1c contribuye a una menor incorporación de apoB y a la consiguiente menor formación de VLDL. También puede existir una disminución de la síntesis de apoB (55), o una menor respuesta posprandrial de la apoB disociada del incremento de triglicéridos (56). En todos los casos, la consecuencia final es la dificultad en el envío del exceso de triglicéridos hacia el plasma. Cuando la tasa de síntesis de triglicéridos sobrepasa la capacidad de producción de VLDL y de su exportación, los triglicéridos se acumulan dentro de los hepatocitos, dando lugar a la esteatosis, marcador patognomónico de la EHGNA (**figura 8B**).

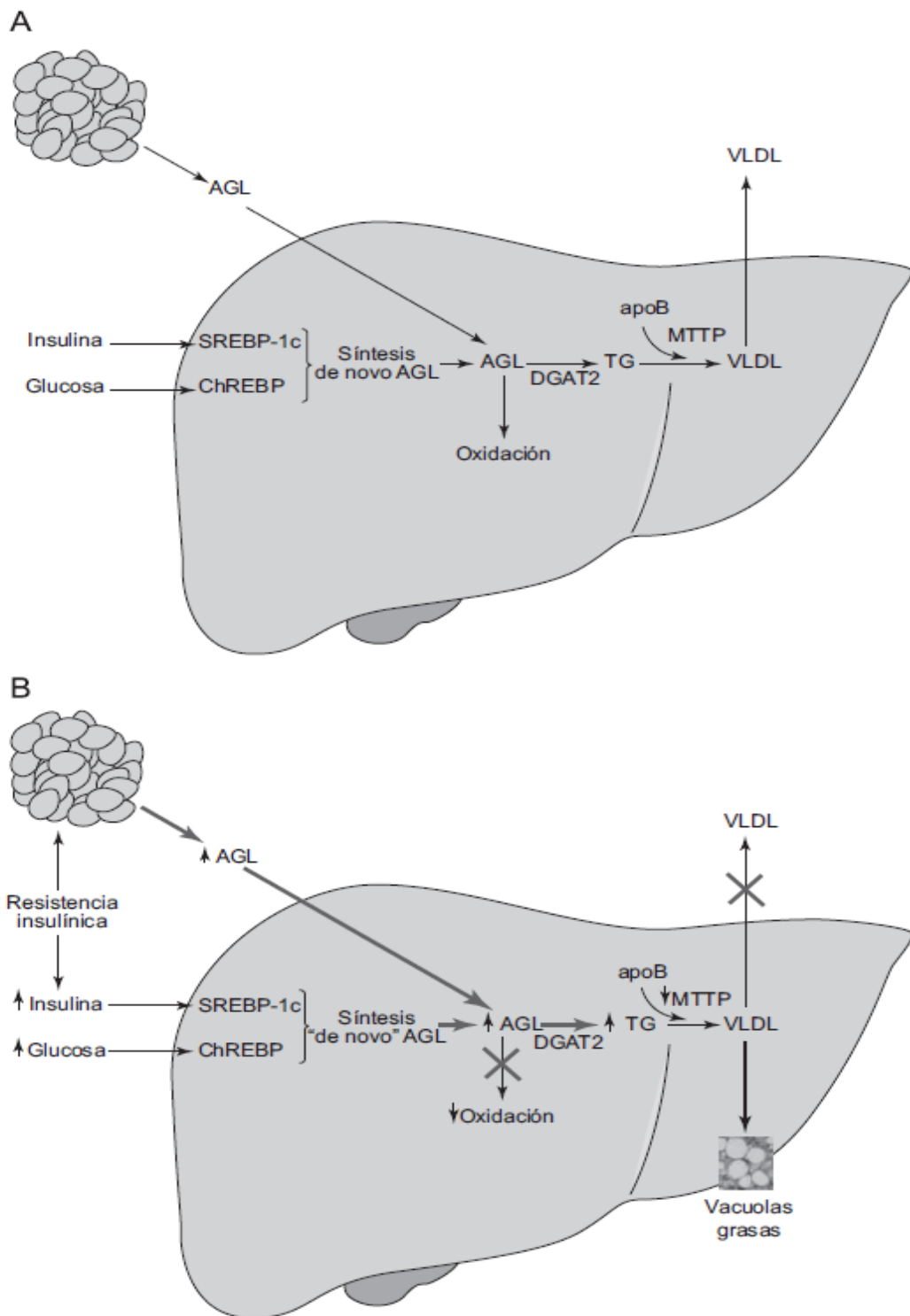


Figura 8. A: Síntesis hepática normal de triglicéridos y VLDL. B: Fisiopatología de la EHGA. La RI y la hiperinsulinemia conducen a la acumulación de lípidos en el hígado por varios mecanismos. En el tejido adiposo, la RI aumenta la lipólisis de triglicéridos e incrementa los niveles circulantes de los AGL que son captados por el hígado. Además, la hiperinsulinemia y la hiperglucemia aumentan la síntesis de novo de los AGL e inhibe su beta-oxidación. La consecuencia es la acumulación de los AGL dentro de los hepatocitos. Tomada de *Brea y cols* (57).

El incremento del aporte de ácidos grasos libres al hígado, y el consiguiente exceso de triglicéridos acumulados, genera un aumento de los productos resultantes de su oxidación (peróxido de hidrógeno, superóxido y peróxidos lipídicos) que a su vez provocan peroxidación lipídica y estrés oxidativo. Los radicales libres de oxígeno, así como algunos productos intermedios de la peroxidación lipídica, son quimiotácticos de neutrófilos, estimulan a las HSC y provocan aumentan la secreción de citoquinas y adipoquinas, como el TGF- β , llevando consigo por tanto el desarrollo de inflamación y fibrosis hepática.

La teoría de la patogénesis y progresión de la EHGNA más aceptada es la del “doble impacto” propuesta por *Day y James* en 1998. El primer golpe sería el acúmulo de triglicéridos en los hepatocitos que darán lugar a la esteatosis simple, y el segundo el estrés metabólico-oxidativo y la producción descontrolada de citoquinas como intento de compensar la alteración de la homeostasis lipídica, que provocan inflamación, necrosis y activación de la cascada fibrogénica (58).

d. Histología

Los hallazgos anatomopatológicos de la EHGNA son indistinguibles de las lesiones inducidas por el abuso del alcohol. El hallazgo más común es la presencia de esteatosis macrovesicular difusamente distribuida, que se presenta con diferentes grados de gravedad casi en el 100% de los casos. Se exige un mínimo de entre el 5 y el 10% de infiltración grasa para poder definirse como esteatosis hepática (59). Además, el amplio espectro de esta enfermedad incluye infiltración de células inflamatorias, balonización de los hepatocitos con presencia en su interior de hialina de Mallory y de acúmulo de gránulos de glucógeno, necrosis de los mismos y fibrosis en el caso de enfermedad avanzada. Para el diagnóstico de esteatohepatitis, que aparece entre un 10 y un 20% de los pacientes, es necesaria la combinación de esteatosis, presencia de polimorfonucleares, monocitos, o ambos, balonización hepatocitaria y áreas de necrosis (60). De entre los pacientes con esteatohepatitis, un 25-35% desarrollan fibrosis progresiva, entre el 65-75% permanecen estables o presentan regresión de la fibrosis, y entre el 9-20% progresan a cirrosis (61). En la **figura 9** pueden observarse algunas de estas alteraciones.

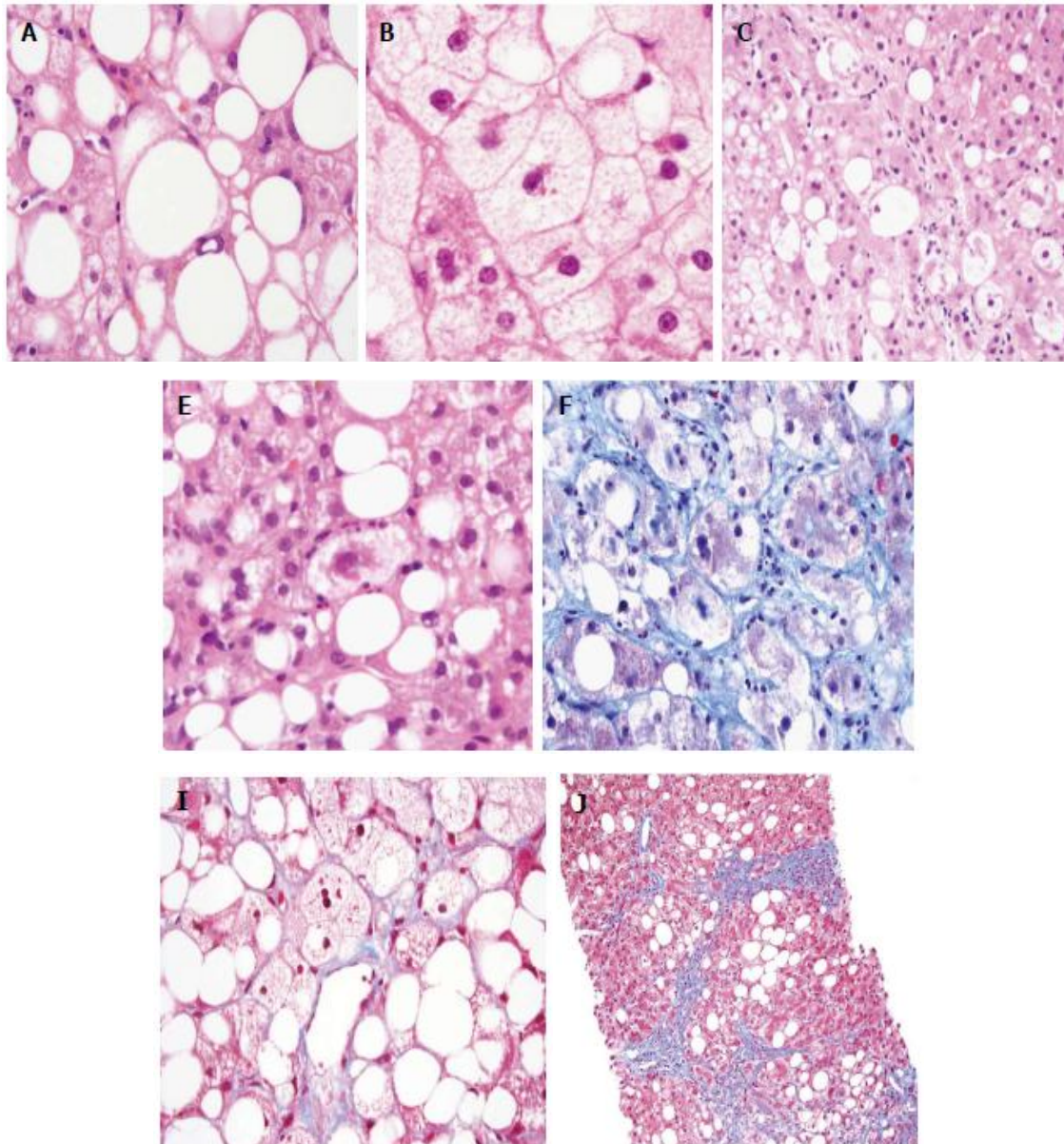


Figura 9: Imágenes reales con las principales alteraciones histológicas de la EHGNA. A: Esteatosis mixta, micro y macrovesicular (tinción hematoxilina-eosina, 600 x); B: Esteatosis microvesicular, núcleos centrales con citoplasma espumoso y megamitocondrias (tinción hematoxilina-eosina, 600 x); C: Hepatocitos balonzados (tinción hematoxilina-eosina, 600 x); E: Cuerpos de Mallory (tinción hematoxilina-eosina, 600 x); F: Cuerpos de Mallory en color azul-verde y densa fibrosis perisinusoidal (tinción de tricrómico de masson, 600 x); I: Fibrosis perisinusoidal (tinción de tricrómico de masson, 600 x); J: Fibrosis en puentes (tinción de tricrómico de masson, 200 x). Tomada de *Nalbantoglu y cols* (62).

En el 66% de los pacientes con EHGNA se encuentran lesiones mínimas de fibrosis en el momento de su diagnóstico histológico, mientras que en el 25% hay fibrosis septal, y el 15% presenta cirrosis bien establecida. La presencia de hallazgos de tipo inflamatorio,

fibrosis o cuerpos de Mallory están vinculados con un mal pronóstico en comparación con la presencia aislada de esteatosis, que presenta un curso clínico benigno y con carácter reversible.

Existe una clasificación clásica de la severidad histológica de la enfermedad, de *Brunt y cols.*, mediante la valoración del porcentaje de infiltración grasa, del grado de inflamación y de los estadios de fibrosis (60). Otra de las clasificaciones más utilizadas en la práctica clínica es la de *Matteoni y cols.*, que permite establecer el grado de afección y el pronóstico (63).

e. Historia natural de la enfermedad

La EHGNA se describe en íntima relación con la epidemia de obesidad de distribución universal, es decir, el proceso tiene una base metabólica y su gravedad es variable. La progresión de la lesión hepática depende del daño histológico en el momento del diagnóstico, así, la esteatosis hepática tiende a permanecer más o menos estable mientras que el esteatohepatitis tiende a evolucionar a cirrosis y CHC.

En un estudio evolutivo de 132 pacientes durante 10 años de seguimiento se comprobó que el 25% de los que presentaban esteatohepatitis habían progresado a cirrosis, falleciendo un 12% en relación con la hepatopatía (64). La presencia de esteatohepatitis multiplica por diez el riesgo de cirrosis y por ocho la mortalidad hepática, siendo ambas más probables a medida que aumenta la gravedad del estadiaje de la fibrosis (65).

En los pacientes con cirrosis secundaria a esteatohepatitis, el CHC y el fallo hepatocelular son las principales causas de morbi-mortalidad. En el estudio de *Hashimoto y cols.*, la tasa acumulativa de desarrollo de un CHC fue del 11,3%, con una tasa de supervivencia a los 5 años del 75,2% y una proporción acumulada de recurrencia del CHC a los 5 años de seguimiento de un 72,5% (66).

Estos datos sugieren la importancia y la necesidad de establecer un seguimiento protocolizado de los pacientes con esteatohepatitis para prevenir las complicaciones de la cirrosis, evaluar la formación de varices esofágicas y para el diagnóstico precoz del CHC. Los factores que comportan un mayor riesgo evolutivo de la esteatohepatitis son la edad

mayor de 40 años, un índice de masa corporal (IMC) > 40 kg/m², una relación aspartato aminotransferasa (AST)/alanino aminotransferasa (ALT) superior a 1, y la coexistencia de DM2 o hiperlipemia. El riesgo de mortalidad es mayor que en los pacientes con cirrosis por otras causas, debido a la asociación de la EHGNA con factores metabólicos y de riesgo cardiovascular (49;67).

f. Diagnóstico

Los sujetos con EHGNA son en su mayoría asintomáticos, aunque pueden mostrar manifestaciones clínicas inespecíficas como fatiga, malestar general o dolor en el hipocondrio derecho. En ocasiones existe sólo hepatomegalia, sin ictericia, y los datos de esplenomegalia o signos clínicos de hipertensión portal son muy raros. De ahí que casi siempre se sospeche el diagnóstico por la presencia de alteraciones ecográficas o de los resultados de laboratorio descubiertos de manera accidental.

Deben excluirse otras causas de hepatopatía, especialmente las hepatitis virales y el alcoholismo, por ser las más prevalentes en nuestro medio. La ausencia de consumo de alcohol es una de las características definitorias de esta entidad, pero es difícil de establecer con seguridad, motivo por el que se usan con frecuencias cuestionarios específicos o, incluso, combinaciones de datos analíticos.

En la actualidad, para el diagnóstico de la EHGNA se dispone básicamente de la biopsia hepática, técnica de referencia, y de métodos no invasivos representados por los biomarcadores de laboratorio y las técnicas de imagen.

- *Biopsia hepática.* La biopsia hepática es el estándar de referencia para el diagnóstico de la EHGNA, ya que confirma los hallazgos histológicos típicamente descritos en la enfermedad y permite su estratificación. Sin embargo, tiene limitaciones significativas, que se desarrollarán más adelante, entre las que destacan el error de muestreo, la variabilidad intra e interobservador y las potenciales complicaciones del procedimiento. Es por ello, que en los últimos años se ha potenciado el desarrollo de técnicas no invasivas, fundamentalmente biomarcadores y estudios de imagen (68).

- *Biomarcadores.* Aunque un porcentaje bastante elevado de los pacientes con EHGNA pueden tener las pruebas de función hepáticas normales, dentro del patrón característico del laboratorio se encuentran la elevación moderada de la aspartato aminotransferasa (AST; EC 2.6.1.1.) y la alanino aminotransferasa (ALT; EC 2.6.1.2), así como también hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglucemia. Los niveles altos de fosfatasa alcalina (ALP; EC 3.1.3.1.) y γ -glutamilttransferasa (GGT; EC 2.3.2.2.) son comunes, apareciendo entre el 25-75% de los casos. La bilirrubina y la albúmina suelen permanecer normales hasta etapas avanzadas de la hepatopatía. Un 20-50% de estos pacientes presentan niveles elevados de ferritina e incremento de la saturación de transferrina. Si bien estas alteraciones no son específicas, ni tampoco suficientemente sensibles para detectar la enfermedad en estadios iniciales, sí ayudan a excluir otras causas potenciales de enfermedad hepática después de descartar alcoholismo y marcadores virales positivos (69).

Mención aparte merecen los biomarcadores directos de fibrosis, que reflejan procesos de remodelación de la matriz extracelular y de deposición o degradación de colágeno en el hígado. Estos, también ampliamente evaluados para la valoración de la hepatopatía por el VHC, ofrecen mayor sensibilidad y especificidad que los marcadores séricos tradicionalmente usados para el estudio de la función hepática. Estos biomarcadores directos, así como los algoritmos matemáticos que combinan varios de ellos, que se explicarán detenidamente en el capítulo referido a los métodos diagnósticos de fibrosis hepática, han mostrado buenos resultados en la caracterización de las alteraciones hepáticas propias de la EHGNA, refiriéndose útiles para el diagnóstico y la estratificación de la enfermedad, solos o en combinación con otras técnicas no invasivas (68;70;71).

- *Técnicas de imagen.* De entre las técnicas de imagen, que se explicarán en detalle más adelante, la ecografía es la técnica de cribado más comúnmente utilizada en la práctica clínica rutinaria cuando existe sospecha de EHGNA, debido sobre todo a su bajo coste y a su accesibilidad. En la imagen ecográfica se observa un aumento de la ecogenicidad hepática que confiere al hígado un aspecto brillante. El

principal inconveniente radica en que para la detección de esteatosis se precisa una infiltración grasa de al menos un 30%. Además, su sensibilidad es baja en estadios leves de la enfermedad, y de forma inherente a la técnica está sujeta a cierta variabilidad intra e interobservador (72;73).

Han cobrado especial relevancia en los últimos años técnicas de imagen como el Fibroscan® o el ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse; Técnica de la Fuerza de Radiación Acústica del Impulso), basadas en la medición de la rigidez hepática mediante ultrasonidos. Estas técnicas, aunque con sus limitaciones, han mostrado buenos resultados en la evaluación de la EHGNA (68;70).

Otras técnicas de imagen, aunque por el momento apenas utilizadas en la práctica clínica para el diagnóstico de la EHGNA, son la tomografía computerizada (TC) o 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 la RM (74). Dentro de la RM existe una modalidad llamada “elastografía de resonancia magnética” (Elasto-RM), que produce imágenes codificadas a color 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 (75). Las principales limitaciones de esta técnica son su elevado coste, su poca disponibilidad y que, en ocasiones, es mal tolerada por los pacientes.

g. Tratamiento

El abordaje terapéutico de la EHGNA debe de ser integral y multidisciplinario ya que, aunque la resistencia a la insulina es el principal factor patogénico, otros muchos influyen en su desarrollo. Por tanto, los posibles objetivos terapéuticos son múltiples. La finalidad primordial es tratar la hepatopatía, lo que supone mejorar la esteatosis y prevenir la fibrosis, pero de forma ineludible las actuaciones para conseguirlo comparten la mejoría de otras alteraciones, como la reducción de la obesidad y la disminución del riesgo vascular.

Actualmente el manejo terapéutico de la enfermedad se centra principalmente en modificaciones del estilo de vida, pero pueden ser necesarios fármacos adyuvantes e incluso tratamiento quirúrgico.

✓ Modificación del estilo de vida

La intervención dietética y la práctica de ejercicio físico constituyen la piedra angular y el primer paso a tomar en el tratamiento de la EGHNA, aunque su eficacia queda limitada al cumplimiento del paciente. Aún así, la pérdida de peso inducida por ambos se asocia a cambios en la fisiopatología que conducen a una mejora de la sensibilidad a la insulina, a la normalización de las enzimas hepáticas, a una disminución del aporte hepático de ácidos grasos libres y a una reducción de los mecanismos inflamatorios y fibróticos. También se ha comprobado que la actividad física por sí sola es capaz de reducir la esteatosis hepática, independiente de la pérdida de peso (76).

✓ Tratamiento farmacológico

Las intervenciones en el estilo de vida pueden no ser eficaces en todos los casos y por lo tanto deben ser considerados otros enfoques, incluyendo el tratamiento farmacológico. Diversos fármacos han sido evaluados para valorar su efectividad en el tratamiento de este tipo de pacientes, especialmente agentes insulino-sensibilizantes. Sin embargo, por ahora la presencia de EHGNA por sí sola no es una indicación para la prescripción de antidiabéticos o hipolipemiantes, aunque en pacientes que también presentan esos trastornos metabólicos el tratamiento estaría más justificado.

Entre los antidiabéticos, no hay una evidencia clara de preferir una clase específica de fármacos. Las tiazolidinedionas han sido ampliamente estudiadas, principalmente rosiglitazona y pioglitazona. La comercialización de rosiglitazona fue suspendida por producir un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular, y en el caso de la pioglitazona se ha comprobado que mejora todos los parámetros de la histología hepática, aunque después de la interrupción del tratamiento los niveles de transaminasas pueden volver a los valores basales. Además, el uso a largo plazo puede resultar en complicaciones médicas tales como edema, insuficiencia cardíaca congestiva,

osteoporosis y aumento de peso, por lo que en caso de prescripción debe realizarse un seguimiento riguroso.

La biguanida metformina, otro antidiabético, tiene efectos metabólicos beneficiosos obvios, no sólo en términos de control de la glucosa, sino también en el aumento de HDL y además promueve la pérdida de peso. Sin embargo no se ha probado convenientemente que produzca una mejoría sobre la histología hepática, por lo que las guías clínicas no recomiendan su uso (77).

El efecto de los fármacos hipolipemiantes en el tratamiento de la EHGNA todavía no es completamente conocido, aunque la mayoría de los estudios sugirieron un beneficio leve en la esteatosis, sin efecto claro sobre la fibrosis, ya sea para las estatinas, fibratos, probucol o ezetimiba (77). Sin embargo, los beneficios de las estatinas en estos pacientes van más allá del hígado. Éstas, además de producir una inhibición competitiva de la síntesis del colesterol, tienen efectos pleiotrópicos por sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antioxidantes, así como en la disfunción endotelial y en la biodisponibilidad del óxido nítrico. Sus efectos terapéuticos en pacientes con EHGNA incluyen una disminución de las transaminasas y de la esteatosis, así como mejoría histológica de la inflamación hepática, aunque su uso clínico en pacientes con EHGNA que no presentan dislipemia no se recomienda (76).

La Vitamina E, debido a su capacidad antioxidante ha sido estudiada para el tratamiento de la EHGNA. Dos importantes estudios randomizados han comprobado su beneficio sobre la reducción de las aminotransferasas, y en la mejora de la histología hepática, aunque sin afectar a la fibrosis. Además, en los pacientes que no logran una pérdida de peso, la prescripción de vitamina E se relaciona con una disminución de la progresión de la enfermedad (77).

El ácido ursodesoxicólico mostró en ensayos con animales su posible eficacia en el tratamiento de la EHGNA, pero lamentablemente los ensayos en humanos no mostraron ningún efecto sobre la histología hepática, aunque puede mejorar los niveles de adiponectina y la resistencia a la insulina.

La pentoxifilina y diversos probióticos parecen prometedores en estudios piloto, pero se necesitan ensayos más rigurosos y evidencias más robustas para justificar su uso.

Además, varios antifibróticos, antiapoptóticos y terapias inmunes están siendo evaluados en estudios preclínicos y en ensayos en fase II para el tratamiento de la EHGNA.

✓ Cirugía bariátrica

Como ya se ha comentado anteriormente, existe una elevada asociación entre la obesidad y la EHGNA; la prevalencia estimada en la población general de esta enfermedad está entre 10-24%, mientras que en pacientes obesos alcanza el 79% (78;79). Esto es la causa de que al menos en primera instancia, la intervención dietética y la práctica de ejercicio constituyan el tratamiento inicial de la enfermedad.

Sin embargo, un porcentaje no despreciable de estos pacientes presentan un grado de obesidad extremo, la denominada obesidad mórbida. En la **tabla 1** se pueden observar los criterios establecidos por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) para definir la obesidad en grados según el IMC en adultos (80).

Categoría	Valores límite del IMC (Kg./m ²)
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5 - 24,9
Sobrepeso grado I	25,0 – 26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0- 29,9
Obesidad de tipo I	30,0 - 34,9
Obesidad de tipo II	35,0 - 39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0 – 49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥ 50

Tabla 1: Criterios de la SEEDO para definir la obesidad en función del IMC.

Cuando el paciente llega al grado de obesidad mórbida, los cambios dietéticos, el ejercicio físico o el tratamiento farmacológico no son eficaces en un 96-98% de los casos. En estos casos la opción terapéutica más eficaz para lograr a largo plazo la pérdida de peso es el tratamiento quirúrgico, la cirugía bariátrica, que está indicada en pacientes con IMC > 40 kg/m² o con IMC >35 kg/m² y comorbilidades asociadas.

Por tanto, teniendo en cuenta el elevado porcentaje de pacientes con EHGNA que son obesos, muchos de ellos serán candidatos a someterse a cirugía bariátrica, la cual se ha asociado a una disminución del riesgo de progresión de la EHGNA y, en algunos casos, a la regresión completa de las lesiones histológicas. Se ha comprobado que después de la cirugía los pacientes pierden hasta el 60% del peso corporal, y además se produce una drástica reducción de la esteatosis hepática, los fenómenos necroinflamatorios e incluso la fibrosis, disminuyendo por tanto el estadio de la EHGNA. La cirugía bariátrica ha mostrado igualmente una mejora de los componentes del SM (81-84).

Es de gran importancia predecir y prevenir el desarrollo de enfermedades hepáticas avanzadas en pacientes obesos, especialmente en obesos mórbidos. En los pacientes sometidos a cirugía bariátrica, la detección de EHGNA pre-quirúrgica puede ser tomada en consideración para identificar pacientes de alto riesgo, en los que debe proponerse un tratamiento previo. Además, permitiría realizar un control post-quirúrgico más exhaustivo para reducir la morbilidad y mortalidad en relación con la hepatopatía, así como realizar un seguimiento más estrecho en el futuro.

En cuanto al proceso quirúrgico, se han descrito multitud de técnicas. La Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad Mórbida y de las Enfermedades Metabólicas hace una clasificación en la que las divide básicamente en 3 tipos: restrictivas, malabsortivas y mixtas.

- *Técnicas restrictivas puras*

Gastroplastia vertical anillada

Banda gástrica ajustable

- *Técnica malabsortivas puras*

By-pass yeyunocólico

By-pass yeyunoileal

- *Técnicas mixtas (restrictivas-malabsortivas)*

By-pass gástrico

Derivación bilio-pancreática

Cruce duodenal

Inicialmente se describieron casos de esteatosis severa producida por la rápida pérdida de peso, en especial con el bypass yeyuno-ileal. Sin embargo en la actualidad parece imponerse el by-Pass gástrico en Y de Roux, que ha paliado este problema.

De entre las diversas técnicas existentes, el by-pass gástrico en “Y de Roux” se considera actualmente el patrón de referencia de la cirugía de la obesidad, ya que ofrece un excelente balance entre pérdida de peso, riesgo quirúrgico y calidad de vida posterior (85;86). Como veremos más adelante, esta fue la técnica quirúrgica que se realizó a todos los pacientes obesos incluidos en esta tesis doctoral.

Al inicio de la descripción de la técnica se realizaba únicamente mediante abordaje abierto, sin embargo en la actualidad el uso de laparoscopia reduce la complicación de las heridas y la estancia hospitalaria. Al evitar la incisión abdominal se consigue una mejor mecánica respiratoria y hay un mínimo traumatismo quirúrgico, lo que disminuye el estrés sistémico, el dolor y el riesgo de infección postoperatoria de la herida.

Previamente a la cirugía, todos los pacientes son evaluados por un equipo interdisciplinario con experiencia médica-quirúrgica, psiquiátrica y nutricional. Este equipo debe valorar las indicaciones y contraindicaciones del tratamiento quirúrgico, realizar una evaluación completa, tratar y optimizar las comorbilidades médicas antes de la intervención, y valorar el bienestar psicológico del paciente, estableciendo unas expectativas realistas sobre la pérdida de peso, además de educarlo para que participe activamente en el tratamiento postoperatorio.

Esta técnica quirúrgica produce pérdida de peso por dos mecanismos: restricción gástrica y malabsorción intestinal. Tal como puede observarse en la **figura 10**, la técnica consiste en la creación de un pequeño reservorio gástrico, mediante una cortadora quirúrgica, de

unos 30 ml excluyendo una parte del estómago a lo largo de la curvatura menor, y la posterior realización de la anastomosis del reservorio gástrico con un asa de yeyuno. El bolo alimenticio entra al pequeño saco gástrico ocasionando una saciedad más temprana, y posteriormente pasa directamente al yeyuno, evitándose así la absorción intestinal en el duodeno y en el segmento más proximal del yeyuno, lo que restringe en gran medida la cantidad de calorías y nutrientes que se absorben. Esta nueva asa que transporta el alimento se une con el intestino que transporta las secreciones bilio-pancreáticas, mediante una anastomosis a una distancia del reservorio variable, en torno a los 160 cm.

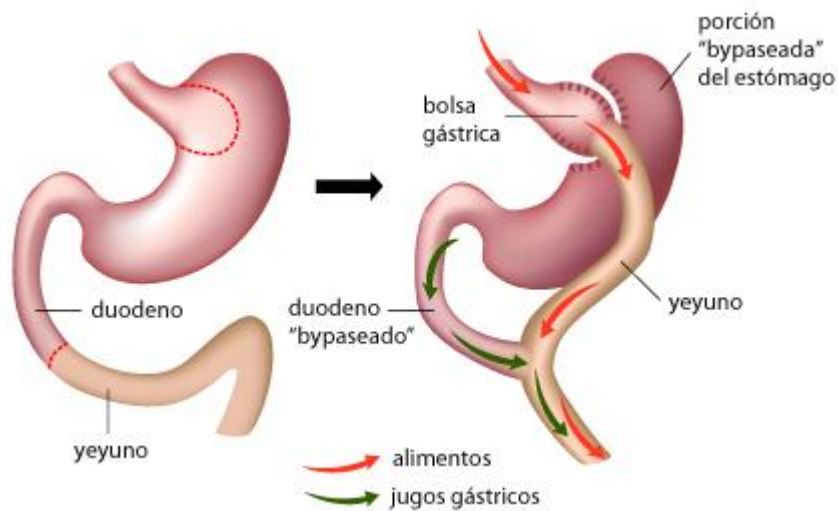


Figura 10: Esquema del procedimiento quirúrgico de Bypass gástrico en "Y de Roux". Tomada de www.vigolap.es.

1.2 Diagnóstico de la fibrosis hepática

El conocimiento de la magnitud de la fibrosis hepática es esencial para determinar la progresión de la enfermedad en las hepatopatías crónicas, para poder establecer un pronóstico y, en caso necesario tomar decisiones sobre la de prescripción de tratamiento.

En la actualidad, la biopsia hepática es el estándar de referencia para el diagnóstico de la fibrosis hepática, ya que permite su detección y cuantificación de manera directa, así como la valoración de la presencia de esteatosis y actividad necroinflamatoria, además de aportar la posibilidad de descartar otras patologías hepáticas. Sin embargo, es un método

invasivo que conlleva un riesgo inherente de complicaciones, además de presentar limitaciones técnicas que provocan error de muestreo, así como la variabilidad de los resultados en función del observador (87-89).

Estas limitaciones, junto con la necesidad creciente de métodos que puedan predecir con precisión la fase inicial de la enfermedad y permitan la evaluación del enfermo de forma periódica, han potenciado en los últimos años el desarrollo de métodos alternativos para el análisis no invasivo de la fibrosis hepática, representados fundamentalmente por las técnicas de imagen y los biomarcadores de laboratorio.

1.2.1 Métodos invasivos

i. Biopsia hepática

Actualmente la biopsia hepática se considera la técnica de referencia para determinar la fibrosis hepática y es por tanto el *gold standard* del diagnóstico de la enfermedad.

El análisis histopatológico de la biopsia permite la detección y cuantificación de manera directa de la fibrosis hepática, y además aporta información sobre la actividad necroinflamatoria, el grado de esteatosis y sobre la etiología del trastorno hepático.

Existen varias escalas histopatológicas que permiten graduar la lesiones encontradas. Una de las primera escalas disponibles fue la de *Knodell* (90), publicada en 1981 y denominada también “*Índice de Actividad Histológica*”, que valora semicuantitativamente la actividad de la enfermedad estableciendo una puntuación en función de cuatro categorías: necrosis periportal y/o puentes de necrosis, necrosis focal y degeneración intralobular, inflamación portal y fibrosis. Posteriormente se han desarrollado otros sistemas de clasificación histológica como el sistema de *Scheuer* (91). Este, menos complejo que el de *Knodell*, y ampliamente utilizado, fue modificado posteriormente por *Batts y Ludwig* (92;93). Más adelante, como resultado de una modificación de la de *Knodell*, se desarrolló la escala de *Ishak* (94), que incluye una terminología descriptiva para la inflamación y la fibrosis. Además contiene más estadios de fibrosis, lo que permite una evaluación más detallada, pero sin embargo reviste mucha más complejidad.

Actualmente uno de los sistemas de clasificación más utilizados es el Metavir (95), que fue descrito para la valoración específica de pacientes con VHC, a diferencia del resto de clasificaciones que eran genéricas en la valoración de la hepatitis crónica. Este sistema permite la valoración de la fibrosis y la actividad necroinflamatoria, estableciendo por orden creciente cuatro categorías para cuantificar la inflamación (A0-A3) y cinco para la fibrosis (F0-F4). En cuanto a los estadios de fibrosis, F0 corresponde a ausencia de fibrosis; F1, fibrosis portal sin septos; F2, fibrosis portal con algunos septos; F3, numerosos septos sin cirrosis; y F4 cirrosis. Se considera fibrosis significativa cuando el estadio de fibrosis es igual o superior a F2 y fibrosis avanzada, cuando se informa un estadio igual o superior a F3.

En referencia a la EHGNA, se han descrito tres escalas específicas para la valoración histopatológica de las lesiones hepáticas; dos fueron publicadas por *Brunt* (60) y *Matteoni* (63) en el año 1999, y posteriormente, en el año 2005, la red estadounidense de investigación clínica sobre la EHGNA, validó un sistema de puntuación semicuantitativo, aunque actualmente su uso se limita a la investigación (96).

La escala de *Brunt* (60) valora la esteatosis, la actividad necroinflamatoria y la fibrosis, estableciendo las siguientes categorías:

✓ *Esteatosis*

Grado 0: No hay presencia de esteatosis.

Grado 1: <33% esteatosis.

Grado 2: 33-66% esteatosis.

Grado 3: >66% esteatosis.

✓ *Actividad Necroinflamatoria*

Grado 0: Sin signos de actividad necroinflamatoria.

Grado 1 (Leve): Esteatosis <66%, posibilidad de algún hepatocito balonizado, a nivel intra-acinar algún foco inflamatorio e infiltrado de polimorfonucleares y/o linfocitos y sin inflamación portal o leve.

Grado 2 (Moderada): Esteatosis de cualquier grado, degeneración balonzante, infiltrado intra-acinar de polimorfonucleares, inflamación portal e intra-acinar de media a moderada, que puede llevar fibrosis asociada.

Grado 3 (Severa): Esteatosis panacinar, balonzación generalizada, inflamación intra-acinar, infiltración de polimorfonucleares con hepatocitos balonzados e inflamación portal de media a moderada.

✓ *Fibrosis*

Grado 0: Ausencia de fibrosis.

Grado 1: Fibrosis perisinusoidal/pericelular leve.

Grado 2: Fibrosis perisinusoidal/pericelular con fibrosis periportal.

Grado 3: Fibrosis perisinusoidal/pericelular con fibrosis periportal y fibrosis en puentes.

Grado 4: Cirrosis.

Por otro lado tenemos el sistema de clasificación de *Matteoni* (63), que clasifica la enfermedad en cuatro tipos, atendiendo a las siguientes características:

- ✓ Tipo 1: Esteatosis sin inflamación ni fibrosis.
- ✓ Tipo 2: Esteatosis con inflamación lobular, sin fibrosis.
- ✓ Tipo 3: Esteatosis y presencia de hepatocitos balonzados.
- ✓ Tipo 4: Esteatosis y presencia de hialina de Mallory y/o fibrosis.

A pesar de que la biopsia todavía sea considerada el estándar de referencia, su exactitud y reproducibilidad se han cuestionado por varios motivos, además de los riesgos que entraña la prueba.

Por un lado, debido al pequeño tamaño de la muestra de hígado que normalmente se toma, el resultado podría no ser representativo del verdadero grado de fibrosis que presenta el paciente, así mismo con el resto de alteraciones histológicas. Normalmente una biopsia hepática supone un volumen de 1/50000 del total del órgano, lo que se asocia a un error muestral (88), fundamentalmente cuando la afectación hepática está

parcheada, no difusa o uniforme. Existen estudios que han demostrado que en función del lóbulo hepático de donde se extrae la muestra puede haber diferencias de al menos un grado de fibrosis en el 33% de los casos (97). *Bedossa y cols.* señalaron que las biopsias hepáticas deberían tener una longitud de al menos 2,5 cm para poder emitir un diagnóstico de seguridad en el 80% de los casos (89), sin embargo en la práctica clínica generalmente se toman muestras más pequeñas, lo que implica que en muchos casos se infravalore el grado de fibrosis.

Por otro lado, una de las principales limitaciones de la biopsia es la relativa subjetividad a la que está sujeta, que puede dar lugar a resultados con diferencias significativas en función del observador. A pesar de que el uso de sistemas estandarizados de evaluación ha reducido la variabilidad inter e intraobservador, la variación en el estadiaje de las muestras sigue siendo un problema importante (89;97), e incluso en aquellos casos en los que un profesional experimentado realiza la biopsia hepática y un patólogo experto interpreta los resultados, la tasa de diferencia en la clasificación puede llegar a ser hasta del 20% (98;99).

Además, dado que la biopsia es un método invasivo, no está exenta de riesgos (87). Se han descrito complicaciones menores asociadas al procedimiento como dolor, hemorragia leve que no requiere transfusión o hipotensión transitoria. Pero también pueden producirse complicaciones mayores como hemorragias más graves que requieren transfusión o tratamiento quirúrgico, perforación de órganos adyacentes, neumohemotorax, peritonitis biliar, sepsis, reacción alérgica a anestésicos, y en un porcentaje muy pequeño (1:10000 a 1:20000), puede producirse incluso la muerte (89;100).

Aparte de las limitaciones y riesgos asociados a la técnica que se acaban de describir, el hecho de proporcionar una visión estática de la enfermedad, que no permite predecir cuál va a ser la evolución a medio o largo plazo es también un inconveniente. Además, dado su carácter invasivo, la biopsia no puede proponerse como técnica para realizar el seguimiento periódico que generalmente requieren los pacientes con hepatopatía crónica. Otras limitaciones no menos importantes son, su elevado coste y una baja aceptación por parte de los pacientes que en ocasiones conlleva demoras terapéuticas.

También existen algunas contraindicaciones que imposibilitan su realización como coagulopatías severas, obstrucción biliar extrahepática o la falta de colaboración por parte del paciente (100).

Por tanto, dadas las limitaciones de la biopsia hepática, el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos no invasivos, fáciles de realizar, reproducibles y capaces de diferenciar entre los distintos estadios de fibrosis hepática, se ha invocado como una necesidad indiscutible. Los avances en técnicas de imagen y en marcadores serológicos han generado expectativas sobre nuevos procedimientos diagnósticos que puedan constituir una alternativa a la biopsia hepática.

1.2.2 Métodos no invasivos

i. Examen físico

Aunque no se considera propiamente un método diagnóstico, la exploración física del paciente puede revelar signos propios de las hepatopatías crónicas tales como ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia, circulación colateral abdominal, arañas vasculares (predominantemente en cara, tronco y extremidades superiores), telangiectasias, eritema palmar o ginecomastia en varones. También pueden apreciarse en las uñas bandas o estrías horizontales blanquecinas separadas entre sí por otras zonas de color normal (uñas de Muehrcke), cuya patogenia se ha relacionado con estados de hipoalbuminemia. En la **figura 11** pueden observarse algunos de estos signos.



Figura 11: Signos físicos presentes en enfermos con cirrosis hepática. A la izquierda uñas de Muehrcke, en el centro una araña vascular y la derecha arañas vasculares y telangiectasias en la región pectoral.

Si bien todos estos signos son poco específicos, y normalmente aparecen en estadios avanzados de la hepatopatía.

ii. Pruebas de imagen

a. Ecografía

La ecografía abdominal es una técnica inocua, barata y de gran valor diagnóstico en la patología abdominal. Por esto, tras la anamnesis y la exploración física, es la técnica de elección en pacientes con sospecha de enfermedad hepática, simultáneamente a las pruebas analíticas dirigidas al establecimiento de la causa del proceso.

El parénquima hepático se define según varios parámetros ecográficos: ecogenicidad, tamaño, contornos y ecoestructura. Un hígado sano presenta unas características ecográficas determinadas. 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 en su interior pueden definirse vasos sanguíneos y en su porción superior y lateral el diafragma (101).

En la hepatopatía crónica se pueden distinguir varios patrones ecográficos: patrón de EHGNA, patrón de cirrosis hepática con o sin hipertensión portal y patrón de hepatopatía crónica inespecífica.

- *Patrón de EHGNA:* el hallazgo ecográfico característico y más constante es el aumento de la ecogenicidad hepática debido al depósito de grasa (esteatosis) en los hepatocitos. Esta hiperecogenicidad es de grano fino muy denso, lo que confiere al hígado un aspecto “brillante”. Otros hallazgos que pueden encontrarse son una disminución en la visualización de los vasos intrahepáticos y del diafragma y una atenuación posterior del sonido.
- *Patrón de cirrosis hepática:* los cambios histológicos que se producen en la cirrosis hepática (nódulos de regeneración rodeados de bandas de fibrosis y grados variables de inflamación, acompañados en algunos casos de esteatosis) se traducen en los siguientes signos ecográficos:

- ✓ Superficie hepática nodular: refleja la presencia de septos fibróticos y nódulos de regeneración. Se hace más evidente en la interfase del hígado con la vesícula biliar y en la zona adyacente al riñón derecho, en el borde posterior del lóbulo izquierdo y en la posición más cercana al transductor (**figura 12**) (102;103).

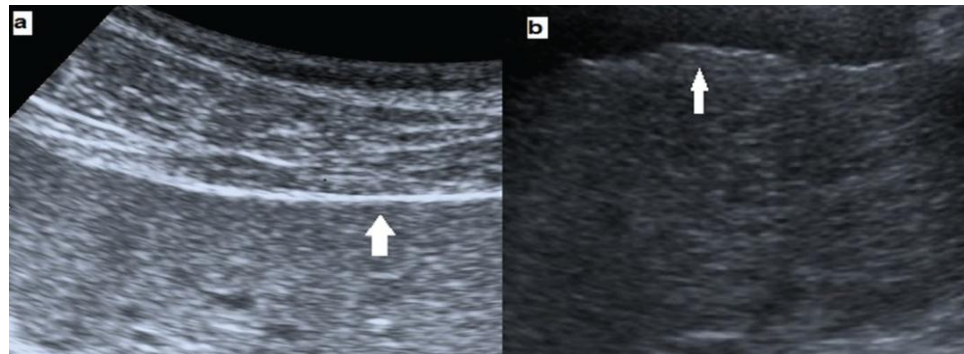


Figura 12: A: bordes lisos en un hígado sano. B: bordes irregulares y discontinuos en un paciente con cirrosis hepática. Tomada de *Marín-Serrano y cols* (104).

- ✓ Cambios en la ecogenicidad hepática: A medida que la enfermedad avanza la ecoestructura hepática se torna hiperecoica y el grano se engruesa hasta adoptar, en fases avanzadas, un aspecto heterogéneo de nodularidad gruesa, debido a la fibrosis (**figura 13**). La detección de estos cambios tiene una baja sensibilidad ya que son un signo subjetivo cuya constatación depende del explorador y del equipo utilizado (105;106).

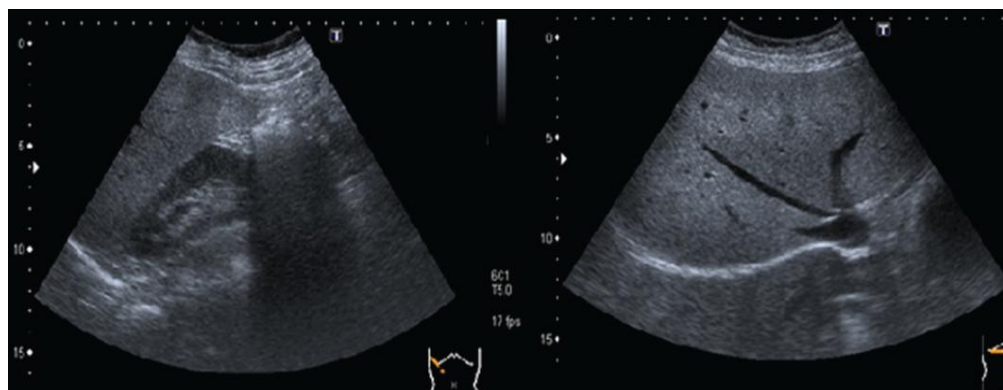


Figura 13: Hígado hiperecogénico, de grano medio y sin atenuación del sonido (fibrosis) en un paciente con hepatitis crónica por virus C. Tomada de *Marín-Serrano y cols* (104).

- ✓ Cambios en la morfología hepática: Los cambios acontecidos en la microcirculación hepática como consecuencia del desarrollo de fibrosis y nódulos de regeneración provocan disfunción hepatocitaria y atrofia. En los estadios iniciales el hígado puede estar aumentado de tamaño, pero con la evolución de la enfermedad se produce atrofia del lóbulo derecho. Por el contrario, es frecuente observar aumento del tamaño del lóbulo caudado y del segmento lateral del lóbulo izquierdo, debido a que sus vasos nutricios están menos comprometidos por la distorsión arquitectural que se produce en la cirrosis hepática. La hipertrofia del lóbulo caudado es un signo con una especificidad muy elevada, de alrededor del 90%, pero con una sensibilidad más baja, de alrededor del 45% (104;107;108). **Figura 14.**

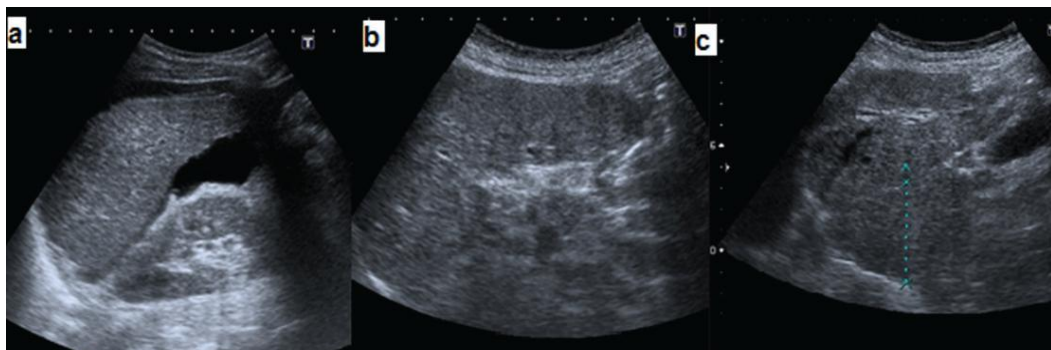


Figura 14: Alteraciones ecográficas en la cirrosis hepática. a) Atrofia del lóbulo hepático derecho b) Hipertrofia del lóbulo hepático izquierdo c) Hipertrofia del caudado. Tomada de *Marín-Serrano y cols* (104).

- ✓ Hipertensión portal: Cuando a los signos previamente mencionados se añaden datos ecográficos de hipertensión portal, el diagnóstico de cirrosis hepática se hace aún más consistente. Existen signos ecográficos directos, como dilatación del sistema venoso esplenoportal, calibre fijo de la vena esplénica y de la vena mesentérica superior con los movimientos respiratorios, o colaterales venosas portosistémicas, e indirectos, como son la presencia de esplenomegalia, ascitis o engrosamiento de la pared vesicular (104).
- *Patrón de hepatopatía crónica inespecífica*: engloba tres lesiones heterogéneas, la hepatitis crónica con más o menos fibrosis, la EGHNA y la cirrosis hepática sin

patrón ecográfico típico. Aparecen signos ecográficos distintos a los ya expuestos; hígado de tamaño y borde variable, de contorno no nodular, hiperecogénico de grano grueso o heteroecogénico y no asociado a signos de hipertensión portal.

La ecografía es una técnica muy utilizada para la valoración de la hepatopatía crónica, especialmente porque a su falta de invasividad se suma su potencial para proporcionar información útil sobre el parénquima hepático, además de detectar cambios extrahepáticos secundarios a hipertensión portal. No obstante, la mayoría de estos cambios corresponden a una fase avanzada de cirrosis, situación en la que el diagnóstico clínico puede ser realizado con facilidad, y además es una técnica limitada por la variación inter e intraobservador. No se considera suficientemente precisa para la cuantificación de la esteatosis y la fibrosis hepática en los estadios iniciales, ni tampoco para diferenciar estadios intermedios. El diagnóstico de una cirrosis hepática establecida se puede realizar de forma relativamente segura a partir de una semiología ecográfica bien definida, pero, por el contrario, en pacientes con enfermedad crónica menos avanzada o que no presentan los indicios ecográficos habituales ni hipertensión portal, determinar el estadio histológico de la enfermedad es más complicado. Esto supone una limitación importante, pues aproximadamente el 25% de los pacientes a los que se les realiza una biopsia hepática por aumento mantenido de las transaminasas, en estas circunstancias ya presentan una fibrosis avanzada o cirrosis hepática no sospechada. Dados estos inconvenientes, en la actualidad cada vez se recurre de manera más frecuente a técnicas de imagen más modernas, fundamentalmente las basadas en la elastografía, que ofrecen mejores resultados para detectar esteatosis y fibrosis hepática en estadios iniciales, así como para diferenciar las etapas intermedias.

b. Sonoelastografía

La sonoelastografía es una técnica que permite evaluar objetivamente la relación entre las distintas estructuras tisulares y su elasticidad. Fue descrita a principios de los años noventa (109), y hasta la actualidad se han descrito múltiples aplicaciones en diferentes tejidos como el hígado, la mama, el tiroides, la próstata y los vasos sanguíneos (110-114). El fundamento básico de la técnica consiste en la compresión del tejido y la creación de una imagen que refleja la elasticidad resultante de esa compresión. Existen dos tipos bien

diferenciados, la sonoelastografía semicuantitativa (*strain elastography*), y la cuantitativa (*shear-wave elastography*).

- *Sonoelastografía semicuantitativa*: adquiere los datos anatómicos pre-compresión del tejido a estudio. Posteriormente, mediante un compresor externo (transductor ecográfico) o una función fisiológica (respiración) se aplica una pequeña presión y se adquiere otro mapa de la anatomía del tejido post-compresión. Mediante la comparación de los dos mapas anatómicos se calcula el desplazamiento del tejido deformado, y se refleja en un mapa de colores (109;115;116).
- *Sonoelastografía cuantitativa*: esta modalidad, mediante el envío de microimpulsos acústicos con niveles de energía mínimos, mide el desplazamiento del tejido independientemente de la presión aplicada, creando un mapa tisular relativo al desplazamiento de las estructuras adyacentes. No es necesaria la compresión del tejido con un transductor, por lo que disminuye la variabilidad inter e intraobservador, aumentando por tanto la reproducibilidad; esto supone la principal ventaja frente a la modalidad semicuantitativa.

Dentro de la sonoelastografía cuantitativa podemos distinguir a su vez tres tipos de imágenes (117-120):

- ✓ Cualitativa: aporta un mapa de colores de la lesión con respecto al tejido adyacente.
- ✓ Cuantitativa: ofrece un valor numérico, en kilopascales (kPa) o metros por segundo (m/s), que refleja la deformidad del tejido en la región de interés elegida.
- ✓ Combinación de las dos anteriores: sobre un mapa cualitativo de colores se mide la dureza del tejido en la región de interés (RDI).

Los datos se procesan calculando el módulo de elasticidad del tejido, en función de una serie de parámetros técnicos. Varias casas comerciales han integrado software de sonoelastografía en equipos de ultrasonidos, nombrando de

diferentes formas esta base física: ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse Imaging*), Shear Wave Point Quantification, Elastografía Cuantitativa ShearWave™...

Tal como se detallará en el capítulo de material y métodos, en esta tesis doctoral a todos los pacientes se les realizará, además de una ecografía abdominal, la técnica Arfi cuantitativa.

La técnica Arfi evalúa de forma objetiva la consistencia o dureza de los tejidos. Esta modalidad diagnóstica añade información estructural a las propiedades morfológicas que nos muestra la ecografía, permitiendo alcanzar mejores resultados de sensibilidad y especificidad. La información básica que aporta la técnica es la velocidad a la que un impulso predeterminado (velocidad de onda de corte o V_c) atraviesa la región de interés (121). El fundamento de la técnica consiste en que un transductor envía múltiples micropulsos u ondas sonoras longitudinales de 1-162 microsegundos de duración con una frecuencia fija 2,67 megahercios, que provocan la 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 los micropulsos iniciales han atravesado el tejido. La medida se realiza en la región de interés, que el ecografista ha elegido previamente. En la **figura 15** puede observarse el procedimiento de forma esquemática.

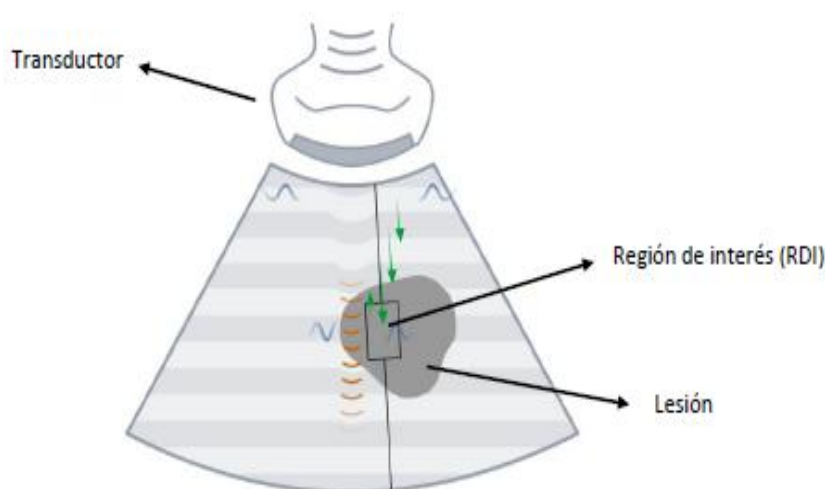


Figura 15: Base física de la técnica Arfi, anteriormente descrita.

Cada tejido del organismo tiene unas propiedades mecánicas características, que van a condicionar el modo y la velocidad a la que el sonido lo atraviese. Por ello, la Vc obtenida para cada tejido es una propiedad intrínseca a él y además, reproducible (122-124). La velocidad de las ondas transversales depende de la elasticidad del tejido, y se traducirá en una Vc determinada, que será el resultado proporcionado por la plataforma ecográfica (121), tal como se observa en la **figura 16**.



Figura 16: Imagen ecográfica hepática de la técnica Arfi realizada a un paciente con VHC. En el extremo derecho se puede observar la Vc proporcionada por el equipo.

Al igual que ocurre a nivel ecográfico, el hígado sano presenta unas propiedades elastográficas determinadas. Se han publicado pocas series sobre datos elastográficos en individuos sanos, siendo la de *Popescu y cols* una de las más referenciadas, que concluye una Vc media de $1,15 \pm 0,21$ m/s (125).

Las características elastográficas de un hígado patológico varían en función del agente etiológico causante. Las Vc obtenidas en los distintos tipos de hepatopatías guardan relación con la matriz hepática que conforma la enfermedad. Se ha demostrado que tanto en la esteatohepatitis no alcohólica, como en las hepatopatías virales o las de origen alcohólico, las Vc obtenidas son directamente proporcionales a la gravedad de la lesión, apareciendo por tanto los valores más elevados en los hígados cirróticos. Por el contrario,

en hígados que únicamente presentan esteatosis simple, se ha observado una disminución de la Vc (126-128).

Se cree que el aumento de la Vc que se produce en pacientes con el hígado inflamado o fibrótico es debido a la mayor reticulación extracelular hepática o la presencia de edema o células inflamatorias asociadas. Esto confiere mayor densidad al tejido, lo cual facilita el paso de las ondas enviadas por el transductor, redundando en una mayor Vc. Por otra parte la disminución de la Vc que parece existir en la esteatosis simple podría ser debida a la reducción de la densidad del tejido hepático y el aumento del espacio intercelular que producen las vacuolas grasas, lo que se traduce en un hígado más blando y por tanto más resistente al paso de las ondas, con la consiguiente disminución de la Vc.

La RDI es elegida por el operador, guiado por la imagen ecográfica. Tiene un tamaño rectangular fijo de 10 x 6 mm, y un espesor de 2 μ m. Puede alcanzar una profundidad de 8 cm, lo cual resulta particularmente útil en pacientes obesos, que presentan un panículo adiposo mayor.

Por otra parte, deben tenerse en cuenta las limitaciones del procedimiento. Para realizar la técnica adecuadamente se necesitan unas condiciones determinadas: ausencia de movimiento por parte del paciente y evitar la interposición de vasos u otras estructuras distintas a la que se va a estudiar, como hueso, aire... Si el paciente se mueve durante la exploración se obtendrá un valor de Vc nulo, y deberá repetirse el procedimiento. Cuando se interponen otras estructuras con una rigidez diferente a la del tejido que se pretende estudiar se obtienen datos de Vc falseados, ya que por ejemplo, los vasos son más elásticos que los órganos internos y los huesos son más rígidos.

c. Elastografía de transición

La elastografía de transición (ET), comercializada con el nombre de FibroScan® por la empresa Echosens (París, Francia), aparece por primera vez en una publicación científica como nueva técnica diagnóstica de fibrosis hepática en el año 2003. El uso de la ET en pacientes con enfermedad hepática se basa en la relación existente entre la rigidez del hígado y el grado de fibrosis hepática (129).

El FibroScan® consta de un transductor de ultrasonidos de 5 megahercios de frecuencia acoplado sobre el eje de un vibrador. La sonda del transductor de ultrasonidos, que se coloca sobre la piel en un espacio intercostal a la altura del lóbulo hepático derecho, genera una vibración de baja frecuencia y moderada amplitud que induce una onda elástica que se propagará a través del tejido. Esta propagación es analizada mediante la adquisición de señales de ultrasonido con las que se genera el mapa de rastreo de dicha onda elástica, de acuerdo a los parámetros de profundidad y tiempo. De esta manera, se determina la velocidad de propagación de la onda elástica, que está relacionada con la elasticidad tisular hepática: a menor elasticidad del tejido, mayor velocidad de propagación de la onda.

El FibroScan® mide la elasticidad de un cilindro de parénquima hepático de aproximadamente 1 centímetro de diámetro y entre 2-4 centímetros de longitud. Esto representa un volumen cien veces mayor que el explorado con la biopsia, por lo que se considera más representativo de la totalidad del parénquima hepático. La profundidad de las mediciones oscila entre 25 y 45 milímetros. Los resultados se expresan en kilopascales (129;130). En la **figura 17** que se muestra a continuación se puede ver el equipo de FibroScan®, así como de manera esquemática, la propagación de las ondas a través del parénquima hepático.



Figura 17: Equipo FibroScan®. A la derecha se ilustra el transductor generando una vibración que dará lugar a la onda que se propaga por el hígado.

Diversos estudios han valorado la exactitud diagnóstica del FibroScan® en comparación con la biopsia hepática. La mayoría están realizados en pacientes con VHC, pero también en pacientes con hepatopatía por virus B, VIH, o EHGNA (129;131-136). En la mayoría de los trabajos se describe una asociación estadísticamente significativa entre la medida de la elasticidad hepática y los distintos estadios de fibrosis obtenidos mediante el análisis histológico.

Las principales limitaciones descritas de la técnica son la presencia de ascitis, ya que las ondas de baja frecuencia no se transmiten a través de líquidos, y la obesidad, pues la grasa de los tejidos interfiere con la difusión de las ondas elásticas y de ultrasonidos, imposibilitando la adecuada realización del procedimiento (129;137;138). También se han reportado problemas técnicos al realizar la exploración a pacientes con espacios intercostales estrechos. Estas limitaciones suponen la principal desventaja frente al Arfi, que además, al contar con un ecógrafo incorporado, aporta un estudio ecográfico simultáneo y permite mayor precisión a la hora de la elección de la RDI. Más recientemente, tratando de paliar estas desventajas se ha comercializado un nuevo dispositivo que permite la exploración en pacientes obesos ya que cuenta con una sonda XL y un nuevo transductor que posibilita que la señal penetre a mayor profundidad y que la medición se realice entre 35-75 milímetros.

d. Otras técnicas

Recientemente ha sido descrita la técnica de elastografía por resonancia magnética, (elasto-RM), para evaluar la rigidez en diversos tipos de tejidos. La elasto-RM utiliza una técnica modificada de contraste de fases sensible a las características de propagación de las ondas acústicas de corte que son generadas en el órgano de interés. La técnica puede ser implementada en un sistema convencional de resonancia magnética añadiendo un hardware y software adecuado y acoplado un inductor neumático o electromecánico para generar la propagación de ondas mecánicas en el hígado. Mediante una secuencia de resonancia magnética con contraste de fases, que utiliza gradientes de movimiento programados que oscilan sincrónicamente con las vibraciones aplicadas, se captura la imagen de las ondas que se propagan en el hígado. Cada adquisición elastográfica proporciona una imagen que representa el desplazamiento causado por la onda

propagada en el medio. Las imágenes de ondas se procesan entonces mediante un algoritmo de inversión desarrollado especialmente para generar imágenes cuantitativas que captan la rigidez del tejido llamadas elastogramas, que al ser tomados en sitios de interés en el órgano proporcionan valores de elasticidad significativos (**figura 18**). La unidad de medida de la elasticidad es el kPa (139;140).

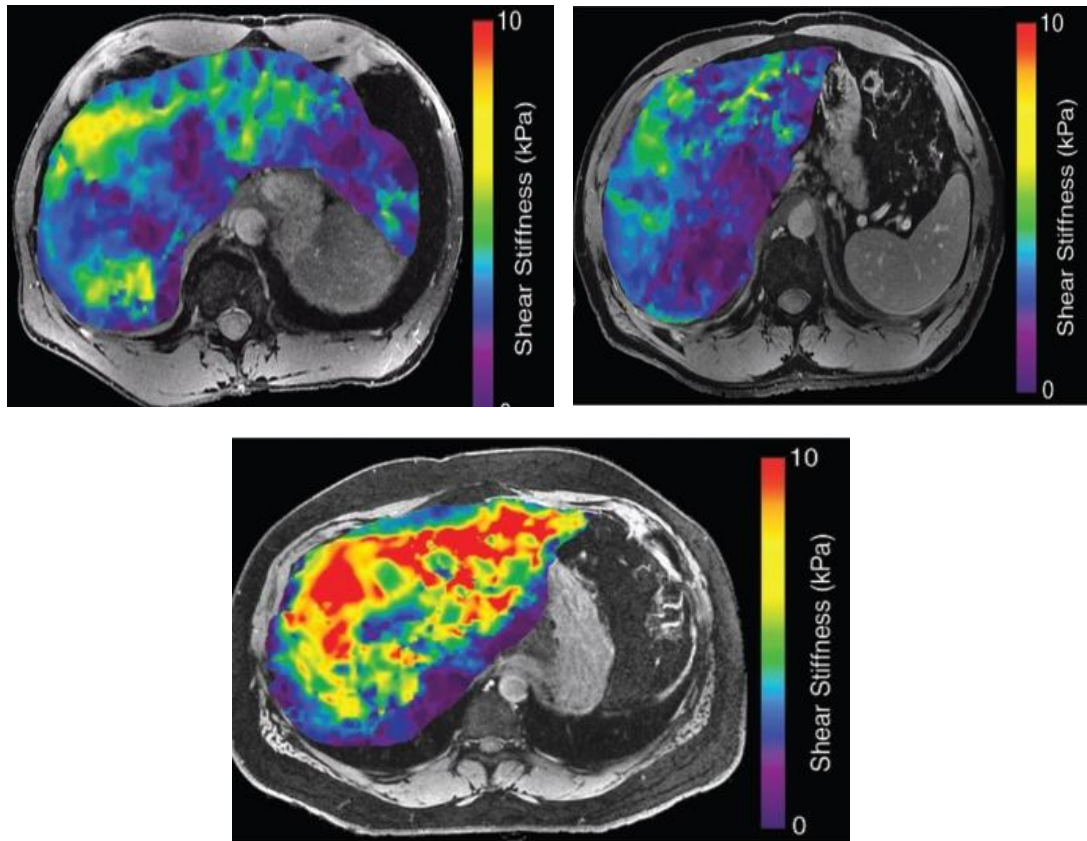


Figura 18: Elastogramas hepáticos.

Algunos autores han encontrado que la elasto-RM muestra una alta sensibilidad y especificidad para discriminar entre estadios intermedios de fibrosis en pacientes con enfermedad hepática crónica (140;141). La técnica, además, puede ser utilizada en pacientes obesos ya que las ondas de compresión tienen una buena penetración. Sin embargo, como principal limitación presenta un elevado coste, así como una disponibilidad todavía escasa en los centros sanitarios. Además, su reciente desarrollo implica que los resultados sobre su utilización en el diagnóstico de fibrosis hepática son

todavía escasos, generalmente basados en un bajo número de pacientes y todavía necesitan ser validados.

Por otro lado, también existe otra técnica de imagen para el diagnóstico de fibrosis hepática basada en la tomografía computerizada (TC), denominada Fibro-Tac. Esta técnica se dio a conocer en un estudio publicado en el año 2008 (142) que, utilizando la biopsia hepática como estándar de referencia, reveló que el análisis óptico digital de imágenes de TC podría ser eficaz para determinar tanto el estadio como la distribución de la fibrosis hepática. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos, este método también presenta limitaciones. Los autores señalan que los resultados podrían verse influenciados por el grado de homogeneidad en la distribución de la fibrosis, así como por la presencia de lesiones focales o de altos grados de esteatosis. Además es importante señalar que la técnica fue desarrollada en pacientes con hepatitis crónica C, y que se utilizó como criterio de exclusión la presencia de esteatohepatitis. También debe mencionarse que su uso es limitado por la exposición a la radiación, así como por su escasa disponibilidad.

iii. Biomarcadores de fibrosis hepática

En los últimos años, el interés en la identificación de biomarcadores serológicos como métodos diagnósticos de fibrosis hepática ha ido en aumento. Además de su naturaleza no invasiva, el error de muestreo y la variabilidad en relación con el analizador es prácticamente nula, por lo que en principio suponen una buena alternativa frente a la biopsia. Por otra parte, las determinaciones pueden realizarse repetidamente en el tiempo, permitiendo por lo tanto un control dinámico de la enfermedad. Estas son las principales razones de que los biomarcadores se presenten como una buena herramienta para la supervisión de la progresión de la enfermedad hepática crónica, ya sea como parte del seguimiento de la historia natural de la misma o bien para el control de los regímenes de tratamiento.

Los biomarcadores séricos son parámetros que nos dan información sobre el estado de fibrosis hepática. Tratan de establecer cuál es el estado de fibrosis y de actividad inflamatoria hepática equivalente a la información que suministra la biopsia. Según *Afdhal y cols* (143) el biomarcador ideal de fibrosis debería ser específico del hígado, sen-

cillo y rápido de realizar, reproducible en cualquier laboratorio e independiente de cambios metabólicos y de alteraciones en la excreción urinaria y biliar. Además, debería estar estrechamente correlacionado con el contenido de la MEC, ser eficaz en todo el abanico de enfermedades hepáticas crónicas y ser suficientemente sensible para discriminar los diferentes estadios de la fibrosis, permitiendo el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta a las terapias antifibróticas. Aunque según esto en la actualidad no hay ningún marcador serológico de fibrosis hepática que cumpla todos estos requisitos, son varias las moléculas que han mostrado buenos resultados en diferentes estudios clínicos.

Tradicionalmente los biomarcadores de fibrosis hepática se clasifican en dos grandes grupos: indirectos y directos. Los indirectos reflejan alteraciones de la función hepática, pero no nos aportan información de la MEC. Por el contrario, los directos reflejan la actividad dinámica de la MEC, indicando en unos casos fibrogénesis y en otros fibrolisis (143). Cuando se usan individualmente estos marcadores son útiles para el diagnóstico o la exclusión de la cirrosis, pero por lo general tienen una precisión limitada para el diagnóstico de fibrosis clínicamente significativa. Por esto, con el objeto de mejorar el rendimiento diagnóstico se han diseñado índices que combinan marcadores, directos, indirectos o la combinación de ambos.

Hasta hace pocos años, la utilización de los marcadores serológicos de fibrosis hepática se circunscribía a pacientes con VHC. Debido a los prometedores resultados obtenidos, el interés en el rendimiento diagnóstico de estos se ha extendido a enfermedades hepáticas de diferente etiología, incluida la EHGNA.

a. Indirectos

Los marcadores indirectos son los clásicos marcadores serológicos bioquímicos obtenidos en el laboratorio clínico a partir de los análisis de rutina que reflejan las alteraciones en la función hepática. Entre ellos encontramos la albúmina, las aminotransferasas, el recuento de plaquetas, la γ -glutamilttransferasa, el colesterol, los triglicéridos, la bilirrubina total y la fosfatasa alcalina, el tiempo de protrombina y los tradicionales marcadores séricos

bioquímicos de inflamación, como la haptoglobina, α 2-macroglobulina y apolipoproteína-A1. A continuación se detallan los más relevantes:

✓ *Albúmina*

La albúmina es una proteína de síntesis hepática, cuya vida media oscila entre los 19 y los 21 días. Su producción depende de la función hepatocelular, pero también de otros factores, como el adecuado aporte de aminoácidos, la presión oncótica plasmática y los valores de algunas citoquinas, principalmente la interleuquina 6, que inhibe su síntesis.

Es la proteína más abundante en el plasma normal, constituyendo hasta dos tercios de las proteínas totales. Por esta razón, las disminuciones del nivel de albúmina debidas a una alteración de su síntesis, como sucede en la malnutrición, en la malabsorción o en la disfunción hepática, o bien por pérdidas, tal como ocurre en la ascitis o la nefropatía, dan como resultado un desequilibrio de la presión oncótica intravascular. Esta pérdida se manifiesta clínicamente con el desarrollo de edemas periféricos (144).

Además del mantenimiento de la presión oncótica, la albúmina ejerce de depósito móvil de aminoácidos para su incorporación a otras proteínas, así como función de proteína transportadora.

En las hepatopatías agudas las concentraciones de albúmina generalmente no se ven afectadas por su gran vida media; sin embargo en las hepatopatías crónicas va disminuyendo de forma progresiva. Su principal utilidad es como marcador pronóstico de la función hepática de los pacientes con cirrosis (144).

✓ *Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1; L-Aspartato: 2-Oxoglutarato Aminotransferasa; AST)*

Alanino aminotransferasa (EC 2.6.1.2; L-Alanina: 2-Oxoglutarato Aminotransferasa; ALT)

Se conocen también como transaminasas, pues son enzimas que transfieren un aminoácido a un cetoácido acepto para dar lugar a aminoácidos distintos de los originales. En el hígado se han detectado no menos de sesenta reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son la AST y la ALT.

Estas enzimas no son específicas del hígado, se encuentran ampliamente distribuidas por el organismo. La AST está constituida por dos isoenzimas, una citoplasmática y otra mitocondrial, presente en los hepatocitos pero también en células de otros tejidos (corazón, músculo esquelético y riñón). La ALT es exclusivamente citoplasmática y es más específica del daño hepático o renal, ya que su concentración en el miocardio o el músculo esquelético es menor. Ambas enzimas se catabolizan en el hígado, siendo la biliar una ruta menor de eliminación (145;146).

Las concentraciones de ambas en plasma reflejan la liberación debida a renovación celular fisiológica o a lesión celular, que provocan alteraciones de la permeabilidad de la membrana citoplasmática que permiten el paso de las enzimas desde el espacio intracelular. Sus valores séricos normales oscilan entre 5 y 33 unidades internacionales por litro (U/L). La AST citoplasmática presenta su actividad más elevada en los hepatocitos, con niveles aproximadamente 7000 veces mayores que en plasma. También la ALT presenta una elevada actividad en los hepatocitos, con niveles celulares aproximadamente 3000 veces mayores que en plasma. La vida media de la AST es 17 horas y de la ALT 47 horas.

Ambas enzimas se han utilizado clásicamente como marcadores de daño hepático, aunque debido a su amplia distribución tisular aparecerán alteradas en otras patologías como afecciones cardíacas o musculares. Los cambios observados en las concentraciones de ambas enzimas ante una lesión hepática pueden explicarse por las diferencias en los niveles de actividad hepática y en la vida media.

La característica principal del daño hepatocelular agudo es el aumento de los niveles de aminotransferasas, que normalmente se sitúan más de ocho veces por encima de los niveles de referencia. En la mayoría de las formas de daño injuria hepática aguda, al principio el nivel de AST será mayor que el de ALT, debido a la elevada actividad de la AST en los hepatocitos. Pasadas 24-48 horas, si el daño persiste la ALT alcanzará concentraciones mayores debido a su mayor vida media.

Por otro lado, en el daño hepático crónico frecuentemente la ALT está más elevada, aunque a medida que la fibrosis progresa la actividad de la AST aumenta gradualmente

debido a que la extensión del daño hepático aumenta la liberación enzimática de las mitocondrias de los hepatocitos. Por tanto, con la evolución de la enfermedad la proporción de AST aumenta con respecto a la de ALT, de modo que para el momento en que se presenta la cirrosis los niveles de AST son a menudo mayores que los de ALT. También se ha postulado que las células sinusoidales hepáticas juegan un papel en el aclaramiento de la AST, lo que explicaría el aumento de su concentración a medida que progresa la enfermedad (145).

Además de sus valores individuales, diversos estudios han correlacionado el ratio AST/ALT (cociente de Ritis) con la etiología y la gravedad del daño hepático en diversas etiologías. Valores >1 se han relacionado con cirrosis hepática y >2 con hepatopatía alcohólica. Se ha visto que el ratio muestra una mejor correlación con el grado de fibrosis que con el nivel de inflamación en pacientes con VHC (147;148).

✓ *Recuento de plaquetas*

La trombocitopenia es una alteración común en los pacientes con hepatopatía crónica, haciéndose más evidente a medida que progresa la enfermedad, de manera que aparece de forma frecuente en los casos con cirrosis.

El factor causal de la disminución del recuento de plaquetas que parece tener más importancia es la disminución en la producción de trombopoyetina, una citoquina producida en el hígado la cual es la responsable de la maduración de los megacariocitos y de la formación de las plaquetas maduras. Tal como puede observarse en la **figura 19**, se ha comprobado que en pacientes trasplantados los niveles séricos de trombopoyetina aumentan de forma paulatina en el período post-trasplante, con la consecuente elevación de las cifras de plaquetas (149).

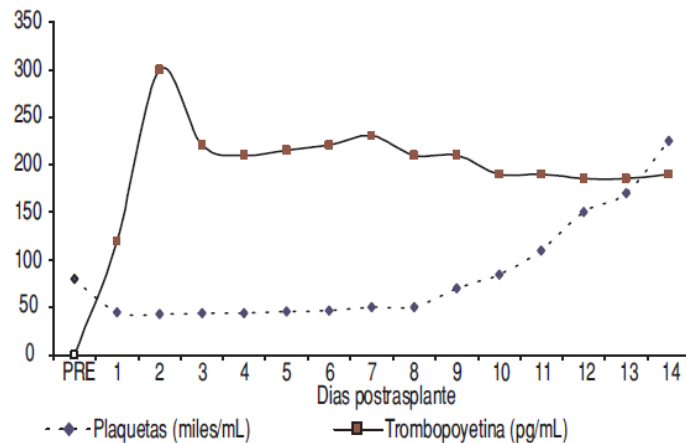


Figura 19: Variación en el recuento de plaquetas en combinación con aumento brusco y la posterior normalización de las concentraciones de trombopoyetina en pacientes sometidos a trasplante hepático. Tomada de *Téllez-Ávila y cols (149)*.

Por otro lado es conocido que, en fases avanzadas de la hepatopatía, cuando aparece hipertensión portal y esplenomegalia congestiva, el bazo puede llegar a secuestrar el 90% de las plaquetas circulantes, traduciéndose esto en una trombocitopenia. Sin embargo, a pesar de ello estas plaquetas son capaces de participar de manera activa en el proceso de hemostasia (149).

- ✓ *γ-Glutamiltransferasa (EC 2.3.2.2; γ-Glutamil-Péptido: Aminoácido γ-glutamyltransferasa; GGT)*

La GGT es una enzima que cataliza la transferencia de grupos γ -glutamil de un péptido a otro, o bien de un péptido a un aminoácido, a si misma o al agua. Generalmente está unida a la membrana plasmática de las células que muestran una gran capacidad de excreción o absorción, como los hepatocitos (en el lado canalicular), los túbulos renales proximales, las células epiteliales intestinales y las de la próstata. Existen varias isoenzimas, que no son específicas de tejido. La liberación celular de GGT está relacionada principalmente con la liberación de fragmentos de membrana, siendo el hígado la mayor fuente de actividad (146).

La GGT muestra marcados cambios según la edad y el sexo, y tiene una vida media de entre siete y diez días, aunque en la hepatopatía alcohólica esta aumenta hasta 28 días.

Su determinación está indicada principalmente para la detección de daño hepático, sin ser específica de ningún tipo etiología. Su concentración tiende a ser más elevada en los trastornos obstructivos y en las lesiones hepáticas ocupantes que en el daño de los hepatocitos. Aunque es un marcador sensible, su especificidad es baja y su valor predictivo de hepatopatía es solo del 32%, por lo que su uso no está indicado para el cribado ni la evaluación inicial de pacientes con enfermedad hepática. Su mayor utilidad reside en determinar la causa del aumento de la fosfatasa alcalina, corroborando el aumento de ambas la existencia de un patrón colestásico (146).

También se ha documentado un aumento de sus niveles en el 60-70% de los individuos que abusan crónicamente del alcohol, aunque no está muy clara la correlación con la cantidad ingerida. Por otro lado existe un porcentaje de bebedores habituales que presentan concentraciones normales de GGT (145;146).

Así mismo los niveles de GGT se ven incrementados con el consumo de ciertos fármacos, particularmente los que son inductores enzimáticos, como por ejemplo la fenitoína y la carbamazepina.

✓ *Bilirrubina total*

La bilirrubina es el metabolito más importante del grupo hemo, que se encuentra en la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos. Los individuos adultos sanos producen entre 250 y 350 mg de bilirrubina al día aproximadamente, cerca del 85% derivada de la degradación de los glóbulos rojos senescentes en las células del sistema mononuclear fagocítico en el bazo. Esta bilirrubina, denominada indirecta o no conjugada pasa al torrente sanguíneo por difusión pasiva y debido a que es altamente insoluble en agua, la mayor parte es transportada por la albúmina, existiendo tan solo una pequeña porción libre. Por acción de varias proteínas transportadoras se produce la captación de la bilirrubina al interior del hepatocito, donde tiene lugar la conjugación con ácido glucurónico. La bilirrubina conjugada, también denominada directa, es hidrosoluble, lo que le permite pasar a la bilis y posteriormente al intestino, donde será transformada por la flora intestinal en urobilinógeno y estercobilina (145).

La elevación de los niveles séricos de bilirrubina se produce cuando aumenta su producción, como es el caso de las anemias hemolíticas, cuando disminuye la captación o conjugación hepática, como sucede en la enfermedad de Gilbert o en el síndrome de Crigler-Najjar, debido a la existencia de colestasis intra o extrahepática o por lesión hepatocelular, que es lo que ocurre en las hepatopatías crónicas. Las elevaciones de los valores de bilirrubina conjugada son muy específicas de las enfermedades hepatobiliares.

Los niveles de bilirrubina pueden ser normales en muchos pacientes con hepatopatía crónica, incluso en aquellos que presentan cirrosis compensada, pero a medida que progresa la enfermedad se van elevando de forma gradual.

La hiperbilirrubinemia sérica constituye el sustrato bioquímico de la ictericia de la piel y mucosas típicamente observada en los pacientes hepatópatas.

- ✓ *Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1; Ortofosfórico-Monoester Fosfohidrolasa [Alcalina Optimizada]; ALP)*

La ALP representa a una familia de enzimas codificadas por diferentes genes. Las formas más abundantes de ALP en plasma están codificadas por un único gen que se encuentra en el cromosoma 1 y que produce la isoenzima no específica de tejido que se encuentra en riñón, hígado y hueso; estas formas se diferencian en sus cadenas laterales de carbohidratos. Otros tres genes, situados en el cromosoma 2, codifican la fosfatasa alcalina placentaria, intestinal y la de células germinales, también denominada *placental-like* por su similitud con la placentaria.

En las células, la ALP se encuentra fundamentalmente unida a membranas celulares, donde parece estar implicada en la escisión de compuestos que contienen fosfato y pueden facilitar el movimiento de sustancias a través de las membranas celulares. La ALP hepática, producida por los hepatocitos, se encuentra unida a la superficie canalicular de los mismos. La vida media de la isoenzima hepática de la ALP es de tres días (146).

Parece haber diferentes mecanismos de liberación de ALP desde las células, lo que hace que existan diferentes formas de ALP en plasma. Con el daño hepático la síntesis de ALP aumenta, pero los ácidos biliares disuelven fragmentos de la membrana canalicular con

enzimas unidas. Mientras que en suero normal habitualmente se observa una única forma de ALP hepática, cuando existe daño hepatobiliar se pueden observar tanto el producto normal como la forma unida a membrana unida a lipoproteínas.

Cuando existe un aumento de la ALP puede establecerse el origen recurriendo a la separación electroforética de las isoenzimas. Sin embargo, en la práctica clínica suele ser suficiente determinar la GGT para confirmar el origen hepático.

La elevación de los niveles de ALP hepática se produce mayoritariamente debido a trastornos que cursan con colestasis; a mayor grado de colestasis mayor es el aumento de ALP, siendo las colestasis de tipo obstructivo las responsables de los mayores aumentos. Con menor frecuencia se producen elevaciones de la ALP por lesiones hepatocelulares, como es el caso de la hepatopatía crónica, y siempre aumentos más moderados que los producidos por procesos colestásicos (146).

✓ *Tiempo de protrombina*

El hígado tiene un papel clave en el proceso de la hemostasia, ya que representa el órgano en el cual se sintetizan la mayoría de los factores de la coagulación así como sus inhibidores, además de las sales biliares, las cuales son necesarias para la absorción de vitamina K. Además, el hígado elimina de la circulación los factores de la coagulación activados. Por tanto, la enfermedad hepática crónica se asocia tanto con procesos hemorrágicos como con estados de hipercoagulabilidad.

El hígado sintetiza el fibrinógeno y los factores de coagulación dependientes de vitamina K (II, VII, IX y X), así como los factores V, VIII, XI y XII. Clásicamente se ha relacionado la disminución de los factores de la coagulación con la gravedad del daño y el pronóstico de enfermedades hepáticas.

En los pacientes con enfermedad hepatocelular severa se observa una disminución en la síntesis y la activación de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K, especialmente el factor VII. Con el mayor avance de la enfermedad, los factores XI y XII también se ven afectados. Además, los pacientes con enfermedad hepática colestásica tienen disminuida la secreción de sales biliares, necesarias para la absorción de vitamina

K. En estos pacientes, a diferencia de aquellos con enfermedad hepatocelular, el TP puede ser corregido mediante la administración de vitamina K.

El tiempo de protrombina (TP) se encuentra generalmente sin alteraciones o ligeramente prolongado en los estadios tempranos de la enfermedad hepática debido a la gran reserva funcional de las proteínas de la coagulación existente en el hígado. Sin embargo, a medida que avanza la hepatopatía, la síntesis deficiente de los factores de coagulación se ve reflejada en el alargamiento del TP, lo cual, en conjunción con otras evidencias de hepatopatía, es un hallazgo importante y una medida de la severidad de la enfermedad. Este es el motivo de que el TP se utilice en varios modelos pronósticos de la gravedad de la hepatopatía (149).

Existen estudios que han demostrado una buena correlación del TP con el grado de fibrosis hepática determinado mediante biopsia en hepatopatías crónicas de diversas etiologías (150).

✓ *Lípidos*

El hígado es el principal centro de síntesis del colesterol, las apolipoproteínas y todas las lipoproteínas circulantes excepto los quilomocrones. A medida que la enfermedad hepática avanza y la fibrosis progresa, aumenta la resistencia al flujo sanguíneo en el sistema venoso portal, afectando de manera negativa en la función de síntesis y metabólica del hígado. Por tanto, no es sorprendente que en las hepatopatías crónicas pueda observarse una reducción de los niveles séricos de lípidos y lipoproteínas, aunque normalmente esto no se hace evidente hasta alcanzar el estadio de cirrosis (145).

La apolipoproteína A (ApoA) es el componente proteico principal de la HDL, siendo sus dos constituyentes mayoritarios la apolipoproteína A tipo 1 (apoA-1) y la apolipoproteína A tipo 2 (apoA-2) y comprendiendo la apoA-1 alrededor del 75% del total. La apoA-1 se sintetiza en hígado e intestino y es un activador de la enzima lecitin colesterol-aciltransferasa, la cual esterifica el colesterol en el plasma. El daño hepatocelular se acompaña de una disminución de ApoA-1, que conlleva por tanto una reducción de los niveles de la enzima a la que activa (151).

La ApoA-1 se encuentra atrapada en la matriz extracelular y diversos estudios han relacionado su concentración con el grado de fibrosis hepática, lo que ha llevado a que su determinación esté incluida en algunos índices matemáticos que estiman el grado de fibrosis hepática que veremos más adelante (152;153).

Aunque las anomalías lipídicas son comunes en las enfermedades hepáticas, raramente son útiles para el diagnóstico.

✓ *α2-Macroglobulina*

La α2-macroglobulina es la principal proteína no inmunoglobulina más grande del plasma, con un peso molecular de 725000 daltons. Se considera un inhibidor de las proteasas, ya es capaz de inactivarlas mediante la formación de enlaces covalentes y complejos con ellas; su propia conformación queda alterada de este modo, lo cual aumenta la eliminación por el sistema retículoendotelial. Desarrolla por tanto una función importante en el mantenimiento del equilibrio de la proteólisis. El espectro de inhibición varía muy ampliamente, incluyendo casi todos los tipos de proteasas portadores de serina, grupos carboxilo, tiol y metales (144).

Esta proteína, que se considera un reactante de fase aguda, es producida localmente por los hepatocitos y las células estrelladas en los focos fibróticos e inflamatorios. Además, su capacidad de inhibir a las proteasas implica la inhibición del catabolismo de las proteínas de la matriz extracelular, contribuyendo por tanto a la progresión de la fibrosis en el hígado. Estos datos sugieren que la α2-macroglobulina desempeña un papel importante en el metabolismo de colágeno en las enfermedades hepáticas (153;154).

Diversos estudios han demostrado un aumento de las concentraciones de α2-macroglobulina en la fibrosis hepática. Esta correlación positiva que muestra su concentración con el grado de fibrosis, al contrario que ocurre con la mayoría de proteínas de síntesis hepática, podría explicarse por las diferentes funciones de las citoquinas durante la fibrogénesis y la respuesta de fase aguda. Por ejemplo, el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) estimula la síntesis de α2-macroglobulina y por el

contrario disminuye la de la haptoglobina, otra proteína cuya concentración se muestra disminuida en la fibrosis hepática (152;153).

✓ *Haptoglobina*

Es una proteína cuya función es combinarse con la hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos para mantener los depósitos de hierro corporal y de proteínas. Migra en la fracción α_2 del patrón electroforético de las proteínas plasmáticas. La vida media de la haptoglobina circulante, libre de hemoglobina, es de cuatro días. Los complejos haptoglobina-hemoglobina son eliminados de la circulación en unos minutos por el sistema retículo-endotelial, donde la hemoglobina será degradada.

La haptoglobina se considera un reactante de fase aguda, por lo que sus niveles séricos aumentan en respuesta al estrés, a la inflamación o a la infección. Tras un episodio hemolítico, las concentraciones de haptoglobina disminuyen a medida que los complejos de hemoglobina son eliminados de la circulación.

Por otro lado, al igual que ocurre con otras proteínas, la concentración de haptoglobina se ve disminuida en las hepatopatías, cuando la capacidad de síntesis hepática se altera (144). Se ha constatado una fuerte asociación negativa de los niveles de haptoglobina y el grado de fibrosis hepática, de manera independiente a procesos hemolíticos, hiperesplenismo o insuficiencia hepática (152).

b. Directos

Su descubrimiento ha venido vinculado directamente a los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la generación de la fibrosis hepática. La fibrosis hepática progresa cuando se produce un desequilibrio entre la degradación y la producción de la MEC. Los marcadores séricos directos reflejan el metabolismo de la MEC y los cambios cualitativos y cuantitativos en sus macromoléculas. Algunos de estos marcadores reflejan fibrogénesis y otros fibrolisis, por lo que la combinación de ambos permite obtener una visión dinámica del proceso fibrótico en el hígado. En este grupo de biomarcadores se incluyen productos de la síntesis o la degradación del colágeno,

enzimas implicadas en la biosíntesis o degradación de la matriz, así como glicoproteínas de la matriz extracelular, proteoglicanos y glicosaminoglicanos.

Ninguno de los marcadores directos disponibles en la actualidad se ajusta completamente los criterios ideales. En particular, ninguno es específico del hígado, y todos se ven afectados por los cambios en su aclaramiento, metabolismo y excreción. La vida media en suero de estas moléculas es corta, por lo que sus concentraciones probablemente reflejan la actividad del metabolismo de la MEC. Dado que la tasa de reposición de MEC está relacionada tanto con la deposición y eliminación de nueva MEC, como con la remodelación de la MEC ya establecida, los niveles séricos de los biomarcadores directos probablemente reflejan tanto la actividad del proceso como el total de masa de MEC sujeta a metabolismo. Esto es apoyado por al menos tres hechos; en primer lugar, los niveles de estos marcadores son a menudo más elevados en condiciones con rápida progresión de la fibrosis (por ejemplo en hepatitis alcohólica grave o en las hepatitis virales más activas) y además sus concentraciones pueden estar ya elevadas antes de la deposición de MEC. En segundo lugar, los niveles tienden a caer en respuesta al tratamiento de la enfermedad subyacente, a menudo antes de que exista una reducción apreciable en la etapa de la fibrosis. Y en tercer lugar, en las hepatopatías crónicas las elevaciones de algunos de estos biomarcadores se correlacionan de forma independiente con el grado de fibrosis, en lugar de con las características bioquímicas o histológicas de inflamación (143).

El hecho de que las concentraciones de algunos de estos biomarcadores correlacionen de manera muy significativa con el grado de inflamación histológica y con los niveles de transaminasas, refleja la importancia que tienen los procesos inflamatorios y necróticos del hígado en la regulación positiva de la fibrogénesis.

Los biomarcadores directos de fibrosis hepática pueden ser subdivididos en tres grupos: los que reflejan la deposición de MEC, aquellos que informan de la eliminación de MEC y un tercer grupo en el que estarían aquellos en los que no está clara la relación con la deposición o eliminación de MEC. En la **tabla 2** que aparece a continuación puede observarse la clasificación de los principales biomarcadores directos. Además, en la **figura**

20 se ilustra el proceso de síntesis de los biomarcadores directos en el contexto del proceso de la fibrogénesis hepática.

	Specimen			Method
	Serum	Urine	Liver biopsy	
Extracellular matrix-related enzymes				
Enzyme				
Prolyl hydroxylase	+	-	+	Radioenzymatic, RIA
Monoamine-oxidase	+	-	(+)	Enzymatic
Lysyl oxidase	+	-	+	RIA
Lysyl hydroxylase	+	-	-	RIA
Galactosylhydroxylslyl-glycosyltransferase	+	-	+	RIA
Collagen peptidase	+	-	+	Enzymatic
N-Acetyl- β -D-glucosaminidase	+	+	+	Enzymatic
Collagen fragments and split products				
Type of collagen				
Type I -procollagen				
N-terminal propeptide (PINP)	+	-	+	ELISA
C-terminal propeptide (PICP)	+	-	+	RIA
Type III-Procollagen				
Intact Procollagen	+	-	-	RIA
N-terminal propeptide (P III NP)	+	-	-	RIA
Complete propeptide (Col 1-3)	+	-	-	RIA
Globular domain of Propeptide (Col-1)	+	-	-	RIA
Type IV-Collagen				
NC1-fragment (C-terminal)	+	+	-	ELISA, RIA
crosslinking domain (PIVP)	+	+	-	RIA
7S domain ("7S Collagen")	+	+	+	RIA
Type VI-Collagen				
Glycoproteins and matrix-metalloproteinase (inhibitors)				
Marker				
Laminin, P1-fragment	+	-	-	RIA, EIA
Undulin	+	-	-	EIA
Vitronectin	+	-	-	EIA
Tenascin	+	-	-	ELISA
YKL-40	+	-	+	RIA/ELISA
(pro)matrix metalloproteinase (MMP-2)	+	-	-	ELISA
Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2)	+	-	-	ELISA
sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule, sCD54)	+	-	-	ELISA
sVCAM-1 (soluble vascular cell adhesion molecule, sCD106)	+	-	-	ELISA
Glycosaminoglycans				
Marker				
Hyaluronic acid (Hyaluronan)	+	-	-	Radioligand assay ELISA
Molecular mediators				
Marker				
Transforming growth factor β (TGF- β)	+	-	+	ELISA
Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)	+	?	+	ELISA

Tabla 2: Clasificación de los biomarcadores directos de fibrosis hepática, así como el tipo de muestra donde se determinan habitualmente y el método de medida. Tomado de *Gressner y cols* (11).

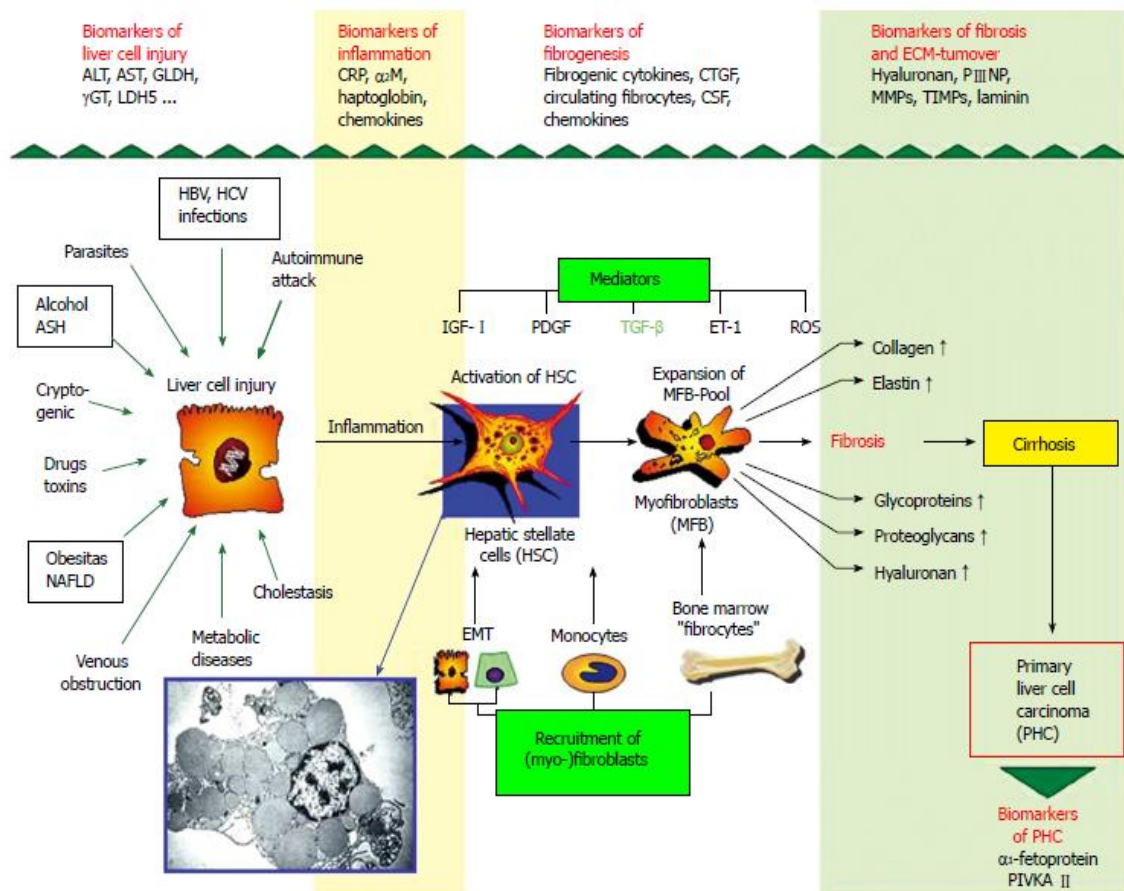


Figura 20: Secuencia patogénica de la activación fibrogénica de las HSC a miofibroblastos que conduce a la fibrosis, cirrosis y en último estadio al carcinoma hepatocelular primario. En este contexto se observa la síntesis de los principales biomarcadores de fibrosis hepática en función del estadio de la enfermedad, incluidos los biomarcadores directos. ASH: esteatohepatitis alcohólica; ET-1: endotelina-1; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico; NASH: esteatohepatitis no alcohólica; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; ROS: especies reactivas de oxígeno; TGFβ: factor de crecimiento transformante β; PIVKA-II (antagonista II de la proteína inducida por la ausencia de vitamina K). Tomada de *Gressner y cols (11)*.

A continuación se describen los biomarcadores directos más relevantes:

✓ Ácido Hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano de alto peso molecular, no sulfatado y de cadena lineal. Está presente en los espacios extracelulares, pericelulares e intracelulares. Es un polímero lineal formado por la repetición de unidades de [ácido D-glucurónico (1-β-3) N-acetil-D-glucosamina (1-β-4)]_n (**figura 21**). El número de disacáridos

presentes en cada molécula es 2000-25000, lo que hace que cada molécula de HA pueda alcanzar un peso molecular de 10^4 - 10^7 daltons (155;156).

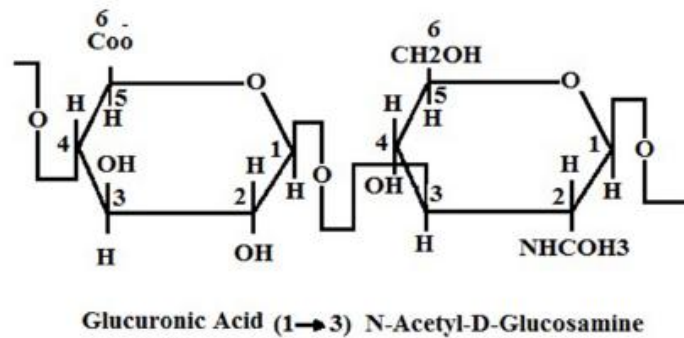


Figura 21: Estructura de una molécula de HA. Tal como puede observarse existe un enlace glicosídico entre las moléculas de Ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Tomada de *Rostami y cols* (155).

El HA es un componente importante del tejido conectivo, por lo que está presente en el cordón umbilical, el líquido sinovial, la piel y el humor vítreo. Además, el HA existe en diferentes partes del cuerpo, y en diferentes formas, tamaños y concentraciones: libremente en el sistema linfático y en el torrente sanguíneo, en la MEC y también unido a receptores específicos en superficies de las células. Aproximadamente la mitad del HA está presente en la piel, y una cuarta parte en el esqueleto, las articulaciones y los ligamentos. El resto se distribuye entre otros órganos, como músculo, pulmón, cerebro, hígado, y riñón (155).

El HA posee una serie de peculiaridades que lo diferencian del resto de glicosaminoglicanos. Estas diferencias incluyen la presencia de grupo sulfato, cadenas moleculares de tamaño corto, así como la ruta de su biosíntesis. La mayoría de los glicosaminoglicanos se sintetizan en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, sin embargo el HA se sintetiza por enzimas especiales, las ácido hialurónico sintetetas, que se encuentran en las superficies interiores de las membranas plasmáticas de algunos tejidos, tales como las células de revestimiento sinovial o las HSC. Las moléculas resultantes pasan a través de la membrana plasmática y en última instancia son secretadas al espacio extracelular (155).

El hígado es el principal tejido responsable de la síntesis y la eliminación de la forma circulante de esta macromolécula; se sintetiza principalmente por las células estrelladas hepáticas y sirve como componente integral de la MEC, y es degradado por las células endoteliales sinusoidales. La degradación de HA se produce localmente, en aproximadamente un 20-30% de su totalidad, y el sistema linfático drena el resto. La vida media de HA varía entre los órganos, así como entre los diferentes subtipos: 2-5 minutos en la sangre, <1 día en la piel y 2-3 semanas en los cartílagos (155).

Entre los diversos órganos que participan en la degradación del HA, el hígado es uno de los más importantes. Como se mencionó anteriormente, las células endoteliales sinusoidales son las principales responsables de su metabolismo hepático. Estas células también contribuyen a la rápida eliminación del HA del torrente sanguíneo. Aunque la principal vía de eliminación es la hepática, también se elimina HA a través del riñón y el bazo.

La concentración sérica de HA depende principalmente de los cambios morfológicos que acompañan a la capilarización sinusoidal hepática en la evolución de las enfermedades hepáticas crónicas a cirrosis (156). Es por ello, que aunque sus concentraciones aumentan a medida que la fibrosis progresa, los mayores niveles se observan en los pacientes cirróticos.

En cuanto a la aplicación clínica de la determinación de los niveles de HA en la hepatopatía crónica existen controversias entre los diversos artículos publicados, así como entre los diversos tipos de hepatopatías. En referencia a la hepatopatía por VHC, aunque con diferencias en los puntos de corte aportados, los estudios concluyen de forma general que la principal ventaja del HA reside en su capacidad para descartar fibrosis severa o cirrosis pues presenta elevados valores predictivos negativos. Niveles inferiores a 60 ng/mL permiten descartar cirrosis hepática con valor predictivo del 99% (157;158). Por otro lado, en cuanto a la EHGNA, diversos estudios sugieren que el HA es buen predictor de fibrosis, mostrando una buena correlación en comparación con otros marcadores (155).

✓ *Péptido aminoterminal del Procolágeno tipo III*

El colágeno, componente principal en el desarrollo de la fibrosis hepática, es producido y secretado en una forma precursora denominada procolágeno, que consta de grandes dominios adicionales conocidos como propéptidos del procolágeno. Una vez que el procolágeno se secreta, mediante una escisión enzimática se liberan los propéptidos amino y carboxi terminales del procolágeno, transformándose así el procolágeno en colágeno (**figura 22**). Así, la cantidad de propéptidos es proporcional a la cantidad de colágeno formado, y pueden calificarse como índices de la síntesis de colágeno. Por otro lado, las moléculas de colágeno formadas de esta manera se ensamblan para formar las fibras de colágeno.

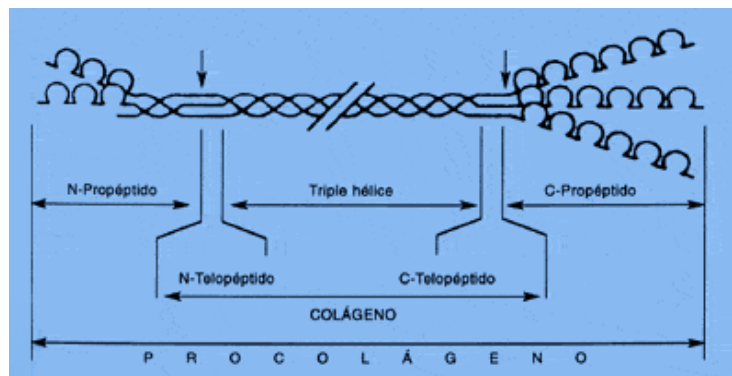


Figura 22: Puede observarse de forma esquemática la relación estructural entre el procolágeno, colágeno y los propéptidos amino y carboxiterminales. Tomada de www.infobioquimica.com.

Por tanto, el propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III (PIIINP) es el producto que se libera durante la conversión del procolágeno tipo III en colágeno tipo III. Esta molécula, que tiene un peso molecular de 42 kilodaltons, es un componente importante del tejido conectivo que aparece en suero durante los procesos de deposición y remodelación de la MEC (143).

Según han demostrado diversos estudios, la concentración relativa de PIIINP en la membrana basal es mayor durante la fibrogénesis hepática, seguida por un aumento de sus niveles en suero, por lo que su concentración muestra correlación con el proceso de generación de la fibrosis hepática. Por ello, el PIIINP se ha postulado como un buen

predictor de fibrosis, aunque sin embargo, su capacidad para diferenciar las etapas iniciales de la fibrosis de la cirrosis hepática parece ser menor que la del HA. Esto podría ser debido a que el PIIINP refleja mejor el proceso de fibrogénesis y la inflamación que la fibrosis ya establecida, al contrario de lo que ocurre con el HA (156).

Por otro lado, es conocido que en el hígado humano sano el colágeno tipo I y el tipo III son los más abundantes, y que la composición del tejido fibrótico hepático varía dependiendo de la madurez en que se encuentre. El tejido fibrótico inmaduro consiste predominantemente en colágeno tipo III, mientras que el tejido fibrótico maduro tiene una relación de colágeno tipo III:I menor, pues predomina el tipo I (151). Esto también estaría en relación con el hecho de que los pacientes que presentan altas concentraciones de PIIINP estén involucrados en un proceso activo de fibrogénesis hepática.

También se ha observado que en pacientes con VHC tratados con interferón, que tiene un efecto antifibrótico, los niveles de PIIINP disminuyen, lo que enfatiza su relación con el proceso de generación de fibrosis hepática (159).

Es importante tener en cuenta que el PIIINP, al igual que ocurre con la mayoría de los marcadores de fibrosis hepática, no es un biomarcador específico de hígado. Son conocidas sus elevaciones en la fibrosis pulmonar, la acromegalia, enfermedades reumáticas y la pancreatitis crónica (6).

✓ *Inhibidor Tisular de la Metaloproteasa tipo 1*

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) son un grupo de proteínas involucradas en la degradación de la MEC.

Las MMPs son enzimas que se producen intracelularmente y son secretadas en forma de proenzimas, que requieren un proceso de escisión por mecanismos de la superficie celular para tener actividad funcional. Estas enzimas participan de manera directa en la eliminación de la MEC, pues son las principales encargadas de la degradación del colágeno. Por otro lado, la acción de MMPs se contrarresta con la acción de sus inhibidores tisulares, las TIMPs.

La acción de las MMPs y las TIMPs es muy importante para el metabolismo de la MEC, ya que no solo conlleva su degradación, si no que permite la deposición de nueva matriz. Sin embargo, la relación es compleja y además de esta función, desarrollan otras múltiples actividades, que incluyen la activación de factores de crecimiento, acción efectora sobre la proliferación celular, así como la inhibición de procesos de apoptosis. Así, la asociación entre sus concentraciones y la fibrosis hepática no está totalmente establecida (143).

La hipótesis principal es que la fibrogénesis hepática se asocia con la interrupción de la degradación de la MEC mediada por las células estrelladas hepáticas. En cultivos in vitro con HSC se ha observado una reducción de los niveles de MMPs, mientras que por el contrario las concentraciones de TIMPs aumentan, lo que promueve la acumulación de MEC. Esto se corresponde a los hallazgos en hígados cirróticos humanos, en los que se ha demostrado el aumento de expresión de TIMPs. Si aumentan los niveles de TIMPs, disminuirán los de las proteínas a las que inhiben, las MMPs; dado que, tal como ya se ha comentado, estas enzimas son las encargadas de regular la eliminación de colágeno, esto contribuirá a la acumulación de colágeno en el contexto del hígado fibrótico (143).

Por lo tanto, parece que el desequilibrio entre MMPs y TIMPs afecta a la tasa de progresión de la fibrosis, y su estimación se correlaciona con el estadio de fibrosis. Los resultados de los estudios de estos marcadores, sin embargo han sido variables en función de la MMP y/o TIMP evaluada.

Una de las TIMPs más ampliamente estudiadas ha sido la tipo 1. Varios estudios han reportado su correlación con el grado de fibrosis hepática, demostrando su utilidad como biomarcador en este campo (160;161). También *Boeker y cols* demostraron la capacidad de TIMP-1 para la identificación de pacientes con etapas tempranas de fibrosis (162).

✓ *Factor de crecimiento transformador beta (TGF- β)*

Las citoquinas mediadoras en el proceso de fibrogénesis hepática también se han evaluado como biomarcadores en un número limitado de estudios con resultados mixtos.

Una de las citoquinas más estudiadas es el TGF- β , el estímulo dominante para la producción de la matriz extracelular por las células estrelladas hepáticas. Es una citoquina

pleiotrópica implicada en la regulación y diferenciación del crecimiento tisular, producción de MEC y en la respuesta inmune. Se han identificado tres isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$), pero solo la $\beta 1$ ha sido vinculada a la fibrogénesis hepática.

Claramente el TGF- β juega un papel principal en proceso de generación de fibrosis hepática, ya que su activación induce la transformación de las HSC en miofibroblastos, estimula la síntesis de MEC y regula a la baja su degradación, y puede promover la destrucción de los hepatocitos por la inducción de apoptosis. Todo esto explica que actualmente el TGF- β sea el eje principal de ensayos clínicos para la búsqueda de terapias antifibróticas (6).

Diversos estudios han encontrado una correlación significativa de las concentraciones de TGF- β con la gravedad de la enfermedad hepática y lo sugirieron por tanto como un biomarcador no invasivo óptimo de la fibrosis (163;164).

Sin embargo, también se ha observado una correlación significativa con la actividad de las transaminasas, y además se ha demostrado que cantidades importantes de TGF- β localizadas en los hepatocitos se liberan cuando existe permeabilización de los mismos, lo que indicaría que el TGF- β también podría comportarse como un marcador de necrosis en lugar de fibrogénesis (6).

✓ YKL-40

YKL-40 (Chondrex) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las quitinasas, concretamente a las 18-glicosilhidrolasas. La proteína se ha denominado YKL-40 a partir de su peso molecular (40 kilodaltons) y el código de una letra para sus tres aminoácidos N-terminales (tirosina, lisina y leucina) (165).

Esta proteína se produce por una amplia variedad de células, incluyendo condrocitos, células sinoviales, macrófagos activados, neutrófilos, y en particular por las células situadas en tejidos con aumento de la remodelación/degradación o inflamación de la matriz extracelular, tales como las células estrelladas hepáticas.

Aunque la función fisiológica de YKL-40 no se conoce con exactitud, se sabe que es factor de crecimiento para fibroblastos, condrocitos y células sinoviales, y que actúa como quimioatrayente para las células endoteliales vasculares. Además es capaz de modular la morfología de las células endoteliales mediante la promoción de la formación de túbulos ramificados, lo que indica que podría tener un papel en la angiogénesis (165).

Estudios hemodinámicos han demostrado que YKL-40 se libera en el área hepatoesplénica y estudios inmunohistoquímicos en biopsias hepáticas han mostrado tinción positiva para YKL-40 en áreas con fibrosis, particularmente en áreas con fibrogénesis. Además se cree esta proteína también podría ser secretada directamente por las HSC, ya que en ellas se ha encontrado ARN mensajero de YKL-40 (166).

Diversos estudios han demostrado la elevación de YKL-40 en pacientes con enfermedad hepática crónica, así como una correlación significativa con el grado de fibrosis, por lo que se ha propuesto como biomarcador de fibrosis. Se ha reportado una sensibilidad y especificidad cercanas al 80% en pacientes con VHC. Además se ha observado que las concentraciones séricas de esta proteína correlacionan con otros productos de la MEC secretados por las HSC y fibroblastos, como el PIIINP, HA y TIMP-1 (165;166).

✓ *Laminina*

La laminina fue identificada por primera vez en 1979 en un fibrosarcoma murino. La molécula es un gran complejo, de aproximadamente 850 kilodaltons, conformado por tres cadenas polipeptídicas denominadas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$, entrelazadas mediante puentes disulfuro formando una estructura asimétrica en forma de cruz característica (**figura 23**).

Es una de las principales glicoproteínas de la membrana basal y participa en una serie de fenómenos biológicos tales como la adhesión, migración, diferenciación celular y el crecimiento, la respuesta inflamatoria y el mantenimiento del citoesqueleto mediante su unión a varios componentes de la matriz.

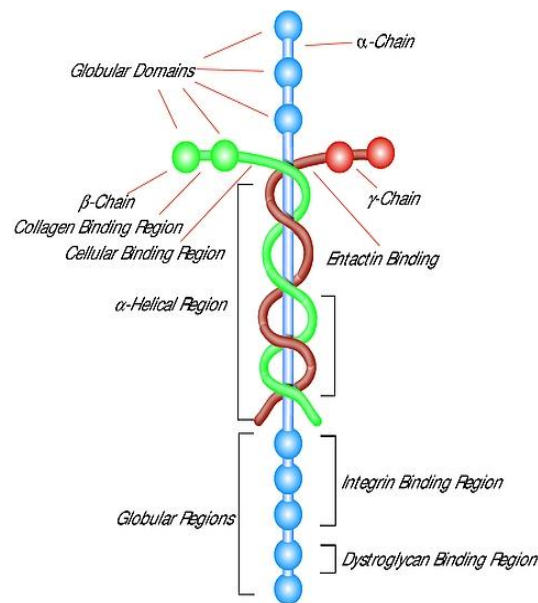


Figura 23: Estructura de la laminina. Tomada www.epidemiologiamolecular.com

Existen receptores de unión para la laminina en la superficie de una amplia gama de células, tales como plaquetas, células musculares, neutrófilos, células endoteliales y hepatocitos. Además se ha demostrado la existencia de una clase de receptores transmembrana para la laminina conocidos como integrinas, que están implicados en mecanismos de comunicación célula-célula, célula-matriz e incluso de adhesión célula-patógeno. Se han descrito proteínas de unión a laminina en agentes patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y *Candida albicans* (167).

En el hígado normal, la laminina se encuentra alrededor de los vasos y conductos biliares, donde se identifican las membranas basales. En este órgano, la glicoproteína también está implicada en actividades intracelulares tales como la diferenciación normal de los conductos biliares, la expresión génica del ARN mensajero de la albúmina en los hepatocitos o la regeneración con la organización lobular normal después de una hepatectomía parcial. La laminina es sintetizada por los hepatocitos y las células sinusoidales, principalmente por las células estrelladas hepáticas.

Con el desarrollo de la cirrosis hepática, se produce la deposición de laminina y colágeno, tanto a lo largo de las fibras de fibrosis septal y sinusoides subendoteliales como en el

espacio de Disse. En este último sitio esto va a determinar la formación de una verdadera membrana basal a lo largo de los sinusoides, fenómeno conocido como “capilarización del espacio de Disse”. Por otro lado, además del aumento de la producción de laminina en el hígado, se produce una disminución de su degradación por parte de las células endoteliales.

Debido a esta relación entre la deposición tisular de laminina y la fibrosis avanzada, los niveles séricos de laminina se han utilizado por varios autores como un parámetro no invasivo para evaluar la fibrosis hepática en pacientes con distintos tipos de hepatopatía (167).

c. Índices derivados de algoritmos matemáticos

Con el objetivo de mejorar la precisión respecto al uso de biomarcadores aislados en la identificación de los distintos grados de fibrosis hepática, especialmente la fibrosis significativa y la cirrosis por su trascendencia clínica, se han diseñado múltiples índices que combinan marcadores serológicos directos e indirectos.

Estos índices o algoritmos matemáticos han resultado de diversos estudios clínicos, que utilizando modelos estadísticos, como regresión logística múltiple, han seleccionado los parámetros que mejores resultados ofrecían para la detección y clasificación de la fibrosis hepática. En la **tabla 3** que aparece a continuación pueden observarse los principales índices matemáticos disponibles en la actualidad.

Index	Parameters	Chronic liver disease	Sensitivity (%)	Specificity (%)
PgAA-index	Prothrombin time, γ GT, apolipoprotein A1, α 2-macroglobulin	Alcohol	79	89
Bonacini-index	ALT/AST-ratio, INR, platelet count	HCV	46	98
Sheth-index	AST/ALT (De Ritis)	HCV	53	100
Park-index		HCV	47	96
PGA-index	Prothrombin time, cGT, apolipoprotein A1	Mixed	91	81
Fortunato-score	Fibronectin, prothrombin time, PCHE, ALT, Mn-SOD, β -NAG	HCV		94
Fibrotest (fibro-score)	Haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A1, γ GT, bilirubin	HCV, HBV	75	85
Pohl-score	AST/ALT-ratio, platelet count	HCV	41	99
Actitest	Fibrotest + ALT	HCV		
Forns-index	Age, platelet count, γ GT, cholesterol	HCV	94	51
Wai-index (APRI)	AST, platelet count	HCV	89	75
ELF-score	PIIINP, hyaluronan, TIMP-1	Mixed	90	41
Patel-index (FibroSpect)	Hyaluronan, TIMP-1, α 2-macroglobulin	HCV	77	73
Sud-index (fibrosis probabilityindex, FPI)	Age, AST, cholesterol, insulin resistance (HOMA), past alcohol intake	HCV	96	44
Leroy-score	PIIINP, MMP-1	HCV	60	92
Fibrometer test	Platelet count, prothrombin index, AST, α 2-macroglobulin, hyaluronan, urea, age	Mixed	81	84
Hepascore	Bilirubin, cGT, hyaluronan, α 2-macroglobulin, age, gender	HCV	63	89
Testa-index	Platelet count/spleen diameter-ratio	HCV	78	79
FIB-4	Platelet count, AST, ALT, age	HCV/HIV	70	74
FibroIndex	Platelet count, AST, γ -globulin	HCV	38	97

Abbreviations: GGT, c-glutamyltransferase; PIIINP, N-terminal propeptide of type III-procollagen; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases; MMP, matrix metalloproteinases; β -NAG, N-acetyl- β -glucosaminidase; AST, aspartate-aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; INR, international normalized ratio.

Tabla 3: Se ilustran los principales algoritmos matemáticos para la detección de fibrosis hepática, así como el tipo de enfermedad hepática, y la sensibilidad y especificidad obtenida en el estudio en el que se desarrollaron. Tomada de *Gressner y cols* (166).

A continuación se describen de manera más detallada varios de los algoritmos más utilizados:

✓ APRI

El APRI (AST to platelet ratio index; Índice AST/plaquetas) fue desarrollado en el año 2003 por *Wai y cols*. (168) en un estudio realizado en pacientes con VHC. La población de estudio se compuso de 192 pacientes, así como una población adicional de otros 78 pacientes para la validación del algoritmo. Todos los pacientes eran naive y se utilizó la biopsia hepática como estándar de referencia.

Además de variables clínicas y demográficas, las variables de laboratorio incluidas en el estudio fueron las siguientes: carga viral y genotipo, recuento de leucocitos y de plaquetas, razón internacional normalizada (INR), bilirrubina, albúmina, ALT, AST y ALP. Mediante la realización de un análisis de regresión logística detectaron aquellas variables

que se asociaban con la presencia de fibrosis significativa y cirrosis, y posteriormente desarrollaron la fórmula del algoritmo que se observa en la **figura 24**, a la que denominaron APRI.

$$\text{APRI} = \frac{\text{AST level (/ULN)}}{\text{Platelet counts (10}^9\text{/L)}} \times 100$$

Figura 24: Fórmula matemática del índice APRI. ULN: Upper limit normal, límite superior de normalidad

El valor diagnóstico del algoritmo se comprobó mediante la elaboración de curvas ROC (receiver operation characteristics). El APRI fue preciso en la predicción de fibrosis significativa y cirrosis, con áreas bajo la curva (AUC) de 0,80 y 0,89 en la población de estudio, y 0,88 y 0,94 en la población de validación respectivamente. Utilizando los puntos de corte optimizados, se identificaba fibrosis significativa con exactitud en el 51% de los pacientes y cirrosis en el 81%. Con estos resultados concluyeron que el algoritmo permitía identificar a los pacientes con VHC con fibrosis significativa y cirrosis con un alto grado de precisión.

El algoritmo APRI posteriormente ha sido valorado en multitud de estudios y en otros tipos de hepatopatías, incluida la EHGNA (169;170). Aunque los resultados son muy variables, especialmente en lo que se refiere a la detección de fibrosis significativa, el APRI es un índice ampliamente utilizado, principalmente por su sencillez y disponibilidad, dado que incluye pruebas de laboratorio fácilmente disponibles.

✓ *Forns*

Este algoritmo fue diseñado para discriminar entre pacientes con y sin fibrosis hepática significativa, en un estudio clínico con una cohorte de 476 pacientes naive (un grupo de estimación con 351 pacientes y un grupo de validación con 125 pacientes) con hepatitis crónica C que se sometieron a biopsia hepática (171).

El análisis de regresión multivariante identificó la edad, la GGT, el colesterol, el recuento de plaquetas y tiempo de protrombina como predictores independientes de la fibrosis,

por lo que se utilizaron estas variables para desarrollar un modelo y un sistema de puntuación que demostró ser útil para identificar a los pacientes sin fibrosis hepática importante. El algoritmo matemático consiste en la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Forns} = -7,811 - 3,131 \ln [\text{Plaquetas } (10^9/L)] + [0,781 \ln \text{GGT } (UI/L)] + [3,467 \ln \text{Edad } (\text{años})] - [0,014 \text{Colesterol } (mg/dL)]$$

El AUC fue de 0,86 en el grupo de estimación y 0,81 en el grupo de validación. Utilizando el punto de corte óptimo (menor de 4,2), la presencia de fibrosis significativa podría ser excluida con alta precisión (valor predictivo negativo de 96%) en el 36% de los pacientes. Del mismo modo, podría ser excluida con la misma seguridad en el 39% de los pacientes del grupo de validación. Por tanto el índice de Forns predice con precisión la ausencia de fibrosis significativa en más de un tercio de los pacientes con VHC.

Al igual que ocurre con el algoritmo APRI, este índice ha sido ampliamente analizado en diversos tipos de hepatopatías, con resultados dispares en función del estudio (172;173). La accesibilidad de los biomarcadores que lo componen hace que pueda utilizarse fácilmente en la práctica clínica diaria.

✓ *Fibrotest*

Este algoritmo fue descrito en un estudio clínico transversal llevado a cabo en pacientes con VHC utilizando la biopsia hepática como estándar de referencia (152). El estudio se realizó en una población de análisis formada por 205 pacientes, y posteriormente se validó en otra población de 134 pacientes. Las características de los pacientes, así como los marcadores bioquímicos no mostraron diferencias entre las dos poblaciones de pacientes. En el estudio fueron incluidos once biomarcadores: α 2-macroglobulina, haptoglobina, AST, ALT, GGT, bilirrubina total, albúmina, α 1-globulina, β -globulina, γ -globulina, apoA-1. En la población de validación también se estudiaron la interleuquina 10, TGF- β , HGF, apoA-2 y apolipoproteína-B.

Después de realizar el análisis estadístico adecuado diseñaron el índice matemático, que incluía los biomarcadores que ofrecían mejores resultados: haptoglobina, α 2-macroglobulina, apoA-1, GGT y bilirrubina total, ajustado por edad y sexo. En el artículo la

fórmula matemática de cálculo del algoritmo no se proporciona, pues tiene una patente mundial (Patente de EE.UU. Aplicación Nº de Serie 09 / 687.459), pero sin embargo sí aparece reflejada en un libro sobre el manejo práctico de las hepatitis crónicas de origen viral (174) y en un artículo que evalúa su validez en una cohorte de pacientes con hepatopatía por VHB (175). La fórmula del algoritmo es pues la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Fibrotest} = & 4,467 \log(\alpha 2\text{Macroglobulina}) - 1,357 \log(\text{Haptoglobina}) \\ & + 1,017 \log(\text{GGT}) + 0,281 \text{Edad} + 1,737 \log(\text{Bilirrubina}) - 1,184 \text{ApoA1} \\ & + 0,301 (\text{Sexo}) - 5,054 \end{aligned}$$

Las unidades fueron las siguientes: $\alpha 2$ -macroglobulina en g/L, haptoglobina en g/L, GGT en UI/L, edad en años, bilirrubina en $\mu\text{mol/l}$, apoA-1 en g/l, sexo masculino=1 y sexo femenino=0.

Las AUC para el diagnóstico de fibrosis significativa correspondiente a la población de estudio y a la de validación fueron 0,82 y 0,85 respectivamente. Utilizando los puntos de corte optimizados obtuvieron elevados valores predictivos positivos y negativos, que permiten confirmar o descartar con seguridad la presencia o ausencia de fibrosis significativa.

Al igual que ocurre con la mayoría de los algoritmos para la estimación del grado de fibrosis hepática, el Fibrotest ha sido evaluado en diferentes tipos de hepatopatías crónicas obteniendo de manera general buenos resultados (153;175-177).

✓ *Fibrometer*

Este algoritmo fue desarrollado a partir de un estudio clínico cuyo objetivo era encontrar nuevos marcadores bioquímicos que permitiesen la evaluación de diferentes características de la fibrosis hepática, teniendo en cuenta el tipo de hepatopatía (alcohólica o por virus C o B). En el estudio se incluyeron biomarcadores individuales así como algoritmos matemáticos ya descritos en otros estudios clínicos. Como estándar de referencia se utilizó la biopsia hepática (178).

El estudio se realizó en dos pasos, un primer paso de exploración llevado a cabo con 383 pacientes con hepatitis viral (B y C) y 95 pacientes con hepatopatía alcohólica, y un segundo paso de validación en una población formada por 120 pacientes con VHC.

El algoritmo Fibrometer se diseñó para la detección de fibrosis significativa en los pacientes con hepatopatía crónica de origen viral mediante regresión logística e incluyó siete parámetros (plaquetas, tiempo de protrombina, AST, α 2-macroglobulina, HA, urea, y edad). La fórmula matemática fue la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Fibrometer} = & -0,007 \text{ Plaquetas (g/L)} - 0,049 \text{ TP (\%)} + 0,012 \text{ AST (UI/L)} \\ & + 0,005 \alpha 2 \text{ Macroglobulina (mg/dL)} + 0,021 \text{ HA (\mu g/L)} - 0,270 \text{ Urea (mmol/L)} \\ & + 0,027 \text{ Edad (años)} + 3,718 \end{aligned}$$

El AUC para la detección de fibrosis significativa (estadios F2-F4 de la clasificación Metavir) fue 0,883 en la etapa exploratoria y 0,892 en la etapa de validación. En el análisis de regresión logística que evaluó el Fibrometer junto con los algoritmos APRI, Forns y Fibrotest, únicamente el Fibrometer predijo de forma independiente la detección de fibrosis significativa.

Por otra lado, en los pacientes con hepatopatía alcohólica, el algoritmo diseñado para la detección de fibrosis significativa fue el siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Fibrometer} = & -0,169 \text{ TP (\%)} + 0,015 \alpha 2 \text{ Macroglobulina (mg/dL)} + \\ & 0,032 \text{ HA (\mu g/L)} - 0,040 \text{ Edad (años)} + 16,541 \end{aligned}$$

El AUC obtenida con este algoritmo en los pacientes alcohólicos fue 0,962.

En la **tabla 4** que aparece a continuación se muestran los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos con los correspondientes algoritmos en ambos tipos de pacientes.

	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value	Diagnostic Accuracy
Virus	80.5 (74.4-86.6)	84.1 (77.9-90.3)	86.3 (80.8-91.7)	77.6 (70.8-84.5)	82.1 (77.7-86.5)
Alcohol	91.8 (84.9-98.7)	92.6 (82.7-100)	96.6 (91.9-100)	83.3 (70.0-96.7)	92.0 (86.4-97.7)

NOTE. All values are expressed as % (95% CI).

Tabla 4: Valores de sensibilidad y especificidad, así como valores predictivos positivos y negativos obtenidos con el Fibrometer en pacientes con hepatitis virales y con con hepatopatía alcohólica. Tomado de *Cales y cols* (178).

Este estudio introduce además de forma novedosa dos algoritmos (para hepatopatía viral y alcohólica) para el cálculo del área de fibrosis, que permiten obtener una medida cuantitativa de la cantidad fibrosis hepática, siendo esto independiente del estadio histológico.

En base a los resultados obtenidos los autores concluyeron que el índice Fibrometer tiene una alta precisión diagnóstica para la detección de fibrosis clínicamente significativa. Posteriormente el Fibrometer ha sido evaluado en diversos estudios clínicos incluyendo distintos tipos de hepatopatías (179;180).

✓ *Hepascore*

El algoritmo Hepascore para la predicción de fibrosis hepática se expuso en un estudio clínico que buscaba desarrollar un índice matemático basado en la combinación de marcadores séricos que permitiese detectar con precisión y fiabilidad el estadio de fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C (181).

Para ello evaluaron diez biomarcadores (α 2-macroglobulina, HA, TIMP-1, MMP-2, apoA-1, haptoglobina, bilirrubina, GGT, ALT y albúmina) en 117 pacientes con VHC no tratados contra la enfermedad a los que se realizó una biopsia hepática. Mediante regresión logística múltiple crearon un modelo predictivo para la detección fibrosis significativa, fibrosis avanzada y cirrosis. El algoritmo fue validado en otra población de 104 pacientes.

En índice Hepascore incluyó los parámetros bilirrubina, GGT, HA, α 2-macroglobulina, edad y sexo combinados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Hepascore} = \frac{y}{(1 + y)}$$

Siendo:

$$y = e^b$$

$$b = -4,185818 - (0,0249 \text{ Edad}) + (0,7464 \text{ Sexo}) + (1,0039 \alpha 2 \text{Macroglobulina}) + (0,0302 \text{ HA}) + (0,0691 \text{ Bilirrubina}) - (0,0012 \text{ GGT})$$

Las unidades fueron las siguientes: edad en años, sexo masculino=1, sexo femenino=0, $\alpha 2$ -macroglobulina en g/L, HA en g/L, bilirrubina en mol/L y GGT en UI/L.

Las AUC correspondientes al diagnóstico de fibrosis significativa, fibrosis avanzada y cirrosis fueron 0,85, 0,96 y 0,94 respectivamente. En la población inicial de estudio, una puntuación $\geq 0,5$ permitía la detección con un 92% de especificidad y un 67% de sensibilidad de fibrosis significativa; una puntuación $< 0,5$ permitía la exclusión con un 81% de especificidad y un 95% de sensibilidad de fibrosis avanzada y puntuaciones $< 0,84$ excluían con un 84% de especificidad y un 71% de sensibilidad la presencia de cirrosis.

En la población de validación las AUC para la detección de fibrosis significativa, fibrosis avanzada y cirrosis fueron 0,82, 0,90 y 0,89 respectivamente. Una puntuación $\geq 0,5$ permitía la detección de fibrosis significativa con una sensibilidad y especificidad del 63% y 89% respectivamente, mientras que una puntuación $< 0,5$ permitían predecir la ausencia de fibrosis avanzada con un 74% de especificidad y un 88% de sensibilidad.

Basándose en los resultados anteriores los autores concluyeron que el índice Hepascore proporciona información clínicamente útil con respecto a los diferentes estadios de fibrosis en pacientes con hepatitis C. Al igual que ocurre con la mayoría de los algoritmos, el Hepascore también ha sido evaluado posteriormente en múltiples estudios con diversos tipos de hepatopatías (182-184).

✓ *FibroQ*

Este algoritmo se propuso como un nuevo índice no invasivo para predecir la fibrosis hepática en hepatopatía crónica de origen viral. *Hsieh y cols.* publicaron en 2009 (185) el estudio en el que se desarrolló este índice, al que denominaron FibroQ (fibro-cociente), y cuya precisión diagnóstica compararon con otros algoritmos descritos con anterioridad.

Este estudio de cohorte retrospectiva incluyó 140 pacientes con hepatitis viral crónica por virus B y C que se habían sometido a una biopsia hepática percutánea previamente a comenzar el tratamiento antiviral. Se registraron los datos clínicos, incluido el sexo y la edad, y se determinaron los niveles de AST, ALT, recuento de plaquetas, tiempo de protrombina e INR. Para la gradación histológica de la biopsia hepática se utilizó el sistema Metavir. Por otro lado calcularon el índice APRI y el ratio AST/ALT.

Utilizando los parámetros que mostraban una correlación más significativa con la clasificación de la escala Metavir desarrollaron el algoritmo, que consistió en la siguiente fórmula:

$$FibroQ = \left[\frac{10 \times Edad \times AST \times INR}{Plaquetas \times ALT} \right]$$

Las unidades fueron las siguientes: edad en años, AST en UI/L, recuento de plaquetas en $10^3/\mu\text{L}$ y ALT en UI/L.

Mediante el uso de curvas ROC calcularon la precisión para el diagnóstico de fibrosis significativa y de cirrosis. Para la predicción de fibrosis significativa el FibroQ obtuvo mejores resultados que APRI [AUC 0,783 vs 0,631 ($p=0,02$)], pero igual al ratio AST/ALT [AUC 0,783 vs 0,733 ($p=0,26$)]; y lo mismo ocurrió en la detección de cirrosis [AUC 0,791 vs 0,634 ($p=0,03$) y AUC 0,791 vs 0,782 ($p=0,47$) respectivamente.

Utilizando valores de FibroQ por debajo del punto de corte inferior (0,6) y por encima del punto de corte más alto (1,6) se identificaba correctamente la presencia o ausencia de fibrosis significativa en el 77,1% de los pacientes. Los autores del este estudio publicaron con posterioridad otro en el que validaron la utilidad del FibroQ en una cohorte de pacientes con VHC (186).

✓ *FIB-4*

Este índice surgió de un estudio clínico que buscaba diseñar un algoritmo basado en biomarcadores de rutina para predecir el grado de fibrosis hepática en pacientes coinfectados por VIH/VHC (187).

Se realizó un análisis retrospectivo en 832 pacientes que habían sido sometidos a una biopsia hepática, en donde la fibrosis se evaluó mediante la clasificación de Ishak. Los pacientes fueron asignados al azar a la población de análisis (n=555) o a la de validación (n=277).

El análisis de regresión logística multivariado reveló que el recuento de plaquetas, la edad, la AST y el INR se asociaban de forma independiente con la fibrosis. Sin embargo, sólo 505 de los 555 pacientes de la población de análisis tenían disponibles las cuatro variables; los valores de INR faltaban en la mayoría de los 50 pacientes restantes. La ALT fue la siguiente variable en el proceso de selección, que no había sido incluida en el primer modelo ya que no alcanzó significación. Por lo tanto, se diseñó un segundo modelo aplicable a 555 pacientes que incluía la edad, la AST, el recuento de plaquetas, y la ALT en lugar del INR.

Basándose en esto, se desarrolló un índice simple denominado FIB-4 que consistía en la siguiente fórmula:

$$FIB4 = \left[\frac{\text{Edad (años)} \times \text{AST (UI/L)}}{\text{Plaquetas } \left(\frac{10^9}{L}\right) \times \text{ALT (UI/L)}} \right]^{1/2}$$

El AUC del índice fue 0,765 para la diferenciación entre fibrosis media-moderada y fibrosis avanzada. En la población de validación, utilizando un punto de corte <1,45 el valor predictivo negativo para excluir fibrosis avanzada fue del 90% con una sensibilidad del 70%. Con el punto de corte >3,25 obtenían un valor predictivo positivo del 65% y una especificidad del 97%. Utilizando estos puntos de corte la fibrosis hepática del 87% de los pacientes se clasificaba correctamente de acuerdo a la gradación de la biopsia.

Posteriormente el FIB-4 ha sido evaluado en otros estudios clínicos con cohortes de pacientes con distintos tipos de hepatopatías, como pacientes monoinfectados por VHC o pacientes con EHGNA (188;189).

✓ *ELF*

Este algoritmo matemático se desarrolló a partir de un estudio clínico llevado a cabo por el Grupo Europeo de Fibrosis Hepática, publicado por *Rosenberg y cols.* en el año 2004 (190). El objetivo del estudio era comparar el rendimiento diagnóstico de varios marcadores séricos con la gradación histológica de la biopsia hepática, para identificar un panel óptimo de biomarcadores séricos que, combinados mediante un algoritmo, permitiesen estimar el grado de fibrosis hepática.

En el estudio, multicéntrico y de cohorte transversal internacional, se analizaron los niveles séricos de nueve biomarcadores de fibrosis hepática y se compararon con el estadio de fibrosis en muestras de biopsia de hígado obtenidas de 1021 pacientes con enfermedad hepática crónica de diversa etiología. El panel de biomarcadores incluidos se seleccionó tratando de incluir marcadores de síntesis o degradación de la matriz, teniendo en cuenta los mecanismos básicos implicados en la fibrogenesis hepática. Se estudiaron el colágeno tipo IV y el tipo VI, PIIINP, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, tenascina, laminina y HA. En el estudio histológico de la biopsia hepática se utilizaron los sistemas Scheuer e Ishak para la clasificación de la fibrosis.

De los 1021 pacientes reclutados, el número de ellos dentro de cada categoría diagnóstica fue el siguiente: 496 con hepatitis crónica C, 64 con hepatopatía alcohólica, 61 con EHGNA, 61 con hepatitis B, 53 con cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria, 48 con enfermedad recurrente tras trasplante hepático, 45 con hepatitis autoinmune, 32 con hemocromatosis, 19 con cirrosis criptogénica, 4 pacientes coinfectados con virus B y C, y 138 en la categoría de “otros diagnósticos” (incluyendo la enfermedad granulomatosa de etiología desconocida y los casos en los que el diagnóstico no se hizo a partir de la alteración de las pruebas de función hepática, como ocurrió en el resto).

Los datos clínicos o las determinaciones bioquímicas estaban incompletos en 45 de los pacientes, y también en 55 de ellos las muestras de biopsia se consideraron inadecuadas para el análisis histológico. Por tanto, estos pacientes fueron excluidos del estudio por lo que la cohorte total se compuso de 921 sujetos. De esta población global derivaron el grupo de estudio y el de validación.

Para el diseño de los grupos de estudio se seleccionó al azar un grupo de 400 pacientes de la población total, que conformaron el grupo de estudio y los 521 pacientes restantes formaron el grupo de validación.

Mediante un análisis discriminante en el grupo de estudio, se seleccionaron las variables en las que se observaban mayores diferencias entre los estadios de fibrosis proporcionados por la biopsia, y se diseñó el algoritmo, que combinaba la edad, HA, PIIINP y TIMP-1. El algoritmo, que no recibió un nombre concreto, consistía en la siguiente fórmula:

$$= -6,38 - [0,014 \ln \text{Edad (años)}] + [0,616 \ln \text{HA (ng/mL)}] \\ + [0,586 \ln \text{PIIINP (ng/mL)}] + [0,472 \ln \text{TIMP1 (ng/mL)}]$$

Posteriormente el algoritmo se evaluó en la población de validación. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la **tabla 5**, donde puede observarse que el algoritmo ELF permitía la detección de fibrosis significativa (estadios 3 y 4 de la clasificación de Scheuer) con un 90,5% de sensibilidad.

Scheuer score	AUC	SE	P	95% CI of area	DST	Sensitivity (%)	Specificity (%)
X = 0,1 vs 2,3,4	.782	.0213	<.0001	.740-.823	-.864	90.3	29.6
Y = 0,1,2 vs 3,4	.804	.0236	<.0001	.757-.850	.102	90.5	41.0
Z = 0,1,2,3 vs 4	.887	.0256	<.0001	.837-.937	.025	90.7	69.2

Tabla 5: Se ilustran los resultados obtenidos por el algoritmo en la población de validación para diferenciar los diferentes grados de fibrosis hepática de la biopsia hepática. Aunque solo se muestran los estadios de la clasificación de Scheuer, también se analizó para la gradación con el sistema Ishak, cuyos resultados no se indican por ser similares. Tomado de *Rosenberg y cols* (190).

Por otro lado se estudió el rendimiento del algoritmo al analizar las diferentes etiologías de forma independiente y los resultados obtenidos en las tres hepatopatías más prevalentes pueden observarse en la **tabla 6** que aparece a continuación.

G _v	AUC	SE	P	95% CI of AUC
Hepatitis C	.773	.0386	<.0001	.697-.848
NAFLD	.870	.1040	.0002	.666-1.000
ALD	.944	.0555	<.0001	.836-1.000

Tabla 6: Áreas bajo la curva (AUC) del algoritmo para la detección de fibrosis significativa en los subgrupos de pacientes con VHC, EHGNA (NAFLD) y hepatopatía alcohólica (ALD). Tomado de *Rosenberg y cols (190)*.

Además, en la **tabla 7** se ilustran la sensibilidad y especificidad del algoritmo junto con los valores predictivos positivos y negativos, también obtenidos para los grupos en función de la etiología. Según los autores, tanto en la EHGNA como en la hepatopatía alcohólica, los valores predictivos positivos y negativos deben ser interpretados con cautela, ya que el número de pacientes eran relativamente pequeño, aunque la alta sensibilidad y especificidad acreditan el uso del algoritmo.

Disease	Score	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Hepatitis C	.063	95	29	27.7	94.9
	.067	90	31	27.5	92.3
	.090	85	43	29.9	91.1
	.126	80	58	35.2	91.0
	.190	63	80	47.9	88.5
	.219	52	85	50.0	86.2
	.268	47	90	57.8	85.6
	.426	38	95	70.0	84.3
NAFLD	.564	30	99	89.5	83.3
	.375	89	96	80	98
	.462	78	98	87	96
ALD	.087	100.0	16.7	75.0	100.0
	.431	93.3	100.0	100.0	85.7

Tabla 7: Se muestran los resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo (PPV) y negativo (NPV) del algoritmo en la población de validación dividida según etiología, en función del punto de corte escogido (score). Tomado de *Rosenberg y cols (190)*.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, los autores concluyen que el algoritmo puede ser utilizado para detectar con una precisión considerable la presencia o ausencia de fibrosis hepática significativa en una amplia gama de trastornos hepáticos.

Posteriormente, en el año 2008 se publicó otro estudio que validó el algoritmo original y el resultado alcanzado con una versión simplificada de la fórmula, que incluyó los tres biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 pero no tuvo en cuenta la edad, en una cohorte independiente de 196 pacientes con EHGNA (71).

Denominaron entonces al algoritmo original OELF (Test Original de Fibrosis Hepática; Original European Liver Fibrosis test) y al nuevo, ELF (test de Fibrosis Hepática mejorado: Enhanced Liver Fibrosis panel) y la nueva fórmula simplificada fue la siguiente:

$$ELF = -7,412 [0,681 \ln HA (ng/mL)] + [0,775 \ln PIIINP (ng/mL)] + [0,494 \ln TIMP1 (ng/mL)]$$

Además, también se analizó si la adición de biomarcadores individuales al algoritmo podría mejorar el rendimiento diagnóstico existente. Los marcadores examinados fueron la edad, el índice de masa corporal, la presencia de diabetes o alteración de la glucosa en ayunas, el cociente AST/ALT, el recuento de plaquetas y la albúmina.

Las fibrosis de las muestras de biopsia hepática se graduó mediante un sistema de clasificación de 5 etapas que indicaban lo siguiente: etapa 0 ausencia de fibrosis, etapa 1 fibrosis perisinusoidal o portal, etapa 2 fibrosis perisinusoidal y portal o periportal, etapa 3 fibrosis septal o en puentes, y etapa 4 cirrosis.

El algoritmo ELF simplificado tuvo un AUC de 0,90 para distinguir fibrosis severa, 0,82 para fibrosis moderada y 0,76 en la detección de ausencia de fibrosis. La simplificación del algoritmo mediante la eliminación de la edad no alteró el rendimiento diagnóstico. En la **tabla 8** puede observarse el rendimiento diagnóstico del algoritmo ELF para diferenciar los distintos estadios de fibrosis según los diferentes puntos de corte.

Stage of Fibrosis	Discriminant Score Threshold	Sens	Spec	PPV	NPV	LR (+ve)	LR (-ve)
0 versus 1/2/3/4 (any fibrosis)	-1.6533	100	4	60	100	1.04	0
	-1.2009	95	19	63	71	1.17	0.28
	-1.02813	90	27	64	66	1.23	0.36
	-0.6415	80	56	72	66	1.80	0.37
	-0.2070	61	80	81	79	3.01	0.49
	0.2112	45	90	86	53	4.47	0.61
	0.3272	43	95	93	54	8.67	0.59
	1.6454	13	100	100	45	N/A	0.87
	-1.4217	100	7	42	100	1	0
0/1 versus 2/3/4 (moderate fibrosis)	-1.0691	95	22	45	86	1.21	0.24
	-0.6746	90	50	54	88	1.78	0.21
	-0.3625	80	67	62	84	2.44	0.29
	-0.1068	70	80	70	80	3.51	0.37
	0.3145	56	90	78	75	5.35	0.49
	0.5734	45	95	85	72	8.71	0.57
	2.2859	9	100	100	62	N/A	0.91
	-1.2413	100	12	26	100	1.14	0
	-0.7121	98	42	34	98	1.68	0.05
0/1/2 versus 3/4 (severe fibrosis)	-0.4184	96	57	41	98	2.24	0.07
	-0.1068	90	75	52	96	3.54	0.15
	0.3576	80	90	71	94	7.84	0.22
	0.8139	62	95	78	89	11.40	0.41
	1.6454	29	99	87	82	21.32	0.72
	2.2858	16	100	100	80	N/A	0.84

Abbreviations: Sens, sensitivity; Spec, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR, likelihood ratio; LR +ve, positive likelihood ratio; LR -ve, negative likelihood ratio.

Tabla 8: Se indican los resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo (PPV) y negativo (NPV) del nuevo algoritmo ELF para los distintos puntos de corte (discriminant score threshold). Tomado de *Guha y cols (71)*.

La adición de marcadores individuales al algoritmo mejoró la capacidad diagnóstica, con áreas bajo la curva de 0,98, 0,93 y 0,84 para la detección de fibrosis severa, fibrosis moderada, y ausencia de fibrosis respectivamente, permitiendo por tanto una mejor estratificación de los pacientes.

En el año 2011 *Parkes y cols. (191)* también publican una simplificación del algoritmo original y su validación en una cohorte independiente de pacientes con VHC. En contraste con el algoritmo original, que derivó de una población de 521 pacientes (el grupo de validación), en este estudio utilizaron la totalidad de la cohorte del estudio original (n=921) para reevaluar el algoritmo y valorar la posibilidad de simplificarlo y optimizar el rendimiento diagnóstico.

Para realizar la simplificación del algoritmo original se realizó regresión logística utilizando los marcadores individuales incluidos originalmente (HA, PIIINP y TIMP-1) y la edad, mediante una agrupación binaria para los estadíos de la biopsia. Este análisis se llevó a

cabo en el conjunto de la cohorte original (n=921). Al igual que hicieron *Guha y cols.*, se denominó OELF al algoritmo original y ELF al simplificado.

Los resultados obtenidos justificaron el uso de una versión simplificada del algoritmo ELF que mantenía HA, PIIINP y TIMP-1, pero prescindiendo de la edad, ya que resultó no significativa. No fue posible simplificar más el algoritmo sin comprometer el rendimiento diagnóstico. La fórmula del nuevo algoritmo fue la siguiente:

$$ELF = -7,412 [0,681 \ln HA (ng/mL)] + [0,775 \ln PIIINP (ng/mL)] + [0,494 \ln TIMP1 (ng/mL)] + 10$$

Como puede observarse la fórmula coincide con la resultante de la simplificación del algoritmo realizada por *Guha y cols.* (71) en pacientes con EHGNA. Únicamente difieren en que *Parkes y cols.* introducen al final de la fórmula la constante +10, con el fin aumentar y positivizar los resultados, que tanto con el algoritmo original como con la simplificación de *Guha y cols.*, eran números negativos o en torno a cero.

La segunda parte del estudio consistió en la validación externa del nuevo algoritmo simplificado. Para ello se analizaron biopsias y muestras de suero pareadas de 347 pacientes con hepatopatía por VHC no tratados previamente en tres cohortes independientes (con n=87, n=173 y n=87 respectivamente). Las biopsias se clasificaron utilizando los sistemas de puntuación Metavir e Ishak. Los grupos fueron los siguientes: no fibrosis (Metavir F0 o Ishak 0), fibrosis leve (Metavir F1 o Ishak 1/2), fibrosis moderada (Metavir F2 o Ishak 3) y fibrosis grave/cirrosis (Metavir F3/4 o Ishak 4/6).

El rendimiento diagnóstico del nuevo algoritmo ELF en la identificación de estadio de fibrosis derivado de la histología hepática se evaluó mediante áreas bajo curva. Para comparar los resultados, tanto el panel original ELF como el simplificado fueron evaluados en las cohortes de validación externa.

Los valores de AUC obtenidos con el algoritmo simplificado en las tres cohortes de pacientes para la identificación de los distintos grados de fibrosis se presentan en la **tabla 9**.

Fibrosis stage Ishak/METAVIR	AUROC (95% CI) CHC Cohort 1* n = 87	AUROC (95% CI) CHC Cohort 2 n = 173	AUROC (95% CI) CHC Cohort 3 n = 87
	ELF	ELF	ELF
% 4–6/% Fr 3,4	24	28	34
0 vs 1–6	0.70 (0.51, 0.89)	0.79 (0.71, 0.86)	n/a
FO vs 1–4;			
0–1 vs 2–6	n/a	0.79 (0.72, 0.87)	0.70
0–2 vs 3–6	0.74 (0.63, 0.84)	0.83 (0.76, 0.89)	0.87 (0.80, 0.95)
FO,1 vs 2–4;			
0–3 vs 4–6	0.84 (0.74, 0.94)	0.86 (0.80, 0.92)	0.89 (0.83, 0.96)
FO–2 vs 3,4			
0–4 vs 5,6	0.90 (0.81, 0.98)	0.87 (0.81, 0.93)	0.89 (0.82, 0.96)
FO–3 vs 4			

Tabla 9: Se observan las áreas bajo la curva para el algoritmo ELF simplificado en las tres cohortes de validación en función de la gradación histológica de la muestra de biopsia hepática. Tomado de *Parkes y cols (191)*.

También se analizó el nuevo algoritmo ELF simplificado en la combinación de las tres cohortes (n=347). En la **tabla 10** que aparece a continuación se muestran los resultados obtenidos en la identificación de fibrosis severa.

ELF threshold	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
9.13	95	44	44	95
9.39	90	55	48	92
9.59	85	63	52	90
10.22	70	85	68	86
10.48	62	89	73	83
10.90	54	95	82	81

Tabla 10: Se ilustran las sensibilidades, especificidades y valores predictivos positivos (PPV) y negativos (NPV) en función de los puntos de corte (threshold) del algoritmo ELF simplificado en población resultante de la agrupación de las tres cohortes para la identificación de fibrosis severa. Tomado de *Parkes y cols (191)*.

Al comparar el rendimiento diagnóstico del algoritmo original y la versión simplificada en la población original se observaron resultados muy similares para la identificación de cada nivel de gravedad de la fibrosis (**tabla 11**).

Fibrosis stage	AUROC (95% CI) Original training cohort $n = 921$	
	OELF	ELF
% 4–6	27	
0 vs 1–6	0.72 (0.68, 0.75)	0.72 (0.68, 0.75)
0,1 vs 2–6	0.77 (0.74, 0.80)	0.77 (0.74, 0.80)
0–2 vs 3–6	0.79 (0.76, 0.82)	0.79 (0.76, 0.82)
0–3 vs 4–6	0.83 (0.80, 0.86)	0.83 (0.80, 0.86)
0–4 vs 5,6	0.86 (0.83, 0.89)	0.86 (0.83, 0.89)

AUROC, area under receiver operator characteristic curves; ELF, Enhanced Liver Fibrosis; OELF, Original European Liver Fibrosis.

Tabla 11: Rendimiento diagnóstico del algoritmo original (OELF) y la versión simplificada (ELF) en la cohorte original. Tomado de *Parkes y cols* (191).

En vista a los resultados obtenidos los autores concluyen que el uso de la versión simplificada del algoritmo ELF permite identificar con buena precisión la fibrosis severa en pacientes con VHC. Además reflejan la ventaja de eliminar la variable de la edad en el algoritmo simplificado, ya que permite que esta pueda ser utilizada por separado en los análisis pronósticos. Adicionalmente indican que la omisión de edad facilita la simplificación del análisis automatizado, eliminando la necesidad de registrar este dato demográfico.

Con posterioridad al estudio original y a aquellos que simplificaron el algoritmo, se han llevado a cabo estudios de validación en poblaciones independientes para reevaluar el rendimiento del algoritmo ELF. Los estudios más relevantes que han evaluado el algoritmo lo han hecho en cohortes de pacientes con en hepatopatía por VHC, VHB, EHGNA y cirrosis biliar primaria, y de forma general han confirmado que el algoritmo refleja con exactitud la gravedad de la fibrosis tomando como referencia la biopsia hepática (192-196). En la mayoría de estos estudios el AUC oscila alrededor de 0,8, siendo este nivel de rendimiento el considerado como umbral para la aceptación en la práctica clínica.

Más recientemente se están llevando a cabo estudios clínicos para investigar la capacidad del algoritmo para predecir los resultados clínicos a largo plazo de las hepatopatías crónicas, incluyendo el desarrollo de hipertensión portal, la descompensación propia de la enfermedad hepática, el desarrollo de cáncer hepatocelular, el trasplante hepático y la muerte por enfermedad hepática, así como mortalidad por causas distintas a la hepática en este tipo de pacientes.

✓ *Via Index*

Este algoritmo se ha dado a conocer a través de un estudio clínico publicado recientemente, en 2014, por *Takaki y cols* (197). El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un nuevo índice para la evaluación de fibrosis hepática que combinase la Vc derivada de la técnica Arfi con marcadores bioquímicos o hematológicos. Así mismo también compararon el rendimiento diagnóstico del nuevo algoritmo con el de los índices APRI y FIB-4.

Para ello contaron con una población de 176 pacientes con hepatopatía crónica por VHC, divididos en dos grupos; un grupo de análisis (n=120) y otro de validación (n=56). Todos los pacientes se sometieron a una biopsia hepática, lo que permitió, utilizando el sistema Metavir, evaluar tanto la fibrosis como la actividad inflamatoria presente en el hígado.

En el grupo de análisis, la Vc, el INR y la ALT correlacionaron de forma significativa e independiente con el grado de fibrosis determinado mediante la biopsia. De acuerdo con esto los autores desarrollaron el algoritmo al que denominaron “Via Index” (Índice Via) y que consistió en la siguiente fórmula:

$$\text{Via Index} = -1,282 + 0,965 Vc (m/s) + 1,785 INR + 0,00185 ALT (UI/L)$$

En el grupo de análisis las AUC del Via Index fueron 0,838 para el diagnóstico de fibrosis significativa ($\geq F2$), 0,904 para la detección de fibrosis grave ($\geq F3$) y 0,958 para el diagnóstico de cirrosis (F4). En el conjunto de pacientes que conformaban el grupo de validación las áreas bajo la curva fueron 0,917 ($\geq F2$), 0,906 ($\geq F3$) y 1,000 (F4) respectivamente.

Según los resultados de las AUC, el rendimiento del Via Index fue superior frente al uso de la Vc de forma individual. Por otro lado, al compararlo con los índices APRI y FIB-4 se obtienen resultados equivalentes para la detección de fibrosis significativa, y superiores para el Via Index en el diagnóstico de fibrosis severa y/o cirrosis (**tabla 12**).

		Cut-off	AUROC	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
≥F2	VIA	1.859	0.838	83.3	71.9	42.6	94.5	75.8
	FIB-4	21.2	0.841	83.3	76.0	46.5	94.8	77.5
	APRI	4.988	0.879	75.0	91.7	69.2	93.6	88.3
	SWV	1.250	0.773	75.0	78.1	42.6	92.6	75.0
≥F3	VIA	2.251	0.904	84.9	85.2	95.2	62.2	85.0
	FIB-4	29.47	0.705	59.1	70.5	87.3	33.3	84.1
	APRI	8.7636	0.709	53.8	81.5	90.9	33.8	61.6
	SWV	1.595	0.863	84.9	81.5	94	61.1	84.1
F4	VIA	2.763	0.958	93.7	88.9	99	53.3	93.3
	FIB-4	48.16	0.670	82.0	66.7	96.8	23.1	80.8
	APRI	12.27	0.566	66.7	55.6	94.9	11.9	87.5
	SWV	1.775	0.915	85.6	88.9	99	33.3	85.5

Tabla 12: Se ilustran los resultados obtenidos para el Via Index, APRI, FIB-4 y Vc (SWV) en función de los grados de fibrosis determinados mediante la biopsia hepática en el grupo de validación (n=56). Tomado de *Takaki y cols (197)*.

Los autores concluyen que este nuevo algoritmo permite la estratificación del grado de fibrosis hepática en pacientes con VHC de forma precisa. Además remarcan que el hecho de que el Via Index combine marcadores bioquímicos y hematológicos con variables derivadas del estudio mecánico o elastográfico del hígado, como es la Vc, supone un valor añadido, pues son métodos potencialmente distintos, lo que mejora la certeza diagnóstica.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Justificación e hipótesis del estudio

Las enfermedades crónicas del hígado son la quinta causa más frecuente de muerte en la Unión Europea, ya que implican el desarrollo de fibrosis, que paulatinamente conduce a la insuficiencia hepática progresiva, hipertensión portal y en última instancia a la cirrosis y carcinoma hepatocelular. La hepatitis C, padecida actualmente por alrededor de 170 millones de personas en el mundo, y la EHGNA, cuya prevalencia está aumentando de forma significativa debido a la pandemia de la obesidad, son dos de las principales causas de hepatopatía crónica, lo que justifica en primera instancia el estudio de los aspectos clínicos relacionados, como son el diagnóstico, el control evolutivo de la enfermedad o el manejo terapéutico.

El desarrollo de fibrosis es el punto patogénico común en todas las enfermedades hepáticas crónicas. Los estudios experimentales y clínicos de los últimos veinte años han proporcionado un conocimiento detallado de la estructura y composición de la matriz extracelular en el tejido hepático normal y fibrótico, del origen celular de los diversos componentes de la matriz, de varias condiciones genéticas que predisponen a la fibrogénesis, de la regulación por citoquinas y factores de crecimiento de la fibrogénesis y la fibrolisis, así como de múltiples enfoques terapéuticos experimentalmente exitosos. Sin embargo, a pesar de estos importantes logros, la traducción de esta investigación básica a la práctica clínica real y el manejo de los pacientes es todavía limitada, especialmente en relación con las terapias antifibróticas y con las exploraciones diagnósticas no invasivas.

El curso clínico de las enfermedades hepáticas crónicas depende de forma significativa de la tasa de progresión y del grado de fibrosis, y es por ello que, encontrar métodos que permitan realizar el diagnóstico y el seguimiento de forma precisa y no invasiva es realmente importante. Actualmente, el diagnóstico considerado "estándar de oro" continúa siendo la biopsia hepática, que sin embargo tiene múltiples limitaciones además de su naturaleza invasiva, como el error de muestreo y la variabilidad inter e intraobservador. Por lo tanto, el valor diagnóstico de la biopsia como técnica de referencia para la detección de fibrosis debe ser revisado, además del hecho de que su naturaleza invasiva hace de ella un método inviable para el control evolutivo periódico de las hepatopatías crónicas. Estas limitaciones refuerzan la necesidad de técnicas

alternativas no invasivas, representadas fundamentalmente por los biomarcadores y las técnicas de imagen.

Los biomarcadores han sido ampliamente evaluados en el contexto de la fibrosis hepática en diversas etiologías, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de la historia natural de la enfermedad, e incluso para la monitorización de los tratamientos terapéuticos. El hecho de que los biomarcadores hayan sido tan estudiados en este campo responde a diversas cuestiones. En primer lugar a su naturaleza no invasiva, que los convierte en un método ideal para el control dinámico de la enfermedad. En segundo lugar, los biomarcadores ya utilizados en la práctica clínica, se determinan mediante técnicas estandarizadas, muchas de ellas completamente automatizadas, lo que les confiere la propiedad de ser absolutamente reproducibles, especialmente en comparación con la biopsia e incluso con las técnicas de imagen. También debe tenerse en cuenta que las variaciones de los biomarcadores van a evidenciar alteraciones a nivel molecular de la estructura hepática que reflejan el estado fisiopatológico del hígado, y en muchos de los casos esto va a ser previo a las alteraciones detectadas con otras técnicas no invasivas, como las técnicas de imagen, lo que permite una detección muy precoz de la enfermedad. Todas estas razones convierten a los biomarcadores en candidatos ideales para el diagnóstico y control de la fibrosis, por permitir una monitorización más continua y probablemente más fiel que el actual método de referencia.

Sin embargo, en la actualidad todavía no se ha encontrado ninguna molécula que cumpla los requisitos de un biomarcador de fibrosis ideal, ni aporte resultados completamente satisfactorios, y esto ha llevado al desarrollo de múltiples algoritmos basados en una combinación de más o menos parámetros, con el objetivo de mejorar la sensibilidad y la especificidad clínica. Además, en la mayoría de los casos se necesita una evaluación más rigurosa, independiente y generalizada de la utilidad, tanto de los biomarcadores individuales como de los algoritmos, en el diagnóstico y seguimiento de las hepatopatías crónicas para tomar la decisión final de recomendar su uso en la práctica clínica habitual.

Por tanto, partiendo de estas premisas la hipótesis de este estudio es que los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1, de forma individual o combinados mediante el algoritmo ELF, podrían ser útiles en la determinación de la fibrosis hepática en pacientes

con hepatitis crónica C, y en la evaluación de la EHGNA en pacientes obesos, aportando una mejora en la caracterización del estado fisiopatológico del hígado. Además, la combinación de estos biomarcadores con la técnica Arfi o con determinados signos ecográficos, podría suponer un modelo conveniente en la evaluación de la hepatopatía de estos pacientes, suponiendo una mayor seguridad y una menor iatrogenia a la hora de sustituir la biopsia hepática como estándar de referencia.

Para la comprobación de esta hipótesis se plantea un estudio para valorar la verdadera utilidad clínica de los citados biomarcadores, y estudiar su asociación con otras variables clínicas, con los parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico y anatomopatológico del hígado, así como con otros biomarcadores y algoritmos más utilizados en la práctica clínica habitual para valorar la función hepática.

2.2 Objetivos

i. Objetivo general

El objetivo general de este estudio es evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores ácido hialurónico (HA), péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) e inhibidor tisular de la metaloproteasa-1 (TIMP-1), de forma individual y combinados mediante el algoritmo ELF, en la evaluación de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica C y de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica respectivamente.

Para ello se establecen unos objetivos específicos para cada grupo de pacientes.

ii. Objetivos específicos

a. Pacientes con hepatopatía crónica por VHC

1. Estudiar las características generales de los pacientes con hepatopatía crónica por VHC seguidos de manera periódica en las consultas de hepatología de nuestro hospital: descripción de la población total y de los grupos de estudio.
2. Determinar el intervalo de valores existentes en nuestra población del algoritmo ELF y de los biomarcadores directos HA, PIIINP y TIMP-1, evaluar sus valores en función de las características clínicas, demográficas y ecográficas de los pacientes, y estudiar su asociación con el resto de variables continuas.
3. Analizar la eficacia clínica de los biomarcadores directos e indirectos y de los algoritmos matemáticos en la evaluación de la fibrosis hepática de nuestra población de estudio, utilizando la velocidad de onda de corte como estándar de referencia.
4. Elaborar un modelo diagnóstico que combine los biomarcadores con el estudio radiodiagnóstico, y definir la utilidad que aporta en la evaluación no invasiva de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis por VHC.

b. Pacientes Obesos sometidos a cirugía bariátrica

1. Estudiar las características de los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica en nuestro hospital: descripción de la población general y de los grupos de estudio.
2. Determinar el intervalo de valores existentes en nuestra población de estudio del algoritmo ELF y de los biomarcadores directos HA, PIIINP y TIMP-1, evaluar sus valores en función de las características clínicas y demográficas de los pacientes, y estudiar su asociación con el resto de variables continuas.
3. Analizar la eficacia clínica de los biomarcadores indirectos y directos, de los algoritmos matemáticos y de los parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico en la evaluación de la hepatopatía crónica de nuestra población de estudio, utilizando la biopsia hepática como estándar de referencia.
4. Elaborar un modelo diagnóstico que combine los biomarcadores con el estudio radiodiagnóstico y definir la utilidad que aporta en la evaluación no invasiva de la hepatopatía crónica en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica.

III. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

La presente tesis doctoral comprende un estudio observacional transversal llevado a cabo en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, que incluye a pacientes diagnosticados de hepatitis crónica C que siguen controles periódicos de su enfermedad en las Consultas de Hepatología, y pacientes obesos con sospecha de EHGNA sometidos a cirugía bariátrica en la Unidad de Cirugía de la Obesidad.

Los pacientes se reclutaron en el periodo comprendido desde octubre de 2012 a diciembre de 2013, y posteriormente se llevo a cabo la recogida de datos, el procesamiento de las muestras, las determinaciones analíticas y el análisis de los resultados.

El estudio se llevó a cabo en el Servicio de Análisis Clínicos del ya citado hospital, pero debido al necesario abordaje multidisciplinar de los pacientes, se realizó en estrecha colaboración con los servicios de Radiodiagnóstico, Digestivo, Cirugía General y del Aparato Digestivo, Anatomía Patológica y Microbiología, pues desempeñaban un papel clave en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de ambos grupos de pacientes.

3.2 Pacientes

Se incluyeron en este estudio dos grupos principales de pacientes, uno compuesto por sujetos diagnosticados de hepatitis crónica C y otro formado por pacientes obesos con sospecha de EHGNA sometidos a cirugía bariátrica.

Como ya se ha citado anteriormente, los pacientes fueron reclutados de las consultas de hepatología del Servicio de Digestivo y de la Unidad de Cirugía de la Obesidad del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo respectivamente, ambos en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. Se establecieron por tanto criterios de inclusión y exclusión específicos para cada uno de los grupos, que se especifican a continuación.

3.2.1 Criterios de inclusión

- ✓ Pacientes con hepatopatía crónica por VHC
 - Pacientes diagnosticados de hepatitis crónica por VHC. El diagnóstico se establece por la elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) por encima de 40 UI/L en al menos dos determinaciones diferentes y mantenimiento de esta elevación más de seis meses. Además el paciente debe dar positivo el test anti-VHC de tercera generación y debe detectarse la presencia de RNA-VHC mediante una técnica cualitativa o cuantitativa.

- ✓ Pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica
 - Índice de masa corporal $>40 \text{ kg/m}^2$ o $>35 \text{ kg/m}^2$ con comorbilidades significativas relacionadas con la obesidad.
 - Riesgo operatorio aceptable.
 - Evidencias de no pérdida de peso mediante técnicas no quirúrgicas.
 - Criterios clínicos, analíticos o ecográficos de sospecha de EHGNA, sin contraindicación de cirugía, que indiquen la realización de una biopsia hepática para filiar y graduar la hepatopatía.

3.2.2 Criterios de exclusión

- ✓ Pacientes con hepatopatía crónica por VHC
 - Edad > 70 años.
 - Pacientes con consumo de alcohol >20 gramos/día.
 - Pacientes con hepatitis distinta del VHC o con coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
 - Pacientes con cualquier otra enfermedad hepática conocida: déficit de α -1-antitripsina, cirrosis biliar primaria o enfermedades por depósito de metales (enfermedad de Wilson, hemocromatosis).

✓ Pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica

- Toma de medicación que pudiera tener efectos adversos sobre el hígado (hepatotóxica).
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, hepatitis viral, déficit de α -1-antitripsina y enfermedades por depósito de metales (enfermedad de Wilson, hemocromatosis).
- Pacientes con consumo de alcohol >20 gramos/día.

3.2.3 Grupos de estudio

La población total incluida en el estudio fue de 107 pacientes con hepatitis crónica C y 57 pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica.

Para la consecución de los objetivos marcados, cada uno de estos dos grupos principales de pacientes fue dividido a su vez en subgrupos, de acuerdo a los criterios expuestos a continuación.

✓ Pacientes con hepatopatía crónica por VHC

Estos pacientes se dividieron en subgrupos de acuerdo al grado de fibrosis hepática determinado por la técnica Arfi.

Tal como se ha comentado en la introducción el estándar de referencia para la determinación de la fibrosis es la biopsia hepática, pero los riesgos y limitaciones que conlleva hacen que pocas veces se lleve a cabo en la práctica clínica en este tipo de pacientes. Además, el carácter invasivo de este procedimiento lo convierte en inviable para el control periódico de la evolución de la enfermedad, algo indispensable en este tipo de pacientes. Por tanto, al no disponer de estudio histológico del hígado en los pacientes de este grupo, por no estar justificado ética ni clínicamente, tomamos como referencia para la clasificación de la fibrosis la velocidad de onda de corte (Vc) proporcionada por la técnica Arfi.

Son varios los estudios, incluidos metaánalisis y multicéntricos, que han analizado el rendimiento de la técnica Arfi en el diagnóstico de fibrosis hepática en pacientes con

hepatitis crónica C utilizando la biopsia hepática como estándar de referencia, obteniendo muy buenos resultados (197-204). La potencia y robustez de estos estudios permiten utilizar esta técnica de forma segura para la clasificación de la fibrosis de estos pacientes. Es por ello, que la técnica Arfi puede considerarse una prueba subrogada de la biopsia hepática para la determinación de la fibrosis.

Dentro de los artículos más recientes y relevantes que abordan la validación de la técnica Arfi para la determinación de la fibrosis hepática en este tipo de pacientes, observamos discrepancias en los puntos de corte de Vc para el establecimiento de los distintos grados de fibrosis. Si bien las diferencias son poco significativas y probablemente debidas a la heterogeneidad de las respectivas cohortes de pacientes estudiados.

Después de analizar y contrastar todos estos estudios, optamos por utilizar los puntos de corte propuestos para población europea en un estudio multicéntrico internacional publicado por *Sporea y cols.* (198) en 2012, debido a la gran similitud de la metodología de trabajo y de las características de la población con nuestro estudio. En esta publicación se analiza el rendimiento de la técnica Arfi en una cohorte de 914 pacientes europeos y asiáticos con hepatitis crónica C, utilizando la escala Metavir para la clasificación de la biopsia hepática como referencia. Como resultados obtienen una excelente correlación entre la Vc y el grado de fibrosis de la biopsia, detectándose además diferencias significativas en los valores de Vc de los distintos estadios de fibrosis, así como altos valores de áreas bajo la curva, sensibilidad y especificidad, avalando todo ello la validez de la técnica Arfi para la cuantificación del grado de fibrosis. También se evalúa en este estudio el rendimiento de la técnica al separar la cohorte total en dos subgrupos de pacientes, asiáticos y europeos, obteniendo igualmente buenos resultados, aunque significativamente diferentes entre ellos. Este último hallazgo justificó que en nuestra población de estudio utilizásemos los puntos de corte de Vc obtenidos en el subgrupo de pacientes europeos.

Dichos puntos de corte fueron los siguientes: un valor de Vc $>1,21$ m/s (AUC: 0,857; sensibilidad: 81,1%; especificidad: 82,6%) para la predicción de fibrosis equivalente a un grado $\geq F2$ de la escala Metavir, y un valor de Vc $>1,74$ m/s (AUC: 0,892;

sensibilidad: 86,4%; especificidad: 84,6%) para la predicción de fibrosis equivalente a un grado igual a F4.

Por tanto, utilizando estos puntos de corte se establecieron los siguientes subgrupos de pacientes:

- Grupo 1 (n=33): Pacientes con $V_c < 1,21$ m/s, equivalente a los grados F0-F1 de fibrosis hepática según la escala Metavir.
- Grupo 2 (n=40): Pacientes con $V_c \geq 1,21$ y $< 1,74$ m/s, equivalente a los grados F2-F3 de fibrosis hepática según la escala Metavir.
- Grupo 3 (n=34): Pacientes con $V_c \geq 1,74$ m/s equivalente al grado F4 de fibrosis hepática según la escala Metavir.

✓ Pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica

Las indicaciones generales para la realización de una biopsia hepática en pacientes con sospecha de EHGNA son confirmar o descartar el diagnóstico y estratificar la lesión hepática con el objetivo de proponer un tratamiento y establecer un pronóstico de la enfermedad. Así mismo la biopsia permite la exclusión de otras enfermedades hepáticas (62;100).

La biopsia se considera actualmente el método de referencia para el diagnóstico y estratificación de la EHGNA, por lo que este grupo de pacientes se clasificó de acuerdo a los hallazgos histológicos de la biopsia hepática.

Tal como se ha comentado en la introducción, la EHGNA engloba un amplio espectro de lesiones que van desde la esteatosis hepática simple, pasando por la esteatohepatitis con cambios necroinflamatorios asociados a un grado variable de fibrosis, que pueden progresar a cirrosis hepática e incluso a CHC. De entre estos hallazgos, es conocido que la esteatosis simple suele mostrarse asintomática, además de presentar un curso clínico benigno y carácter reversible. Por el contrario, el hecho de presentar esteatohepatitis supone un mal pronóstico, multiplicando la probabilidad de evolucionar a cirrosis, lo que implica así mismo un aumento del riesgo de fallecimiento a causa de la hepatopatía.

Por tanto, atendiendo a las implicaciones clínicas que suponen en el manejo, la evolución y el pronóstico de estos pacientes los hallazgos de la biopsia, los sujetos de este grupo se clasificaron en dos subgrupos de acuerdo a los resultados del estudio anatomopatológico. Estos subgrupos fueron los siguientes:

- Grupo 1 (n=28): Pacientes cuya biopsia hepática no reveló alteraciones o bien presentó únicamente esteatosis simple.
- Grupo 2 (n=29): Se incluyeron en este grupo el resto de los pacientes, es decir, aquellos cuya biopsia hepática reveló, además de esteatosis y con independencia del grado o el porcentaje, la presencia de infiltrados inflamatorios, necrosis hepatocitaria, fibrosis, balonización de los hepatocitos o hialina de Mallory.

3.3 Métodos

3.3.1 Parámetros de estudio

Los parámetros de estudio incluidos en esta tesis doctoral comprendieron variables clínicas, parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico y del estudio anatomopatológico de la biopsia hepática, y parámetros de laboratorio.

i. Variables clínicas

Para cada uno de los dos grupos de pacientes se recogieron las siguientes variables clínicas:

- ✓ Pacientes con hepatopatía crónica por VHC
 - a. Datos epidemiológicos
 - Edad (años)
 - Sexo

b. Datos Clínicos

- Tratamiento antiviral: Ningún paciente llevaba tratamiento en el momento de recogida de las muestras. Los pacientes, con independencia del tipo de tratamiento, se clasificaron en:
 - Si: aquellos pacientes que habían llevado tratamiento antiviral con anterioridad a la recogida de las muestras (incluyendo los que finalizaron el tratamiento completo y los que tuvieron que suspenderlo por algún motivo).
 - No: pacientes naive.

✓ Pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica

a. Datos epidemiológicos

- Edad (años)
- Sexo
- Peso (Kg)
- Índice de masa corporal (Kg/m^2)

b. Comorbilidades

- Hipertensión arterial (HTA): definida como presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y/o diastólica ≥ 90 mmHg.
- Dislipemia: de acuerdo los criterios del *Adult Treatment Panel III* (205), definida como concentraciones de colesterol total ≥ 200 mg/dL, y/o de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) < 40 mg/dL, y/o de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) > 100 mg/dL, y/o de triglicéridos > 150 mg/dL, o pacientes que estaban con alguna terapia hipolipemiente en el momento de la inclusión en el estudio.
- Diabetes mellitus: diagnosticada según los criterios de la *American Diabetes Association* y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que implicaban una glucemia plasmática ocasional ≥ 200 mg/dL y síntomas de diabetes, glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL, glucemia plasmática ≥ 200 mg/dL a las 2 horas de una prueba de

tolerancia oral de glucosa (75g de glucosa), hemoglobina glicosilada $\geq 6,5\%$ o precisar tratamiento hipoglucemiante.

- Síndrome metabólico: diagnosticado según los criterios del *Adult Treatment Panel III* (205), que establece el diagnóstico de SM cuando hay tres o más de los siguientes hallazgos: obesidad abdominal (circunferencia de cintura >102 cm en varones y >88 cm en mujeres), hipertrigliceridemia (>150 mg/dL), cHDL bajo (<40 mg/dL en varones; <50 mg/dL en mujeres), HTA o glucemia en ayunas elevada (>110 mg/dL).

ii. Parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico

Tanto la técnica Arfi como la ecografía abdominal fueron realizadas por un radiólogo con seis años de experiencia en elastografía y ecografía abdominal, en el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

En el caso de los pacientes con VHC, el estudio radiodiagnóstico se llevo a cabo la semana previa a la cita para la revisión de su enfermedad en las consultas de hepatología, de manera simultánea a la toma de muestras para el análisis de laboratorio. Por otro lado, en el caso de los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica, el estudio radiodiagnóstico se realizó el día previo a la cirugía, como parte del estudio pre-operatorio, y de forma simultánea a la toma de muestras para el análisis de laboratorio.

La técnica Arfi se realizó mediante la plataforma de ecografía Acuson S2000 (Siemens, Erlangen, Germany), con el programa 2.0, una sonda convex de 4-1 MHz multifrecuencia, imagen de tejido de armónicos (4 MHz) y un índice mecánico de 1,7. Este equipo permite así mismo la realización de una ecografía abdominal convencional.

La técnica Arfi se llevó a cabo con el paciente en decúbito supino, el brazo derecho en máxima abducción, y la sonda situada sobre la piel en el espacio intercostal, entre la 9ª y 10ª costilla, ligeramente por encima de la línea media axilar, con retención de la respiración. Las imágenes en modo B se obtuvieron en el lóbulo hepático derecho y la región de interés se posicionó en el segmento VI a una profundidad de 3,5 a 8 cm por debajo de la cápsula hepática, evitando así errores en los pacientes obesos. Se tomaron

tres medidas con éxito de Vc, y la Vc definitiva se obtuvo de la media entre las 3 Vc adquiridas. Las medidas se consideraron incorrectas cuando, por movimientos o artefactos, se obtenía "XXX".

Simultáneamente, durante la realización del ARFI, se realizó una ecografía abdominal a todos los pacientes, para valorar la presencia de los siguientes signos ecográficos de hepatopatía crónica: hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia del lóbulo caudado, heterogeneidad del parénquima hepático, superficie hepática nodular, esteatosis, ascitis o hipertensión portal.

Se objetivó la existencia de hepatomegalia cuando la dimensión sagital desde la cúpula hasta la punta del lóbulo hepático derecho fue mayor que 15 cm, medidos en la línea media clavicular.

Se consideró la existencia de esplenomegalia cuando el diámetro bipolar o longitudinal del bazo fue mayor de 13 cm, medido en línea axilar posterior, entre el V y el VII espacio intercostal.

La hipertrofia del lóbulo caudado se definió como una relación superior a 0,6 entre el diámetro transversal del lóbulo caudado (medido desde su margen medial al margen lateral derecho de la vena porta) y el diámetro transversal del lóbulo hepático derecho (medido desde el margen derecho de la vena porta hasta el punto más lateral del lóbulo derecho). Ambas mediciones se obtuvieron mediante la colocación del transductor a nivel de la bifurcación de la vena porta.

La heterogeneidad del parénquima hepático se valoró subjetivamente, considerándola positiva cuando, con independencia del grado, se observó un aumento de la ecogenicidad, pudiendo acompañarse de dificultad para la observación del diafragma y los vasos intrahepáticos.

Se determinó como positiva la existencia de superficie hepática nodular cuando se apreció una superficie irregular, discontinua y/o lobulada, en lugar de la superficie lisa y regular característica de un hígado sano. La nodularidad corresponde a la presencia de nódulos de regeneración y fibrosis.

La presencia de esteatosis se detectó subjetivamente de acuerdo la presencia de un parénquima hepático hiperecogénico en comparación con la ecogenicidad cortical del riñón derecho, y la disminución en la visualización del diafragma y de las paredes de los vasos hepáticos.

Se consideró la presencia de ascitis cuando se observó una colección líquida libre en el espacio peritoneal, ecográficamente anecoica.

Se consideró la existencia de hipertensión portal cuando se detectaron alguno de los siguientes signos ecográficos: dilatación del sistema venoso espleno-portal (constatación de una vena porta >13mm, de una vena esplénica >12mm y de una vena mesentérica superior >11mm), calibre fijo de la vena esplénica y de la vena mesentérica superior con los movimientos respiratorios (variación menor del 10% en el calibre de la vena esplénica y de la mesentérica superior en inspiración y espiración) y/o presencia de vasos colaterales portosistémicos.

Por tanto, teniendo en cuenta todo lo anterior, del estudio radiodiagnóstico se obtuvieron las siguientes variables:

- Vc (m/s).
- Signos ecográficos de hepatopatía crónica (presencia o ausencia): esta variable se consideró positiva cuando el paciente presentaba al menos uno de los signos ecográficos mencionados anteriormente (hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia del lóbulo caudado, heterogeneidad del parénquima hepático, superficie hepática nodular, esteatosis, ascitis o hipertensión portal).
- Hepatomegalia (presencia o ausencia).
- Esplenomegalia (presencia o ausencia).
- Hipertrofia del lóbulo caudado (presencia o ausencia).
- Heterogeneidad del parénquima hepático (presencia o ausencia).
- Superficie hepática nodular (presencia o ausencia).
- Esteatosis (presencia o ausencia).
- Ascitis (presencia o ausencia).
- Hipertensión portal (presencia o ausencia).

iii. Parámetros derivados del estudio anatomopatológico de la biopsia hepática

La muestra de biopsia hepática se obtuvo únicamente en el grupo de sujetos obesos sometidos a cirugía bariátrica. Estos pacientes, de acuerdo con los criterios de inclusión, presentaban signos clínicos, analíticos o ecográficos sospechosos de EHGNA que indicaban la realización de una biopsia hepática para confirmar y graduar la hepatopatía.

Por el contrario, tal como se ha comentado anteriormente, en el caso de los pacientes con hepatopatía por VHC, a pesar de considerarse el estándar para el diagnóstico de la fibrosis, no se pudo obtener muestra de tejido hepático para estudio anatomopatológico, por no estar justificada ética ni clínicamente y existir otras técnicas de carácter no invasivo suficientemente contrastadas.

Todos los pacientes se sometieron a cirugía bariátrica en la Unidad de Cirugía de la Obesidad del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. El proceso quirúrgico se llevó a cabo por dos cirujanos con más de doce años de experiencia en este tipo de cirugía. En todos los pacientes se realizó la técnica de bypass gástrico en "Y de Roux" vía laparoscópica, que ya se ha explicado en detalle en la introducción.

Durante la cirugía, a todos los pacientes se les recogió muestra para biopsia hepática, mediante la toma de una pequeña cuña de tejido del segmento VI hepático, de aproximadamente 1×1,5×1,5 cm. La toma de biopsia en cuña presenta la ventaja de realizarse bajo visión directa, y además permite el control directo e inmediato del riesgo de hemorragias (100).

Las cuñas de tejido se fijaron inmediatamente en formol tamponado al 10% y se enviaron al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca para su estudio. Allí, las muestras se incluyeron en un bloque de parafina para obtener láminas de tejido de 4 a 6 µm de grosor. Los cortes histológicos se tiñeron con las técnicas de hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff, tricrómico de Masson, Perls y tinción para reticulina. Todas las muestras tuvieron una longitud mínima de 1,5 cm y contuvieron al menos 10 espacios porta. El procedimiento de análisis de todas las muestras fue llevado a cabo por el mismo patólogo, con más de veinte años de experiencia, que desconocía cualquier otro tipo de información del paciente.

Se analizó la presencia de las siguientes alteraciones histopatológicas: esteatosis, inflamación, fibrosis, hepatocitos balonizados e hialina de Mallory.

Para el diagnóstico de EHGNA y la clasificación de las alteraciones encontradas se utilizaran las clasificaciones de *Brunt y cols.* para la esteatosis y la de *Matteoni y cols.* para la clasificación de los hallazgos de esteatohepatitis (60;63), que ya se han desarrollado en detalle en la introducción.

Por tanto, del estudio anatomopatológico se obtuvieron las siguientes variables:

- Esteatosis (%).
- Inflamación (presencia o ausencia).
- Fibrosis (presencia o ausencia).
- Hepatocitos balonizados (presencia o ausencia).
- Hialina de Mallory (presencia o ausencia).

iv. Parámetros de laboratorio

Las variables derivadas de los parámetros de laboratorio fueron las mismas en ambos grupos de pacientes, a excepción de las determinaciones relacionadas con el VHC, el algoritmo Fibrotest y el recuento de linfocitos totales y su porcentaje relativo, que únicamente se determinaron en los pacientes con Hepatitis crónica C. Las variables fueron las siguientes:

- Parámetros hematológicos: hemograma y coagulación.
 - Hemograma: hemoglobina (g/dL), hematocrito (%), volumen corpuscular medio (fL), recuento de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), recuento de leucocitos totales ($\times 10^3/\mu\text{L}$), recuento de linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), porcentaje de linfocitos (%).
 - Coagulación: actividad de protrombina (%), razón internacional normalizada (INR), ratio del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPAr) y fibrinógeno (mg/dL).
- Parámetros bioquímicos: bioquímica general, pruebas de función hepática y biomarcadores directos de fibrosis.

- Bioquímica general: glucosa (mg/dL), urea (mg/dL), creatinina (mg/dL), proteínas totales (g/dL), albúmina (g/dL), bilirrubina total (mg/dL), colesterol (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), haptoglobina (mg/dL), apoA-1 (mg/dL) y α 2-macroglobulina (g/L).
 - Pruebas de función hepática: AST (UI/L), ALT (UI/L), GGT (UI/L) y ALP (UI/L).
 - Biomarcadores directos de fibrosis: HA (ng/mL), PIIINP (ng/mL) y TIMP-1 (ng/mL).
- Índices matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática: se calcularon con las fórmulas matemáticas pertinentes, ya descritas en la introducción.
- Elf, Apri, Forns, Fibrotest, Fibrometer, Fib-4, Fibro-Q, Hepascore y Via Index.
- Parámetros relativos al VHC: tomados de los Servicios de Microbiología e Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
- Genotipo viral (1 al 6), Carga viral (copias por millón y su logaritmo) y Polimorfismo de la IL28B (CC, CT o TT).

3.3.2 Recogida y procesamiento de las muestras

i. Recogida de las muestras

Todas las muestras para el estudio fueron obtenidas mediante punción venosa antecubital y tras 12 h de ayuno y un periodo de reposo de 20 minutos. La extracción se llevó a cabo por personal de enfermería cualificado.

Tras la extracción, la sangre se recogió en tubos de vacío vacutainer (Becton Dickinson and company, Nueva Jersey, E.E.U.U.) con diferentes aditivos. Se obtuvieron muestras de suero (tubo seco con silicona), plasma (tubo con citrato de sodio) y sangre total (tubo con ácido etilendiaminotetracético tripotásico, EDTA K₃). El tubo de plasma se rellenó de manera que contuviese nueve partes de sangre y una parte de citrato sódico.

La muestra de sangre total se utilizó para realizar el hemograma, después de la extracción y previa agitación. Las muestras de plasma, y la de suero tras la retracción del coágulo de fibrina, fueron centrifugadas a 3500 revoluciones por minuto durante 20 minutos en una centrifuga Kubota 5900 (Kubota Corporation, Osaka, Japón) a 4°C. Inmediatamente después de la centrifugación, con la muestra de plasma se realizó el estudio de hemostasia, y la muestra de suero se alicuotó y se congeló a -80°C para el análisis posterior de los parámetros bioquímicos.

ii. Procesamiento analítico de las muestras

El procesamiento analítico de las muestras se realizó íntegramente en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, a excepción de las determinaciones relativas al VHC, que como ya se ha comentado, se realizaron en los Servicios de Microbiología e Inmunología del mismo hospital, por lo que no se incluyen en este apartado.

✓ Hemograma

El tubo de EDTA para la realización del hemograma, se analizó en el equipo Sysmex XE5000 (Roche Diagnostic®). Este autoanalizador utiliza las tecnologías de citometría de flujo fluorescente y enfoque hidrodinámico.

La citometría de flujo tradicional combinada con el marcado fluorescente es el método comúnmente utilizado para el conteo y diferencial leucocitario. La medición de la fluorescencia revela la proporción núcleo-citoplasma de cada célula teñida individualmente, permitiendo diferenciar las distintas poblaciones de leucocitos. Mediante la proyección de un diodo láser sobre las células y el análisis combinado de su dispersión lateral (en función de la complejidad interna), frontal (en función del volumen) y la fluorescencia del material de ácidos nucleicos, se determina la clasificación de cada leucocito.

Los eritrocitos y plaquetas son contados en un canal exclusivo que utiliza como método de detección la impedancia o corriente directa con la tecnología de enfoque hidrodinámico. Discriminadores automáticos separan las dos poblaciones en base a

algoritmos complejos. La intensidad del pulso eléctrico de cada eritrocito analizado es proporcional al volumen celular. El hematocrito es determinado directamente en base al recuento y detección de volumen de cada eritrocito.

El análisis de hemoglobina se lleva a cabo con lauril sulfato de sodio, que crea un producto estable con el grupo hemo de la hemoglobina y es analizado. La hemoglobina es determinada en un canal separado, minimizando la interferencia por concentraciones altas de leucocitos.

✓ Coagulación

El análisis de los parámetros derivados del estudio de la hemostasia se llevó a cabo en el tubo de plasma anticoagulado con citrato, en el equipo ACL TOP 300 CTS (Werfen® Group). Este analizador permite, de manera completamente automatizada, realizar todas las pruebas de coagulación requeridas en un laboratorio clínico, utilizando un método analítico foto-óptico coagulométrico, cromogénico o inmunológico, en función de la variable determinada.

Los parámetros de la coagulación que se tomaron como variables en este estudio fueron, como ya se ha comentado, el porcentaje de actividad de protrombina (ACTPR), el INR, el TTPAr y el fibrinógeno. A excepción del fibrinógeno, todos estos parámetros son calculados. El cálculo se realiza, a partir del tiempo de protrombina (TP) en el caso del porcentaje de actividad de protrombina y del INR, y a partir del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) en el caso del TTPAr.

Las variables TP, TTPA y fibrinógeno se determinan por un método foto-óptico coagulométrico. Este método consiste en la irradiación con luz roja a una longitud de onda de 671 nm de una mezcla de plasma del paciente y reactivo (que será diferente en función del analito), y la detección del cambio en la turbidez provocado por la formación del coágulo de fibrina, que se traduce en un cambio en la luz dispersada a 180°. Entonces se calcula el tiempo de coagulación, entendido como el tiempo requerido para alcanzar la cantidad de luz dispersada en la detección del punto de coagulación, tomando como 0% la cantidad de luz dispersada justo después del comienzo de la detección de la reacción, y 100% la cantidad de luz dispersada que está presente cuando la coagulación es del 100%.

El TP se calcula utilizando un reactivo que contiene factor tisular recombinante relipidado con un fosfolípido sintético, mezclado con cloruro cálcico, tampón y conservantes. La adición de plasma del paciente, en presencia de iones calcio, inicia la activación de la vía extrínseca de la coagulación, que resulta finalmente en la conversión del fibrinógeno en un coágulo de fibrina.

La ACTPR es el porcentaje de actividad con respecto a un plasma normal, al que se le supone una actividad del 100%. El resultado del TP, que se expresa en segundos, se convierte en un porcentaje de la actividad normal mediante una curva de referencia. Cada laboratorio debe realizar su propia curva, mediante la preparación y el análisis de diluciones de un pool de plasmas citratados normales pertenecientes a sujetos sanos.

El factor tisular utilizado para la determinación del TP es de origen humano, y en función del lote, puede originar resultados de actividad variables. Esto, junto con la variabilidad de los sistemas analíticos, da lugar a diferencias, que pueden ser significativas, en los resultados de TP. Por tanto, con el objeto de normalizar los resultados de TP, se desarrolló el INR, que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$INR = \left[\frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ control}} \right]^{ISI}$$

El TP control debe calcularlo cada laboratorio, utilizando un pool de plasmas normales de individuos sanos. El valor de índice de sensibilidad internacional (ISI) viene asignado por el fabricante para cada lote de reactivo.

En el test del TTPA, el plasma del paciente es incubado con una cantidad óptima de fosfolípidos, una superficie de contacto cargada negativamente y tampón, lo que inicia la vía intrínseca de la coagulación. Después de una incubación a 37° durante un determinado período de tiempo, la adición de cloruro cálcico desencadena el proceso de la coagulación y se medirá el tiempo necesario para la formación del coágulo.

El TTPA también puede expresarse como un ratio entre el TTPA del paciente y TTPA control. Cada laboratorio debe establecer su propio TTPA control, utilizando un pool de plasmas de individuos sanos representativos de la población local.

El fibrinógeno se determina de manera cuantitativa mediante el método de Clauss, que utiliza un exceso de trombina (de origen bovino) para convertir el fibrinógeno en fibrina en el plasma diluido. A concentraciones altas de trombina y bajas de fibrinógeno el nivel de la reacción está en función de la concentración de fibrinógeno.

✓ Bioquímica

Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron en la muestra recogida en el tubo de suero (tubo seco con silicona), cuyo contenido se había alicuotado y congelado a -80°C inmediatamente después de la centrifugación posterior a la extracción. Una vez concluido el proceso de recolección de las muestras, estas fueron descongeladas para proceder al análisis de las magnitudes bioquímicas. Se realizó la descongelación a 37°C , invirtiendo el contenedor varias veces para asegurar la homogeneidad de la muestra. Antes del procesamiento de las muestras se comprobó la ausencia de restos de fibrina, en cuyo caso se realizó una nueva centrifugación.

Para el análisis bioquímico se utilizaron tres analizadores automatizados, el Cobas 8000 (Roche Diagnostic®), el BN ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics®) y el Advia Centauro CP (Siemens Healthcare Diagnostics®). A continuación se detallan los parámetros determinados en cada equipo, así como el principio analítico utilizado.

- Cobas 8000 (Roche Diagnostic®)

En esta plataforma analítica modular se llevaron a cabo las determinaciones de glucosa, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, colesterol, triglicéridos, AST, ALT, GGT y ALP. Todas las determinaciones se realizaron en el módulo de química clínica c701 del equipo, y para cada una de ellas se utilizó el método que se explica a continuación:

✓ *Glucosa*

Test por radiación ultravioleta, utilizando el método de referencia enzimático con hexoquinasa. La hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por ATP. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) oxida la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP a gluconato-6-fosfato. No se oxidan otros hidratos de

carbono. La velocidad de formación de NADPH durante la reacción es directamente proporcional a la concentración de glucosa, que se determina fotométricamente. En la **figura 25** se ilustra de forma esquemática el procedimiento analítico empleado.

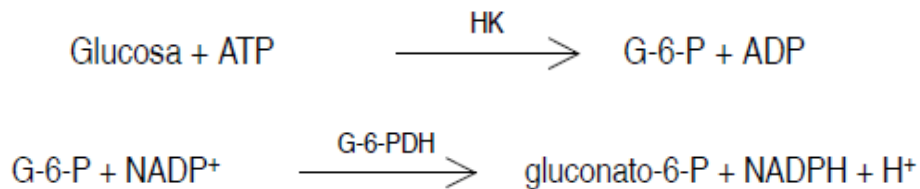


Figura 25: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la glucosa.

✓ *Urea*

Test cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa. Primeramente la urea es hidrolizada por la ureasa a amonio y carbonato. En una segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con el amonio en presencia de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción, por cada mol de urea hidrolizada se oxidan dos moles de NADH a NAD⁺. La velocidad con que la concentración de NADH disminuye es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y se mide fotométricamente. En la **figura 26** que aparece a continuación se ilustra de manera esquemática el procedimiento analítico empleado.

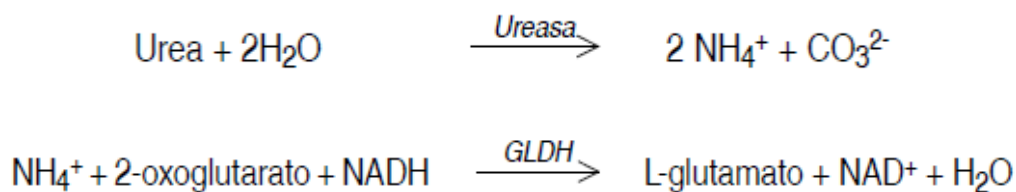


Figura 26: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la urea.

✓ *Creatinina*

Test cinético colorimétrico basado en el método de Jaffé. En una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-anaranjado con el picrato. La tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra, que se

determina fotométricamente. La prueba emplea la determinación del blanco para minimizar la interferencia por bilirrubina. Para corregir las reacciones inespecíficas por cromógenos no-creatinina en suero y plasma, como por ejemplo las proteínas y cetonas, los resultados se corrigen en $-26 \mu\text{mol/L}$ ($-0,3 \text{ mg/dL}$). En la **figura 27** puede observarse de manera esquemática el procedimiento analítico empleado.

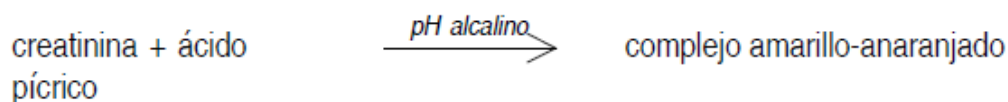


Figura 27: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la creatinina.

✓ *Proteínas totales*

Test colorimétrico. En solución alcalina, el cobre bivalente reacciona con el enlace peptídico de las proteínas formando el característico complejo biuret purpúreo. Con tartrato sódico-potásico se impide la precipitación de hidróxido de cobre y con yoduro potásico se inhibe la autoreducción del cobre. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de proteína y se determina fotométricamente. En la **figura 28** se representa esquemáticamente el procedimiento analítico empleado.

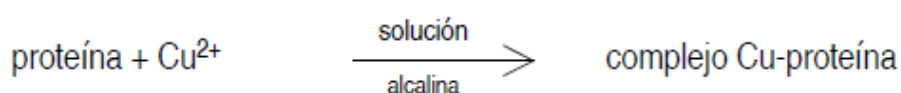


Figura 28: Esquema representativo del principio del test para la determinación de las proteínas totales.

✓ *Albumina*

Test colorimétrico. Con un pH de 4,1 la albúmina tiene un carácter suficientemente catiónico como para formar un compuesto con el verde de bromocresol (BCG), colorante aniónico, formando un complejo azul verdoso. La intensidad del colorante azul verdoso es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y se determina fotométricamente. En la **figura 29** se ilustra esquemáticamente el procedimiento analítico empleado.

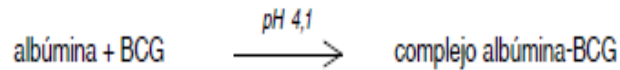


Figura 29: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la albúmina.

✓ *Bilirrubina total*

Test colorimétrico. En un medio fuertemente ácido y en presencia de un agente disolvente adecuado, la bilirrubina total se acopla a un ión de diazonio. La intensidad cromática del pigmento rojo azoico formado es directamente proporcional a la concentración de la bilirrubina total y se mide fotométricamente. En la **figura 30** puede observarse el procedimiento analítico empleado de manera esquemática.



Figura 30: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la bilirrubina total.

✓ *Colesterol*

Método enzimático colorimétrico. Los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la enzima colesterol esterasa (CE) a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa (CHOD) cataliza entonces la oxidación de colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno formado produce la unión oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona para formar un colorante rojo de quinona-imina. La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol, que se determina midiendo el aumento de la absorbancia. En la **figura 31** aparece representado de manera esquemática el procedimiento analítico empleado de manera esquemática.

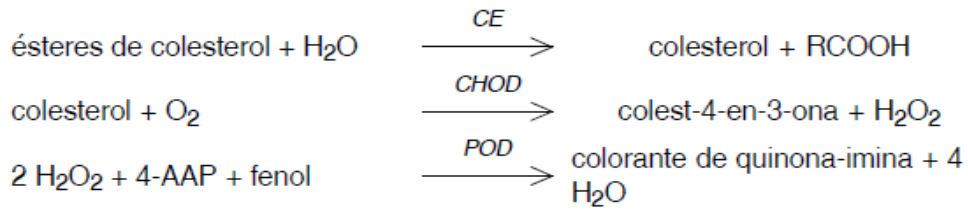


Figura 31: Esquema representativo del principio del test para la determinación del colesterol.

✓ *Triglicéridos*

Test enzimático colorimétrico. Mediante el empleo de una lipasa lipoproteica (LPL) obtenida de microorganismos, los triglicéridos se hidrolizan completa y rápidamente a glicerol, con la oxidación subsiguiente a dihidroxiacetonafofato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y 4-clorofenol para formar un cromógeno rojo, el 4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona. La intensidad cromática del colorante rojo formado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos, que se determina fotométricamente. En la **figura 32** se ilustra esquemáticamente el procedimiento analítico empleado de manera esquemática.

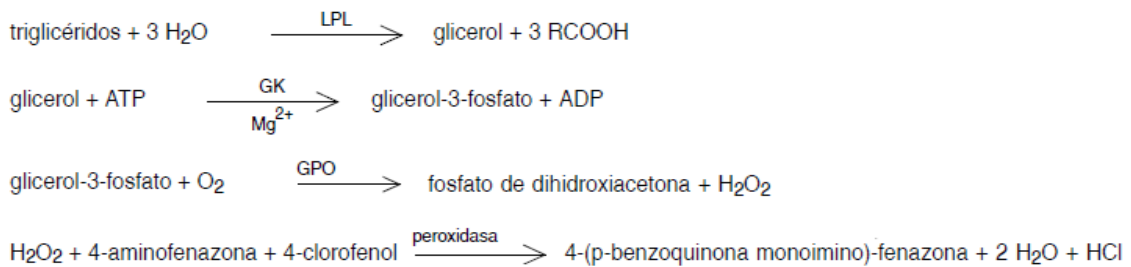


Figura 32: Esquema representativo del principio del test para la determinación de los triglicéridos.

✓ *AST*

Test cinético acorde al método estandarizado por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), pero mejorado en cuanto al rendimiento y la estabilidad. La AST de la muestra cataliza la transferencia de un grupo amino entre L-aspartato y 2-oxoglutarato para obtener oxaloacetato y L-glutamato. A continuación y en presencia de la malato deshidrogenasa (MDH), el oxaloacetato reacciona con NADH para formar NAD⁺. La

velocidad de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la AST, que se determina midiendo la reducción de la absorbancia. En la **figura 33** se representa de manera esquemática el procedimiento analítico empleado de manera esquemática.

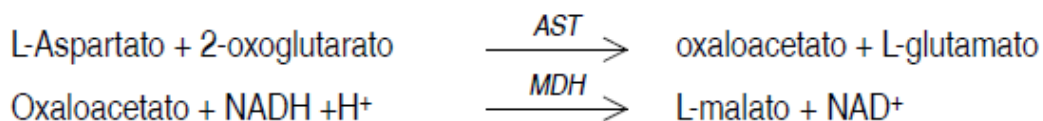


Figura 33: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la AST.

✓ *ALT*

Test cinético acorde al método estandarizado por la IFCC, pero mejorado en cuanto al rendimiento y la estabilidad. La ALT cataliza la reacción entre la L-alanina y el 2-oxoglutarato. El piruvato formado es reducido por NADH en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) para formar L-lactato y NAD⁺. La velocidad inicial de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALT, que se determina midiendo la reducción de la absorbancia. En la **figura 34** puede observarse de manera esquemática el procedimiento analítico empleado.

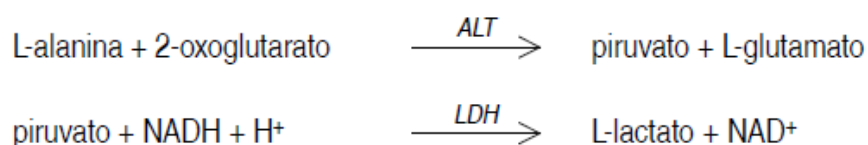


Figura 34: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la ALT.

✓ *GGT*

Prueba enzimática colorimétrica. La γ -glutamyltransferasa transfiere el grupo γ -glutamil de la L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina. La cantidad de 5-amino-2-nitrobenzoato liberada es proporcional a la actividad de la GGT en la muestra, que se determina fotométricamente midiendo el aumento de la absorbancia. En la **figura 35** se ilustra esquemáticamente el procedimiento analítico empleado.

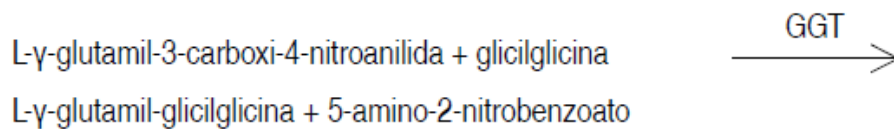


Figura 35: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la GGT.

✓ *ALP*

Test colorimétrico. En presencia de iones de magnesio y de zinc, las fosfatasas desdoblan el p-nitrofenilfosfato a fosfato y p-nitrofenol. El p-nitrofenol liberado es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALP, la cual se determina midiendo el aumento de la absorbancia. En la **figura 36** se representa esquemáticamente el procedimiento analítico empleado.

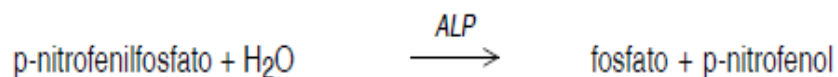


Figura 36: Esquema representativo del principio del test para la determinación de la ALP.

- BN ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics®)

En este autoanalizador compacto se llevaron a cabo las determinaciones de haptoglobina, apolipoproteínaA-1 y α 2-macroglobulina. En los tres casos el método de medida fue la inmunonefelometría.

Mediante la adición de anticuerpos específicos contra el analito que se desea cuantificar, se produce la formación de inmunocomplejos. En este caso se utilizan antisueros líquidos de origen animal producidos mediante la inmunización de conejos con haptoglobina, apolipoproteínaA-1 y α 2-macroglobulina humanas altamente purificadas. Al adicionarlos a la muestra del paciente se forman los correspondientes inmunocomplejos.

Al aplicar un haz de luz con una longitud de onda de 840 nanómetros a través de la cubeta que contiene estos complejos, se producirá la dispersión de la misma. La cantidad

de luz dispersada por los complejos será proporcional a la concentración del analito en cuestión en la muestra del paciente.

- Advia Centauro CP (Siemens Healthcare Diagnostics ®)

En este autoanalizador compacto se llevaron a cabo las determinaciones de HA, PIIINP y TIMP-1. En los tres casos se trata de un ensayo de tipo sándwich a dos puntos que utiliza la tecnología de quimioluminiscencia directa.

✓ HA

El ensayo utiliza una proteína de unión al ácido hialurónico (HABP), tanto para la captura como para la detección de HA. El reactivo del cartucho contiene HABP conjugada con éster de acridinio y el reactivo del pocillo auxiliar contiene HABP conjugada con isocianato de fluoresceína (FITC). La fase sólida contiene un anticuerpo monoclonal anti-FITC unido de forma covalente a partículas paramagnéticas.

En una primera incubación de 18 minutos a 37°C, el anticuerpo monoclonal anti-FITC unido de forma covalente a partículas paramagnéticas se unirá a la HABP marcada con fluoresceína, y esta a su vez se unirá al HA. En una segunda incubación de otros 18 minutos a 37°C se forma un sándwich entre el complejo anterior y la HABP conjugada con éster de acridinio. La mezcla se traslada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente, y la adición de una solución ácida y una básica generan el inicio de la reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Existe una relación directa entre la cantidad de actividad del HA en la muestra del paciente y la cantidad de unidades relativas de luz detectadas por el sistema. En la **figura 37** que aparece a continuación se observa esquemáticamente el procedimiento de medida.

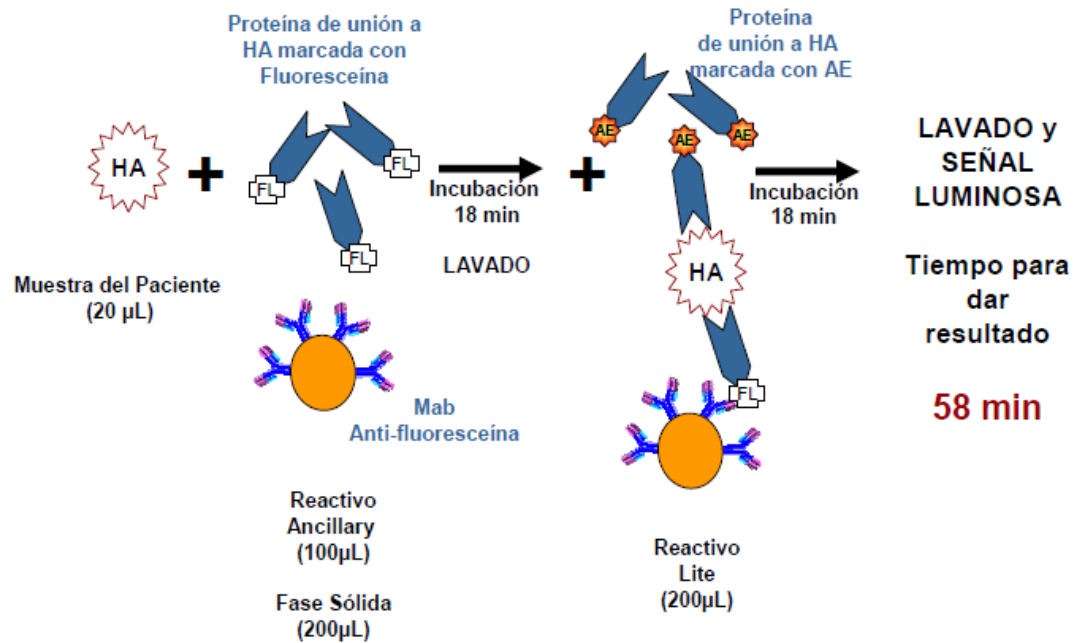


Figura 37: Esquema representativo del principio del test para la determinación del HA.

✓ *PIIINP*

El ensayo emplea dos anticuerpos monoclonales de ratón: el primer anticuerpo, presente en el reactivo lite, es un anticuerpo anti-PIIINP marcado con éster de acridinio. El segundo anticuerpo, presente en el reactivo del pocillo auxiliar, es un anticuerpo anti-PIIINP marcado con biotina. La fase sólida contiene partículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina.

En una primera incubación de 2,75 minutos a 37°C, las partículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina se unen al anticuerpo anti-PIIINP marcado con biotina, que a su vez se unirá al PIIINP. En una segunda incubación de 5 minutos a 37°C se forma un sándwich entre el complejo anterior y el anticuerpo anti-PIIINP marcado con éster de acridinio. La mezcla se traslada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente, y la adición de una solución ácida y una básica generan el inicio de la reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Existe una relación directa entre la cantidad de actividad del PIIINP en la muestra del paciente y la cantidad de unidades relativas de luz

detectadas por el sistema. En la **figura 38** que aparece a continuación se observa esquemáticamente el procedimiento de medida.

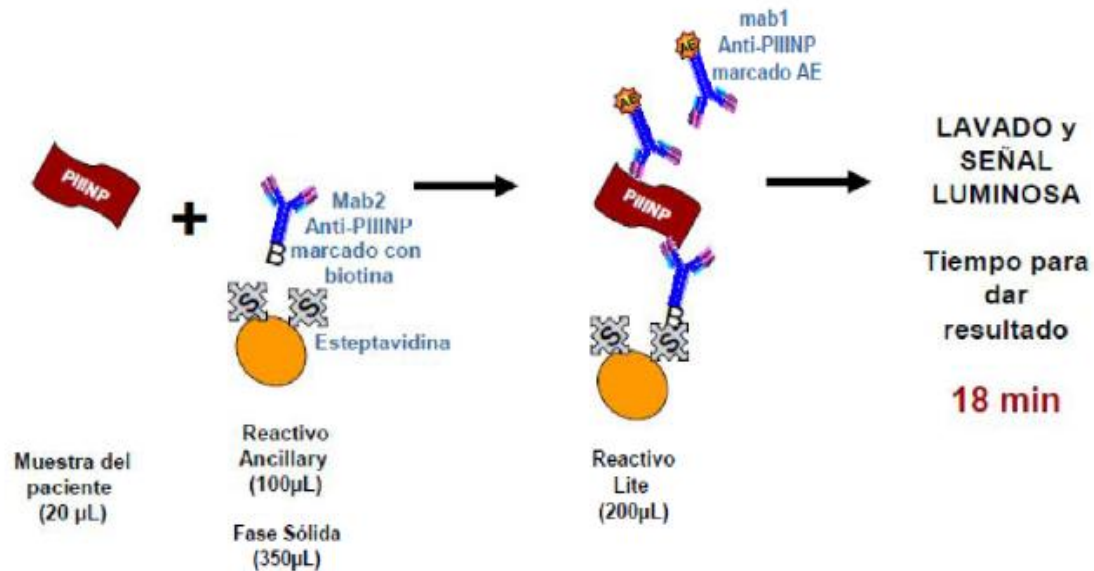


Figura 38: Esquema representativo del principio del test para la determinación del PIINP.

✓ *TIMP-1*

El ensayo emplea dos anticuerpos monoclonales de ratón anti-TIMP-1: un anticuerpo anti-TIMP-1 marcado con éster de acridinio y un anticuerpo anti-TIMP-1 marcado con FITC. La fase sólida contiene un anticuerpo monoclonal anti-FITC unido de forma covalente a partículas paramagnéticas.

Se realiza una única incubación de 2,75 minutos a 37°C, en la que se formará el sándwich entre el TIMP-1, el anticuerpo anti-TIMP-1 marcado con éster de acridinio y el anticuerpo anti-TIMP-1 marcado con FITC. A su vez este sándwich se unirá al anticuerpo monoclonal anti-FITC unido de forma covalente a partículas paramagnéticas. La mezcla se traslada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente, y la adición de una solución ácida y una básica generan el inicio de la reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Existe una relación directa entre la cantidad de actividad del TIMP-1 en la muestra del

paciente y la cantidad de unidades relativas de luz detectadas por el sistema. En la **figura 39** que aparece a continuación se observa esquemáticamente el procedimiento de medida.

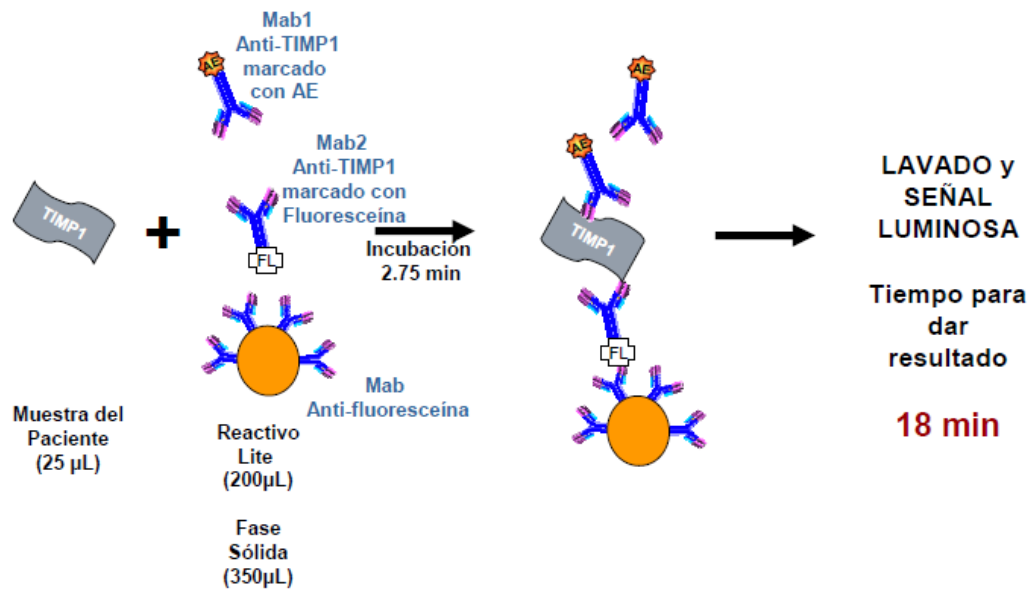


Figura 39: Esquema representativo del principio del test para la determinación del TIMP-1.

3.4 Análisis Estadístico

En las variables cuantitativas, para el estudio de ajuste a una distribución normal se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas fueron representadas como media \pm desviación estándar, y las variables que no mostraron una distribución normal se representaron como la mediana [rango intercuartílico] (percentil 25-percentil 75). Las variables cualitativas se expresaron como frecuencia absoluta y frecuencia relativa en porcentajes.

En el grupo de pacientes con VHC, tanto las comparaciones entre los tres subgrupos a estudio, como los valores de cada biomarcador en función de las características clínicas y demográficas se realizaron mediante el test Anova, o mediante el test Kruskal-Wallis si las variables no seguían una distribución normal. Por otro lado, en el grupo de pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica, las comparaciones entre los dos subgrupos a

estudio se realizaron mediante el test t Student, o mediante el test U-Mann-Whitney si las variables no seguían una distribución normal.

Las variables cualitativas fueron comparadas mediante test de Chi-cuadrado con test exacto de Fisher, en caso de ser relevante.

Las correlaciones entre variables continuas se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según siguieran o no, una distribución normal.

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para estudiar la influencia que ejercen sobre los biomarcadores directos estudiados (HA, PIIINP y TIMP-1) y sobre el algoritmo ELF el resto de variables continuas. Para ello se tomaron como variables dependientes los citados biomarcadores directos y el algoritmo ELF, y se incluyeron como variables independientes aquellas variables con un nivel de significación $<0,15$ en el estudio de correlaciones. De acuerdo al tamaño muestral, se incluyeron hasta un máximo de diez variables independientes en el caso de los pacientes con VHC y seis en el caso de los pacientes obesos. Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal se calculó la ecuación que define, en el porcentaje indicado por el coeficiente de determinación, los valores de cada una de las variables dependientes.

Se establecieron curvas ROC de los biomarcadores, de los algoritmos matemáticos y de la Vc (esta última únicamente en el caso de los pacientes obesos), para evaluar su capacidad de discriminación entre los individuos positivos y negativos para el evento fijado como objetivo diagnóstico. Para aquellas variables en las que el AUC resultó significativa, se calculó el punto de corte óptimo de discriminación de acuerdo al Índice de Youden, el cual maximiza las diferencias entre los verdaderos positivos y los falsos positivos (206;207), así como los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Así mismo, se realizó una comparación de estas variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208).

Además, se realizó un análisis de regresión logística binaria, tomando como variables dependientes el diagnóstico de fibrosis significativa en el grupo de pacientes con VHC y la detección en la biopsia hepática de esteatosis junto con infiltrados inflamatorios, balonización hepatocitaria, fibrosis o hialina de mallory en el grupo de pacientes obesos, y

como covariables diversos biomarcadores así como factores clínicos y variables derivadas del estudio radiodiagnóstico. Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para el modelo, obteniendo el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la ecuación que define, en el porcentaje indicado por el coeficiente de determinación, la probabilidad de que ocurra el evento considerado como variable dependiente.

Para evaluar los distintos modelos de regresión logística propuestos, se calculó el estadístico chi-cuadrado de Hosmer-Lemeshow (209) para todos los modelos, considerando un nivel de significación de $p < 0,05$ como una calibración inadecuada. Así mismo, se valoró la capacidad de discriminación de cada modelo, calculando el estadístico c mediante la creación de curvas ROC, y se obtuvieron los puntos de corte óptimos de acuerdo al índice de Youden, los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN. Además, en el caso del grupo de pacientes con hepatopatía por VHC, los modelos de regresión logística elaborados para el diagnóstico de fibrosis significativa, se evaluaron para el diagnóstico de cirrosis, calculando los puntos de corte óptimos, los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN pertinentes.

Se compararon los estadísticos c de cada modelo mediante la diferencia de áreas (208). Del mismo modo, en el grupo de pacientes obesos, se compararon las AUC de los modelos de regresión con las obtenidas con los biomarcadores y algoritmos. Así mismo se calculó el índice de discriminación integrado (IDI) para cada modelo tal como describió *Pencina y cols* (210).

El nivel de significación estadística utilizado en los contrastes de hipótesis fue de $p < 0,05$.

El análisis estadístico se realizó a través de los programas Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versión 16.0 para sistema operativo Windows (SPSS, Inc, Chicago, EE.UU.) y MedCalc Statistical Software version 15.2.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

3.5 Comité Ético y Consentimiento Informado

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca autorizó la realización del estudio (ver anexos 1 y 2).

Todos los pacientes fueron informados en detalle del estudio y dieron su consentimiento firmado para la participación.

Solo han tenido acceso a los datos clínicos los facultativos de los Servicios de Análisis Clínicos, Radiodiagnóstico, Digestivo, Cirugía General y del Aparato Digestivo, Anatomía Patológica y Microbiología, asegurándose la confidencialidad de los mismos, estableciendo un protocolo pertinente para ello.

IV. RESULTADOS

El análisis de los resultados se realizó de forma independiente en los dos grupos de estudio, el grupo compuesto por pacientes con hepatitis crónica C y el grupo de pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica.

Los resultados se abordaron de manera específica a cada uno de los objetivos planteados.

4.1 PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC

4.1.1 Objetivo 1: Estudiar las características generales de los pacientes con hepatopatía crónica por VHC seguidos de manera periódica en las consultas de hepatología de nuestro hospital: descripción de la población total y de los grupos de estudio.

Se realizó un estudio observacional transversal en una población formada por 107 pacientes mono infectados por VHC que asisten a consulta para el seguimiento de rutina de su patología en el Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

i. Características de la población global de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de las características de la población de estudio, incluyendo las variables demográficas, clínicas y analíticas.

Las características demográficas y los parámetros clínicos relativos al VHC de la población total se describen en la **tabla 13**.

Variables demográficas y clínicas de la población total (n=107)	
Edad (años)	47,92±11,50
Sexo	Mujeres: 36,4% (n=39) Hombres: 63,6% (n=68)
Tratamiento antiviral (n=90)	Si: 40% (n=36) No: 60% (n=54)
Genotipo viral (n=95)	1: 76,8% (n=73) 2: 2,1% (n=2) 3: 11,6% (n=11) 4: 8,4% (n=8) 5: 1,1% (n=1)
Carga viral (n=74)	1687227[619408,5-3459799] copias/millón Logaritmo: 6,15±0,63
Polimorfismo IL28B (n=61)	CC: 24,6% (n=15) CT: 62,3% (n=38) TT: 13,1% (n=8)

Tabla 13: Características demográficas y clínicas de la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar, % y n (número de casos), y mediana [rango intercuartílico].

A continuación, en la **tabla 14**, pueden observarse los resultados de las variables derivadas del estudio radiodiagnóstico en la población total:

Estudio Radiodiagnóstico (n=107)		
Vc (m/s)	1,4[1,2-2,02]	
Signos Ecográficos de Hepatopatía Crónica	Si	No
	60,99% n=57	39,01% n=50
Hepatomegalia	7,5% n=8	92,5% n=99
Esplenomegalia	2,8% n=3	97,2% n=104
Hipertrofia del Lóbulo Caudado	8,4% n=9	91,6% n=98
Heterogeneidad del Parénquima	14% n=15	86% n=92
Superficie Nodular	21,5% n=23	78,5% n=84
Esteatosis	15% n=16	85% n=91
Hipertensión Portal	1,9% n=2	98,1% n=107
Ascitis	0% n=0	100% n=100

Tabla 14: Resultados del estudio radiodiagnóstico en la población total. Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico], % y n (número de casos). Vc: velocidad de onda de corte. La variable signos ecográficos de hepatopatía crónica se consideró positiva en aquellos pacientes que presentaban al menos uno de los signos ecográficos evaluados.

Los resultados de los parámetros hematológicos y las magnitudes bioquímicas obtenidos en la población global se describen en las **tablas 15-16** que aparecen a continuación.

Parámetros hematológicos		
	Población total de estudio (n=107)	Valores de referencia
Hb (g/dL)	14,89±1,84	13,5-17,5
Htc (%)	44,07±4,81	41-53
VCM (fL)	90,10±6,54	80-100
Plaquetas (x10³/μL)	202,45±68,81	150-350
Leucocitos (x10³/μL)	7,75±2,06	4,50-11
Linfocitos (x10³/μL)	2,73±0,93	1-4
Linfocitos (%)	35,83±9,56	22-44
ACTPR (%)	91,32±15,15	70-100
INR	1,01[1-1,10]	0,90-1,20
TTPAr	0,99[0,94-01,07]	0,80-1,30
Fibrinógeno (mg/dL)	240,30±44,60	238-498

Tabla 15: Descripción de los parámetros hematológicos en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. Hb: hemoglobina, Htc: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, ACTPR: % de actividad de protrombina, INR: razón internacional normalizada, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada.

Parámetros bioquímicos		
	Población total de estudio (n=107)	Valores de referencia
Glucosa (mg/dL)	86[76-99]	74-106
Urea (mg/dL)	31[25-37]	10-50
Creatinina (mg/dL)	0,82[0,73-0,97]	0,70-1,20
Proteínas Totales (g/dL)	7,56±0,52	6,4-8,3
Albúmina (g/dL)	4,57±0,38	3,5-5,2
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,58±0,30	0,05-1,20
Colesterol (mg/dL)	175,42±38,84	0-190
Triglicéridos (mg/dL)	111[83-159]	0-150
Haptoglobina (mg/dL)	105,65±49,46	30-200
ApoA-1 (mg/dL)	157,19±27,61	110-215
α2-macroglobulina (g/L)	3,27±1,10	1,3-3
AST (UI/L)	39[30-61]	5-40
ALT (UI/L)	68,35±53,35	5-41
GGT (UI/L)	47[26-113]	10-71
ALP (UI/L)	86,95±32,83	40-130

Tabla 16: Descripción de los parámetros bioquímicos en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. ApoA-1: apolipoproteína A1, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ-glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.

En la **tabla 17** que aparece a continuación se detallan los resultados de los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática obtenidos en la población total de estudio.

Algoritmos Fibrosis (n=107)	
Apri	0,40[0,30-0,85]
Forns	5,52±2,53
Fibrotest	-0,04±2,02
Fibrometer	-2,33[(-3,58)-(-0,01)]
Fib-4	1,32[0,84-2,31]
Fibro-Q	2,03[1,23-3,58]
Hepascore	0,45[0,17-0,89]
Via Index	2,07[1,79-2,80]

Tabla 17: Descripción de los algoritmos matemáticos en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico].

ii. Características de los grupos de estudio

Como ya se ha descrito en el apartado de sujetos y métodos, la población fue clasificada en tres grupos de estudio en función de grado de fibrosis hepática de acuerdo a la Vc aportada por la técnica Arfi, utilizando los puntos de corte para población europea indicados en el estudio de *Sporea y cols* (198).

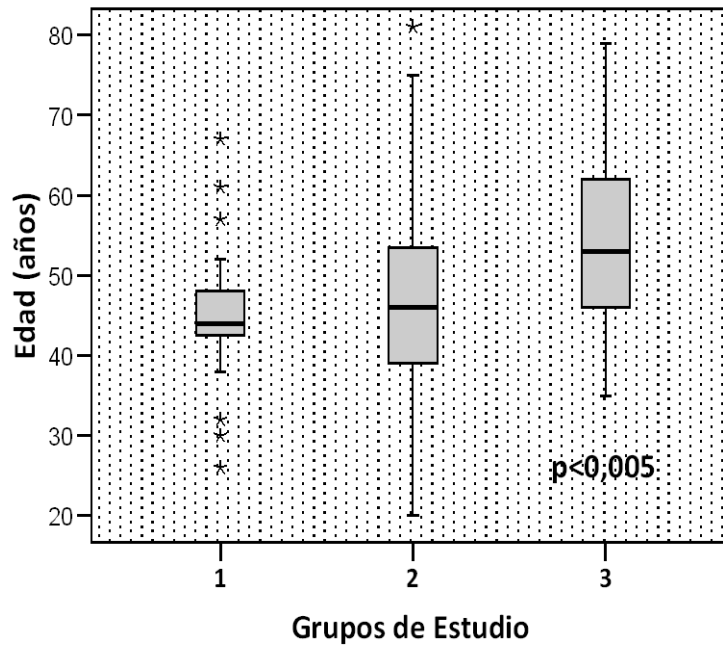
- Grupo 1 (n=33): Pacientes con Vc <1,21 m/s, equivalente a los grados F0-F1 de fibrosis hepática según la escala Metavir.
- Grupo 2 (n=40): Pacientes con Vc ≥1,21 y <1,74 m/s, equivalente a los grados F2-F3 de fibrosis hepática según la escala Metavir.
- Grupo 3 (n=34): Pacientes con Vc ≥1,74 m/s equivalente al grado F4 de fibrosis hepática según la escala Metavir.

Se realizó un estudio descriptivo de las características de los tres grupos de pacientes, incluyendo las variables demográficas, clínicas y analíticas.

Las características demográficas y los parámetros clínicos relativos al VHC de los tres grupos de pacientes se describen en la **tabla 18**. Únicamente se observaron diferencias significativas en el caso de la edad ($p=0,001$; **gráfica 1**).

	Grupo 1 (n=33)	Grupo 2 (n=40)	Grupo 3 (n=34)	p
Edad (años)	43,26±10,95	46,58±11,52	53,26±9,89	0,001
Sexo	F: 33,3% (n=11) M: 66,7% (n=22)	F: 40% (n=16) M: 60% (n=24)	F: 32,4% (n=11) M: 67,6% (n=23)	0,789
Tratamiento antiviral (n=90)	Si: 27,59% (n=8) No: 72,41% (n=21)	Si: 58,6% (n=18) No: 41,4% (n=13)	Si: 33,3% (n=10) No: 66,7% (n=20)	0,062
Genotipo Viral (n=95)	1: 92% (n=23) 2: 0% (n=0) 3: 8% (n=2) 4: 0% (n=0) 5: 0% (n=0)	1: 74,3% (n=26) 2: 5,7% (n=2) 3: 5,7% (n=2) 4: 14,3% (n=5) 5: 0% (n=0)	1: 69,7% (n=23) 2: 0% (n=0) 3: 21,2% (n=7) 4: 6,1% (n=2) 5: 3% (n=1)	0,079
Logaritmo Carga viral (n=74)	6,05±0,55	6,13±0,65	6,24 ±0,71	0,629
Polimorfismo IL28B (n=61)	CC: 23,5% (n=4) CT: 70,6% (n=12) TT: 5,9% (n=1)	CC: 18,2% (n=4) CT: 68,2% (n=15) TT: 13,6% (n=3)	CC: 33,3% (n=7) CT: 47,6% (n=10) TT: 19% (n=4)	0,513

Tabla 18: Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio. Los datos se expresan como media±desviación estándar, % y n (número de casos). F: sexo femenino, M: sexo masculino.



Gráfica 1: Valores de la edad en función del grupo de estudio

En la **tabla 19** pueden observarse los resultados de los parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico en cada uno de los tres grupos de estudio. Mostraron diferencias significativas las variables Vc ($p=0,0001$), signos ecográficos de hepatopatía crónica ($p=0,0001$), esplenomegalia ($p=0,040$), hipertrofia del lóbulo caudado ($p=0,010$), heterogeneidad del parénquima ($p=0,001$) y superficie nodular ($p=0,0001$).

	Grupo 1 (n=33)		Grupo 2 (n=40)		Grupo 3 (n=34)		<i>p</i>
Vc (m/s)	1,10[1,05-1,20]		1,40[1,30-1,58]		2,10[2,03-2,70]		0,0001
Signos Ecográficos de Hepatopatía Crónica	Si	No	Si	No	Si	No	0,0001
	21,2% n=7	78,8% n=26	42,5% n=17	57,5% n=23	76,5% n=26	23,5% n=8	
Hepatomegalia	6,1% n=2	93,9% n=31	7,5% n=3	92,5% n=37	8,8% n=3	91,2% n=31	0,937
Esplenomegalia	0% n=0	100% n=33	0% n=0	100% n=40	8,8% n=3	91,2% n=31	0,040
Hipertrofia del Lóbulo Caudado	3,1% n=1	96,9% n=32	2,5% n=1	97,5% n=39	20,6% n=7	79,4% n=27	0,010
Heterogenicidad del Parénquima	3,1% n=1	96,9% n=32	7,5% n=3	92,5% n=37	32,4% n=11	67,6% n=23	0,001
Superficie Nodular	9,1% n=3	90,9% n=30	10% n=4	90% n=36	47,1% n=16	52,9% n=18	0,0001
Esteatosis	6,1% n=2	93,9% n=31	22,5% n=9	77,5% n=31	14,7% n=5	85,3% n=29	0,174
Hipertensión Portal	0% n=0	100% n=33	0% n=0	100% n=40	5,9% n=2	94,1% n=32	0,119

Tabla 19: Resultados del estudio radiodiagnóstico en los tres grupos de pacientes. Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico], % y n (número de casos). Vc: velocidad de onda de corte. La variable signos ecográficos de hepatopatía crónica se consideró positiva en aquellos pacientes que presentaban al menos uno de los signos ecográficos evaluados.

Para evaluar la influencia de la inflamación hepática en la medida de la Vc estudiamos si dentro de cada grupo de estudio se observaban diferencias en los valores de Vc en función de los valores de ALT. En la **tabla 20** que se observa a continuación aparecen los

valores de Vc de cada uno de los tres grupos estratificados en función del valor de ALT. En ninguno de los casos se observan diferencias significativas.

	Grupo 1 (n=33)		Grupo 2 (n=40)		Grupo 3 (n=34)	
	ALT (UI/L)		ALT (UI/L)		ALT (UI/L)	
	≤41 (n=12)	>41 (n=21)	≤41 (n=18)	>41 (n=22)	≤41 (n=7)	>41 (n=27)
Vc (m/s)	1,12[1,02-1,15]	1,10[1,08-1,20]	1,40[1,30-1,44]	1,43[1,30-1,70]	2,50[1,89-3,20]	2,40[2,10-2,70]
p	0,381		0,274		0,771	

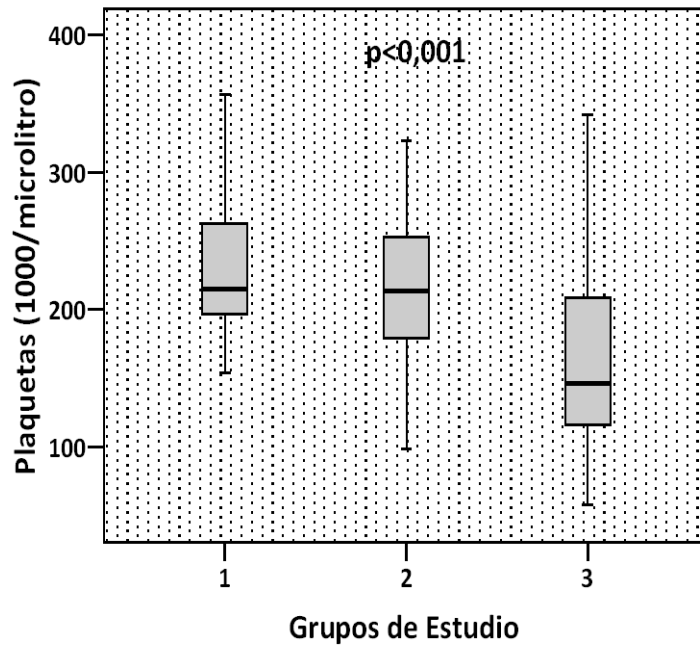
Tabla 20: Valores de la velocidad de onda de corte (Vc) estratificados en función de grupos de estudio y los valores de ALT.

A continuación, en las **tablas 21-22**, se describen las variables hematológicas y bioquímicas de los pacientes divididos por grupos de estudio. En cuanto a las variables hematológicas (**tabla 21**), se encontraron diferencias significativas para las variables hemoglobina ($p=0,022$), VCM ($p=0,024$), recuento de plaquetas ($p=0,0001$; **gráfica 2**) y de leucocitos ($p=0,008$), porcentaje de linfocitos ($p=0,001$; **gráfica 3**), porcentaje de actividad de protrombina ($p=0,002$) e INR ($p=0,002$).

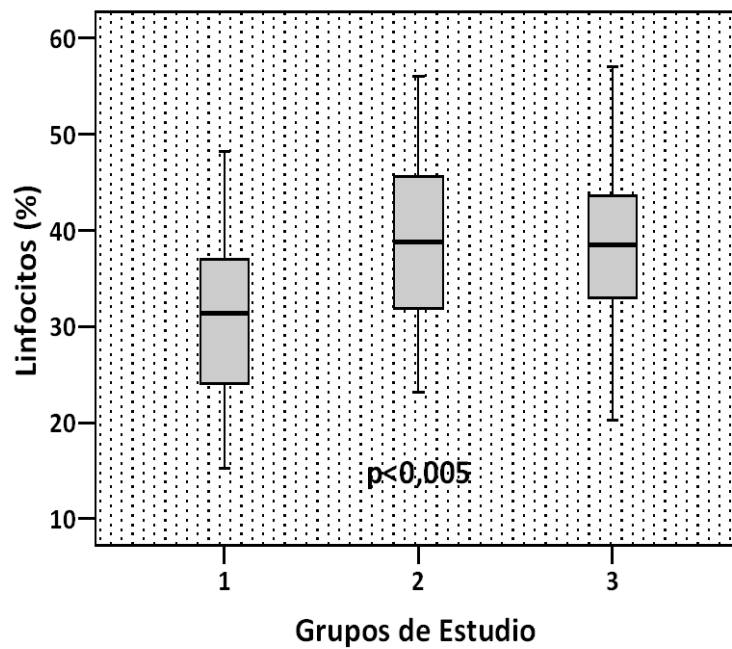
En referencia a las variables bioquímicas (**tabla 22**), mostraron diferencias significativas entre grupos las variables glucosa ($p=0,036$), albúmina ($p=0,0001$; **gráfica 4**), bilirrubina total ($p=0,011$), triglicéridos ($p=0,016$), α 2-macroglobulina ($p=0,0001$; **gráfica 5**), AST ($p=0,0001$; **gráfica 6**), ALT ($p=0,013$), GGT ($p=0,001$) y ALP ($p=0,0001$; **gráfica 7**).

	Grupo 1 (n=33)	Grupo 2 (n=40)	Grupo 3 (n=34)	p
Hb (g/dL)	15,64±1,80	14,77±1,90	14,45±1,67	0,022
Htc (%)	45,41±4,52	43,95±5,33	43,10±4,35	0,127
VCM (fL)	89,22±4,53	88,77±8,10	92,65±5,52	0,024
Plaquetas (x10³/μL)	234,06±61,33	213,20±58,90	161,32±68,55	0,0001
Leucocitos (x10³/μL)	8,69±1,94	7,51±2,03	7,18±2,00	0,008
Linfocitos (x10³/μL)	2,63±0,83	2,88±0,95	2,71±1,01	0,526
Linfocitos (%)	30,84±9,23	37,68±8,98	38,68±8,65	0,001
ACTPR (%)	96,48±11,74	93,38±13,24	83,94±17,77	0,002
INR	1[1-1,10]	1[1-1,10]	1[1,10-1,20]	0,002
TTPAr	1[0,94-1,06]	0,99[0,93-1,06]	0,98[0,93-1,09]	0,905
Fibrinógeno (mg/dL)	232,52±36,14	234,08±33,09	248,53±53,84	0,223

Tabla 21: Descripción de los parámetros hematológicos en los tres grupos de estudio. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. Hb: hemoglobina, Htc: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, ACTPR: % de actividad de protrombina, INR: razón internacional normalizada, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada.



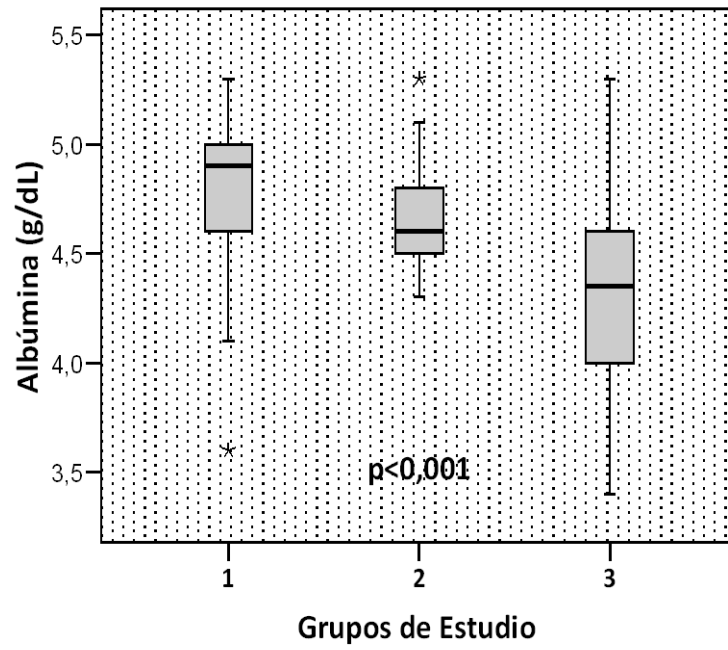
Gráfica 2: Recuento de plaquetas en función del grupo de estudio.



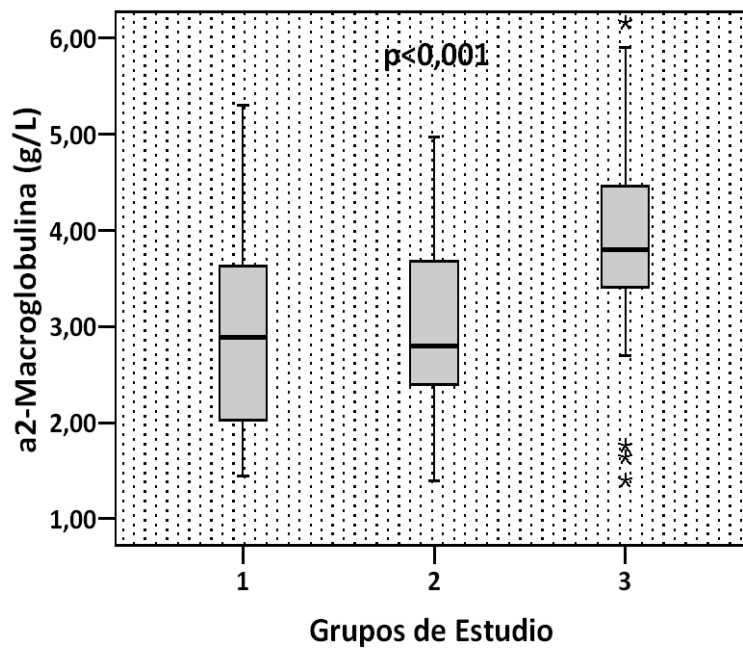
Gráfica 3: Valores del porcentaje de linfocitos en función del grupo de estudio.

	Grupo 1 (n=33)	Grupo 2 (n=40)	Grupo 3 (n=34)	p
Glucosa (mg/dL)	81[72-91]	86[78,50-96,25]	90,50[74,8-135]	0,036
Urea (mg/dL)	32[24-37]	29,50[25-35,75]	32[26,50-38,75]	0,531
Creatinina (mg/dL)	0,85[0,73-0,95]	0,79[0,73-0,98]	0,83[0,71-1,04]	0,613
Proteínas Totales (g/dL)	7,61±0,45	7,56±0,43	7,56±0,67	0,911
Albúmina (g/dL)	4,77±0,35	4,64±0,22	4,32±0,43	0,0001
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,48±0,22	0,60±0,20	0,69±0,42	0,011
Colesterol (mg/dL)	179,58±40,79	177,03±42,76	168,59±32,89	0,490
Triglicéridos (mg/dL)	97[75-131]	110,50[75-161,5]	125,5[99-225,5]	0,016
Haptoglobina (mg/dL)	118,86±48,31	107,84±47,54	91,02±50,25	0,071
ApoA-1 (mg/dL)	164,74±29,81	156,93±25,70	150,61±26,75	0,119
α2-macroglobulina (g/L)	2,93±1,03	3,02±0,93	3,89±1,14	0,0001
AST (UI/L)	37[25-46]	35[29,25-49,8]	68[39,75-118,8]	0,0001
ALT (UI/L)	53,71±32,32	62,85±55,44	90,41±61,06	0,013
GGT (UI/L)	44[20-71]	40,50[23,25-91,8]	102,5[43,8-240,3]	0,001
ALP (UI/L)	78,71±27,11	78,63±29,44	106,09±32,28	0,0001

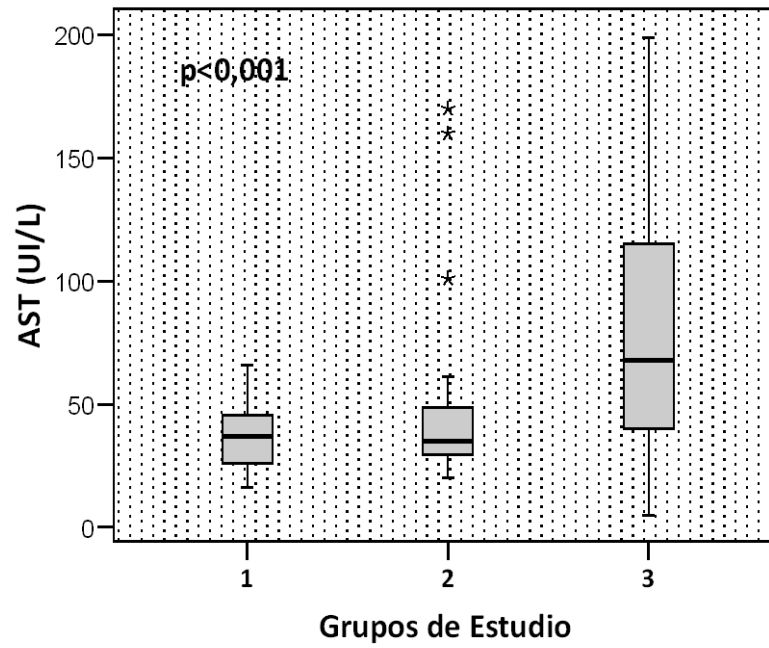
Tabla 22: Descripción de los parámetros bioquímicos en los tres grupos de estudio. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. ApoA-1: apolipoproteínaA-1, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ-glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.



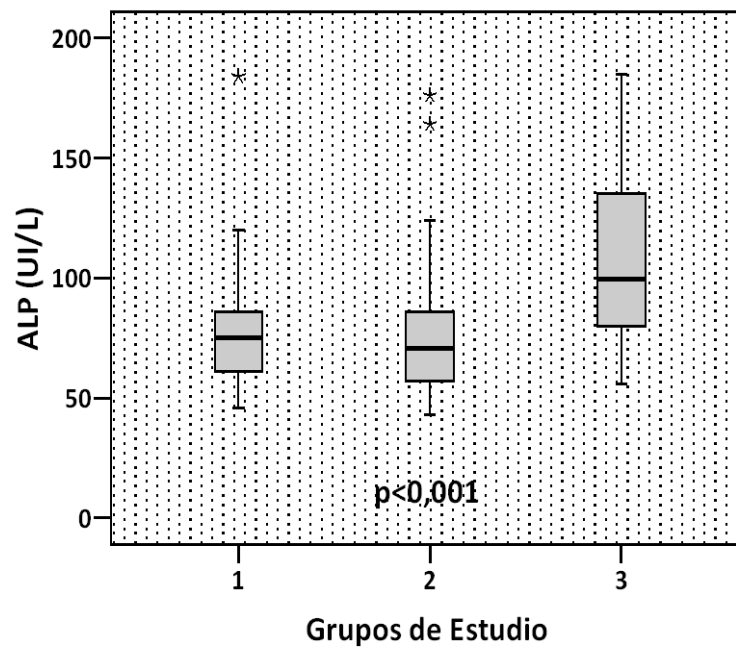
Gráfica 4: Concentraciones de albúmina en función del grupo de estudio.



Gráfica 5: Concentraciones de $\alpha 2$ -macroglobulina en función del grupo de estudio.



Gráfica 6: Concentraciones de AST (aspartato aminotransferasa) en función del grupo de estudio.



Gráfica 7: Concentraciones de ALP (fosfatasa alcalina) en función del grupo de estudio.

En la **tabla 23** pueden observarse los resultados de los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática en los tres grupos de pacientes. Tal como se observa, en todos los casos se encontraron diferencias significativas.

	Grupo 1 (n=33)	Grupo 2 (n=40)	Grupo 3 (n=34)	p
Apri	0,39[0,25-0,53]	0,39[0,30-0,58]	0,98[0,57-2,66]	0,0001
Forns	4,09±1,62	5,27±2,82	7,14±2,04	0,0001
Fibrotest	-0,83±1,86	-0,23±2,62	0,89±1,35	0,002
Fibrometer	-3,31[(-4,1)-(-2,19)]	-2,35[(-3,46)-(-1,2)]	0,72[(-1,75)-4,90]	0,0001
Fib-4	1,11[0,72-1,35]	1,17[0,80-1,84]	2,51[1,53-5,60]	0,0001
Fibro-Q	1,57[0,97-2,23]	1,76[1,17-2,70]	3,43[2,51-5,54]	0,0001
Hepascore	0,23[0,11-0,62]	0,30[0,18-0,73]	0,96[0,72-0,99]	0,0001
Via Index	1,74[1,62-1,92]	2,04[1,90-2,28]	3,29[2,73-3,49]	0,0001

Tabla 23: Descripción de los algoritmos matemáticos en cada uno de los grupos de pacientes. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico].

4.1.2 Objetivo 2: Determinar el intervalo de valores existentes en nuestra población del algoritmo ELF y de los biomarcadores directos HA, PIIINP y TIMP-1, evaluar sus valores en función de las características clínicas, demográficas y ecográficas de los pacientes, y estudiar su asociación con el resto de variables continuas.

i. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF

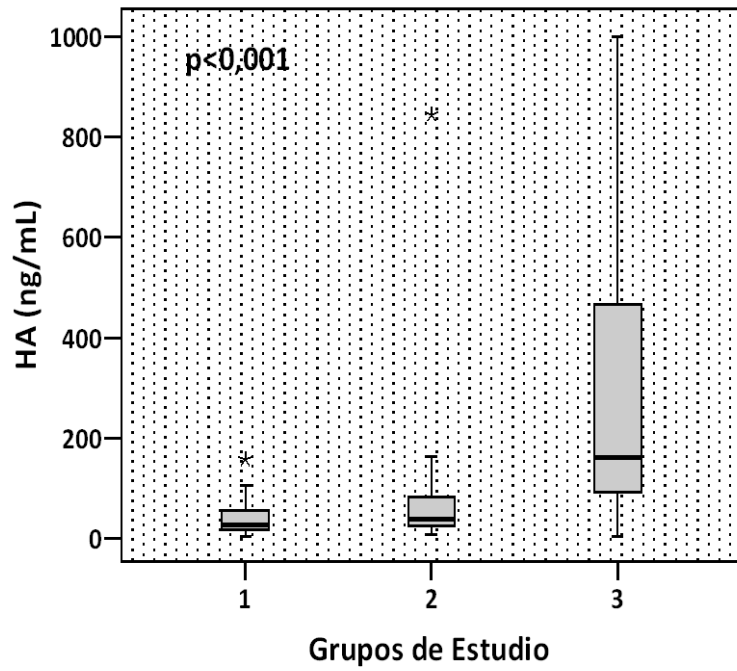
Se determinaron las concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1, y se calcularon los valores del algoritmo ELF en la población total y en los tres grupos de pacientes. Los resultados se muestran en las **tablas 24-25**. A continuación se ilustran estos resultados gráficamente (**gráficas 8-11**).

	Población total (n=107)
HA (ng/mL)	53,81[24,25-121,83]
PIIINP (ng/mL)	10,03[8,04-13,62]
TIMP-1 (ng/mL)	276[226,85-356,65]
ELF	9,93±9,65

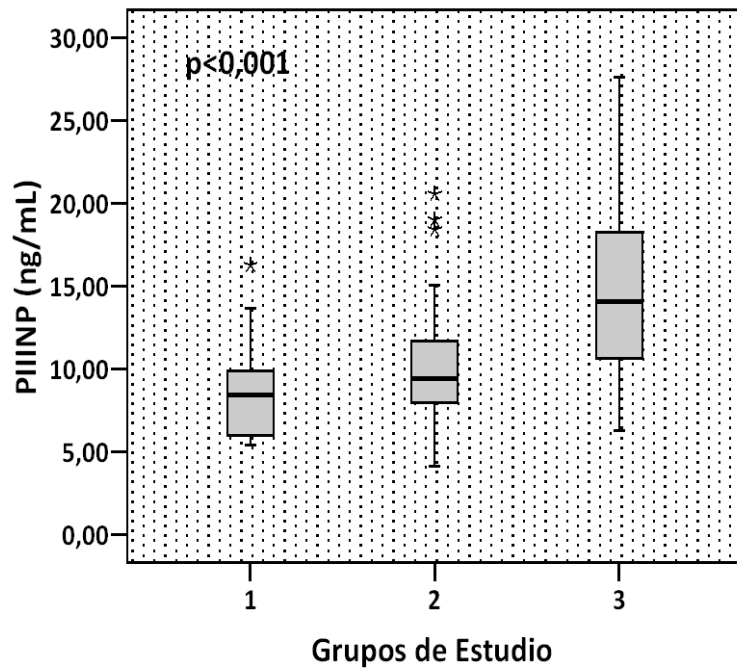
Tabla 24: Descripción de los biomarcadores directos y del algoritmo ELF en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

	Grupo 1 (n=33)	Grupo 2 (n=40)	Grupo 3 (n=34)	p
HA (ng/mL)	27,43[14,70-57,92]	39,06[24,70-83,66]	160,56[90,22-466,1]	0,0001
PIIINP (ng/mL)	8,44[5,94-10,02]	9,44[7,86-11,83]	14,07[10,54-18,34]	0,0001
TIMP-1 (ng/mL)	263,8[208,8-283,2]	245,9[188,2-285,67]	419,9[329,8-498,4]	0,0001
ELF	9,05±0,84	9,60±1,06	11,10±1,24	0,0001

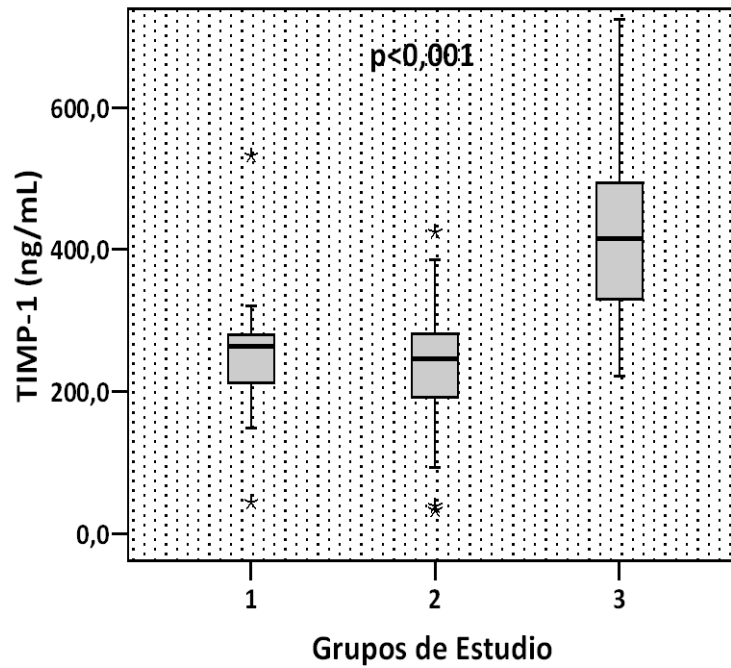
Tabla 25: Descripción de los biomarcadores directos y del algoritmo ELF en cada uno de los grupos de pacientes. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: Test de Fibrosis Hepática mejorado.



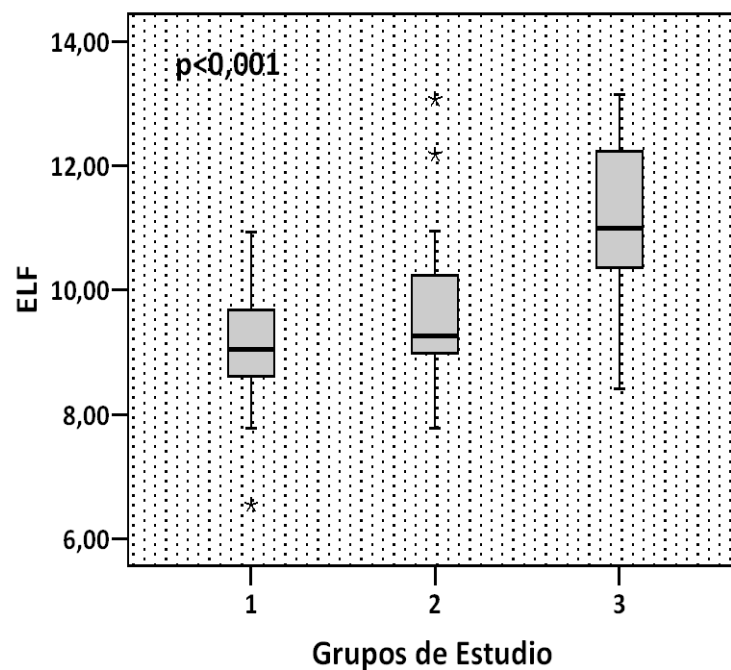
Gráfica 8: Concentraciones de ácido hialurónico (HA) en los tres grupos de estudio.



Gráfica 9: Concentraciones de péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres (PIIINP) en los tres grupos de estudio.



Gráfica 10: Concentraciones de inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno (TIMP-1) en los tres grupos de estudio.



Gráfica 11: Valores de ELF (Test de Fibrosis Hepática mejorado) en los tres grupos de estudio.

ii. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF en función de las características clínicas, demográficas y ecográficas

Se calcularon los valores de cada biomarcador y del algoritmo ELF en función del sexo, el genotipo viral, el polimorfismo de la IL28B y la presencia de signos ecográficos de hepatopatía crónica (**tablas 26-28**).

Tal como aparece reflejado, se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de los biomarcadores PIIINP ($p=0,026$) y TIMP-1 ($p=0,045$) en función del polimorfismo de la IL28B. En ambos casos, los valores más bajos corresponden al polimorfismo mayoritario en la población, el CT (**tabla 27, gráficas 12-13**).

Por otro lado, se observaron diferencias significativas en función de la presencia de signos ecográficos de hepatopatía crónica para el HA ($p=0,001$), PIIINP ($p=0,001$), TIMP-1 ($p=0,0001$) y ELF ($p=0,0001$), encontrándose los mayores valores en los pacientes que sí presentaban signos de hepatopatía crónica en la ecografía (**tabla 28, gráfica 14**).

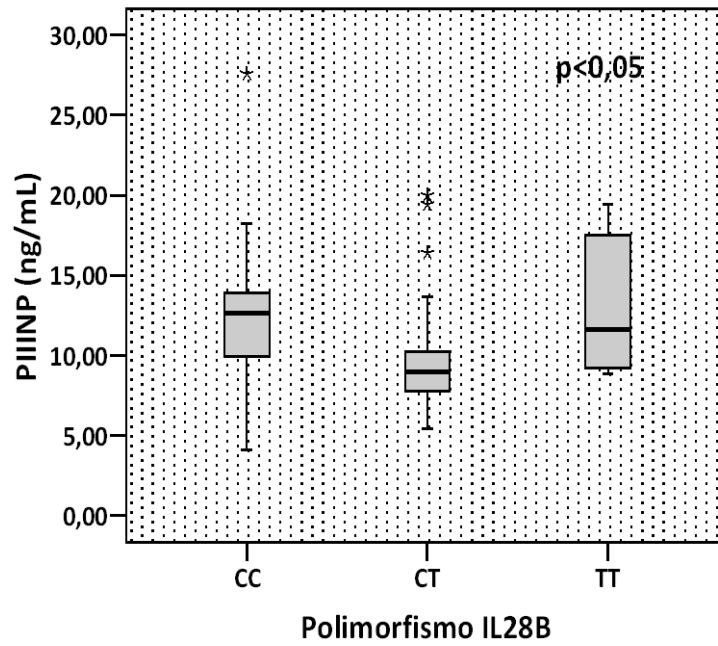
Con el resto de variables clínicas estudiadas, así como con el sexo, no se observaron diferencias significativas.

Sexo			
	Masculino [63,6% (n=68)]	Femenino [36,4% (n=39)]	<i>p</i>
HA (ng/mL)	57,92[27,43-105,17]	49,38[22,57-158,54]	0,665
PIIINP (ng/mL)	10,03[8,04-14,16]	9,97[7,85-13,61]	0,995
TIMP-1 (ng/mL)	283,2[240,2-335,8]	265,75[209,05-377,07]	0,533
ELF	9,96±1,35	9,86±1,37	0,717

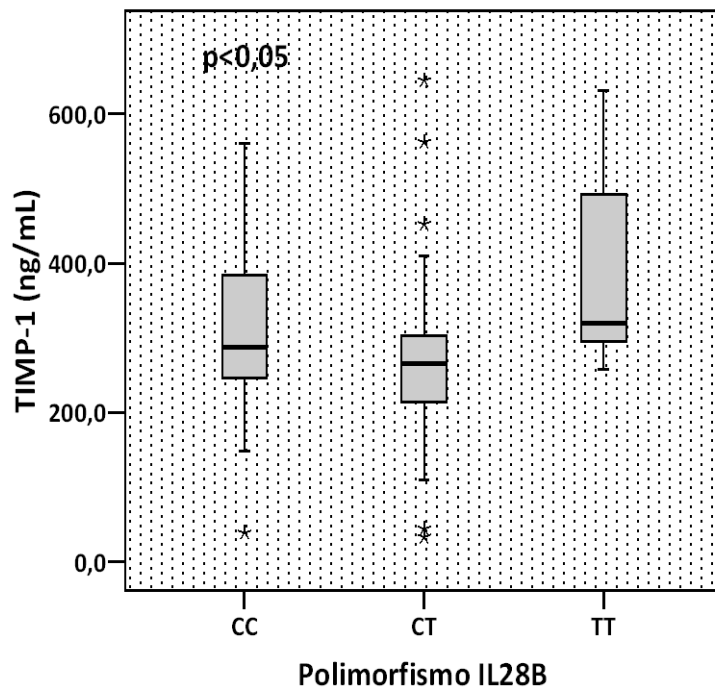
Tabla 26: Concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y valores del algoritmo ELF en función del sexo. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

Genotipo Viral				
	1 [76,8% (n=73)]	3 [11,6% (n=11)]	2-4-5 [11,6% (n=11)]	p
HA	50,24[24,98-113,78]	93,45[41,15-167,64]	51,64[33,48-85,41]	0,159
PIIINP	9,72[7,67-13,63]	12,80[8,94-15,66]	10,98[8,20-12,38]	0,473
TIMP-1	275,1[225,32-356,72]	329,9[302,1-458,2]	268,85[172,9-424,07]	0,060
ELF	9,93±1,43	10,61±1,78	9,84±1,18	0,295
Polimorfismo IL28B				
	CC [24,6% (n=15)]	CT [62,3% (n=38)]	TT [13,1% (n=8)]	p
HA	45,37[22,79-181,1]	35,57[21,24-103,65]	104,13[48,36-439,43]	0,216
PIIINP	12,63[9,23-14,16]	8,99[7,55-10,36]	11,65[9,17-18,08]	0,026
TIMP-1	286,9[244,4-431,1]	264,9[211,95-306,4]	319,4[292,27-526,75]	0,045
ELF	10,03±1,63	9,62±1,40	10,66±1,30	0,174

Tabla 27: Concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y valores del algoritmo ELF en función del genotipo viral y del polimorfismo de la IL28B. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. Los valores de HA, PIIINP y TIMP-1 se expresan en ng/mL. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



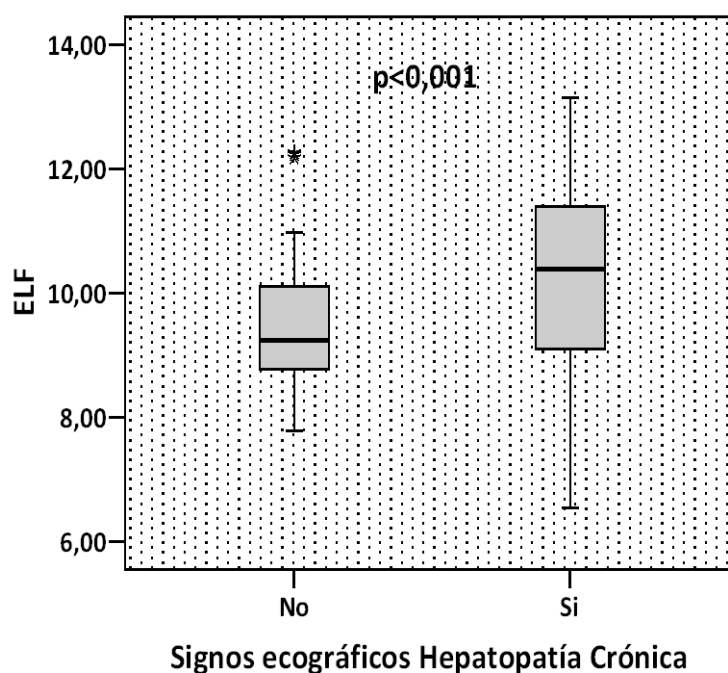
Gráfica 12: Concentraciones del péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres (PIINP) en función del polimorfismo de la IL28B.



Gráfica 13: Concentraciones del inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno (TIMP-1) en función del polimorfismo de la IL28B.

Signos ecográficos de hepatopatía crónica			
	Si [60,99% (n=57)]	No [39,01% (n=50)]	p
HA (ng/mL)	93,32[36,09-209,46]	37,87[22,40-81,31]	0,001
PIIINP (ng/mL)	12,07[9,53-16,30]	8,99[7,27-11]	0,001
TIMP-1 (ng/mL)	320,25[265,9-434,57]	253,60[213,3-298,1]	0,0001
ELF	10,41±1,50	9,49±1,03	0,0001

Tabla 28: Concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y valores del algoritmo ELF en función de la presencia de signos ecográficos de hepatopatía crónica. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



Gráfica 14: Valores de ELF (Test de Fibrosis Hepática mejorada) en función de la presencia de signos ecográficos de hepatopatía crónica.

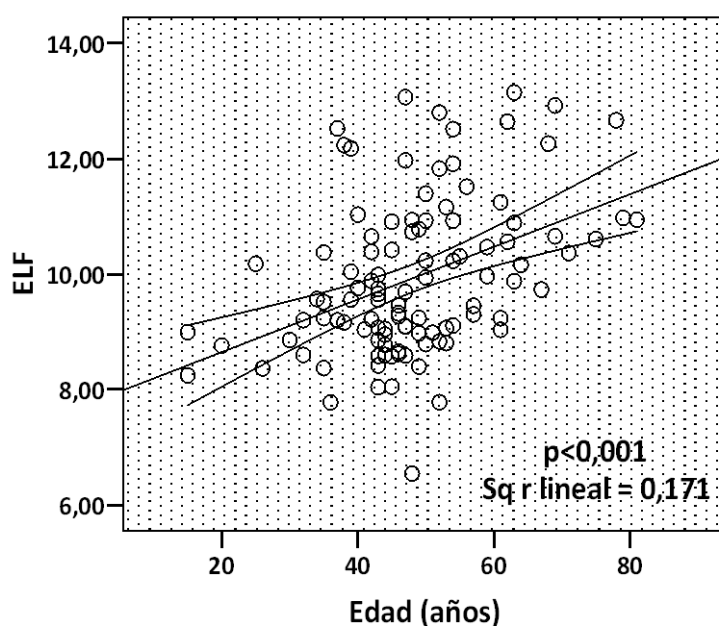
iii. Correlaciones

Para estudiar la asociación de los biomarcadores directos y del algoritmo ELF con el resto de variables continuas se realizó un estudio de correlaciones, incluyendo las variables demográficas, los parámetros clínicos relativos al VHC, los parámetros hematológicos y bioquímicos, los biomarcadores directos de fibrosis, así como con la velocidad de onda de corte (Vc) obtenida en el estudio radiodiagnóstico. Los resultados se muestran en las siguientes **tablas 29-34**.

Tal como aparece reflejado en la **tabla 29**, se constató una correlación significativa entre la edad y el HA, TIMP-1 y ELF ($p=0,0001$; **gráfica 15**).

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Edad	$r=0,471$ $p=0,0001$	$r=0,103$ $p=0,298$	$r=0,484$ $p=0,0001$	$r=0,414$ $p=0,0001$
Logaritmo Carga viral	$r=0,148$ $p=0,220$	$r=0,139$ $p=0,249$	$r=0,218$ $p=0,069$	$r=0,193$ $p=0,109$

Tabla 29: Correlaciones de los biomarcadores HA, PIIINP, TIMP-1 y del algoritmo ELF con la edad y el logaritmo de la carga viral. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



Gráfica 15: Correlación del ELF (test de fibrosis hepática mejorada) con la edad.

En cuanto a las correlaciones de los biomarcadores directos entre sí, se constató un resultado significativo en todos los casos (**tabla 30**).

	HA	PIIINP	TIMP-1
HA	-	$r=0,470$ $p=0,0001$	$r=0,617$ $p=0,0001$
PIIINP	$r=0,470$ $p=0,0001$	-	$r=0,462$ $p=0,0001$
TIMP-1	$r=0,617$ $p=0,0001$	$r=0,462$ $p=0,0001$	-

Tabla 30: Correlaciones de los biomarcadores directos HA, PIIINP, TIMP-1 entre sí mismos. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor de la metaloproteasa tipo uno.

En referencia a los parámetros hematológicos (**tabla 31**), se observó correlación significativa de los tres biomarcadores directos y del ELF con el recuento de plaquetas, (**gráfica 16**), la ACTPR y el INR. Además, el HA y el ELF correlacionaron con el porcentaje de linfocitos, el PIIINP y el ELF con los leucocitos totales, el TIMP-1 con el volumen corpuscular medio y el PIIINP con la hemoglobina y el hematocrito.

Con los parámetros bioquímicos también se observaron diversas correlaciones significativas (**tabla 32**). Los tres biomarcadores y el algoritmo ELF correlacionaron con la glucosa, la albúmina, la AST, ALP y GGT y la α 2-macroglobulina (**gráfica 17**). Así mismo, el ELF y el PIIINP correlacionaron con la bilirrubina, y el PIIINP también con el colesterol y la haptoglobina. Además, los triglicéridos correlacionaron de manera significativa con todos los parámetros a excepción del PIIINP, la ALT con todos a excepción del HA, y la apoA-1 con todos a excepción del TIMP-1.

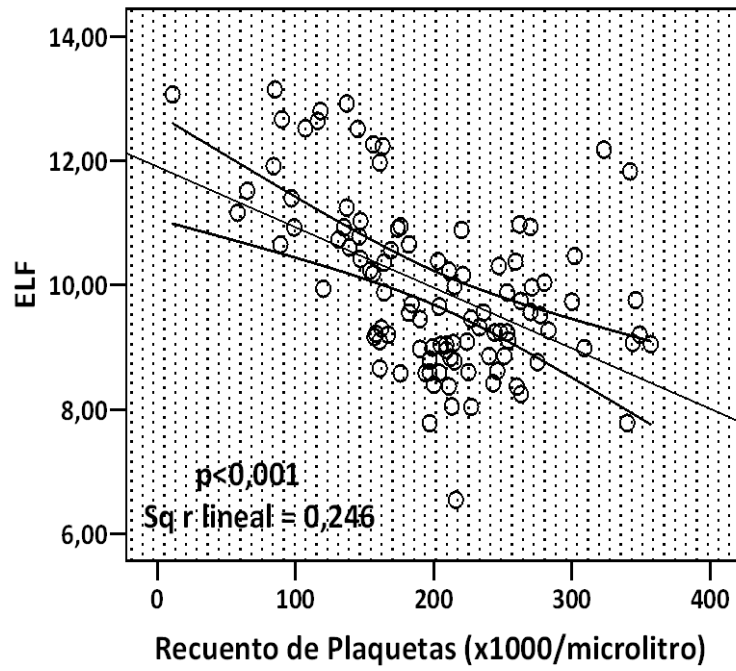
Por otro lado, tanto los biomarcadores directos como el ELF correlacionaron significativamente con todos los algoritmos matemáticos para el cálculo del grado de fibrosis (**tabla 33**) y con la Vc proporcionada por la técnica Arfi (**tabla 34, gráfica 18**).

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Hb	$r=-0,068$ $p=0,494$	$r=-0,255$ $p=0,009$	$r=0,042$ $p=0,667$	$r=-0,144$ $p=0,143$
Htc	$r=-0,026$ $p=0,795$	$r=-0,221$ $p=0,023$	$r=0,068$ $p=0,490$	$r=0,096$ $p=0,331$
VCM	$r=0,160$ $p=0,104$	$r=0,032$ $p=0,746$	$r=0,379$ $p=0,0001$	$r=0,172$ $p=0,079$
Plaquetas	$r=-0,476$ $p=0,0001$	$r=-0,519$ $p=0,0001$	$r=-0,304$ $p=0,002$	$r=-0,496$ $p=0,0001$
Leucocitos totales	$r=-0,169$ $p=0,084$	$r=-0,317$ $p=0,001$	$r=0,154$ $p=0,116$	$r=-0,293$ $p=0,002$
Linfocitos totales	$r=0,003$ $p=0,977$	$r=-0,118$ $p=0,230$	$r=-0,061$ $p=0,533$	$r=-0,033$ $p=0,738$
Porcentaje Linfocitos	$r=0,194$ $p=0,047$	$r=0,165$ $p=0,092$	$r=0,048$ $p=0,629$	$r=0,220$ $p=0,024$
ACTPR	$r=-0,337$ $p=0,0001$	$r=-0,299$ $p=0,002$	$r=-0,225$ $p=0,021$	$r=-0,279$ $p=0,004$
INR	$r=0,232$ $p=0,017$	$r=0,298$ $p=0,002$	$r=0,210$ $p=0,031$	$r=0,235$ $p=0,016$
TTPAr	$r=-0,010$ $p=0,915$	$r=-0,028$ $p=0,779$	$r=-0,097$ $p=0,327$	$r=-0,078$ $p=0,426$
Fibrinógeno	$r=0,057$ $p=0,563$	$r=0,105$ $p=0,288$	$r=0,084$ $p=0,394$	$r=0,106$ $p=0,283$

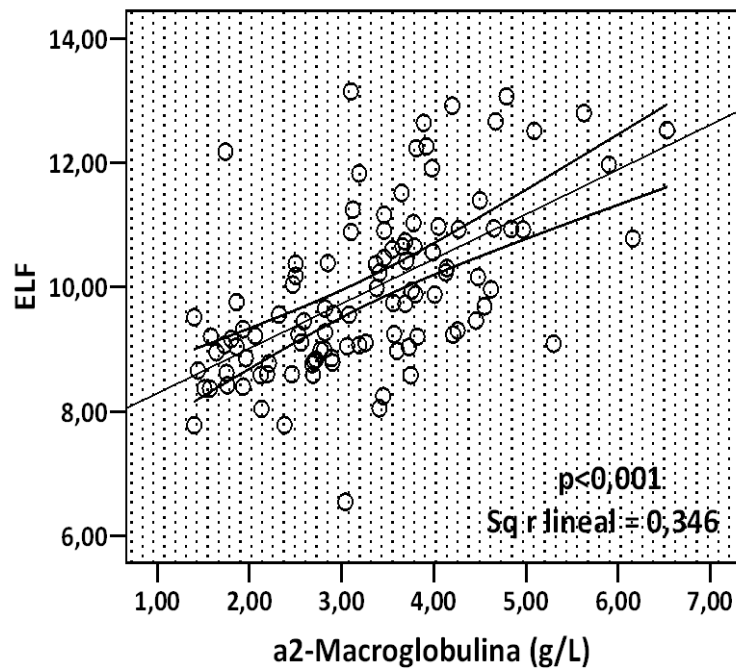
Tabla 31: Correlaciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y del algoritmo ELF con los parámetros hematológicos. Hb: hemoglobina, Htc: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, ACTPR: % de actividad de protrombina, INR: razón internacional normalizada, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada, HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Glucosa	r=0,300 p=0,002	r=0,267 p=0,006	r=0,255 p=0,009	r=0,328 p=0,001
Urea	r=0,038 p=0,697	r=0,016 p=0,875	r=0,185 p=0,059	r=0,023 p=0,819
Creatinina	r=0,057 p=0,566	r=-0,016 p=0,875	r=0,101 p=0,306	r=-0,005 p=0,957
Proteínas Totales	r=-0,065 p=0,513	r=-0,100 p=0,310	r=0,017 p=0,862	r=-0,075 p=0,445
Albúmina	r=-0,517 p=0,0001	r=-0,462 p=0,0001	r=-0,473 p=0,0001	r=-0,566 p=0,0001
Bilirrubina Total	r=0,087 p=0,377	r=0,192 p=0,049	r=0,179 p=0,067	r=0,270 p=0,005
Colesterol	r=0,006 p=0,950	r=-0,311 p=0,001	r=-0,089 p=0,366	r=-0,065 p=0,512
Triglicéridos	r=0,295 p=0,002	r=0,084 p=0,396	r=0,259 p=0,008	r=0,286 p=0,003
AST	r=0,383 p=0,0001	r=0,442 p=0,0001	r=0,478 p=0,0001	r=0,437 p=0,0001
ALT	r=0,172 p=0,079	r=0,276 p=0,004	r=0,305 p=0,002	r=0,330 p=0,001
GGT	r=0,321 p=0,001	r=0,255 p=0,009	r=0,359 p=0,0001	r=0,327 p=0,001
ALP	r=0,348 p=0,0001	r=0,439 p=0,0001	r=0,292 p=0,003	r=0,450 p=0,0001
Haptoglobina	r=-0,049 p=0,617	r=-0,240 p=0,013	r=-0,049 p=0,618	r=-0,141 p=0,150
ApoA-1	r=-0,228 p=0,020	r=-0,201 p=0,040	r=-0,084 p=0,394	r=-0,246 p=0,011
α2-macroglobulina	r=0,628 p=0,0001	r=0,400 p=0,0001	r=0,586 p=0,001	r=0,588 p=0,0001

Tabla 32: Correlaciones de los biomarcadores HA (ácido hialurónico), PIIINP (péptido aminoterminal del procolágeno tipo tres) y TIMP-1 (inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno) y del algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada) con los parámetros bioquímicos. ApoA-1: apolipoproteína A1, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ-glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.



Gráfica 16: Correlación del ELF (test de fibrosis hepática mejorada) con el recuento de plaquetas.



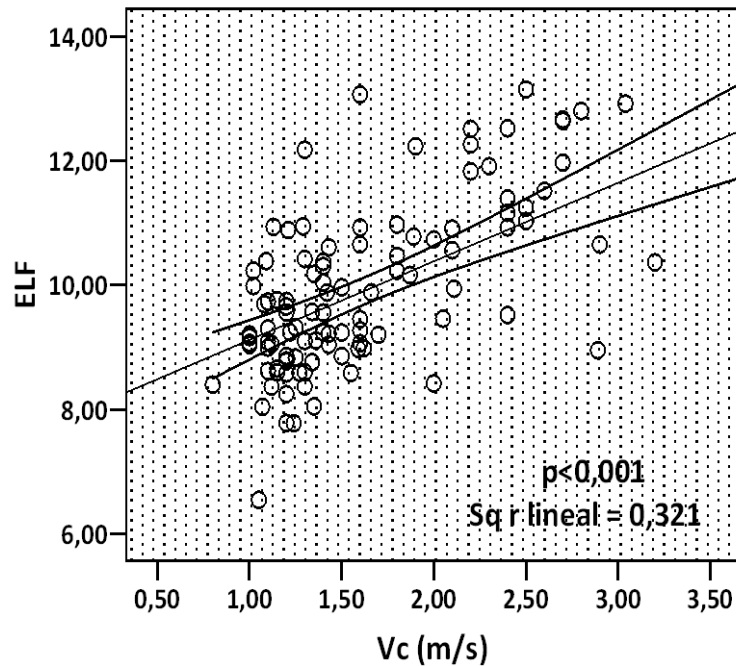
Gráfica 17: Correlación del ELF (test de fibrosis hepática mejorada) con la α_2 -macroglobulina.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Apri	$r=0,479$ $p=0,0001$	$r=0,532$ $p=0,0001$	$r=0,414$ $p=0,0001$	$r=0,511$ $p=0,0001$
Forns	$r=0,579$ $p=0,0001$	$r=0,502$ $p=0,0001$	$r=0,520$ $p=0,0001$	$r=0,571$ $p=0,0001$
Fibrotest	$r=0,568$ $p=0,0001$	$r=0,437$ $p=0,0001$	$r=0,557$ $p=0,0001$	$r=0,415$ $p=0,0001$
Fibrometer	$r=0,751$ $p=0,0001$	$r=0,431$ $p=0,0001$	$r=0,422$ $p=0,0001$	$r=0,711$ $p=0,0001$
Fib-4	$r=0,606$ $p=0,0001$	$r=0,456$ $p=0,0001$	$r=0,516$ $p=0,0001$	$r=0,593$ $p=0,0001$
Fibro-Q	$r=0,563$ $p=0,0001$	$r=0,389$ $p=0,0001$	$r=0,392$ $p=0,0001$	$r=0,526$ $p=0,0001$
Hepascore	$r=0,917$ $p=0,0001$	$r=0,511$ $p=0,0001$	$r=0,635$ $p=0,0001$	$r=0,912$ $p=0,0001$
Via Index	$r=0,484$ $p=0,0001$	$r=0,554$ $p=0,0001$	$r=0,575$ $p=0,0001$	$r=0,536$ $p=0,0001$

Tabla 33: Correlaciones de los biomarcadores HA, PIIINP, TIMP-1 y del algoritmo ELF con los algoritmos Apri, Forn, Fibrometer, Fib-4, Fibro-Q, Hepascore y Via Index. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Vc	$r=0,531$ $p=0,0001$	$r=0,530$ $p=0,0001$	$r=0,592$ $p=0,0001$	$r=0,572$ $p=0,0001$

Tabla 34: Correlaciones observadas entre los biomarcadores HA, PIIINP, TIMP-1 y del algoritmo ELF con la Vc (velocidad de onda de corte). HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



Gráfica 18: Correlación del ELF (test de fibrosis hepática mejorada) con la Vc (velocidad de onda de corte).

iv. Regresión lineal múltiple

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para estudiar la influencia que ejercen el resto de variables continuas sobre los biomarcadores directos estudiados y sobre el algoritmo ELF.

Para ello, se tomaron como variables dependientes, los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y el algoritmo ELF respectivamente, pues son el objetivo principal de esta tesis.

Se incluyeron como variables independientes aquellas variables continuas en las que se observó un nivel de significación $< 0,15$ en el estudio de correlaciones. Se incluyeron hasta un máximo de diez variables independientes, de modo que en los casos en los que se encontraron más de diez con una $p < 0,15$ en el estudio de correlaciones, se incluyeron las diez con mayor nivel de significación. No fueron incluidas como variables independientes los algoritmos matemáticos para la estimación de la fibrosis, y en el caso del ELF, tampoco se incluyeron los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1.

En la **tabla 35** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal múltiple del HA como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes la edad,

PIIINP, TIMP-1, el recuento de plaquetas, ACTPR, albúmina, AST, ALP, α 2-macroglobulina y Vc ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado resultaron significativas la albúmina y la AST ($p < 0,05$).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$HA = 2,867 \text{ Edad} + 1,193 \text{ PIIINP} - 0,120 \text{ TIMP1} - 0,361 \text{ Plaquetas} + 0,741 \text{ ACTPR} - 134,074 \text{ Albumina} + 1,385 \text{ AST} + 0,574 \text{ ALP} + 18,601 \alpha 2 \text{ Macroglobulina} + 72,9 \text{ Vc} + 334,137$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,469$, esta ecuación define los valores de HA en un 46,9%.

Variables	HA	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	p
Edad	0,154(-0,408 a 6,142)	0,085
PIIINP	0,042(-4,819 a 7,206)	0,694
TIMP-1	-0,067(-0,523 a 0,283)	0,556
Plaquetas	-0,019(-0,991 a 0,268)	0,257
ACTPR	0,050(-1,682 a 2,165)	0,545
Albúmina	-0,225(-248,077 a -20,070)	0,022
AST	0,265(0,400 a 2,316)	0,006
ALP	0,083(-0,804 a 1,953)	0,410
α 2-Macroglobulina	0,090(-22,265 a 59,468)	0,368
Vc	0,194(-4,631 a 150,431)	0,065

Tabla 35: Regresión lineal múltiple del ácido hialurónico (HA) como variable dependiente. PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ACTPR: % de actividad de protrombina, AST: aspartato aminotransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, Vc: velocidad de onda de corte.

En la **tabla 36** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal múltiple del PIIINP como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes el HA, TIMP-1, el recuento de plaquetas y de leucocitos, albúmina, colesterol, AST, ALP, α 2-macroglobulina y Vc ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado resultaron significativas las plaquetas y la AST ($p < 0,05$).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$PIIINP = 0,001 HA + 0,010 TIMP1 - 0,022 Plaquetas - 0,312 Leucocitos + 0,952 Albumina - 0,009 Colesterol + 0,018 AST + 0,126 ALP - 0,643 \alpha 2Macroglobulina - 0,025 Vc + 3,432$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,474$, esta ecuación define los valores de PIIINP en un 47,4%.

Variables	PIIINP	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	p
HA	0,028(-0,006 a 0,008)	0,786
TIMP-1	0,162(-0,004 a 0,024)	0,148
Plaquetas	-0,191(-0,045 a 0,000)	0,046
Leucocitos totales	-0,080(-0,906 a 0,282)	0,300
Albúmina	0,045(-3,203 a 5,107)	0,650
Colesterol	-0,045(-0,041 a 0,023)	0,565
AST	0,100(-0,016 a 0,053)	0,296
ALP	0,510(0,084 a 0,167)	0,0001
α 2-Macroglobulina	-0,088(-2,049 a 0,763)	0,366
Vc	-0,002(-2,771 a 2,721)	0,986

Tabla 36: Regresión lineal múltiple del péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres (PIIINP) como variable dependiente. HA: ácido hialurónico, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, AST: aspartato aminotransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, Vc: velocidad de onda de corte.

En la **tabla 37** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal múltiple del TIMP-1 como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes la edad, HA, PIIINP, VCM, albúmina, AST, ALT, GGT, α 2-macroglobulina y Vc ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado las variables VCM, α 2-macroglobulina y Vc resultaron significativas ($p < 0,05$).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} TIMP1 = & 0,496 \text{ Edad} - 0,014 \text{ HA} + 2,389 \text{ PIIINP} \\ & + 4,446 \text{ VCM} - 67,166 \text{ Albumina} - 0,008 \text{ AST} - 0,085 \text{ ALT} \\ & - 0,006 \text{ GGT} + 34,481 \alpha 2 \text{Macroglobulina} + 65,733 \text{ Vc} - 56,435 \end{aligned}$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2=0,576$, esta ecuación define los valores de TIMP-1 en un 57,6%

Variables	TIMP-1	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	p
Edad	0,048(-1,130 a 2,122)	0,546
HA	-0,025(-0,116 a 0,088)	0,783
PIIINP	0,153(-0,071 a 4,850)	0,057
VCM	0,230(1,840 a 7,051)	0,001
Albúmina	-0,203(-120,927 a -13,405)	0,015
AST	-0,003(-0,861 a 0,846)	0,986
ALT	-0,036(-0,642 a 0,472)	0,763
GGT	-0,006(-0,207 a 0,195)	0,951
α 2-Macroglobulina	0,301(15,695 a 53,267)	0,0001
Vc	0,315(30,823 a 100,643)	0,0001

Tabla 37: Regresión lineal múltiple del inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno (TIMP-1) como variable dependiente. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, VCM: volumen corpuscular medio, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ -glutamyltransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, Vc: velocidad de onda de corte.

En la **tabla 38** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal múltiple del ELF como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes la edad, el recuento de plaquetas y de leucocitos, albúmina, AST, ALT, ALP, GGT, α 2-macroglobulina y Vc ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado las variables albúmina, α 2-macroglobulina y Vc resultaron significativas ($p < 0,05$). Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$ELF = 0,013 \text{ Edad} - 0,001 \text{ Plaquetas} - 0,089 \text{ Leucocitos} \\ - 0,672 \text{ Albumina} + 0,006 \text{ AST} - 0,001 \text{ ALT} + 0,006 \text{ ALP} \\ + 0,001 \text{ GGT} + 0,319 \alpha 2 \text{Macroglobulina} + 0,415 \text{ Vc} + 10,863$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2=0,589$, esta ecuación define los valores de ELF en un 58,9%.

Variables	ELF	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	<i>p</i>
Edad	0,115(-0,004 a 0,029)	0,130
Plaquetas	-0,026(-0,004 a 0,003)	0,748
Leucocitos totales	-0,136(-0,177 a 0,000)	0,060
Albúmina	-0,190(-1,242 a -0,103)	0,021
AST	0,185(-0,004 a 0,015)	0,230
ALT	-0,056(-0,008 a 0,005)	0,652
ALP	0,142(-0,001 a 0,012)	0,075
GGT	0,051(-0,002 a 0,003)	0,606
α 2-Macroglobulina	0,261(0,119 a 0,519)	0,002
Vc	0,186(0,056 a 0,773)	0,024

Tabla 38: Regresión lineal múltiple del ELF (test de fibrosis hepática mejorada) como variable dependiente. AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, GGT: γ -glutamilttransferasa Vc: velocidad de onda de corte.

4.1.3 Objetivo 3: Analizar la eficacia clínica de los biomarcadores directos e indirectos y de los algoritmos matemáticos en la evaluación de la fibrosis hepática de nuestra población de estudio, utilizando la velocidad de onda de corte como estándar de referencia.

Para evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores y de los algoritmos matemáticos se emplearon curvas ROC, estudiando el área bajo la curva, y en variables en las que ésta resultó significativa, la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo y negativo.

Se tomaron como variables de estado la identificación de fibrosis significativa (grados \geq F2 de la escala Metavir) y cirrosis (grado F4 de la escala Metavir), es decir, la identificación de los pacientes clasificados en los grupos dos y tres, y tres respectivamente.

i. Biomarcadores Indirectos

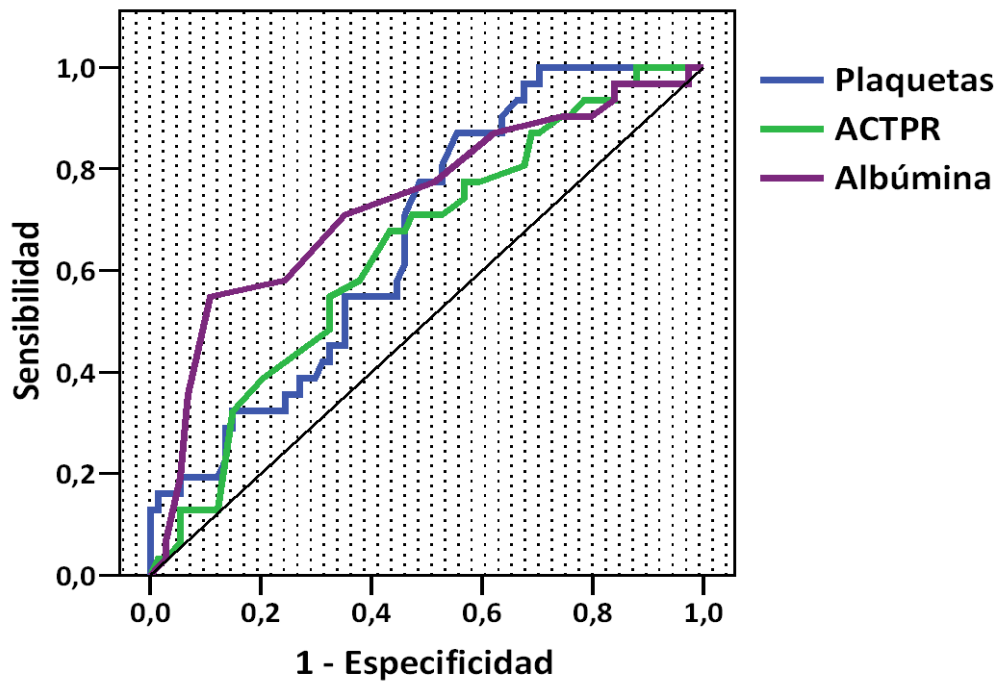
Se realizó el análisis de las curvas ROC para cada uno de los biomarcadores indirectos incluidos en el estudio (recuento de plaquetas, porcentaje de actividad del tiempo de protrombina, albúmina, bilirrubina total, transaminasas, GGT, fosfatasa alcalina, haptoglobina, α 2-macroglobulina y apolipoproteínaA-1).

a. Fibrosis significativa

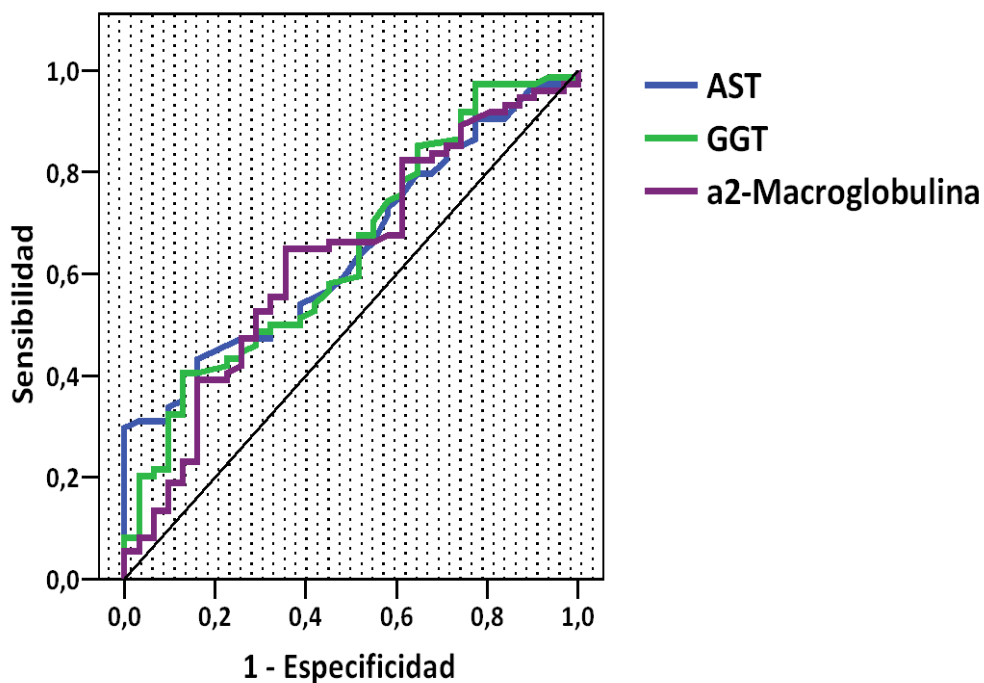
Se obtuvo para cada una de las variables el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 39** y las **gráficas 19-20**.

	AUC	<i>p</i>	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Plaquetas	0,668	0,007	0,562	0,773
ACTPR	0,641	0,023	0,529	0,754
Albúmina	0,733	0,0001	0,622	0,844
Bilirrubina total	0,424	0,223	0,311	0,538
AST	0,648	0,017	0,541	0,755
ALT	0,593	0,135	0,478	0,707
GGT	0,644	0,021	0,530	0,757
ALP	0,598	0,114	0,485	0,712
Haptoglobina	0,605	0,090	0,488	0,722
α 2-Macroglobulina	0,631	0,035	0,514	0,748
ApoA-1	0,596	0,121	0,476	0,717

Tabla 39: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los biomarcadores indirectos para la identificación de fibrosis significativa. ACTPR: porcentaje de actividad del tiempo de protrombina, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ -glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, ApoA-1: apolipoproteína A1.



Gráfica 19: Curva ROC para el diagnóstico de fibrosis significativa de las plaquetas, ACTPR (porcentaje de actividad del tiempo de protrombina) y albúmina.



Gráfica 20: Curva ROC para el diagnóstico de fibrosis significativa de la AST (aspartato aminotransferasa), GGT (γ -glutamilttransferasa) y α 2-macroglobulina.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para las plaquetas, la ACTPR, la albúmina, la AST, la GGT y la α 2-macroglobulina, puesto que fueron las variables que aportaron un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Así mismo se determinó el índice de Youden (207), que analiza la capacidad diagnóstica del biomarcador usando un único valor en reemplazo de la forma clásica, que valora de manera dúal la sensibilidad y especificidad. Este índice se define como:

$$\text{Índice de Youden} = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$$

El resultado del índice varía de (-1) a (+1), si el resultado es inferior o igual a cero la prueba no tiene ningún valor informativo. La prueba se considera tanto mejor cuánto más se aproxima a uno el resultado. Los resultados se reflejan en la **tabla 40**.

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
Plaquetas	174 x10 ³ /μL	44,59	87,10	0,31	89,2	39,7
ACTPR	94%	55,76	64,74	0,24	80,8	39,6
Albúmina	4,8 g/dL	89,19	54,84	0,44	82,5	68
AST	66 UI/L	29,73	100	0,29	100	37,3
GGT	84 UI/L	40,54	87,10	0,27	88,2	38
α2-Macroglobulina	3,08 g/L	64,86	64,52	0,29	81,4	43,5

Tabla 40: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores indirectos para la detección de fibrosis significativa.

Se realizó un análisis de comparación entre estas variables cuya AUC resultó significativa (plaquetas, ACTPR, albúmina, AST, GGT y α 2-macroglobulina). Para ello se compararon los estadísticos c de cada una de estas variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso (**tabla 41**).

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
Plaquetas vs	ACTPR	0,026(-0,121 a 0,173)	0,727
	Albúmina	0,065(-0,081 a 0,212)	0,381
	AST	0,019(-0,122 a 0,162)	0,784
	GGT	0,024(-0,120 a 0,168)	0,744
	α 2-macroglobulina	0,036(-0,095 a 0,169)	0,583
ACTPR vs	Albúmina	0,091(-0,040 a 0,224)	0,175
	AST	0,006(-0,124 a 0,137)	0,924
	GGT	0,002(-0,160 a 0,164)	0,979
	α 2-macroglobulina	0,010(-0,129 a 0,151)	0,881
Albúmina vs	AST	0,085(-0,072 a 0,243)	0,289
	GGT	0,089(-0,079 a 0,259)	0,300
	α 2-macroglobulina	0,102(-0,030 a 0,235)	0,131
AST vs	GGT	0,004(-0,123 a 0,132)	0,949
	α 2-macroglobulina	0,017(-0,118 a 0,152)	0,804
GGT vs	α 2-macroglobulina	0,012(-0,134 a 0,160)	0,863

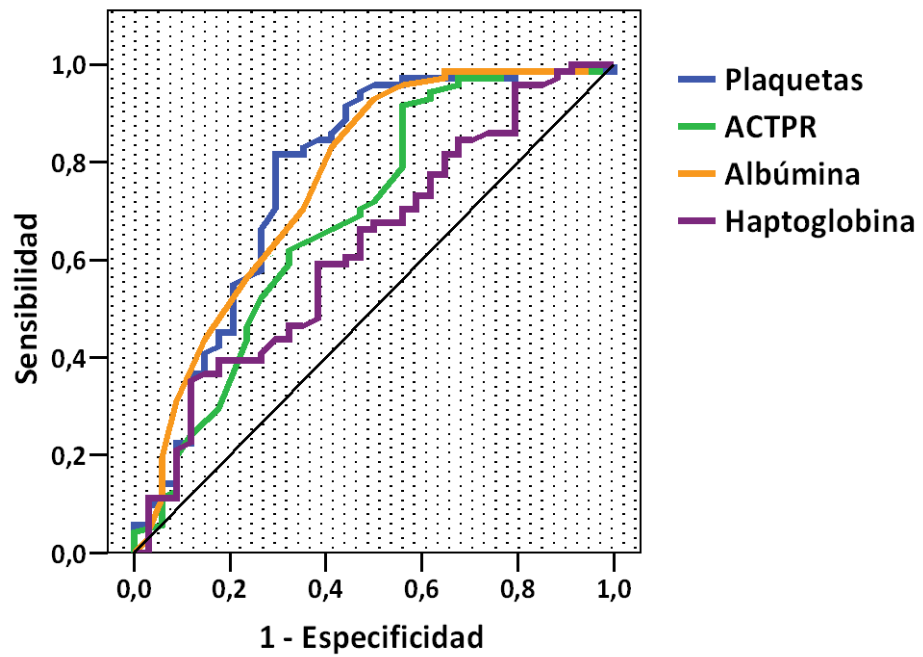
Tabla 41: Diferencia de áreas entre los biomarcadores indirectos para la detección de fibrosis significativa.

b. Cirrosis

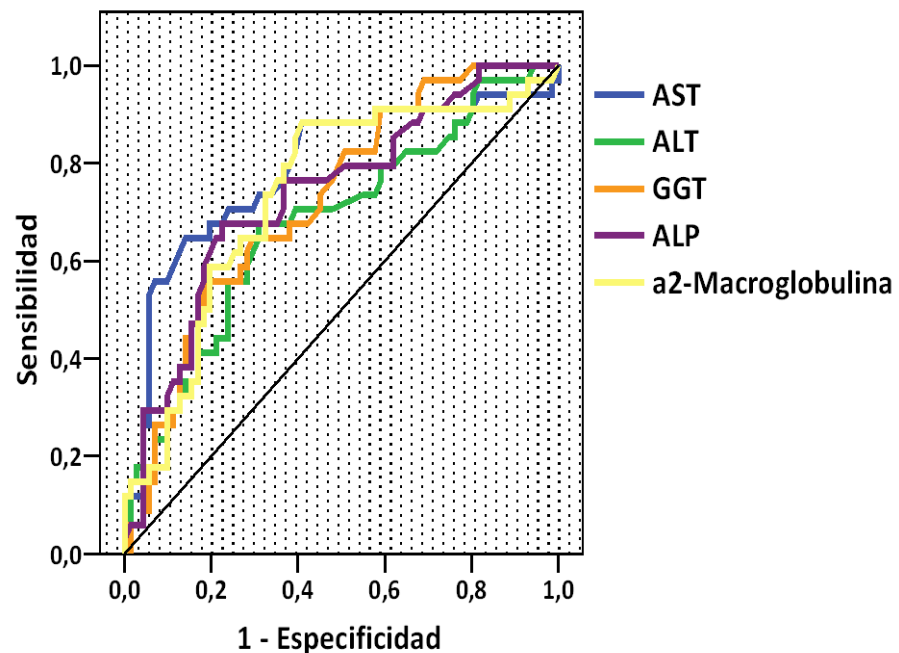
En la **tabla 42** y las **gráficas 21-22** se observan el área bajo la curva (AUC) de cada una de las variables con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza.

	AUC	p	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Plaquetas	0,771	0,0001	0,664	0,878
ACTPR	0,687	0,002	0,572	0,803
Albúmina	0,763	0,0001	0,658	0,868
Bilirrubina total	0,591	0,131	0,467	0,715
AST	0,788	0,0001	0,686	0,890
ALT	0,678	0,003	0,566	0,789
GGT	0,724	0,0001	0,624	0,823
ALP	0,737	0,0001	0,634	0,839
Haptoglobina	0,625	0,038	0,511	0,740
α 2-Macroglobulina	0,736	0,0001	0,632	0,841
ApoA-1	0,582	0,059	0,467	0,698

Tabla 42: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los biomarcadores indirectos para la identificación de cirrosis. ACTPR: porcentaje de actividad del tiempo de protrombina, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ -glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, ApoA-1: apolipoproteína A1.



Gráfica 21: Curva ROC para el diagnóstico de cirrosis de las plaquetas, ACTPR (porcentaje de actividad del tiempo de protrombina), albúmina y haptoglobina.



Gráfica 22: Curva ROC para el diagnóstico de cirrosis de la AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanino aminotransferasa), GGT (γ -glutamyltransferasa), ALP (fosfatasa alcalina) y α 2-macroglobulina.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, el índice de Youden, el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para las plaquetas, la ACTPR, la albúmina, la AST, la ALT, la GGT, la ALP, la haptoglobina y la α 2-macroglobulina, puesto que fueron las variables que aportaron un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 43**.

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
Plaquetas	174 x10 ³ / μ L	70,59	81,69	0,52	64,9	85,3
ACTPR	79%	44,12	91,55	0,35	71,4	77,4
Albúmina	4,3 g/dL	50	92,96	0,42	77,3	79,5
AST	55 UI/L	64,71	85,92	0,50	68,7	83,6
ALT	60 UI/L	67,65	69,01	0,36	51,1	81,7
GGT	85 UI/L	55,88	80,28	0,36	57,6	79,2
ALP	87 UI/L	67,65	77,46	0,45	59	83,3
Haptoglobina	131 mg/dL	88,24	35,25	0,23	39,5	86,2
α2-Macroglobulina	3,08 g/L	88,24	59,15	0,47	50,8	91,3

Tabla 43: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores indirectos para la detección de cirrosis.

De entre las variables cuya AUC resultó significativa, se realizó un análisis de comparación entre las que presentaron un mejor nivel de significación (plaquetas, albúmina, AST, GGT, ALP y α 2-macroglobulina). Para ello se compararon los estadísticos c de cada una de estas

variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso (**tabla 44**).

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
Plaquetas vs	Albúmina	0,008(-0,122 a 0,138)	0,903
	AST	0,016(-0,123 a 0,156)	0,815
	GGT	0,047(-0,066 a 0,162)	0,416
	ALP	0,034(-0,104 a 0,173)	0,625
	$\alpha 2$ -macroglobulina	0,034(-0,077 a 0,146)	0,541
Albúmina vs	AST	0,024(-0,122 a 0,172)	0,742
	GGT	0,039(-0,110 a 0,189)	0,605
	ALP	0,026(-0,096 a 0,149)	0,672
	$\alpha 2$ -macroglobulina	0,026(-0,090 a 0,144)	0,654
AST vs	GGT	0,064(-0,029 a 0,157)	0,177
	ALP	0,051(-0,079 a 0,181)	0,771
	$\alpha 2$ -macroglobulina	0,051(-0,078 a 0,181)	0,437
GGT vs	ALP	0,012(-0,119 a 0,145)	0,848
	$\alpha 2$ -macroglobulina	0,012(-0,104 a 0,129)	0,831
ALP vs	$\alpha 2$ -macroglobulina	0,001(-0,135 a 0,135)	0,997

Tabla 44: Diferencia de áreas entre los biomarcadores indirectos para la detección de cirrosis.

ii. Biomarcadores Directos

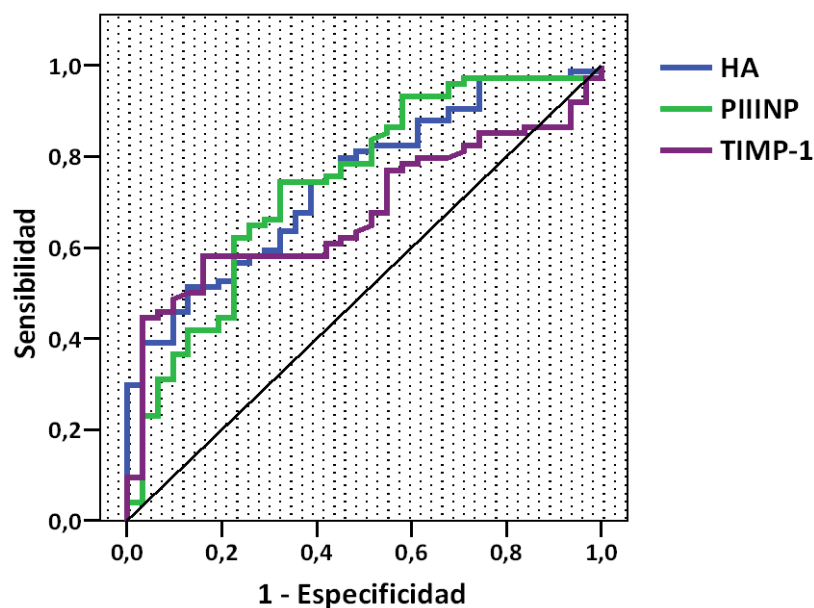
Se realizó el análisis de las curvas ROC para cada uno de los biomarcadores directos estudiados (HA, PIIINP y TIMP-1).

a. Fibrosis significativa

Se obtuvo para cada una de las variables el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 45** y la **gráfica 23**.

	AUC	<i>p</i>	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
HA	0,745	0,0001	0,649	0,842
PIIINP	0,740	0,0001	0,634	0,846
TIMP-1	0,678	0,004	0,575	0,780

Tabla 45: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los biomarcadores directos para la identificación de fibrosis significativa. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno.



Gráfica 23: Curva ROC para el diagnóstico de fibrosis significativa de los biomarcadores directos. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, el índice de Youden, el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los tres biomarcadores directos, puesto que todos ellos aportaron un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 46**.

	Cut-off (ng/mL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
HA	75,31	51,36	87,10	0,38	90,5	42,9
PIIINP	9,05	74,32	67,74	0,42	84,6	52,5
TIMP-1	285,9	58,11	83,87	0,43	89,6	45,6

Tabla 46: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores directos para la detección de fibrosis significativa.

Se realizó un análisis de comparación entre los tres biomarcadores directos. Para ello se compararon los estadísticos *c* mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso (tabla 47).

	Diferencias de áreas	
	Valor (IC95%)	<i>p</i>
HA vs PIIINP	0,005(-0,135 a 0,146)	0,939
HA vs TIMP-1	0,067(-0,033 a 0,169)	0,187
PIIINP vs TIMP-1	0,062(-0,066 a 0,191)	0,343

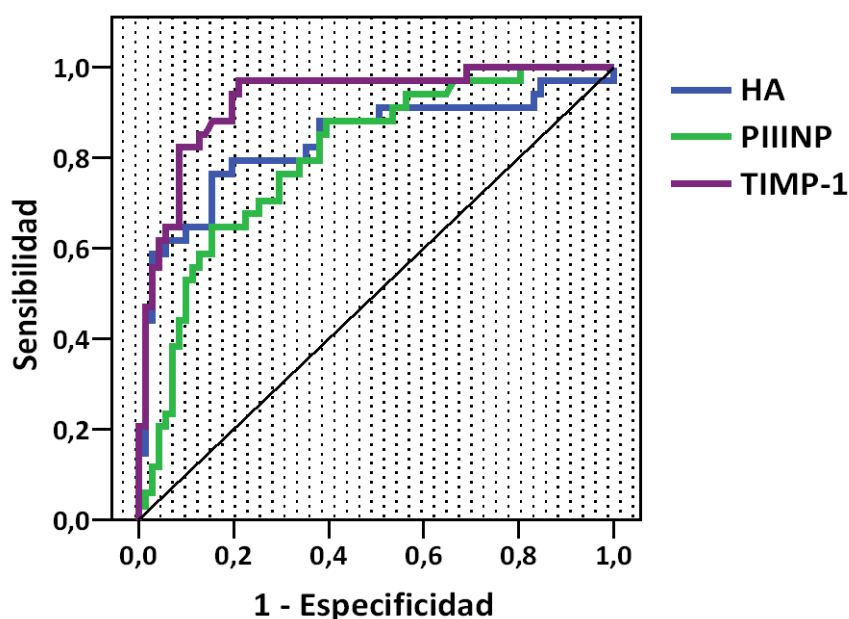
Tabla 47: Diferencia de áreas entre los biomarcadores directos para la detección de fibrosis significativa.

b. Cirrosis

Se obtuvo para cada una de las variables el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 48** y la **gráfica 24**.

	AUC	<i>p</i>	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
HA	0,837	0,0001	0,742	0,931
PIIINP	0,802	0,0001	0,714	0,889
TIMP-1	0,929	0,0001	0,876	0,981

Tabla 48: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los biomarcadores directos para la identificación de cirrosis. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno.



Gráfica 24: Curva ROC para el diagnóstico de cirrosis de los biomarcadores directos. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, el índice de Youden, el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los tres biomarcadores directos, puesto que todos ellos aportaron un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 49**.

	Cut-off (ng/mL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
HA	91,74	76,47	84,51	0,61	70,3	88,2
PIIINP	12,31	64,71	84,51	0,49	66,7	83,3
TIMP-1	285,9	97,06	78,87	0,76	68,7	98,2

Tabla 49: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores directos para la detección de cirrosis. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno.

Se realizó un análisis de comparación entre los tres biomarcadores directos. Para ello se compararon los estadísticos c mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar el TIMP-1 con el HA y con el PIIINP, siendo el TIMP-1 en ambos casos el biomarcador que aportaba mejores resultados (**tabla 50**).

	Diferencias de áreas	
	Valor (IC95%)	p
HA vs PIIINP	0,035(-0,067 a 0,137)	0,501
HA vs TIMP-1	0,091(0,003 a 0,180)	0,042
PIIINP vs TIMP-1	0,127(0,049 a 0,204)	0,001

Tabla 50: Diferencia de áreas entre los biomarcadores directos para la detección de cirrosis.

iii. Algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática

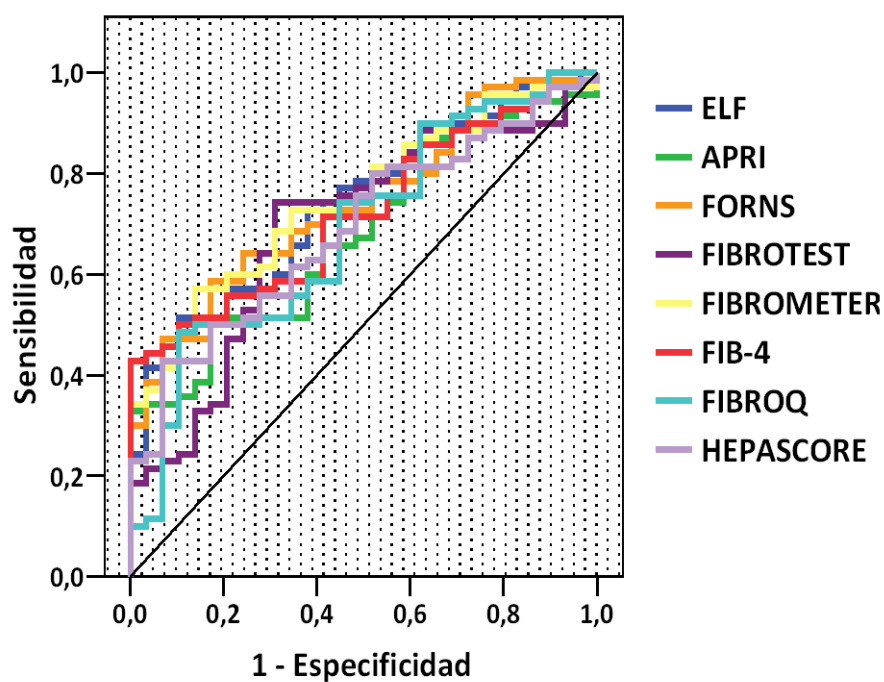
Se realizó el análisis de las curvas ROC para cada uno de los algoritmos matemáticos estudiados (ELF, Apri, Forns, Fibrotest, Fibrometer, Fib-4, Fibro-Q y Hepascore). El algoritmo Via Index no se incluyó, puesto que contiene en su fórmula la V_c , parámetro que nosotros hemos utilizado para la realización de los grupos de estudio.

a. Fibrosis significativa

Se obtuvo para cada uno de ellos el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 51** y la **gráfica 25**.

	AUC	p	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
ELF	0,743	0,0001	0,645	0,824
Apri	0,683	0,004	0,575	0,790
Forns	0,740	0,0001	0,642	0,839
Fibrotest	0,693	0,003	0,579	0,806
Fibrometer	0,748	0,0001	0,651	0,845
Fib-4	0,720	0,001	0,629	0,819
Fibro-Q	0,688	0,003	0,575	0,801
Hepascore	0,691	0,003	0,585	0,797

Tabla 51: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de p e intervalos de confianza de los algoritmos matemáticos para la identificación de fibrosis significativa.



Gráfica 25: Curva ROC para el diagnóstico de fibrosis significativa de los algoritmos matemáticos.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, el índice de Youden, el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los todos algoritmos, puesto que todos ellos aportaron un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 52**.

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
ELF	9,75	59,46	87,10	0,46	91,7	47,4
Apri	0,57	51,35	83,87	0,35	88,4	41,9
Forns	5,26	59,46	83,87	0,43	89,8	46,4
Fibrotest	-0,55	74,32	67,74	0,42	84,6	52,5
Fibrometer	-1,89	56,34	87,10	0,43	90,9	46,6
Fib-4	1,79	44,59	100	0,44	100	43,1
Fibro-Q	2,48	50	90,32	0,40	92,5	43,1
Hepascore	0,77	42,86	93,10	0,36	93,7	40,3

Tabla 52: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los algoritmos matemáticos para la detección de fibrosis significativa.

Se realizó un análisis de comparación entre los algoritmos que presentaron un mejor nivel de significación (ELF, Forns, Fibrotest, Fibrometer, Fib-4 y FibroQ). Para ello se compararon los estadísticos c de cada una de estas variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso (**tabla 53**).

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
ELF vs	Forns	0,025(-0,08 a 0,138)	0,675
	Fibrotest	0,078(-0,035 a 0,193)	0,177
	Fibrometer	0,001(-0,079 a 0,083)	0,965
	Fib-4	0,040(-0,070 a 0,152)	0,471
	FibroQ	0,075(-0,051 a 0,202)	0,242
Forns vs	Fibrotest	0,053(-0,031 a 0,138)	0,220
	Fibrometer	0,023(-0,086 a 0,134)	0,673
	Fib-4	0,015(-0,058 a 0,089)	0,681
	FibroQ	0,050(-0,059 a 0,159)	0,370
Fibrotest vs	Fibrometer	0,076(-0,035 a 0,189)	0,181
	Fib-4	0,037(-0,067 a 0,142)	0,480
	FibroQ	0,003(-0,134 a 0,140)	0,963
Fibrometer vs	Fib-4	0,039(-0,060 a 0,138)	0,441
	FibroQ	0,073(-0,035 a 0,183)	0,185
Fib-4 vs	FibroQ	0,034(-0,036 a 0,106)	0,340

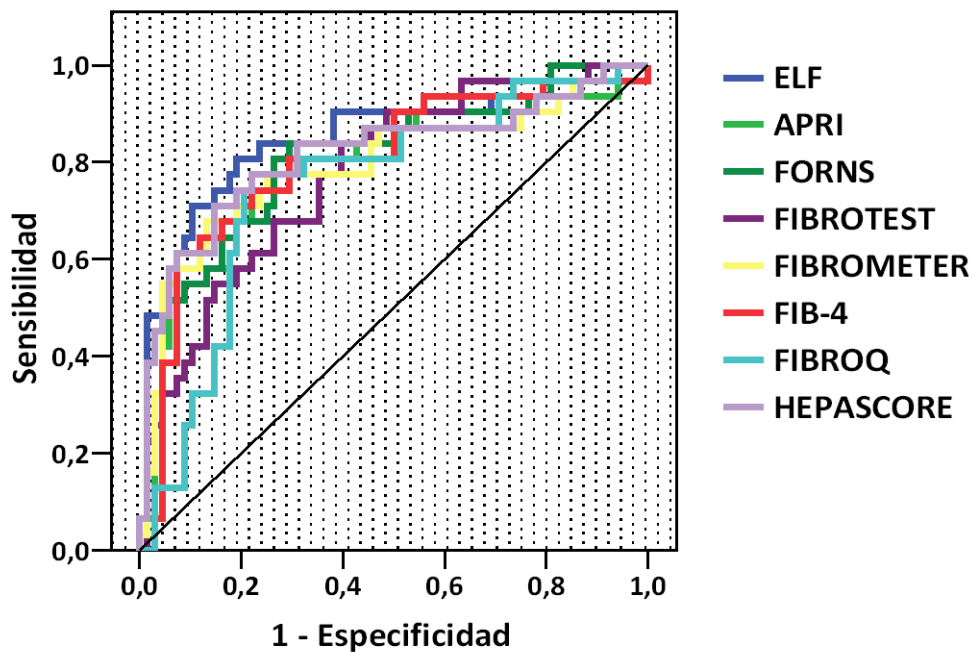
Tabla 53: Diferencia de áreas entre los algoritmos matemáticos para la detección de fibrosis significativa.

b. Cirrosis

Se obtuvo para cada uno de los algoritmos matemáticos el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 54** y la **gráfica 26**.

	AUC	<i>p</i>	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
ELF	0,852	0,0001	0,763	0,941
Apri	0,798	0,0001	0,696	0,901
Forns	0,800	0,0001	0,702	0,898
Fibrotest	0,777	0,0001	0,681	0,873
Fibrometer	0,792	0,0001	0,683	0,900
Fib-4	0,801	0,0001	0,701	0,901
Fibro-Q	0,754	0,0001	0,649	0,858
Hepascore	0,816	0,0001	0,713	0,918

Tabla 54: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los algoritmos matemáticos para la identificación de cirrosis.



Gráfica 26: Curva ROC para el diagnóstico de cirrosis de los algoritmos matemáticos.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, el índice de Youden, el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los todos algoritmos, puesto que todos ellos aportaron un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 55**.

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
ELF	10,04	82,35	80,28	0,63	66,7	90,5
Apri	0,57	79,41	78,87	0,58	64,3	88,9
Forns	5,26	85,29	71,83	0,57	59,2	91,1
Fibrotest	-0,28	85,29	60,56	0,45	50,9	89,6
Fibrometer	-0,52	67,74	87,32	0,55	70	86,1
Fib-4	2,27	64,71	92,96	0,57	81,5	84,6
Fibro-Q	2,37	79,41	78,87	0,58	64,3	88,9
Hepascore	0,77	70,97	85,29	0,56	78,7	86,6

Tabla 55: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los algoritmos matemáticos para la detección de cirrosis

Se realizó un análisis de comparación entre los algoritmos que presentaron un mejor nivel de significación (ELF, Apri, Forn, Fibrometer, Fib-4 y Hepascore). Para ello se compararon los estadísticos c de cada una de estas variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso (**tabla 56**).

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
ELF vs	Apri	0,053(-0,055 a 0,163)	0,335
	Forns	0,051(-0,038 a 0,142)	0,259
	Fibrometer	0,060(-0,030 a 0,151)	0,194
	Fib-4	0,050(-0,042 a 0,144)	0,285
	Hepascore	0,036(-0,004 a 0,076)	0,081
Apri vs	Forns	0,001(-0,107 a 0,111)	0,972
	Fibrometer	0,006(-0,075 a 0,088)	0,873
	Fib-4	0,002(-0,071 a 0,077)	0,940
	Hepascore	0,017(-0,101 a 0,136)	0,771
Forns vs	Fibrometer	0,008(-0,096 a 0,113)	0,872
	Fib-4	0,001(-0,069 a 0,071)	0,978
	Hepascore	0,015(-0,079 a 0,111)	0,747
Fibrometer vs	Fib-4	0,009(-0,062 a 0,081)	0,796
	Hepascore	0,024(-0,070 a 0,119)	0,615
Fib-4 vs	Hepascore	0,014(-0,087 a 0,116)	0,776

Tabla 56: Diferencia de áreas entre los algoritmos matemáticos para la detección de cirrosis.

Finalmente se realizó un análisis de comparación entre los biomarcadores indirectos, los directos y los algoritmos (**tablas 57-58**). Se incluyeron de cada uno de estos grupos, las dos variables con la AUC con mayor nivel de significación (plaquetas, albúmina, HA, PIIINP, ELF y Fibrometer para la detección de fibrosis significativa, y plaquetas, albúmina, HA, TIMP-1, ELF y Hepascore para la detección de cirrosis). Para ello se compararon los

estadísticos c de cada una de estas variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208).

a. Fibrosis significativa

Tal como se observa en la **tabla 57**, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso.

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
Albúmina vs	Plaquetas	0,069(-0,082 a 0,221)	0,373
	HA	0,012(-0,116 a 0,140)	0,854
	PIIINP	0,009(-0,133 a 0,151)	0,900
	ELF	0,032(-0,088 a 0,153)	0,602
	Fibrometer	0,030(-0,082 a 0,143)	0,598
Plaquetas vs	HA	0,081(-0,051 a 0,214)	0,230
	PIIINP	0,078(-0,062 a 0,219)	0,275
	ELF	0,101(-0,029 a 0,232)	0,129
	Fibrometer	0,099(-0,018 a 0,217)	0,098
HA vs	PIIINP	0,002(-0,42 a 0,148)	0,968
	ELF	0,020(-0,021 a 0,061)	0,349
	Fibrometer	0,018(-0,060 a 0,096)	0,649
PIIINP vs	ELF	0,022(-0,094 a 0,141)	0,702
	Fibrometer	0,021(-0,112 a 0,154)	0,755
ELF vs	Fibrometer	0,001(-0,079 a 0,083)	0,965

Tabla 57: Diferencia de áreas entre biomarcadores indirectos, directos y algoritmos matemáticos para la detección de fibrosis significativa.

b. Cirrosis

En la **tabla 58** se ilustran los resultados encontrados. Se observaron diferencias significativas entre las plaquetas y el TIMP-1 y el ELF respectivamente, siendo en ambos casos peor el AUC aportada por las plaquetas. Además, el TIMP-1 y el ELF aportaron unas AUC significativamente superiores a la albúmina y al HA. Por otro lado, el TIMP-1 obtuvo un AUC significativamente mejor que el ELF y el Hepascore respectivamente.

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
Plaquetas vs	Albúmina	0,014(-0,130 a 0,158)	0,846
	HA	0,070(-0,053 a 0,195)	0,265
	TIMP-1	0,175(0,054 a 0,295)	0,004
	ELF	0,105(-0,008 a 0,217)	0,049
	Hepascore	0,068(-0,046 a 0,184)	0,243
Albúmina vs	HA	0,084(-0,041 a 0,211)	0,189
	TIMP-1	0,189(0,083 a 0,295)	0,001
	ELF	0,119(0,005 a 0,232)	0,039
	Hepascore	0,082(-0,036 a 0,202)	0,172
HA vs	TIMP-1	0,104(0,007 a 0,201)	0,034
	ELF	0,034(0,001 a 0,068)	0,048
	Hepascore	0,001(-0,035 a 0,038)	0,920
TIMP-1 vs	ELF	0,070(-0,005 a 0,146)	0,049
	Hepascore	0,106(0,013 a 0,199)	0,025
ELF vs	Hepascore	0,036(-0,004 a 0,076)	0,081

Tabla 58: Diferencia de áreas entre biomarcadores indirectos, directos y algoritmos matemáticos para la detección de cirrosis.

4.1.4 Objetivo 4: Elaborar un modelo diagnóstico que combine los biomarcadores con el estudio radiodiagnóstico, y definir la utilidad que aporta en la evaluación no invasiva de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis por VHC.

Para elaborar un modelo que predijese la probabilidad o riesgo de que un paciente se clasificase en el grupo dos o tres de nuestra población de estudio, es decir, que presentase un grado de fibrosis hepática significativa, equivalente a un estadio \geq F2 de la escala Metavir de acuerdo a resultado de Vc aportado por la técnica Arfi, realizamos un análisis de regresión logística binaria.

Se elaboraron, evaluaron y compararon cuatro modelos para la valoración de la hepatopatía crónica en este tipo de pacientes: un modelo con biomarcadores indirectos, otro modelo que combinase los biomarcadores indirectos y la ecografía, un modelo con biomarcadores indirectos y el algoritmo ELF, y un cuarto modelo que combinase los tres anteriores.

De acuerdo a lo anterior, se establecieron los siguientes cuatro modelos de regresión logística:

- i. *Modelo con biomarcadores indirectos:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración las variables clínicas, los parámetros hematológicos y los biomarcadores clásicamente utilizados en la valoración de este tipo de pacientes, es decir, los biomarcadores indirectos de fibrosis.
- ii. *Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración, además de todas las variables del modelo anterior, las variables derivadas del estudio ecográfico.
- iii. *Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos y el algoritmo ELF.
- iv. *Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración las variables clínicas, los

parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis, el algoritmo ELF y las variables derivadas del estudio ecográfico.

Para la elaboración de los cuatro modelos se consideró como variable dependiente el diagnóstico de fibrosis significativa, entendido como la clasificación en el del grupo dos o tres de nuestro estudio. Además, también se valoró la eficacia de los cuatro modelos para el diagnóstico de cirrosis hepática, es decir, los modelos elaborados se evaluaron tomando como variable dependiente el diagnóstico de cirrosis, entendido como la clasificación en el del grupo tres de nuestro estudio.

a. Fibrosis significativa

i. Modelo con biomarcadores indirectos

Para la realización de este modelo de regresión logística se incluyeron las variables clínicas, los parámetros hematológicos y los biomarcadores indirectos de fibrosis.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para el modelo, obteniendo el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico.

Las variables incluidas en el modelo final fueron la edad, la hemoglobina, las plaquetas, la albúmina, la AST y la $\alpha 2$ -macroglobulina. Se confirmó que la edad, la hemoglobina y la AST fueron factores predictores de fibrosis significativa ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 59**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,397$, este modelo explica en un 39,7% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en los grupos dos o tres de nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 79%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = 0,064 \text{ Edad} - 0,519 \text{ Hemoglobina} - 0,009 \text{ Plaquetas} \\ - 0,748 \text{ Albumina} + 0,033 \text{ AST} - 0,317 \alpha 2 \text{Macroglobulina} + 10,785$$

Siendo $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$, y donde p es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente presente fibrosis significativa, entendido como la clasificación en los grupos dos o tres.

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, hemoglobina en g/dL, plaquetas en $10^3/\mu\text{L}$, albúmina en g/dL, AST en UI/L y $\alpha 2$ -macroglobulina en g/L.

Alternativamente la fórmula puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
Edad	1,053(1,012 a 1,095)	0,012	1,066(1,008 a 1,126)	0,025
Hemoglobina	0,710(0,546 a 0,922)	0,010	0,595(0,409 a 0,865)	0,007
Plaquetas	0,990(0,983 a 0,997)	0,004	0,991(0,981 a 1,001)	0,072
Albúmina	0,095(0,022 a 0,416)	0,002	0,473(0,070 a 3,185)	0,442
AST	1,027(1,005 a 1,049)	0,014	1,034(1,004 a 1,065)	0,027
$\alpha 2$-macroglobulina	1,153(1,015 a 2,346)	0,042	0,728(0,409 a 1,298)	0,282

Tabla 59: Modelo con biomarcadores indirectos. Regresión logística incluyendo parámetros clínicos, hematológicos y biomarcadores indirectos de fibrosis. AST: aspartato aminotransferasa,

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo para la detección de fibrosis significativa, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 60**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo con biomarcadores indirectos	0,78	58,11	90,33	93,5	47,5

Tabla 60: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo con biomarcadores indirectos para la detección de fibrosis significativa.

ii. *Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía*

Para la realización de este modelo de regresión logística se incluyeron las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis y las variables derivadas de la ecografía.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para el modelo, obteniendo el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico.

Las variables incluidas en el modelo final fueron la edad, la hemoglobina, las plaquetas, la albúmina, la AST, la $\alpha 2$ -macroglobulina y la superficie hepática nodular valorada en la ecografía. Al igual que en el modelo anterior, se confirmó que la edad, la hemoglobina y la AST fueron factores predictores de fibrosis significativa ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 61**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,411$, este modelo explica en un 41,1% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en los grupos dos o tres de nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 78,1%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = 0,063 \text{ Edad} - 0,526 \text{ Hemoglobina} - 0,008 \text{ Plaquetas} - 0,747 \text{ Albumina} + 0,037 \text{ AST} - 0,365 \alpha 2 \text{ Macroglobulina} - 0,929 \text{ Superficie Nodular} + 11,507$$

Siendo $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$, y donde p es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente presente fibrosis significativa, entendido como la clasificación en los grupos dos o tres.

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, hemoglobina en g/dL, plaquetas en $10^3/\mu\text{L}$, albúmina en g/dL, AST en UI/L, $\alpha 2$ -macroglobulina en g/L y la superficie nodular, cero si está ausente y uno en caso de presencia.

Alternativamente la fórmula puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
Edad	1,053(1,012 a 1,095)	0,012	1,065(1,007 a 1,126)	0,027
Hemoglobina	0,710(0,546 a 0,922)	0,010	0,591(0,404 a 0,865)	0,007
Plaquetas	0,990(0,983 a 0,997)	0,004	0,992(0,982 a 1,002)	0,109
Albúmina	0,095(0,022 a 0,416)	0,002	0,474(0,067 a 3,365)	0,455
AST	1,027(1,005 a 1,049)	0,014	1,038(1,005 a 1,071)	0,022
$\alpha 2$-macroglobulina	1,153(1,015 a 2,346)	0,042	0,694(0,382 a 1,260)	0,230
Superficie nodular	0,289(0,0079 a 1,058)	0,061	0,395(0,083 a 1,871)	0,242

Tabla 61: Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía. Regresión logística incluyendo parámetros clínicos, hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis y parámetros ecográficos. AST: aspartato aminotransferasa.

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo para la detección de fibrosis significativa, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 62**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía	0,57	83,78	64,52	84,9	62,5

Tabla 62: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo con biomarcadores indirectos y ecografía.

iii. Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF

Para la realización de este modelo de regresión logística se incluyeron las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis y el algoritmo ELF.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para el modelo, obteniendo el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico.

Las variables incluidas en el modelo final fueron la edad, la hemoglobina, las plaquetas, el porcentaje de linfocitos, la albúmina, la AST, la $\alpha 2$ -macroglobulina y el algoritmo ELF. Se confirmó que la edad, la hemoglobina, el porcentaje de linfocitos, la $\alpha 2$ -macroglobulina y el ELF fueron factores predictores de fibrosis significativa ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 63**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,531$, este modelo explica en un 53,1% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en los grupos dos o tres de nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 83,8%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Logit}(p) = & 0,068 \text{ Edad} - 0,496 \text{ Hemoglobina} - 0,008 \text{ Plaquetas} \\ & + 0,094 \% \text{Linfocitos} + 0,007 \text{ Albumina} + 0,023 \text{ AST} - 0,804 \alpha 2 \text{Macroglobulina} \\ & + 0,976 \text{ ELF} - 4,180 \end{aligned}$$

Siendo $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$, y donde p es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente presente fibrosis significativa.

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, hemoglobina en g/dL, plaquetas en $10^3/\mu\text{L}$, albúmina en g/dL, AST en UI/L y $\alpha 2$ -macroglobulina en g/L. Alternativamente la fórmula puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
Edad	1,053(1,012 a 1,095)	0,012	1,071(1,002 a 1,145)	0,045
Hemoglobina	0,710(0,546 a 0,922)	0,010	0,609(0,407 a 0,910)	0,016
Plaquetas	0,990(0,983 a 0,997)	0,004	0,993(0,982 a 1,003)	0,170
% Linfocitos	1,097(1,041 a 1,157)	0,001	1,099(1,025 a 1,178)	0,008
Albúmina	0,095(0,022 a 0,416)	0,002	1,007(0,127 a 8,018)	0,995
AST	1,027(1,005 a 1,049)	0,014	1,024(0,994 a 1,054)	0,121
$\alpha 2$-macroglobulina	1,153(1,015 a 2,346)	0,042	0,447(0,230 a 0,940)	0,034
ELF	2,726(1,622 a 4,581)	0,0001	2,653(1,137 a 6,189)	0,024

Tabla 63: Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada). Regresión logística incluyendo parámetros clínicos, hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis y algoritmo ELF. AST: aspartato aminotransferasa.

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo para la detección de fibrosis significativa, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 64**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,55	85,14	80,65	91,3	64,9

Tabla 64: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF.

iv. *Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía*

Para la realización de este modelo de regresión logística se incluyeron las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis, el algoritmo ELF y las variables derivadas de la ecografía.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para el modelo, obteniendo el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico.

Las variables incluidas en el modelo final fueron la edad, la hemoglobina, las plaquetas, el porcentaje de linfocitos, la albúmina, la AST, la $\alpha 2$ -macroglobulina, el ELF y la superficie hepática nodular valorada en la ecografía. Al igual que en el modelo anterior, se confirmó que la edad, la hemoglobina, el porcentaje de linfocitos, la $\alpha 2$ -macroglobulina y el ELF fueron factores predictores de fibrosis significativa ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 65**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,543$, este modelo explica en un 54,3% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en los grupos dos y tres de

nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 83,8%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Logit}(p) = & 0,068 \text{ Edad} - 0,505 \text{ Hemoglobina} - 0,007 \text{ Plaquetas} \\ & + 0,095 \% \text{Linfocitos} - 0,043 \text{ Albumina} + 0,028 \text{ AST} - 0,882 \alpha 2 \text{Macroglobulina} \\ & + 0,995 \text{ ELF} - 1,059 \text{ Superficie Nodular} - 3,196 \end{aligned}$$

Siendo $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$, y donde p es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente presente fibrosis significativa, entendido como la clasificación en los grupos dos o tres.

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: edad en años, hemoglobina en g/dL, plaquetas en $10^3/\mu\text{L}$, albúmina en g/dL, AST en UI/L, $\alpha 2$ -macroglobulina en g/L y la superficie nodular, cero si está ausente y uno en caso de presencia.

Alternativamente la fórmula puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	1,053(1,012 a 1,095)	0,012	1,071(1,001 a 1,145)	0,046
Hemoglobina	0,710(0,546 a 0,922)	0,010	0,604(0,402 a 0,907)	0,015
Plaquetas	0,990(0,983 a 0,997)	0,004	0,993(0,982 a 1,003)	0,230
% Linfocitos	1,097(1,041 a 1,157)	0,001	1,099(1,025 a 1,179)	0,008
Albúmina	0,095(0,022 a 0,416)	0,002	0,958(0,114 a 8,086)	0,969
AST	1,027(1,005 a 1,049)	0,014	1,028(0,996 a 1,061)	0,091
α2-macroglobulina	1,153(1,015 a 2,346)	0,042	0,414(0,191 a 0,897)	0,025
ELF	2,726(1,622 a 4,581)	0,0001	2,705(1,163 a 6,291)	0,021
Superficie nodular	0,289(0,0079 a 1,058)	0,061	0,347(0,054 a 2,221)	0,264

Tabla 65: Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada) y ecografía. Regresión logística incluyendo parámetros clínicos, hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis, algoritmo ELF y parámetros ecográficos. AST: aspartato aminotransferasa.

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo para la detección de fibrosis significativa, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (tabla 66).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,54	83,68	80,65	91,2	67,6

Tabla 66: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada) y ecografía.

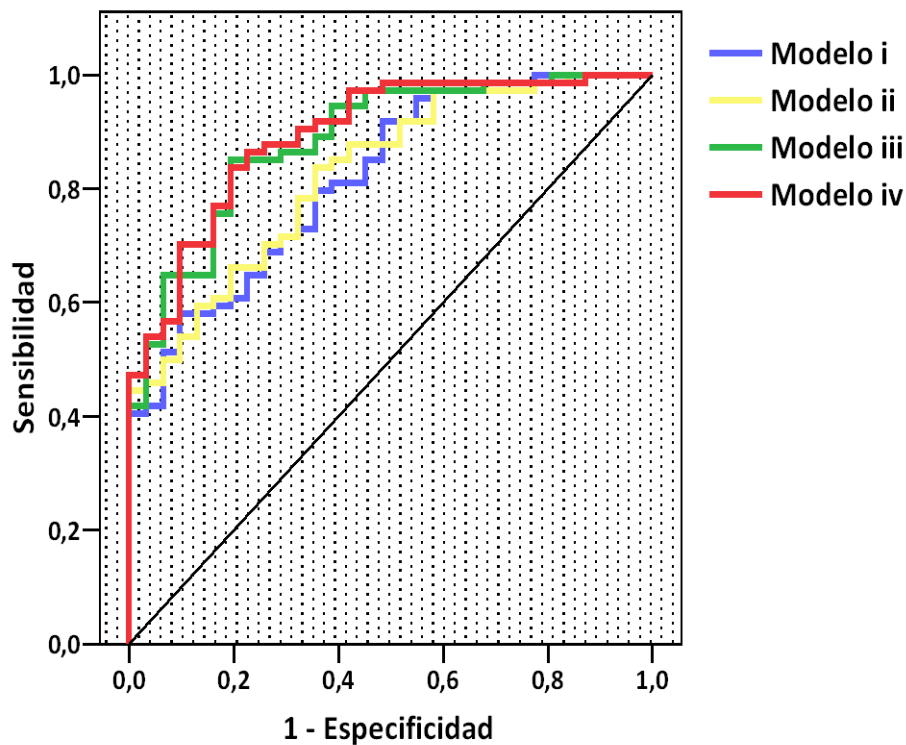
Una vez elaborados los cuatro modelos, para evaluar su validez se estudió cómo se ajustaban a los datos. Para ello se evaluó el grado de calibración y de discriminación de cada uno de los modelos.

Se realizó el test de bondad de ajuste, o test de Hosmer-Lemeshow (209) (**tabla 67**). Este test evalúa un aspecto de la validez de los modelos, la calibración, es decir, el grado en que la probabilidad predicha coincide con la probabilidad esperada. Valores de p no significativos ($p > 0,05$) indican que lo observado se ajusta suficientemente a lo observado. Según los resultados obtenidos, los cuatro modelos tienen una buena calibración.

También se evaluó la capacidad de discriminación de los modelos mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) obteniendo el estadístico c (**tabla 67, gráfica 27**). Esto permite evaluar el grado en el que el modelo distingue entre los individuos en los que ocurre el evento y los que no. Valores de p significativos ($p < 0,05$) indican un grado de discriminación adecuado. Según los resultados obtenidos, los cuatro modelos tienen una capacidad de discriminación adecuada.

	H-L	Estadístico c	
		Valor (IC95%)	p
Modelo con biomarcadores indirectos	0,511	0,820 (0,737-0,903)	0,0001
Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía	0,862	0,827 (0,747-0,908)	0,0001
Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,980	0,886 (0,820 -0,952)	0,0001
Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,935	0,895 (0,832-0,958)	0,0001

Tabla 67: Test de Hosmer-Lemeshow (H-L) y estadístico c de los cuatro modelos de regresión logística.



Gráfica 27: Curva ROC para el diagnóstico de fibrosis significativa de los cuatro modelos de regresión logística binaria.

Además, se comparó la utilidad de los cuatro modelos mediante la diferencia de áreas (208) y el cálculo del IDI (210) para eventos de tipo binario (**tabla 68**). De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas al comparar los modelos con ecografía frente a aquellos que solo incluían biomarcadores, tanto los que contenían biomarcadores indirectos como los que incluían el algoritmo ELF (*i vs ii* y *iii vs iv*). Por el contrario, los modelos con algoritmo ELF aportaron resultados significativamente superiores que los que se conforman únicamente de biomarcadores indirectos (*i vs iii* y *ii vs iv*).

	Diferencias de áreas		IDI	
	Valor (IC95%)	<i>p</i>	Valor (IC95%)	<i>p</i>
Modelo biomarcadores indirectos vs Modelo biomarcadores indirectos y ecografía	0,006 (-0,019 a 0,033)	0,609	0,011 (-0,012 a 0,034)	0,345
Modelo biomarcadores indirectos vs Modelo biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,065 (0,008 a 0,124)	0,025	0,132 (0,067 a 0,196)	0,0001
Modelo biomarcadores indirectos vs Modelo biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,074 (0,015 a 0,133)	0,012	0,142 (0,069 a 0,215)	0,0001
Modelo biomarcadores indirectos y ecografía vs Modelo biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,058 (-0,001 a 0,119)	0,057	0,121 (0,052 a 0,190)	0,001
Modelo biomarcadores indirectos y ecografía vs Modelo biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,067 (0,011 a ,0,123)	0,017	0,131 (0,066 a 0,196)	0,0001
Modelo biomarcadores indirectos y algoritmo ELF vs Modelo biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,008 (-0,007 a 0,025)	0,301	0,010 (-0,011 a 0,031)	0,352

Tabla 68: Diferencias de áreas e IDI al comparar los cuatro modelos de regresión logística.

b. Cirrosis

Por otro lado, los cuatro modelos elaborados para la detección de fibrosis significativa se evaluaron para la detección de cirrosis hepática.

Se calculó de cada uno de los modelos el punto de corte óptimo para la detección de cirrosis, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 69**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo con biomarcadores indirectos	0,32	82,35	84,61	71,8	90,9
Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía	0,25	88,24	80,28	68,2	93,4
Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,27	82,35	84,51	71,8	90,9
Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,44	79,41	91,55	81,8	90,3

Tabla 69: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los cuatro modelos para la detección de cirrosis.

Se evaluó la capacidad de discriminación de los modelos para la detección de cirrosis mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) obteniendo el estadístico *c* (**tabla 70**). Según los resultados obtenidos, los cuatro modelos tienen una capacidad de discriminación adecuada.

	Estadístico c	
	Valor (IC95%)	<i>p</i>
Modelo con biomarcadores indirectos	0,851 (0,765-0,938)	0,0001
Modelo con biomarcadores indirectos y ecografía	0,880 (0,802-0,958)	0,0001
Modelo con biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,881 (0,809-0,952)	0,0001
Modelo con biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,907 (0,841-0,973)	0,0001

Tabla 70: Estadístico c de los cuatro modelos de regresión logística para la detección de cirrosis.

Además, se comparó la utilidad de los cuatro modelos mediante la diferencia de áreas (208) y el cálculo del IDI (210) para eventos de tipo binario (**tabla 71**). De acuerdo a los resultados obtenidos, se observaron diferencias significativas al comparar los modelos con ecografía frente a aquellos que solo incluían biomarcadores, tanto los que contenían biomarcadores indirectos como los que incluían el algoritmo ELF (*i* vs *ii* y *iii* vs *iv*). Así mismo, los modelos que con algoritmo ELF aportaron resultados significativamente superiores que los que se conforman únicamente de biomarcadores indirectos (*i* vs *iii* y *ii* vs *iv*).

	Diferencias de áreas		IDI	
	Valor (IC95%)	p	Valor (IC95%)	p
Modelo biomarcadores indirectos vs Modelo biomarcadores indirectos y ecografía	0,028 (-0,014 a 0,072)	0,198	0,071 (0,023 a 0,120)	0,004
Modelo biomarcadores indirectos vs Modelo biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,029 (-0,010 a 0,069)	0,148	0,074 (0,021 a 0,127)	0,007
Modelo biomarcadores indirectos vs Modelo biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,055 (0,003 a 0,107)	0,036	0,136 (0,075 a 0,197)	0,0001
Modelo biomarcadores indirectos y ecografía vs Modelo biomarcadores indirectos y algoritmo ELF	0,001 (-0,050 a 0,052)	0,974	0,002 (-0,062 a 0,067)	0,939
Modelo biomarcadores indirectos y ecografía vs Modelo biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,026 (-0,009 a 0,063)	0,146	0,074 (0,021 a 0,127)	0,007
Modelo biomarcadores indirectos y algoritmo ELF vs Modelo biomarcadores indirectos, algoritmo ELF y ecografía	0,026 (-0,006 a 0,059)	0,122	0,062 (0,019 a 0,104)	0,004

Tabla 71: Diferencias de áreas e IDI al comparar los cuatro modelos de regresión logística para la detección de cirrosis.

4.2 PACIENTES OBESOS SOMETIDOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA

4.2.1 Objetivo 1: Estudiar las características generales de los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica en nuestro hospital: descripción de la población total y de los grupos de estudio.

Se realizó un estudio observacional transversal en una población formada por 57 pacientes obesos intervenidos de cirugía bariátrica en la Unidad de Obesidad del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

i. Características de la población global de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de las características de la población de estudio, incluyendo las variables demográficas, clínicas y analíticas.

Las características clínicas de la población total se describen en la **tabla 72**.

Variables demográficas y clínicas de la población total (n=57)	
Edad (años)	43,95±12,31
Sexo	Mujeres: 75,4% (n=43) Hombres: 24,6% (n=14)
Peso (kg) IMC (Kg/m²)	128,93±22,54 49,09±8,48
Diabetes Mellitus	Si: 24,6% (n=14) No: 75,4% (n=43)
Dislipemia	Si: 64,9% (n=37) No: 35,1% (n=20)
Hipertensión arterial	Si: 47,4% (n=27) No: 52,6% (n=30)
Síndrome metabólico	Si: 45,6% (n=26) No: 54,4% (n=31)

Tabla 72: Características demográficas y clínicas de la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar, % y n (número de casos). IMC: Índice de masa corporal.

A continuación, en la **tabla 73**, pueden observarse los resultados de las variables derivadas del estudio radiodiagnóstico:

Estudio Radiodiagnóstico (n=57)		
Vc (m/s)	1,97[1,51-2,61]	
Signos Ecográficos de Hepatopatía Crónica	Si	No
	80,7% n=46	19,3% n=11
Hepatomegalia	8,8% n=5	91,2% n=52
Esplenomegalia	0% n=0	100% n=57
Hipertrofia del Lóbulo Caudado	1,8% n=1	98,2% n=56
Heterogeneidad del Parénquima	29,8% n=17	70,2% n=40
Superficie Nodular	1,8% n=1	98,2% n=56
Esteatosis	66,7% n=38	33,3% n=19
Hipertensión Portal	0% n=0	100% n=57
Ascitis	0% n=0	100% n=57

Tabla 73: Resultados del estudio radiodiagnóstico en la población total. Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico], % y n (número de casos). Vc: velocidad de onda de corte. La variable signos ecográficos de hepatopatía crónica se consideró positiva en aquellos pacientes que presentaban al menos uno de los signos ecográficos evaluados.

Los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico del tejido hepático en la población total, de acuerdo con la clasificación de *Brunt* (60) y la de *Matteoni* (63) se describen en las dos siguientes **tablas 74-75**:

Clasificación de <i>Brunt</i> (n=57)	
Estadio 0 (No esteatosis)	10,5% (n=6)
Estadio 1 (Esteatosis < 33%)	57,9% (n=33)
Estadio 2 (Esteatosis 33-66%)	28,1% (n=16)
Estadio 3 (Esteatosis >66%)	3,5% (n=2)

Tabla 74: Resultados del estudio anatomopatológico del tejido hepático en la población total de acuerdo a la clasificación de *Brunt*. Los datos se expresan como % y n (número de casos).

Clasificación de <i>Matteoni</i> (n=53)	
Estadio 1 (Esteatosis sin inflamación ni fibrosis)	45,3% (n=24)
Estadio 2 (Esteatosis con inflamación, sin fibrosis)	24,5% (n=13)
Estadio 3 (Esteatosis y núcleos vacuolados en hepatocitos)	17% (n=9)
Estadio 4 (Esteatosis e hialina de mallory y/o fibrosis)	13,2% (n=7)

Tabla 75: Resultados del estudio anatomopatológico del tejido hepático en la población total de acuerdo a la clasificación de *Matteoni* (la n total es 53, puesto que en cuatro de los pacientes el estudio no reveló ninguna alteración, caso que no contempla esta clasificación). Los datos se expresan como (%) y n (número de casos).

Los resultados de los parámetros hematológicos y las magnitudes bioquímicas obtenidos en la población global se describen en las **tablas 76-77** que aparecen a continuación.

Parámetros hematológicos		
	Población total de estudio (n=57)	Valores de referencia
Hb (g/dL)	13,69±1,51	13,5-17,5
Htc (%)	41,38±4,23	41-53
VCM (fL)	86,70±6,71	80-100
Plaquetas (x10³/μL)	248,04±60,82	150-350
Leucocitos (x10³/μL)	7,60±2,64	4,50-11
ACTPR (%)	97[88,50-100]	70-100
INR	1,05±0,79	0,90-1,20
TTPAr	1,03±0,13	0,80-1,30
Fibrinógeno (mg/dL)	394,05±90,02	238-498

Tabla 76: Descripción de los parámetros hematológicos en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. Hb: hemoglobina, Htc: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, ACTPR: % de actividad de protrombina, INR: razón internacional normalizada, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada.

Parámetros bioquímicos		
	Población total de estudio (n=57)	Valores de referencia
Glucosa (mg/dL)	87[81-99]	74-106
Urea (mg/dL)	26,68±12,31	10-50
Creatinina (mg/dL)	0,75[0,63-0,84]	0,70-1,20
Proteínas Totales (g/dL)	6,77±0,49	6,4-8,3
Albumina (g/dL)	4,09±0,46	3,5-5,2
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,65±0,37	0,05-1,20
Colesterol (mg/dL)	175,19±41,30	0-190
Triglicéridos (mg/dL)	141,40±55,52	0-150
Haptoglobina (mg/dL)	156,80±58,98	30-200
ApoA-1 (mg/dL)	134,85±23,48	110-215
α2-macroglobulina (g/L)	1,84±0,62	1,3-3
AST (UI/L)	24,17±12,34	5-40
ALT (UI/L)	31,91±26,06	5-41
GGT (UI/L)	29,67±12,15	10-71
ALP (UI/L)	74,11±19,60	40-130

Tabla 77: Descripción de los parámetros bioquímicos en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. ApoA-1: apolipoproteína A1, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ-glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.

En la **tabla 78** que aparece a continuación se detallan los resultados de los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática obtenidos en la población total de estudio.

Algoritmos Fibrosis (n=57)	
Apri	0,21[0,15-0,31]
Forns	8,34±2,5
Fibrometer	-3,04±1,43
Fib-4	0,86±0,45
Fibro-Q	1,90±1,08
Hepascore	0,07[0,04-0,14]
Via Index	2,59±0,77

Tabla 78: Descripción de los algoritmos matemáticos en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico].

ii. Características de los grupos de estudio

Como ya se ha descrito en el apartado de sujetos y métodos, la población fue clasificada en dos grupos de estudio en función de los hallazgos del estudio anatomopatológico.

- Grupo 1 (n=28): Pacientes cuya biopsia hepática no reveló alteraciones o bien presentó esteatosis simple.
- Grupo 2 (n=29): El resto de pacientes, es decir, aquellos cuya biopsia hepática reveló, además de esteatosis y con independencia del grado o porcentaje, presencia de infiltrados inflamatorios, balonización hepatocitaria, fibrosis o hialina de mallory.

La distribución de los pacientes en ambos grupos de acuerdo a estos hallazgos puede observarse en las **tablas 79-80**.

Clasificación de <i>Brunt</i>		
	Grupo 1 (n=28)	Grupo 2 (n=29)
Estadio 0 (No esteatosis)	17,9% n=5	3,4% n=1
Estadio 1 (Esteatosis < 33%)	64,3% n=18	51,7% n=15
Estadio 2 (Esteatosis 33-66%)	14,3% n=4	41,4% n=12
Estadio 3 (Esteatosis >66%)	3,6% n=1	3,4% n=1

Tabla 79: Resultados del estudio anatomopatológico del tejido hepático de los dos grupos de pacientes de acuerdo a la clasificación de *Brunt*. Los datos se expresan como % y n (número de casos).

Clasificación de <i>Matteoni</i>		
	Grupo 1 (n=24)	Grupo 2 (n=29)
Estadio 1 (Esteatosis sin inflamación ni fibrosis)	100% n=24	0% n=0
Estadio 2 (Esteatosis con inflamación, sin fibrosis)	0% n=0	44,8% n=13
Estadio 3 (Esteatosis y núcleos vacuolados en hepatocitos periportales)	0% n=0	31% n=9
Estadio 4 (Esteatosis e hialina de Mallory y/o fibrosis)	0% n=0	24,1% n=7

Tabla 80: Resultados del estudio anatomopatológico del tejido hepático de los dos grupos de pacientes de acuerdo a la clasificación de *Matteoni* (en el grupo 1 la n es 24, puesto que en cuatro de los pacientes el estudio no reveló ninguna alteración, caso que no contempla esta clasificación). Los datos se expresan como % y n (número de casos).

Se realizó un estudio descriptivo de las características de los dos grupos de pacientes, incluyendo las variables demográficas, clínicas y analíticas.

Las características clínicas de los dos grupos de pacientes se describen en la **tabla 81**. Como puede observarse, únicamente mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes las variables hipertensión arterial y síndrome metabólico.

	Grupo 1 (n=28)	Grupo 2 (n=29)	p
Edad (años)	41,29±10,91	46,52±13,21	0,11
Sexo	Mujeres: 78,6% (n=22) Hombres: 21,4% (n=6)	Mujeres: 72,4% (n=21) Hombres: 21,6% (n=8)	0,589
Peso (Kg) IMC (Kg/m²)	126,59±23,94 47,17±6,56	131,11±21,34 50,87±9,72	0,45 0,10
Diabetes mellitus	SI: 17,9% (n=5) NO: 82,1% (n=23)	SI: 31% (n=9) NO: 69% (n=20)	0,248
Dislipemia	SI: 64,3% (n=18) NO: 35,7% (n=10)	SI: 65,5% (n=19) NO: 34,5% (n=10)	0,922
Hipertensión arterial	SI: 28,6% (n=8) NO: 71,4% (n=20)	SI: 65,5% (n=19) NO: 34,5% (n=10)	0,005
Síndrome metabólico	SI: 32,1% (n=9) NO: 67,9% (n=19)	SI: 58,6% (n=17) NO: 41,4% (n=12)	0,045

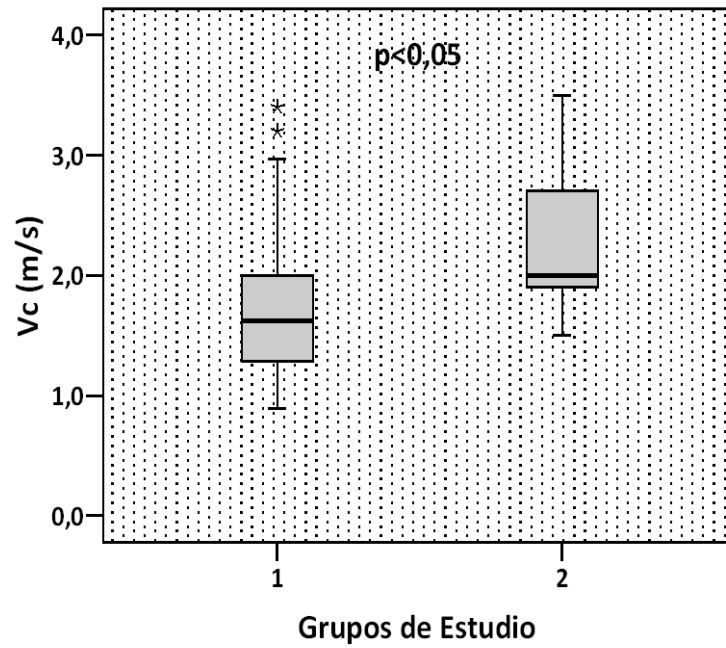
Tabla 81: Características demográficas y clínicas en ambos grupos de estudio. Los datos se expresan como media±desviación estándar, % y n (número de casos). IMC: Índice de masa corporal.

En la **tabla 82** pueden observarse los resultados obtenidos de los parámetros derivados del estudio radiodiagnóstico de los pacientes de cada grupo de estudio. Los valores de Vc mostraron diferencias significativas entre ambos grupos.

	Grupo 1 (n=28)		Grupo 2 (n=29)		p
Vc (m/s)	1,62[1,24-2]		2 [1,90-2,70]		0,003
Signos Ecográficos de Hepatopatía Crónica	Si	No	Si	No	0,689
	78,6% n=22	21,4% n= 6	82,8% n=24	17,2% n=5	
Hepatomegalia	10,7% n=3	89,3% n=25	6,9% n=2	93,1% n=27	0,610
Hipertrofia del Lóbulo Caudado	3,6% n=0	96,4% n=28	0% n=1	100% n=28	0,305
Heterogenicidad del Parénquima	32,1% n=9	67,9% n=19	27,6% n=8	72,4% n=21	0,707
Superficie Nodular	0% n=0	100% n=28	3,4% n=1	96,6% n=28	0,322
Esteatosis	60,7% n=17	39,3% n=11	72,4% n=21	27,6% n=8	0,349

Tabla 82: Resultados del estudio radiodiagnóstico en ambos grupos de pacientes. Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico], % y n (número de casos). Vc: velocidad de onda de corte. La variable signos ecográficos de hepatopatía crónica se consideró positiva en aquellos pacientes que presentaban al menos uno de los signos ecográficos evaluados.

En la **gráfica 28** que aparece a continuación se ilustran las diferencias en los valores de Vc de los pacientes en función del grupo de estudio.



Grafica 28: Valores de Vc (velocidad de onda de corte) en función del grupo de estudio.

A continuación, en las **tablas 83-84**, se describen las variables hematológicas y bioquímicas de los pacientes divididos por grupos de estudio. Ninguna de las variables mostró diferencias entre ambos grupos de pacientes, aunque el VCM y la AST estuvieron próximas a alcanzar la significación estadística ($p=0,072$ y $p=0,068$ respectivamente).

	Grupo 1 (n=28)	Grupo 2 (n=29)	p
Hb (g/dL)	13,43±1,52	13,93±1,50	0,222
Htc (%)	40,63±3,98	42,10±4,40	0,192
VCM (fL)	84,97±6,54	88,17±6,61	0,072
Plaquetas (x10³/μL)	247,89±58,89	248,17±63,67	0,986
Leucocitos (x10³/μL)	7,87±2,92	7,34±2,37	0,454
ACTPR (%)	100[89-100]	94[88-100]	0,346
INR	1,05±0,08	1,04 ±0,07	0,613
TTPAr	1,01±0,09	0,04±0,16	0,399
Fibrinógeno (mg/dL)	393,89±84,32	394,21±98,36	0,990

Tabla 83: Descripción de los parámetros hematológicos en ambos grupos de pacientes. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. Hb: hemoglobina, Htc: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, ACTPR: % de actividad de protrombina, INR: razón internacional normalizada, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada.

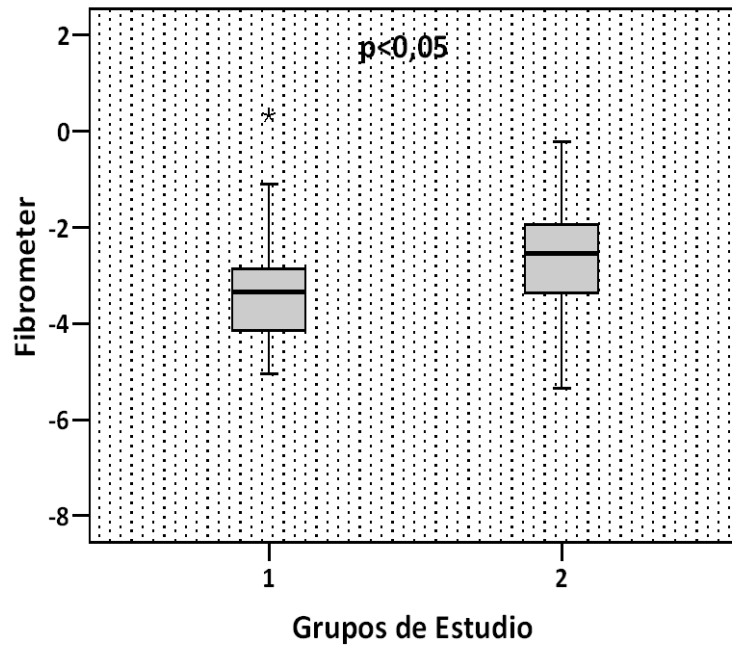
	Grupo 1 (n=28)	Grupo 2 (n=29)	p
Glucosa (mg/dL)	87,50[81,75-99,50]	87[80,50-99]	0,604
Urea (mg/dL)	27,21±8,33	26,17±15,34	0,753
Creatinina (mg/dL)	0,75[0,61-0,83]	0,75 [0,65-0,88]	0,632
Proteínas Totales (g/dL)	6,86±0,57	6,71±0,41	0,318
Albúmina (g/dL)	4,09±0,54	4,10±0,38	0,977
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,60±0,25	0,71±0,45	0,257
Colesterol (mg/dL)	168,14±49,69	182±30,54	0,208
Triglicéridos (mg/dL)	137,36±59,81	145,31±51,79	0,593
Haptoglobina (mg/dL)	167,50±64,84	146,11±51,41	0,177
ApoA-1 (mg/dL)	134,39±22,76	135,31±24,58	0,884
α2-macroglobulina (g/L)	1,85±0,53	1,83±0,70	0,914
AST (UI/L)	21,13±7,41	27,10±15,29	0,068
ALT (UI/L)	21[14,50-31]	26[16,50-53,50]	0,153
GGT (UI/L)	27,39±17,67	31,86±20,56	0,383
ALP (UI/L)	71,36±19,60	76,86±19,52	0,298

Tabla 84: Descripción de los parámetros bioquímicos en cada uno de los grupos de pacientes. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. ApoA-1: apolipoproteína A1, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ-glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.

En la **tabla 85** pueden observarse los resultados de los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática en ambos grupos de pacientes. A continuación se representa gráficamente el Fibrometer, el único que mostró diferencias significativas entre ambos grupos (**gráfica 29**).

	Grupo 1 (n=28)	Grupo 2 (n=29)	p
Apri	0,19[0,13-0,29]	0,22[0,18-0,36]	0,196
Forns	8,34±2,18	8,33±2,90	0,991
Fibrometer	-3,32±1,15	-2,67±1,74	0,011
Fib-4	0,79±0,39	0,94±0,51	0,217
Fibro-Q	1,84±0,96	1,96±1,20	0,697
Hepascore	0,06[0,04-0,11]	0,07[0,04-0,16]	0,343
Via Index	2,51±0,83	2,76±0,71	0,454

Tabla 85: Descripción de los algoritmos matemáticos en cada uno de los grupos de pacientes. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico].



Gráfica 29: Valores del algoritmo Fibrometer en ambos grupos de pacientes.

4.2.2 Objetivo 2: Determinar el intervalo de valores existentes en nuestra población del algoritmo ELF y de los biomarcadores directos HA, PIIINP y TIMP-1, evaluar sus valores en función de las características clínicas y demográficas de los pacientes y estudiar su asociación con el resto de variables continuas.

i. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF

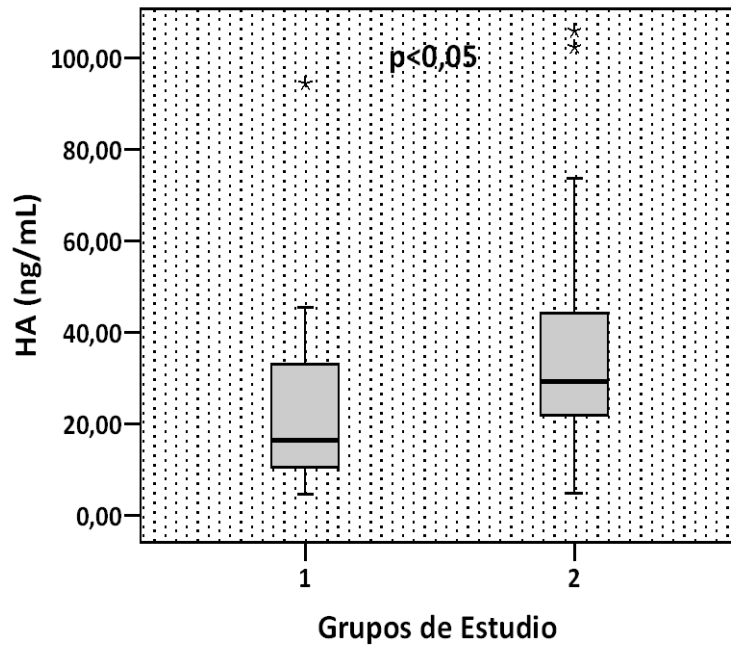
Se determinaron las concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1, y se calcularon los valores del algoritmo ELF en la población total y en ambos grupos de pacientes. Los resultados se muestran en las **tablas 86-87**. A continuación se ilustran estos resultados gráficamente (**gráficas 30-33**).

	Población total (n=57)
HA (ng/mL)	25,10[14,45-37,14]
PIIINP (ng/mL)	7,66±3,46
TIMP-1 (ng/mL)	226,34±74,55
ELF	8,67±0,79

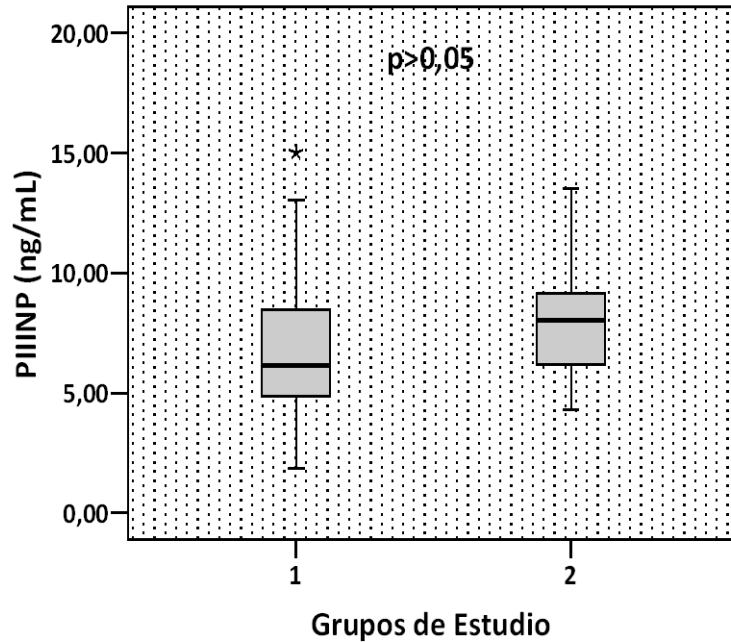
Tabla 86: Descripción de los biomarcadores directos y del algoritmo ELF en la población total. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

	Grupo 1 (n=28)	Grupo 2 (n=29)	p
HA (ng/mL)	16,47[10,26-34,29]	29,24[21,80-44,48]	0,016
PIIINP (ng/mL)	7,01±3,36	8,30±3,50	0,165
TIMP-1 (ng/mL)	209,95±54,54	242,73±88,27	0,100
ELF	8,34±0,71	8,99±0,74	0,002

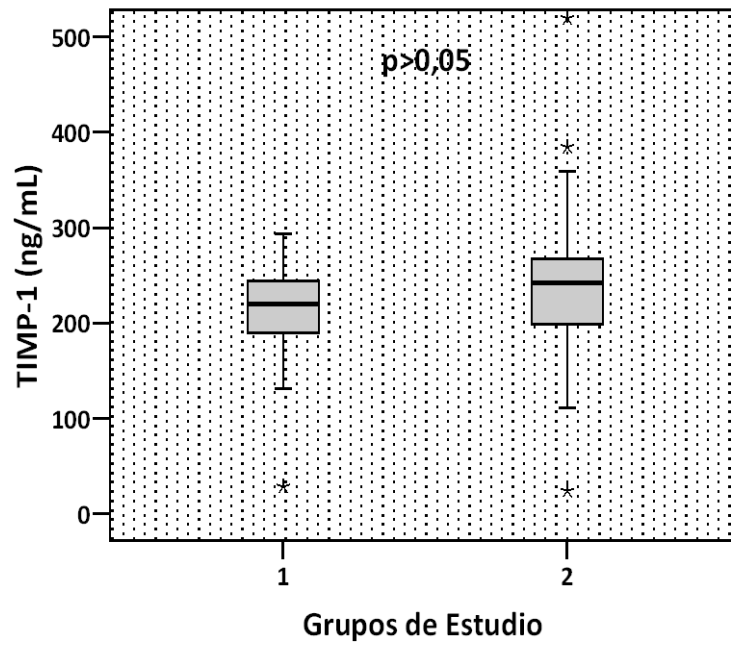
Tabla 87: Descripción de los biomarcadores directos y del algoritmo ELF en cada uno de los grupos de pacientes. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: Test de Fibrosis Hepática mejorado.



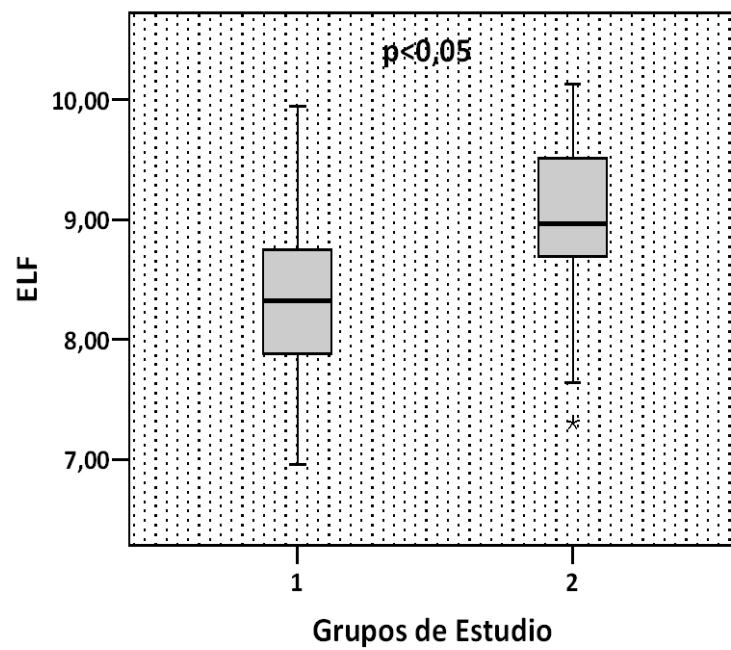
Gráfica 30: Concentraciones de ácido hialurónico (HA) en función de los grupos de estudio.



Gráfica 31: Concentraciones de péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres (PIIINP) en función de los grupos de estudio.



Gráfica 32: Concentraciones de inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno (TIMP-1) en función de los grupos de estudio.



Gráfica 33: Valores del algoritmo ELF en ambos grupos de pacientes. ELF: Test de Fibrosis Hepática mejorado.

ii. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF en función de las características clínicas y demográficas

Se calcularon los valores de cada biomarcador y del algoritmo ELF en función de las diferentes características clínicas y demográficas estudiadas (**tablas 88-89**).

Tal como aparece reflejado, los valores del ELF tienden a ser mayores a medida que aumenta el IMC, aunque las diferencias no alcanzan la significación estadística ($p=0,085$).

Se obtuvieron valores significativamente mayores del biomarcador HA y del algoritmo ELF en los pacientes hipertensos. Por otro lado se encontraron diferencias en el valor del algoritmo ELF en función de la existencia de síndrome metabólico, siendo este significativamente mayor en los pacientes que presentan el síndrome. Con el resto de variables clínicas estudiadas no se observaron diferencias significativas en los resultados del algoritmo ELF ni de los biomarcadores directos.

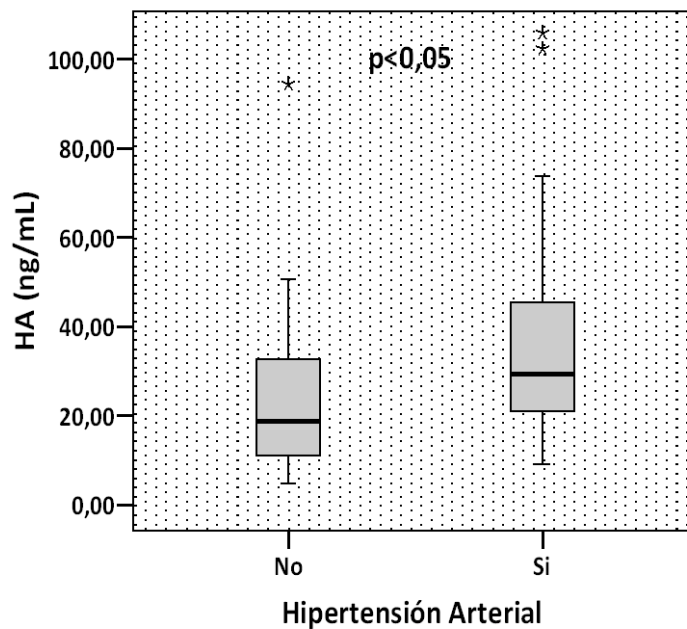
Sexo				
	Masculino [24,6% (n=14)]	Femenino [75,4% (n=43)]	<i>p</i>	
HA (ng/mL)	23,86[11,82-33,15]	26,46[14,77-38,16]	0,573	
PIIINP (ng/mL)	7,39	7,75±3,77	0,688	
TIMP-1 (ng/mL)	200,81±81,43	234,85±71,11	0,178	
ELF	8,53±0,79	8,72±0,79	0,447	
Índice de masa corporal (Kg/m ²)				
	35-39,9 [5,4% (n=3)]	40-49,9 [58,9% (n=31)]	≥50 [35,5% (n=23)]	<i>p</i>
HA (ng/mL)	6,92[6,45-14,25]	28,52[16,09-44,48]	25,10[14,70-30,43]	0,207
PIIINP (ng/mL)	5,41±1,45	7,38±3,13	8,54±4,07	0,260
TIMP-1 (ng/mL)	208,33±45,39	226,83±45,39	228,66±110,14	0,912
ELF	7,71±0,51	8,78±0,75	8,66±0,83	0,085

Tabla 88: Concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y valores del algoritmo ELF en función del sexo y el índice de masa corporal. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

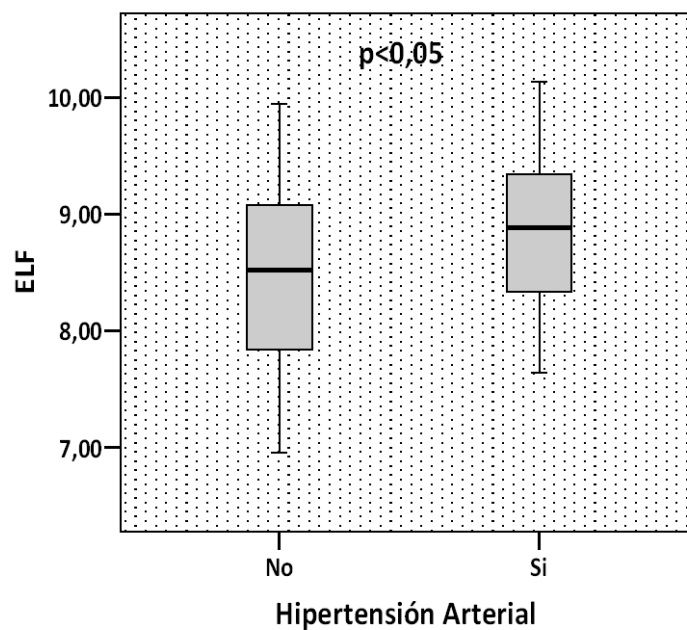
	Hipertensión Arterial			Dislipemia		
	No [52,6% (n=30)]	Si [47,4% (n=27)]	<i>p</i>	No [35,1% (n=20)]	Si [35,1% (n=20)]	<i>p</i>
HA	18,80[10,74-33,31]	29,24[20,56-50,08]	0,029	24,70[11,60-41-89]	25,51[15,41-34,09]	0,924
PIIINP	7,39±3,25	7,97±3,73	0,539	7,39±2,88 (n=20)	7,80±3,76 (n=37)	0,651
TIMP-1	224,04±58,92	228,99±90,48	0,813	224,30±63,83 (n=20)	227,39±80,31 (n=37)	0,876
ELF	8,46±0,79	8,92±0,73	0,030	8,66±0,84 (n=20)	8,67±0,77 (n=37)	0,953
	Diabetes Mellitus			Síndrome Metabólico		
	No [75,4% (n=43)]	Si [24,6% (n=14)]	<i>p</i>	No [54,4% (n=31)]	Si [45,6% (n=26)]	<i>p</i>
HA	22,46[12,51-39,84]	29,59[22,51-34,09]	0,844	20,55[10,98-35,73]	29,59[20,17-45,07]	0,097
PIIINP	7,66±3,85	7,66±1,67	0,994	7,34±3,14	8,05±3,85	0,467
TIMP-1	231,17±76,34	210,35±68,68	0,361	223,09±64,92	230,37±86,25	0,728
ELF	8,61±0,84	8,86±0,59	0,236	8,48±0,82	8,90±0,70	0,047

Tabla 89: Concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y valores del algoritmo ELF en función de la hipertensión, diabetes, dislipemia y el síndrome metabólico. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana [rango intercuartílico]. Los valores de HA, PIIINP y TIMP-1 se expresen en ng/mL. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

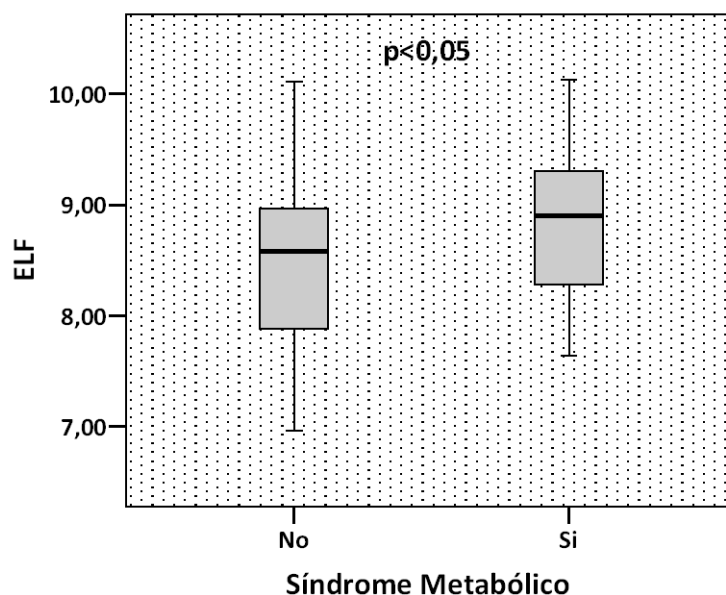
A continuación, en las **gráficas 34-36**, se ilustran las variables que resultaron significativas: HA y ELF en función de la hipertensión, y ELF en función del síndrome metabólico.



Gráfica 34: Concentraciones de ácido hialurónico (HA) en los pacientes que no presentan hipertensión arterial frente a los que sí la presentan.



Gráfica 35: Valores de ELF en los pacientes que no presentan hipertensión arterial frente a los que sí la presentan. ELF: test de fibrosis hepática mejorado.



Gráfica 36: Valores de ELF en los pacientes que no presentan síndrome metabólico frente a los que sí lo presentan. ELF: test de fibrosis hepática mejorado.

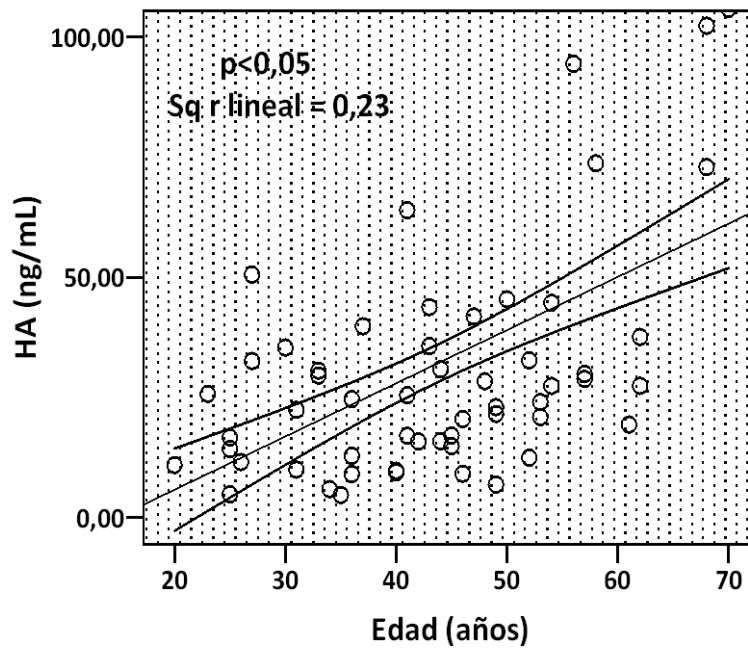
iii. Correlaciones

Para estudiar la asociación de los biomarcadores directos y del algoritmo ELF con el resto de variables continuas se realizó un estudio de correlaciones, incluyendo las variables demográficas y clínicas, los parámetros hematológicos y bioquímicos, los biomarcadores directos de fibrosis, así como con la velocidad de onda de corte (Vc) obtenida en el estudio radiodiagnóstico. Los resultados se muestran en las siguientes **tablas 90-95**.

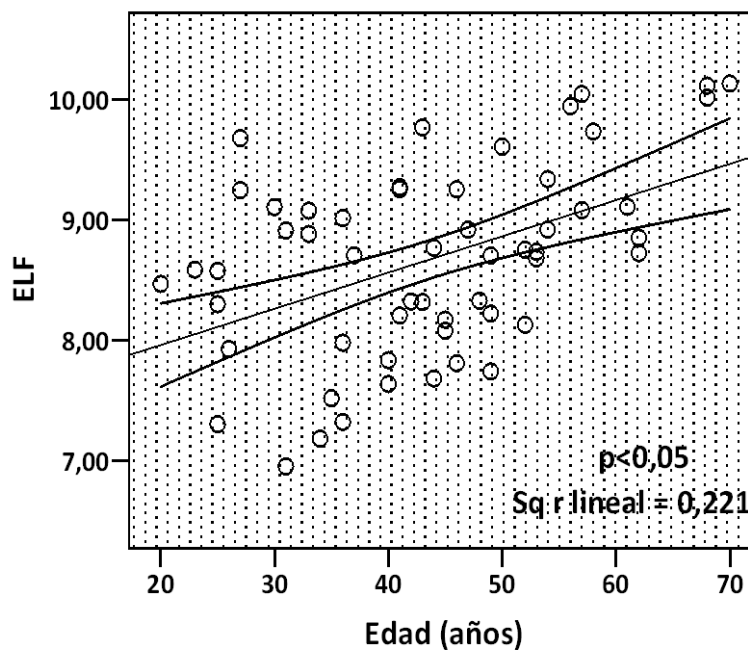
Tal como aparece reflejado en la **tabla 90** y en la **gráficas 37-38**, se observó una correlación significativa del biomarcador HA y del algoritmo ELF con la edad.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Edad	r=0,449 p=0,001	r=0,178 p=0,190	r=0,018 p=0,893	r=0,470 p=0,000
IMC	r=-0,016 p=0,907	r=0,242 p=0,075	r=0,197 p=0,149	r=0,189 p=0,170

Tabla 90: Correlaciones de los biomarcadores HA, PIIINP, TIMP-1 y del algoritmo ELF con la edad y el índice de masa corporal (IMC). HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



Gráfica 37: Correlación del ácido hialurónico (HA) con la edad.

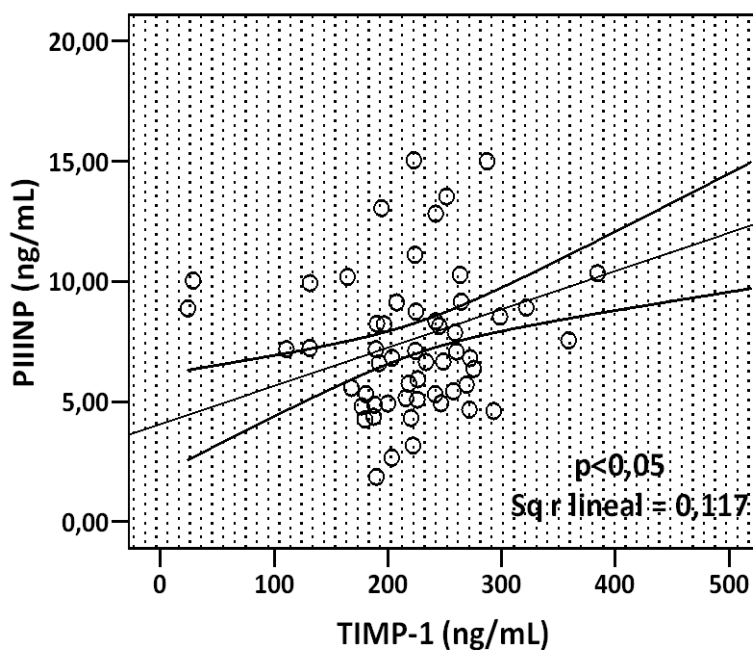


Gráfica 38: Correlación del ELF con la edad. ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

En cuanto a las correlaciones de los biomarcadores directos entre sí, se constató un resultado significativo del PIIINP con el TIMP-1 (**tabla 91, gráfica 39**).

	HA	PIIINP	TIMP-1
HA	-	r=0,176 p=0,195	r=0,090 p=0,510
PIIINP	r=0,176 p=0,195	-	r=0,342 p=0,010
TIMP-1	r=0,090 p=0,510	r=0,342 p=0,010	-

Tabla 91: Correlaciones de los biomarcadores directos HA, PIIINP, TIMP-1 entre sí mismos. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno.



Gráfica 39: Correlación del PIIINP con el TIMP-1. PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor de la metaloproteasa tipo uno.

Al estudiar las correlaciones con los parámetros hematológicos (**tabla 92**) se observaron resultados significativos del PIIINP y el ELF con el volumen corpuscular medio (**gráficas 40-**

41). Además, el TIMP-1 correlacionó significativamente con el fibrinógeno y el algoritmo ELF con el recuento de leucocitos totales.

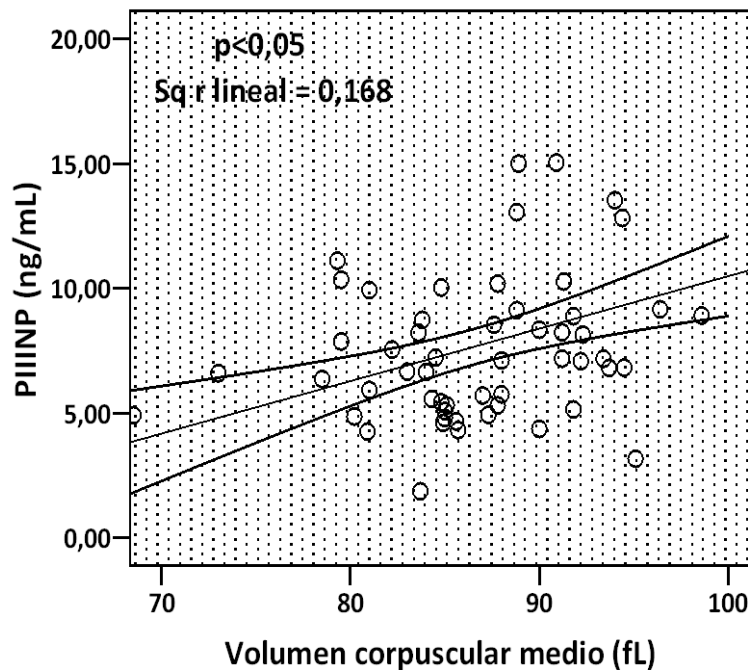
Con relación a los parámetros bioquímicos (**tabla 93**) se observó correlación significativa del HA con la haptoglobina, del PIIINP con la urea (**gráfica 42**), la albúmina y el colesterol, del TIMP-1 con la urea (**gráfica 43**) y la fosfatasa alcalina, y del ELF con las proteínas totales y la haptoglobina.

El análisis de las correlaciones con los algoritmos para el cálculo de fibrosis reveló resultados significativos en los siguientes casos: HA con Forns, Fibrometer, Fib-4 y Hepascore; PIIINP con Forns, Fibro Q y Via Index; TIMP-1 con Via Index y ELF con todos los algoritmos a excepción del Apri (**tabla 94, gráfica 44**).

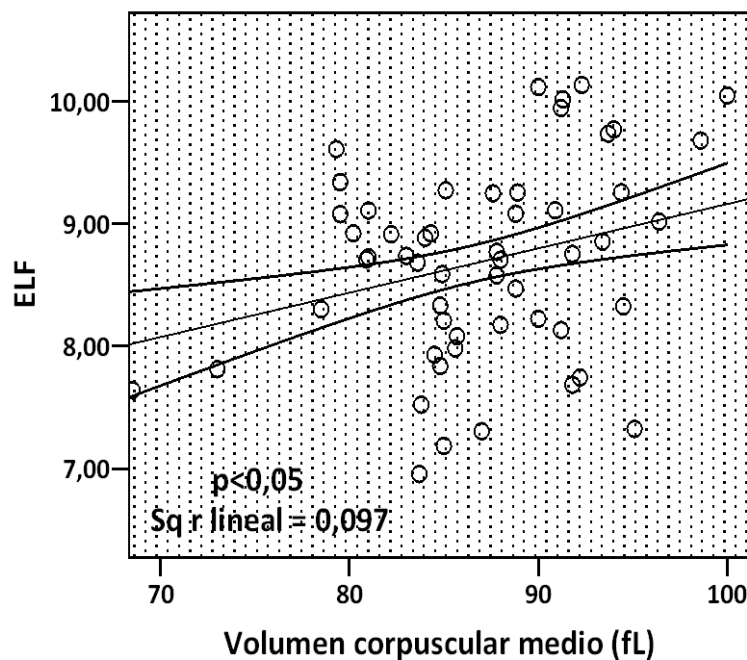
Además, en referencia a la variable continua Vc aportada por el estudio radiodiagnóstico se observó una correlación significativa con PIIINP y ELF (**tabla 95, gráfica 45**).

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Hb	r=0,090 p=0,511	r=-0,068 p=0,621	r=-0,045 p=0,741	r=0,004 p=0,974
Htc	r=0,138 p=0,309	r=-0,063 p=0,591	r=0,004 p=0,978	r=0,047 p=0,733
VCM	r=0,171 p=0,207	r=0,410 p=0,002	r=0,180 p=0,184	r=0,311 p=0,021
Plaquetas	r=0,057 p=0,679	r=-0,198 p=0,143	r=0,165 p=0,225	r=-0,092 p=0,506
Leucocitos totales	r=-0,137 p=0,314	r=-0,147 p=0,280	r=0,038 p=0,782	r=-0,269 p=0,086
ACTPR	r=0,098 p=0,473	r=-0,179 p=0,213	r=0,106 p=0,436	r=-0,046 p=0,738
INR	r=-0,191 p=0,159	r=0,105 p=0,440	r=-0,124 p=0,364	r=-0,081 p=0,558
TTPAr	r=0,066 p=0,629	r=0,206 p=0,128	r=0,247 p=0,066	r=0,192 p=0,161
Fibrinógeno	r=0,064 p=0,642	r=0,152 p=0,265	r=0,282 p=0,035	r=0,179 p=0,191

Tabla 92: Correlaciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y del algoritmo ELF con los parámetros hematológicos. Hb: hemoglobina, Htc: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, ACTPR: % de actividad de protrombina, INR: razón internacional normalizada, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada, HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada



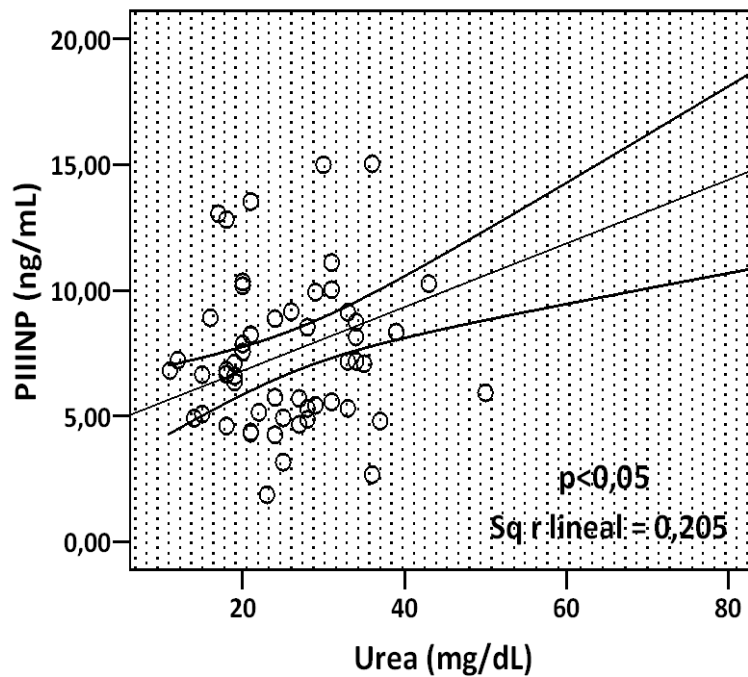
Gráfica 40: Correlación del PIIINP con el volumen corpuscular medio (VCM). PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres.



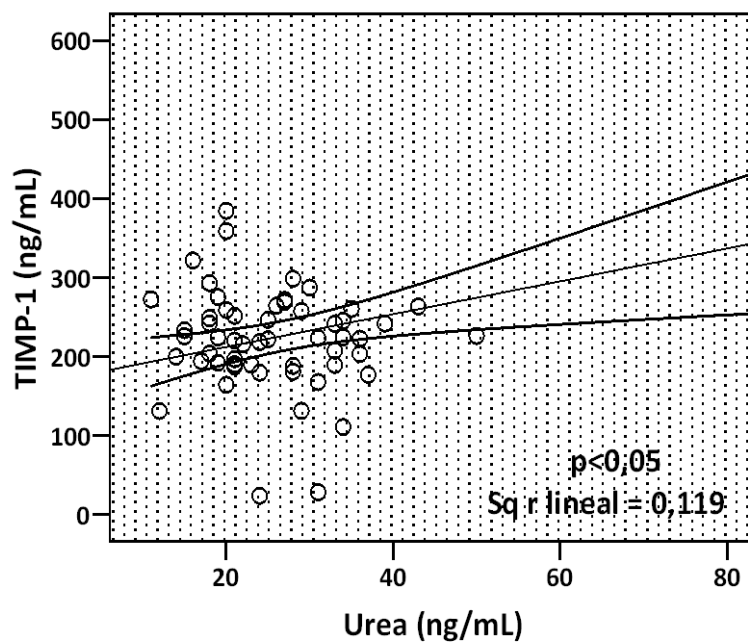
Gráfica 41: Correlación del ELF con el volumen corpuscular medio (VCM). ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Glucosa	r=-0,033 p=0,807	r=-0,021 p=0,878	r=-0,088 p=0,518	r=-0,109 p=0,427
Urea	r=0,162 p=0,233	r=0,453 p=0,000	r=0,346 p=0,009	r=0,238 p=0,080
Creatinina	r=-0,073 p=0,593	r=-0,085 p=0,535	r=0,088 p=0,518	r=-0,048 p=0,726
Proteínas Totales	r=-0,170 p=0,211	r=-0,160 p=0,239	r=-0,120 p=0,377	r=0,267 p=0,049
Albúmina	r=-0,146 p=0,282	r=-0,286 p=0,032	r=-0,127 p=0,351	r=-0,212 p=0,121
Bilirrubina Total	r=0,016 p=0,907	r=0,092 p=0,501	r=-0,245 p=0,069	r=-0,041 p=0,769
Colesterol	r=-0,012 p=0,931	r=-0,330 p=0,013	r=0,064 p=0,640	r=-0,137 p=0,318
Triglicéridos	r=-0,012 p=0,929	r=0,005 p=0,970	r=0,095 p=0,484	r=0,028 p=0,887
AST	r=0,023 p=0,867	r=0,038 p=0,782	r=-0,064 p=0,641	r=0,104 p=0,449
ALT	r=-0,030 p=0,828	r=-0,084 p=0,539	r=-0,095 p=0,487	r=0,057 p=0,681
GGT	r=-0,227 p=0,092	r=-0,137 p=0,316	r=-0,034 p=0,802	r=0,206 p=0,130
ALP	r=-0,039 p=0,775	r=-0,004 p=0,976	r=0,217 p=0,108	r=-0,031 p=0,821
Haptoglobina	r=-0,277 p=0,038	r=-0,122 p=0,370	r=-0,004 p=0,974	r=-0,288 p=0,033
ApoA-1	r=0,216 p=0,109	r=0,080 p=0,556	r=0,015 p=0,911	r=0,213 p=0,118
α 2-macroglobulina	r=0,093 p=0,494	r=0,204 p=0,132	r=0,168 p=0,216	r=0,162 p=0,236

Tabla 93: Correlaciones de los biomarcadores HA (ácido hialurónico), PIIINP (péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres) y TIMP-1 (inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno) y del algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada) con los parámetros bioquímicos. ApoA-1: apolipoproteína A1, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ -glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.



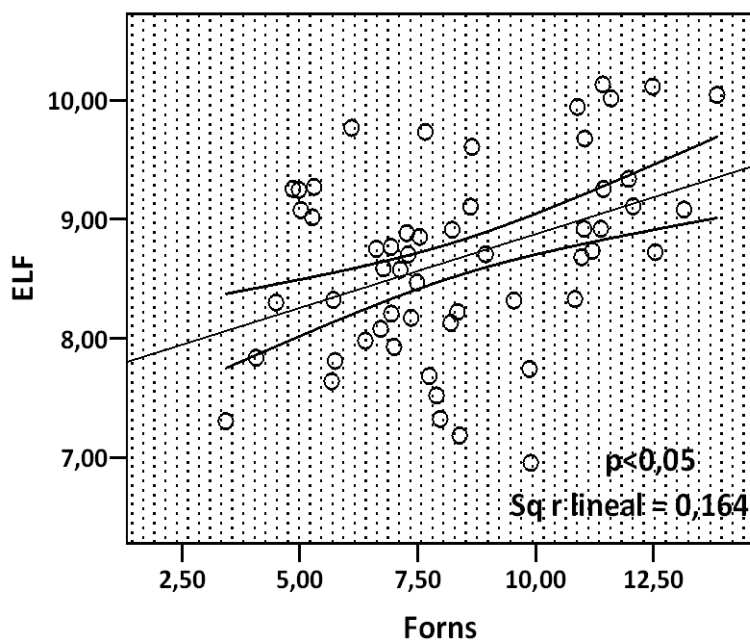
Gráfica 42: Correlación del péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres (PIIINP) con la urea.



Gráfica 43: Correlación del inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno (TIMP-1) con la urea.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Apri	r=0,071 p=0,606	r=0,080 p=0,559	r=-0,130 p=0,340	r=0,071 p=0,605
Forns	r=0,330 p=0,013	r=0,324 p=0,015	r=0,120 p=0,377	r=0,405 p=0,002
Fibrometer	r=0,391 p=0,003	r=0,065 p=0,636	r=-0,137 p=0,312	r=0,322 p=0,016
Fib-4	r=0,300 p=0,025	r=0,243 p=0,071	r=-0,117 p=0,390	r=0,343 p=0,010
Fibro-Q	r=0,225 p=0,095	r=0,284 p=0,034	r=-0,078 p=0,559	r=0,308 p=0,022
Hepascore	r=0,518 p=0,000	r=0,092 p=0,501	r=0,099 p=0,466	r=0,492 p=0,000
Via Index	r=0,060 p=0,661	r=0,316 p=0,018	r=0,282 p=0,035	r=0,286 p=0,048

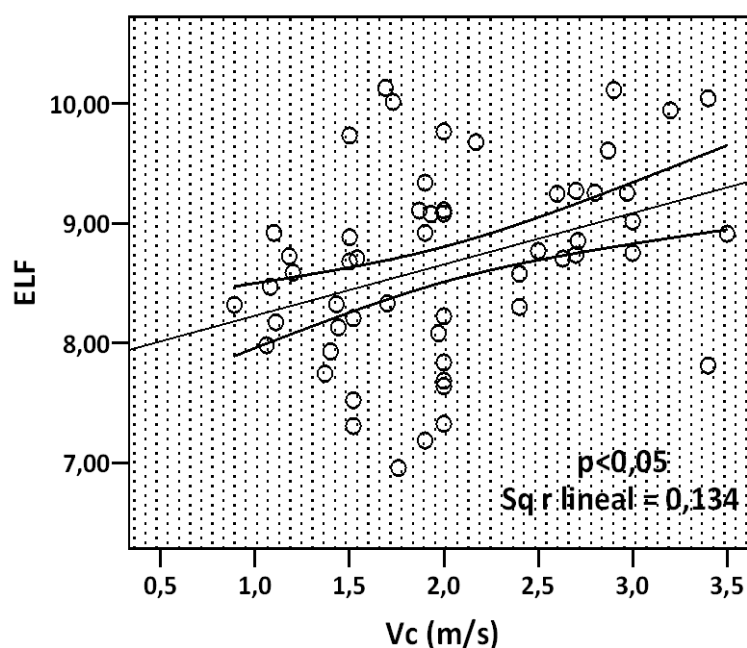
Tabla 94: Correlaciones de los biomarcadores HA, PIIINP, TIMP-1 y el algoritmo ELF con los algoritmos Apri, Forns, Fibrometer, Fib-4, Fibro-Q, Hepascore y Via Index. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



Gráfica 44: Correlación del ELF con el algoritmo Forns. ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
Vc	r=0,201 p=0,137	r=0,305 p=0,022	r=0,153 p=0,261	r=0,375 p=0,005

Tabla 95: Correlaciones observadas entre los biomarcadores HA, PIIINP, TIMP-1 y el algoritmo ELF con la Vc (velocidad de onda de corte). HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno, ELF: test de fibrosis hepática mejorada.



Gráfica 45: Correlación del ELF con la velocidad de onda de corte (Vc). ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

iv. Regresión lineal múltiple

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para estudiar la influencia que ejercen el resto de variables continuas sobre los biomarcadores directos estudiados y sobre el algoritmo ELF.

Para ello, se tomaron como variables dependientes, los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y el algoritmo ELF respectivamente, pues son el objetivo principal de esta tesis.

Se incluyeron como variables independientes aquellas variables continuas en las que se observó un nivel de significación $< 0,15$ en el estudio de correlaciones. Se incluyeron hasta

un máximo de seis variables independientes, de modo que en los casos en lo que se encontraron más de seis con una $p < 0,15$ en el estudio de correlaciones, se incluyeron las seis con mayor nivel de significación. No fueron incluidas como variables independientes los algoritmos matemáticos para la estimación de la fibrosis, y en el caso del ELF, tampoco se incluyeron los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1.

En la **tabla 96** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal múltiple del HA como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes la edad, GGT, haptoglobina, ApoA-1 y Vc ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado únicamente la edad resultó significativa ($p < 0,05$).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$HA = 1,015 \text{ Edad} - 0,124 \text{ GGT} - 0,004 \text{ Haptoglobina} + 0,009 \text{ ApoA1} + 4,048 \text{ Vc} - 17,476$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,242$, esta ecuación define los valores de HA en un 24,2%.

Variables	HA	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	p
Edad	0,440(0,340 a 1,689)	0,004
GGT	-0,084(-0,512 a 0,264)	0,524
Haptoglobina	-0,008(-0,134 a 0,126)	0,955
ApoA-1	0,007(-0,318 a 0,336)	0,956
Vc	0,095(-7,156 a 40,263)	0,471

Tabla 96: Regresión lineal múltiple del ácido hialurónico (HA) como variable dependiente. GGT: γ -glutamyltransferasa, ApoA-1: apolipoproteína A1, Vc: velocidad de onda de corte.

En la **tabla 97** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión del PIIINP como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes las variables IMC, VCM, urea, albúmina, colesterol y TIMP-1 ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado resultaron significativas las variables VCM, urea, albúmina y colesterol ($p < 0,05$).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$PIIINP = 0,069 IMC + 0,141 VCM + 0,085 Urea - 1,802 Albumina - 0,026 Colesterol + 0,007 TIMP1 + 0,222$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,514$, esta ecuación define los valores de PIIINP en un 51,4%.

Variables	PIIINP	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	<i>p</i>
IMC	0,169(-0,022 a 0,160)	0,133
VCM	0,276(0,034 a 0,248)	0,011
Urea	0,306(0,020 a 0,151)	0,012
Albúmina	-0,240(-3,419 a -0,185)	0,030
Colesterol	-0,312(-0,044 a -0,008)	0,005
TIMP-1	0,143(-0,004 a 0,017)	0,213

Tabla 97: Regresión lineal múltiple del péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres (PIIINP) como variable dependiente. IMC: índice de masa corporal, VCM: volumen corpuscular medio, TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada, TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno

En la **tabla 98** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión del TIMP-1 como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes las variables TTPAr, fibrinógeno, urea, bilirrubina total, fosfatasa alcalina y PIIINP ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado ninguna de las variables resultó significativa ($p < 0,05$), aunque se observa una cierta tendencia en las variables fibrinógeno y ALP ($p = 0,081$ y $p = 0,088$ respectivamente).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal múltiple se calculó la siguiente ecuación:

$$TIMP1 = 44,971 TTPAr + 0,180 Fibrinogeno + 1,301 Urea - 41,761 Bilirrubina + 0,787 ALP + 4,608 PIIINP + 8,063$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,327$, esta ecuación define los valores de TIMP-1 en un 32,7%.

Variables	TIMP-1	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	p
TTPAr	0,081(-95,873 a 185,816)	0,923
Fibrinógeno	0,221(-0,023 a 0,382)	0,081
Urea	0,216(-0,356 a 2,958)	0,121
Bilirrubina total	-0,209(-91,339 a 7,817)	0,097
ALP	0,207(-0,121 a 1,695)	0,088
PIIINP	0,214(-1,335 a 10,551)	0,126

Tabla 98: Regresión lineal múltiple del inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo uno (TIMP-1) como variable dependiente. TTPAr: ratio del tiempo parcial de tromboplastina activada, ALP: fosfatasa alcalina, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres.

En la **tabla 99** aparecen los resultados obtenidos en el análisis de regresión del ELF como variable dependiente. Se incluyeron como variables independientes las variables edad, VCM, urea, proteínas totales, haptoglobina y velocidad de onda de corte ($p < 0,15$ en el estudio de correlaciones). Tras realizar el análisis multivariado resultaron significativas las variables edad y Vc ($p < 0,05$).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión lineal se calculó la siguiente ecuación:

$$ELF = 0,018 \text{ Edad} + 0,019 \text{ VCM} + 0,001 \text{ Urea} - 0,190 \text{ Proteinas Totales} - 0,003 \text{ Haptoglobina} + 0,382 \text{ Vc} + 7,197$$

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,390$, esta ecuación define los valores de ELF en un 39%.

Variables	ELF	
	MULTIVARIADO	
	β (IC 95%)	p
Edad	0,283(0,000 a 0,036)	0,048
VCM	0,161(-0,009 a 0,046)	0,180
Urea	-0,003(-0,016 a 0,016)	0,979
Proteínas T.	-0,119(-0,585 a 0,204)	0,337
Haptoglobina	-0,199(-0,006 a 0,001)	0,112
Vc	0,326(0,101 a 0,664)	0,009

Tabla 99: Regresión lineal múltiple del ELF como variable dependiente. VCM: volumen corpuscular medio, Proteínas T.: proteínas totales, Vc: velocidad de onda de corte, ELF: Test de Fibrosis Hepática mejorado.

4.2.3 Objetivo 3: Analizar la eficacia clínica de los biomarcadores indirectos y directos, de los algoritmos matemáticos y de la velocidad de onda de corte derivada del estudio radiodiagnóstico en la evaluación de la hepatopatía crónica de nuestra población de estudio, utilizando la biopsia hepática como estándar de referencia.

Para evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores, de los algoritmos matemáticos y de la velocidad de onda de corte derivada del estudio radiodiagnóstico se emplearon curvas ROC, estudiando el área bajo la curva, y en variables en las que ésta resultó significativa, la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo y negativo.

Se tomó como variable de estado la identificación del grupo dos de nuestro estudio, es decir, la identificación de aquellos pacientes que presentaban en la biopsia hepática infiltrados inflamatorios, balonización de los hepatocitos, fibrosis o hialina de Mallory, además de esteatosis.

i. Biomarcadores Indirectos

Se realizó el análisis de las curvas ROC para cada uno de los biomarcadores indirectos incluidos en el estudio (recuento de plaquetas, porcentaje de actividad del tiempo de protrombina, albúmina, bilirrubina total, transaminasas, GGT, fosfatasa alcalina, haptoglobina, α 2-macroglobulina y apolipoproteínaA-1).

Se obtuvo para cada una de las variables el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 100**.

	AUC	<i>p</i>	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Plaquetas	0,440	0,548	0,248	0,631
ACTPR	0,448	0,604	0,257	0,639
Albúmina	0,472	0,783	0,276	0,669
Bilirrubina Total	0,620	0,230	0,426	0,814
AST	0,616	0,131	0,516	0,874
ALT	0,675	0,153	0,488	0,862
GGT	0,619	0,236	0,415	0,822
ALP	0,540	0,611	0,386	0,693
Haptoglobina	0,391	0,277	0,206	0,577
α2-Macroglobulina	0,401	0,322	0,189	0,613
ApoA-1	0,614	0,256	0,421	0,807

Tabla 100: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los biomarcadores indirectos. ACTPR: porcentaje de actividad del tiempo de protrombina, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, GGT: γ -glutamilttransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, ApoA-1: apolipoproteína A1.

Tras el análisis de las curvas ROC se comprobó que ninguno de los biomarcadores indirectos obtuvo un AUC significativa ($p < 0,05$).

ii. Biomarcadores Directos

Se realizó el análisis de las curvas ROC para cada uno de los biomarcadores directos estudiados (HA, PIIINP y TIMP-1).

Se obtuvo para cada uno de ellos el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 101**.

	AUC	<i>p</i>	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
HA	0,688	0,016	0,544	0,831
PIIINP	0,635	0,082	0,487	0,783
TIMP-1	0,622	0,116	0,474	0,771

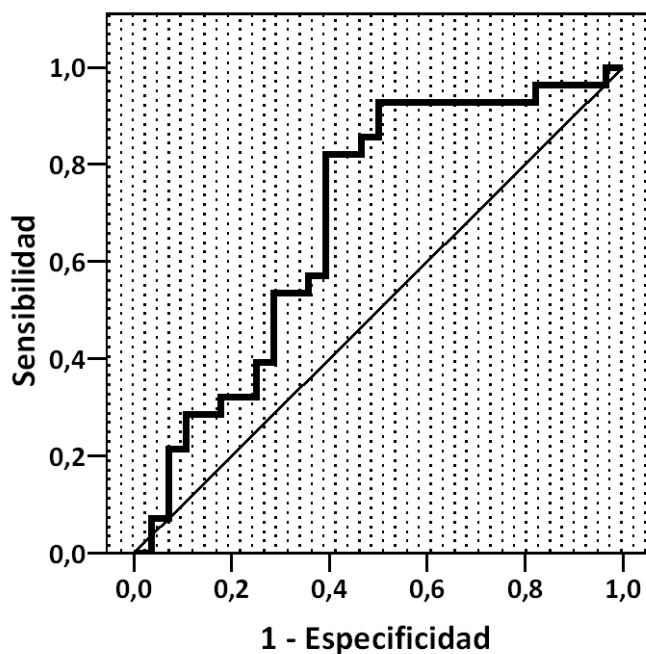
Tabla 101: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza de los biomarcadores directos. HA: ácido hialurónico, PIIINP: péptido aminoterminal de procolágeno tipo tres, TIMP-1: inhibidor de la metaloproteasa tipo uno.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para el HA, puesto que fue el único biomarcador que obtuvo un AUC con un valor de *p* estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Así mismo se determinó el índice de Youden (207), que analiza la capacidad diagnóstica del biomarcador usando un único valor en reemplazo de la forma clásica, que valora de manera dual la sensibilidad y especificidad. Los resultados se reflejan en la **tabla 102**.

	Cut-off (ng/mL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
HA	15,89	92,9	50	0,429	65	87

Tabla 102: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para el ácido hialurónico (HA).

En la **gráfica 46** se representa la curva ROC correspondiente al HA.



Gráfica 46: Curva ROC del ácido hialurónico (HA).

iii. Algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática

Se realizó el análisis de las curvas ROC para cada uno de los algoritmos matemáticos estudiados (ELF, Apri, Forns, Fibrometer, Fib-4, Fibro-Q, Hepascore y Via Index).

Se obtuvo para cada uno de ellos el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 103**.

	AUC	Valor de p	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
ELF	0,741	0,002	0,607	0,874
Apri	0,591	0,245	0,439	0,744
Forns	0,480	0,801	0,322	0,638
Fibrometer	0,726	0,004	0,587	0,865
Fib-4	0,578	0,321	0,424	0,732
Fibro-Q	0,499	0,984	0,343	0,654
Hepascore	0,575	0,337	0,423	0,728
Via Index	0,590	0,252	0,435	0,745

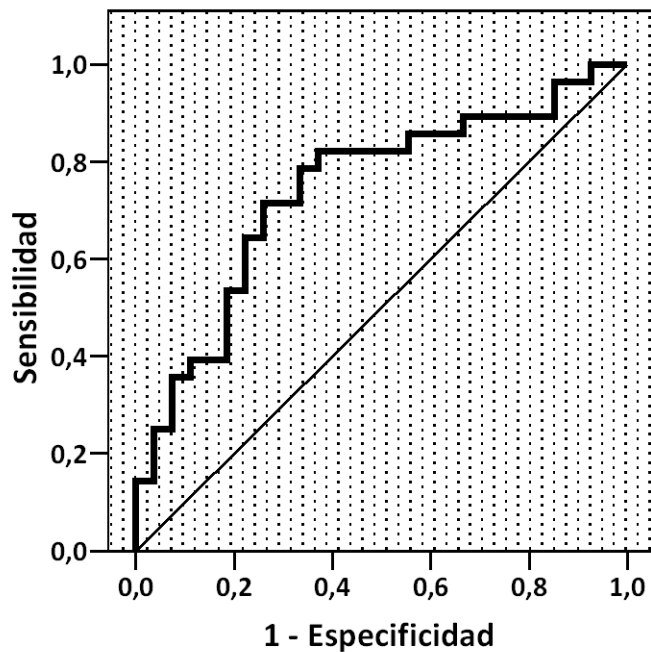
Tabla 103: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de p e intervalos de confianza de los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática.

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los algoritmos ELF y Fibrometer, puesto que fueron los dos únicos que obtuvieron una AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 104**.

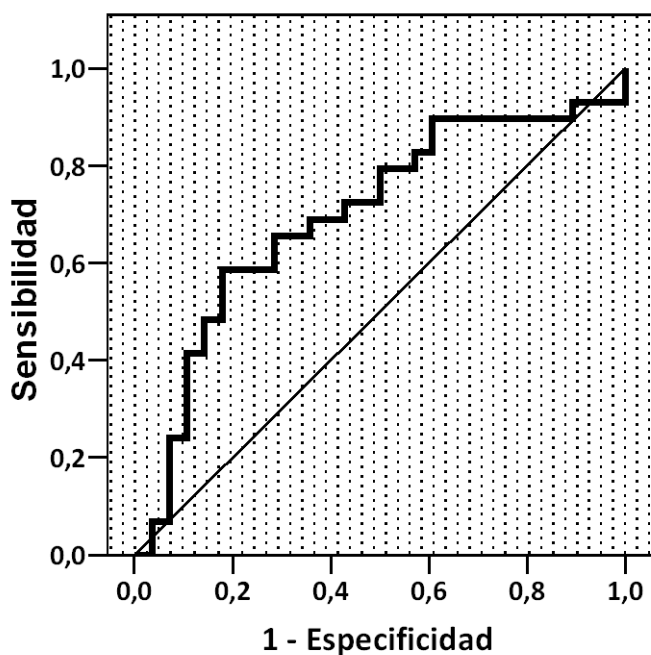
	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
ELF	8,72	71,4	74,1	0,455	73,38	72,15
Fibrometer	-2,753	58,6	82,1	0,407	76,01	66,47

Tabla 104: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los algoritmos ELF y Fibrometer. ELF: test de fibrosis hepática mejorada.

En las **gráficas 47-48** se representan las curvas ROC correspondientes a los algoritmos ELF y Fibrometer.



Gráfica 47: Curva ROC del algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada).



Gráfica 48: Curva ROC del algoritmo Fibrometer.

iv. Estudio radiodiagnóstico

Se realizó el análisis de las curvas ROC de la velocidad de onda de corte (Vc), la única variable continua derivada del estudio radiodiagnóstico.

Se obtuvo el área bajo la curva (AUC) con su correspondiente valor de significación, así como el intervalo de confianza. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 105**.

	AUC	Valor de p	Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Vc	0,729	0,003	0,595	0,863

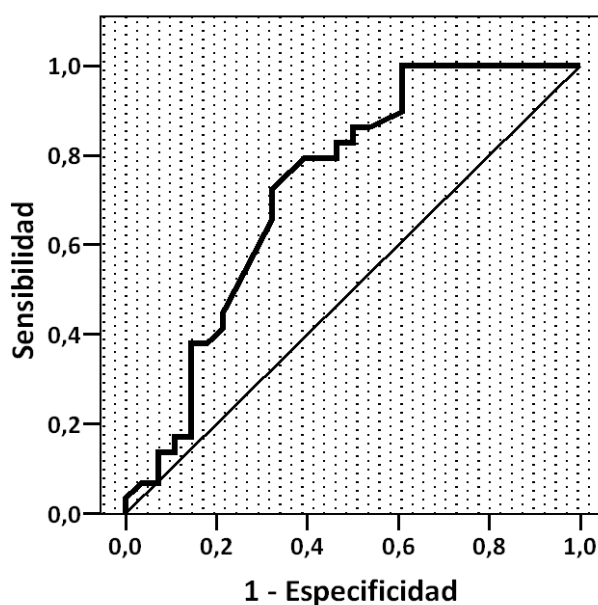
Tabla 105: Valores del área bajo la curva (AUC), valor de p e intervalos de confianza de la velocidad de onda de corte (Vc).

Tras el análisis de las curvas ROC, se calculó el punto de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para la variable Vc, puesto que aportó un AUC con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los resultados se reflejan en la **tabla 106**.

	Cut-off (m/s)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice de Youden	VPP (%)	VPN (%)
Vc	1,9	72,4	67,9	0,403	69,28	71

Tabla 106: Puntos de corte, sensibilidad, especificidad, índice de Youden, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para la velocidad de onda de corte (Vc).

En la **gráfica 49** se representa la curva ROC correspondiente a la Vc.



Gráfica 49: Curva ROC de la velocidad de onda de corte (Vc).

Finalmente se realizó un análisis de comparación entre aquellas variables cuya AUC resultó significativa (HA, ELF, Fibrometer y Vc). Para ello se compararon los estadísticos c de cada una de estas variables mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso (**tabla 107**).

	Diferencias de áreas	
	Valor (IC95%)	<i>p</i>
HA vs ELF	0,029 (-0,069 a 0,124)	0,571
HA vs Fibrometer	0,013 (-0,157 a 0,183)	0,879
HA vs Vc	0,052 (-0,166 a 0,196)	0,869
ELF vs Fibrometer	0,015 (-0,154 a 0,183)	0,866
ELF vs Vc	0,013 (-0,141 a 0,166)	0,872
Fibrometer vs Vc	0,002 (-0,189 a 0,193)	0,984

Tabla 107: Diferencia de áreas. HA: ácido hialurónico, ELF: test de fibrosis hepática mejorada, Vc: velocidad de onda de corte.

4.2.4 Objetivo 4: Elaborar un modelo diagnóstico que combine los biomarcadores con el estudio radiodiagnóstico, y definir la utilidad que aporta en la evaluación no invasiva de la hepatopatía crónica en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica.

Para elaborar un modelo que predijese la probabilidad o riesgo de que un paciente se clasificase en el grupo dos de nuestra población de estudio, es decir, de que presentase en la biopsia hepática infiltrados inflamatorios, balonización hepatocitaria, fibrosis, o hialina de Mallory, además de esteatosis, realizamos un análisis de regresión logística binaria.

Se elaboraron, evaluaron y compararon tres modelos para la valoración de la hepatopatía crónica en este tipo de pacientes: el modelo clásico, constituido por las variables utilizadas actualmente en nuestro hospital, un nuevo modelo que sustituyese la variable Vc (velocidad de onda de corte) del modelo clásico por el algoritmo ELF y un tercer modelo que combinase los dos anteriores.

De acuerdo a lo anterior, se establecieron los siguientes tres modelos de regresión logística:

- i. Modelo de valoración clásico:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración las variables actualmente utilizadas en nuestro hospital para la valoración de la hepatopatía en este tipo de pacientes, es decir, las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis y la velocidad de onda de corte.
- ii. Modelo con algoritmo ELF:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración las mismas variables del modelo clásico, a excepción de la Vc (velocidad de onda de corte), que se sustituyó por el algoritmo ELF.
- iii. Modelo combinado:* para la elaboración de este modelo se tomaron en consideración las variables del modelo clásico, y además el algoritmo ELF.

En los tres modelos se consideró como variable dependiente el diagnóstico de hepatopatía crónica, entendido como la clasificación en el del grupo dos de nuestro estudio.

i. Modelo de valoración clásico

Para la realización de este modelo de regresión logística se incluyeron las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis y la velocidad de onda de corte (Vc), puesto que son los parámetros que actualmente se utilizan en nuestro hospital para la valoración del grado de hepatopatía de este tipo de pacientes.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado (VCM, AST, ALT, Vc, Edad, IMC, SM). Posteriormente se eliminaron del modelo las tres variables clínicas (edad, IMC y SM), puesto que se comprobó que no mejoraban el rendimiento diagnóstico.

En el modelo final se confirmó que el VCM y la Vc fueron factores predictores de clasificación en el grupos dos ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 108**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2=0,389$, este modelo explica en un 38,9% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en el grupo dos de nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 71,9%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = 0,119 \text{ VCM} - 0,029 \text{ AST} + 0,071 \text{ ALT} + 1,482 \text{ Vc} - 14,607$$

Siendo $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$, y donde p es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente se clasifique en el grupo dos.

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: VCM en fl albúmina en g/dL, AST y ALT en UI/L y Vc en m/s.

Alternativamente la fórmula puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
VCM	1,083(0,990 a 1,184)	0,082	1,126(1,006 a 1,261)	0,040
AST	1,051(0,993 a 1,113)	0,086	0,972(0,868 a 1,088)	0,619
ALT	1,029(1,000 a 1,059)	0,050	1,073(0,998 a 1,154)	0,055
Vc	3,316(1,310 a 8,398)	0,011	4,408(1,489 a 13,054)	0,007

Tabla 108: Modelo de valoración clásico. Regresión logística incluyendo parámetros hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis y velocidad de onda de corte (Vc). VCM: volumen corpuscular medio, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa.

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 109**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo Clásico	0,61	65,5	92,3	90,5	72,2

Tabla 109: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo clásico.

ii. Modelo con algoritmo ELF

Para la realización de este modelo de regresión logística se incluyeron las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis y el algoritmo ELF.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado (VCM, AST, ALT, ELF, Edad, IMC y SM). Posteriormente se eliminaron del modelo las tres variables clínicas (edad, IMC y SM), puesto que se comprobó que no mejoraban el rendimiento diagnóstico.

Se confirmó que el algoritmo ELF fue un factor predictor de clasificación en el grupo dos ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 110**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,388$, este modelo explica en un 38,8% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en el grupo dos de nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 70,9%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = 0,099 \text{ VCM} - 0,037 \text{ AST} + 0,069 \text{ ALT} + 1,289 \text{ ELF} - 20,843$$

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: VCM en fl albúmina en g/dL, AST y ALT en UI/L. La fórmula puede expresarse también de la siguiente manera, definiendo la probabilidad de que un paciente se clasifique en el grupo dos.

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
VCM	1,083(0,990 a 1,184)	0,082	1,104(0,987 a 1,235)	0,083
AST	1,051(0,993 a 1,113)	0,086	0,964(0,857 a 1,084)	0,536
ALT	1,029(1,000 a 1,059)	0,050	1,072(0,996 a 1,153)	0,064
ELF	3,390(1,451 a 7,918)	0,005	3,664(1,380 a 9,728)	0,009

Tabla 110: Modelo con algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada). Regresión logística incluyendo parámetros hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis y algoritmo ELF. VCM: volumen corpuscular medio, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa.

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 111**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo con algoritmo ELF	0,47	75	77,8	77,8	75

Tabla 111: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo con algoritmo ELF.

iii. Modelo combinado

Para la realización de este modelo de regresión logística se han incluido las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis, la velocidad de onda de corte (Vc) y el algoritmo ELF.

Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado (VCM, AST, ALT, ELF, Edad, Vc, IMC y SM).

Se confirmó que el SM, el VCM y la ALP fueron factores predictores de clasificación en el grupos dos ($p < 0,05$). Los detalles del análisis se señalan en la **tabla 112**.

Según el coeficiente de determinación obtenido, $R^2 = 0,575$, este modelo explica en un 57,5% la probabilidad de los pacientes de clasificarse en el grupo dos de nuestro estudio. Por otro lado, el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes usando este modelo fue del 74,1%.

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calculó la siguiente ecuación, que define la probabilidad de clasificación en el grupos dos de nuestro estudio:

$$\begin{aligned} \text{Logit}(p) = & 0,021 \text{ Edad} + 0,094 \text{ IMC} - 2,113 \text{ SM} + 0,177 \text{ VCM} \\ & - 0,087 \text{ AST} + 0,126 \text{ ALT} + 0,876 \text{ Vc} + 0,573 \text{ ELF} - 27,809 \end{aligned}$$

Las unidades de las variables incluidas en la fórmula son las siguientes: Edad en años, IMC en kg/m^2 , SM 1 cero si está ausente y uno en caso de presencia, VCM en fL, AST y ALT en UI/L y Vc en m/s.

La fórmula puede expresarse también de la siguiente manera, definiendo la probabilidad de que un paciente se clasifique en el grupo dos.

$$\text{Probabilidad} = \frac{1}{[1 + e^{-\text{Logit}(p)}]}$$

	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Edad	1,037(0,992 a 1,085)	0,112	1,021(0,940 a 1,109)	0,624
IMC	1,062(0,985 a 1,145)	0,119	1,099(0,988 a 1,222)	0,083
SM	0,334(0,113 a 0,989)	0,048	0,121(0,018 a 0,826)	0,031
VCM	1,083(0,990 a 1,184)	0,082	1,193(1,025 a 1,389)	0,022
AST	1,051(0,993 a 1,113)	0,086	0,916(0,797 a 1,053)	0,218
ALT	1,029(1,000 a 1,059)	0,050	1,134(1,025 a 1,255)	0,015
Vc	3,316(1,310 a 8,398)	0,011	2,402(0,614 a 9,387)	0,208
ELF	3,390(1,451 a 7,918)	0,005	1,774(0,513 a 6,138)	0,366

Tabla 112: Modelo combinado. Regresión logística incluyendo variables clínicas, parámetros hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis, velocidad de onda de corte (Vc) y algoritmo ELF (test de fibrosis hepática mejorada). IMC (índice de masa corporal, SM: síndrome metabólico, VCM: volumen corpuscular medio, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa,

Se calculó el punto de corte óptimo del modelo, así como su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 113**).

	Cut-off	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Modelo combinado	0,56	75	92,9	91,3	77,4

Tabla 113: Punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del modelo con combinado.

Una vez elaborados los tres modelos, para evaluar su validez se estudió cómo se ajustaban a los datos. Para ello se evaluó el grado de calibración y de discriminación de cada uno de los modelos.

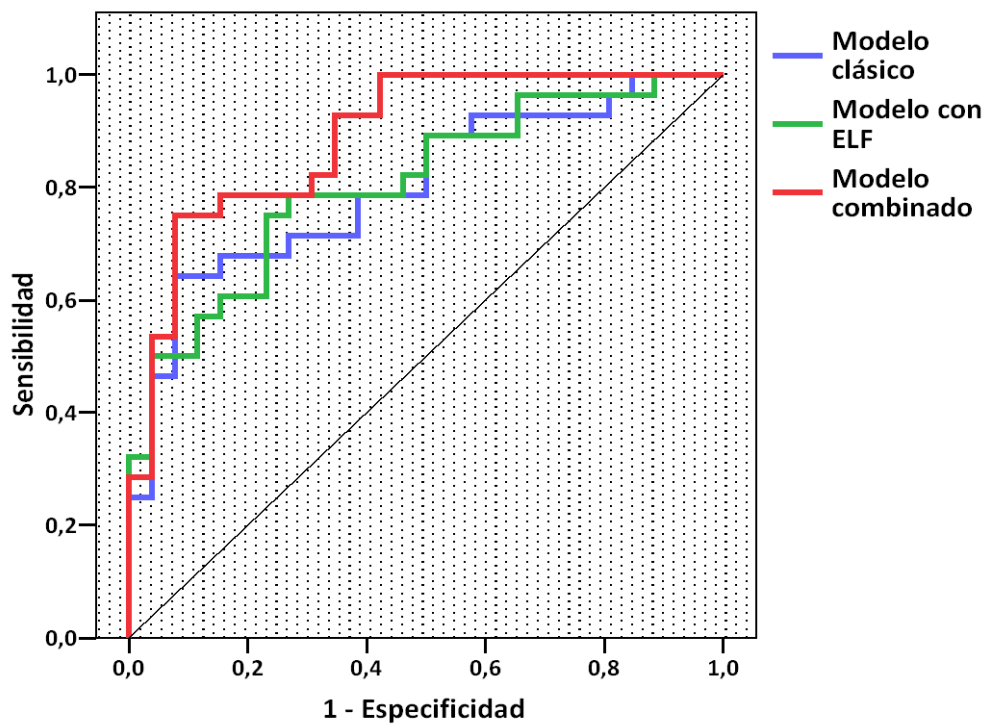
Se realizó el test de bondad de ajuste, o test de Hosmer-Lemeshow (209) (**tabla 114**) y según los resultados obtenidos los tres modelos tienen una buena calibración.

También se evaluó la capacidad de discriminación de los modelos mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) obteniendo el estadístico *c* (**tabla 114, gráfica 50**). Según los resultados obtenidos, el único modelo con una capacidad de discriminación adecuada es el modelo combinado.

Además, se comparó la utilidad de los tres modelos mediante la diferencia de áreas y el cálculo del IDI (210) para eventos de tipo binario (**tabla 115**). De acuerdo a los resultados obtenidos existen diferencias significativas entre el modelo combinado, y el modelo clásico y el modelo del algoritmo ELF respectivamente.

	H-L	Estadístico <i>c</i>	
		Valor (IC95%)	<i>p</i>
Modelo de valoración clásico	0,384	0,802 (0,671-0,898)	0,064
Modelo con el algoritmo ELF	0,999	0,806 (0,676 -0,901)	0,061
Modelo combinado	0,202	0,890 (0,775-0,959)	0,044

Tabla 114: Test de Hosmer-Lemeshow (H-L) y estadístico *c* de los tres modelos de regresión logística.



Gráfica 50: Curva ROC de los tres modelos de regresión logística.

	Diferencias de áreas		IDI	
	Valor (IC95%)	p	Valor (IC95%)	p
Modelo de valoración clásico vs Modelo con algoritmo ELF	0,004 (-0,111 a 0,119)	0,994	-0,009 (-0,115 a 0,114)	0,988
Modelo de valoración clásico vs Modelo combinado	0,088 (-0,012 a 0,188)	0,049	0,175 (0,063 a 0,288)	0,003
Modelo con algoritmo ELF vs Modelo combinado	0,088 (-0,012 a 0,180)	0,040	0,172 (0,066 a 0,278)	0,002

Tabla 115: Diferencias de áreas e IDI al comparar los tres modelos de regresión logística.

Una vez comprobado que el modelo combinado aportaba los mejores resultados de AUC, sensibilidad y especificidad, y de constatar diferencias significativas con los otros dos modelos, se realizó una comparación del mismo con las variables cuya AUC había resultado significativa en el objetivo tres (HA, ELF, Fibrometer y Vc). Para ello se compararon los estadísticos c mediante la diferencia de áreas, según lo descrito por *DeLong y cols* (208). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los casos, lo que refleja que el AUC aportada por el modelo combinado es significativamente mejor que cualquiera de las variables individuales. Los resultados aparecen reflejados en la **tabla 116**.

		Diferencias de áreas	
		Valor (IC95%)	p
Modelo combinado	HA	0,185 (0,038 a 0,332)	0,013
	ELF	0,154 (0,032 a 0,275)	0,013
	Fibrometer	0,166 (0,006 a 0,326)	0,041
	Vc	0,172 (0,038 a 0,307)	0,011

Tabla 116: Diferencias de áreas al comparar el modelo combinado con el HA, ELF, Fibrometer y Vc respectivamente. HA: ácido hialurónico, ELF: test de fibrosis hepática mejorada, Vc: velocidad de onda de corte.

V. DISCUSIÓN

5.1 PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC

La hepatitis C es una enfermedad hepática compleja de gran importancia médica y social. A nivel mundial afecta aproximadamente a 180 millones de personas, además de tres millones de nuevas infecciones que se producen anualmente (36). La prevalencia de la infección por VHC varía mucho de una región a otra, y como resultado, la carga de la enfermedad exhibe diferencias importantes en todo el mundo. Según estimaciones de la OMS, la mayoría de los infectados corresponden al continente asiático (92 millones), seguido de África (28 millones) y América (12,5 millones). En Europa se calcula que el número de infectados ronda los 9 millones.

El VHC es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en los países occidentales, suponiendo en alrededor del 20% de los infectados el desarrollo de cirrosis y la evolución a CHC en el 10% de los pacientes.

Un estudio publicado recientemente (211) indica que en nuestro país que la incidencia de la infección ha disminuido de manera significativa desde el pico de 1991, debido a la reducción de los factores de riesgo, fundamentalmente a la implementación del cribado de anticuerpos del VHC en la sangre para transfusiones. Además, hasta el año 2030 se estima que la reducción de la incidencia todavía será de un 20% adicional. Por el contrario, la carga asociada a la enfermedad se incrementará en los próximos años, a medida que la cohorte de pacientes ya infectados envejezca, y por tanto aumente la aparición de casos de cirrosis, CHC, y por consiguiente el número de muertes relacionadas con la hepatopatía. Por otro lado, los nuevos tratamientos antivirales, y los que probablemente aparecerán en un futuro muy próximo, darán lugar a que la probabilidad de curación del VHC en los próximos años ronde el 90%. Sin embargo, incluso con una considerable mejora de la respuesta al tratamiento, el análisis predice sólo un pequeño impacto en la carga de la enfermedad si la adopción del tratamiento se mantiene sin cambios.

Bajo el tratamiento actual, el número de pacientes que necesitan un transplante, independientemente de las restricciones de edad, se prevé que se duplique para 2030, lo que sugiere una considerable necesidad de actuar. Con una fracción atribuible del 31,6%

en 2012, el VHC es un indicador líder para el trasplante hepático. Según la Organización Nacional de Transplantes, en el año 2011 había 641 personas en lista de espera para trasplante. Debido a que muchas infecciones por VHC aún no han avanzado a la etapa terminal de la enfermedad del hígado, y teniendo en cuenta un número limitado de órganos viables y la capacidad quirúrgica, hay una necesidad urgente de estrategias para combatir el futuro que se avecina.

Según se indica en este estudio, la estrategia que debe llevarse a cabo sin demora para controlar esta enfermedad está clara: aumentar el diagnóstico y la prescripción de tratamiento. En España los programas de detección más eficaces deben dirigirse a los individuos nacidos entre 1950 y 1980, ya que esta cohorte de población refleja el 75% de los infectados. Por otro lado, en los pacientes ya diagnosticados, la mayor reducción de la morbilidad y la mortalidad relacionada con la hepatopatía se producirá con el incremento de la prescripción de tratamiento antiviral, especialmente con las nuevas terapias, debido a su demostrado nivel de eficacia superior. Sin embargo, los autores reflejan que esto requerirá en la mayoría de los países un aumento de entre 3-5 veces en el diagnóstico y/o tratamiento. Por lo tanto, la elaboración, por parte del sistema de salud pública, de un modelo que garantice la mayor cobertura posible de manera sostenible y viable, es fundamental (211).

En esta línea de actuación, y teniendo en cuenta los ya conocidos inconvenientes y limitaciones de la biopsia, implementar la disponibilidad de métodos no invasivos que de manera segura y fiable proporcionen el grado de fibrosis hepática, se perfila como fundamental, ya que tal como ya se ha comentado, la fibrosis es el evento fisiopatológico que va a graduar la evolución de la hepatopatía, permitiendo establecer el pronóstico de cada paciente y valorar la posibilidad de tratamiento.

5.1.1 Objetivo 1

- i. Características de la población global de estudio*
 - a. Características demográficas y clínicas

La cohorte de estudio incluida en esta tesis doctoral se reclutó de las consultas de hepatología del Servicio de Digestivo de nuestro hospital, a donde estos pacientes acuden de manera rutinaria para el seguimiento de su patología. La población es representativa de los pacientes monoinfectados por el VHC en nuestro país.

La edad media de los pacientes fue de 47,92 años, correspondiendo el 63,6% de ellos al sexo masculino. El 60% de los pacientes nunca había llevado tratamiento antiviral (pacientes naive), mientras que el 40% restante correspondió a pacientes no respondedores o que no pudieron finalizar el régimen de tratamiento por algún tipo de intolerancia clínica o analítica. Ningún paciente llevaba tratamiento antiviral en el momento de la recogida de las muestras.

Con respecto al genotipo del virus, el porcentaje mayoritario de los pacientes (76,8%) correspondieron al genotipo 1, y en cuanto al polimorfismo de la IL28B, por orden de frecuencia los pacientes presentaron el genotipo CT, CC y TT, en el 62,3%, 24,6% y 13,1% de los casos respectivamente. La carga viral media de la población general fue de 1687272 copias por millón.

Estas características coinciden con lo descrito en la literatura acerca de los pacientes con hepatopatía crónica por VHC en España. Aunque la distribución por edad de las personas infectadas es relativamente heterogénea, en Europa, y más concretamente en España, existen actualmente dos picos de edad, uno entre 30-45 años, cuya infección es atribuible al consumo de drogas por vía parenteral, y otro de pacientes mayores de 65 años, atribuible a la recepción de transfusiones antes de 1990 o al uso clínico de jeringuillas no esterilizadas antes de 1975, que fue cuando se introdujo en España el material clínico de un solo uso. En cuanto al sexo, las diferencias más notables se encuentran entre los 25-45 años, donde los pacientes infectados son predominantemente varones (212).

El hecho de que el 60% de los casos correspondiesen a pacientes naive, va en relación con varias cuestiones. En primer lugar con la gravedad de la hepatopatía, puesto que el tratamiento antiviral se prescribe, en la mayoría de los casos, a partir de que el paciente presente un grado de fibrosis significativo. Pero también deben tenerse en cuenta otras variables, como por ejemplo la propia voluntad del paciente, que en muchos casos,

especialmente en aquellos asintomáticos o con una situación social compleja para lograr la correcta adherencia, rechazan la terapia antiviral, o la existencia de contraindicaciones.

Con respecto al genotipo viral, también está descrito que el genotipo 1 es uno de los mayoritarios en Europa, y el más frecuente en España (212). Por tanto, los datos referentes a la edad, el sexo o el genotipo viral encontrados en estudios de características similares muestran mucha concordancia con los nuestros (171;181;213).

En cuanto al polimorfismo de la IL28B, la proporción de CC encontrada en nuestro trabajo muestra una gran similitud con los estudios realizados en cohortes españolas por *Graells* (212) y *Rojas y cols.* (214), donde el porcentaje reflejado de este genotipo es del 26% y del 33,1% respectivamente, en ambos casos referidos a pacientes infectados por VHC del genotipo 1. Así mismo, el porcentaje de pacientes con genotipo CC indicado en un estudio estadounidense, de un 25%, también coincide con el nuestro (41). Por otro lado, el trabajo llevado a cabo por *Montes-Cano y cols.* (40) en un hospital sevillano refleja un porcentaje de pacientes con genotipo CC superior, del 48,79%. Las discrepancias podrían ser debidas a las diferencias en el tamaño muestral, y en nuestro caso debe tenerse también en cuenta que no disponemos del resultado del genotipo en la totalidad de los pacientes, aunque harían falta más estudios para esclarecer las discrepancias.

b. Estudio radiodiagnóstico

Con respecto al estudio radiodiagnóstico de la población global encontramos una Vc media de 1,4 m/s. Además, el 60,99% de los pacientes presentó al menos un signo ecográfico de hepatopatía crónica, siendo el más frecuente de estos la presencia de superficie nodular (21,5%), seguido de esteatosis (15%), heterogeneidad del parénquima (14%), hipertrofia del lóbulo caudado (8,4%), hepatomegalia (7,5%), esplenomegalia (2,8%) e hipertensión portal (1,9%). Ningún paciente presentó ascitis.

Tal como ya se ha explicado, el Arfi es una técnica radiodiagnóstica no invasiva que proporciona información sobre las propiedades mecánicas de los tejidos blandos utilizando pulsos acústicos de corta duración y alta intensidad que generan desplazamientos localizados del tejido en cuestión (215). Además la técnica está integrada en un sistema de ecografía tradicional, lo que implica la posibilidad de aportar

ambos resultados en una única exploración, además de permitir la correcta localización de la región de interés para la determinación de la Vc, lo que aumenta la seguridad diagnóstica.

En los últimos años la técnica ha sido muy estudiada para la estimación del grado de fibrosis hepática en diferentes hepatopatías, fundamentalmente en pacientes con hepatitis C. Los resultados obtenidos han sido muy prometedores, mostrando un rendimiento diagnóstico comparable al de la biopsia (197-199;204). Esta es la razón por la que hemos utilizado los resultados aportados por la técnica como estándar de referencia para la clasificación del grado de hepatopatía de nuestros pacientes. Así mismo, este es el motivo que ha propiciado que la técnica comience a estar cada vez más disponible en los centros sanitarios.

Sin embargo a pesar de los buenos resultados aportados, los diferentes estudios indican puntos de corte relativamente discrepantes, que pueden llevar a clasificaciones diferentes. En este sentido, la implementación de un sistema estandarizado para optimizar la reproducibilidad y transferibilidad de los resultados de la técnica es un reto importante.

Al comparar la Vc media de nuestra población con otros estudios similares nos encontramos con resultados bastante concordantes. El trabajo de *Nishikawa y cols.* (202) llevado a cabo en una población de 108 pacientes con VHC indica una Vc media de 1,38 m/s. También el estudio de *Yamada y cols.* (200) refleja resultados muy parecidos, de 1,39 m/s en una cohorte de 124 pacientes. Por otro lado, en el trabajo europeo de *Rizzo y cols.* (204) se muestra una Vc media de 1,7 m/s en una cohorte de 139 infectados por el VHC. La mayoría de estudios europeos no indican la Vc media de la población global, limitándose únicamente a establecer los valores en función del estadio de fibrosis, si bien el trabajo multicéntrico de *Sporea y cols.* (198) indica que existen diferencias entre los resultados obtenidos en pacientes asiáticos y europeos. Sin embargo nuestro resultado parece más concordante con el observado en los estudios en asiáticos, aunque las discrepancias podrían atribuirse a las diferencias en el grado de fibrosis de los pacientes, que obviamente modificarían los resultados de la cohorte total.

La ultrasonografía convencional se considera por su inocuidad, bajo coste y accesibilidad la técnica de imagen de primera elección en la valoración inicial de los pacientes con sospecha o evidencia de enfermedad hepática. Sin embargo su mayor utilidad radica en la detección de cirrosis hepática, cuyo diagnóstico ecográfico es relativamente fácil, al contar con una amplia y bien definida semiología ecográfica que incluye alteraciones de la morfología hepática y signos de hipertensión portal. Por el contrario, en los pacientes en estadios previos a la cirrosis, las alteraciones en la ecoestructura hepática suelen ser poco expresivas y los signos de hipertensión portal generalmente están ausentes, lo que dificulta el diagnóstico ecográfico (104;216). Esto es algo bien demostrado, y es la razón por la que la mayoría de los estudios en este ámbito van enfocados a valorar la eficacia de la ecografía para el diagnóstico de la cirrosis, incluyendo en pocos casos la estimación de la fibrosis en sí misma. Así mismo, la correlación entre la valoración ecográfica y el diagnóstico histológico no ha sido investigada en series grandes de pacientes. Además la mayoría de los estudios incluyen los datos relativos al rendimiento diagnóstico, aportando en muy pocas ocasiones el descriptivo de signos ecográficos encontrados en la cohorte total de estudio, lo que limita el contraste de nuestros resultados.

El estudio europeo de *Colli y cols.* (102), donde se valoraron varios signos ecográficos en una población de 300 pacientes con hepatopatía crónica, correspondiendo el 41% de los casos a pacientes infectados por el VHC, muestra una gran concordancia con nuestros hallazgos. En este caso, el 50% de los pacientes presentó al menos un signo ecográfico de hepatopatía, detectándose superficie nodular en el 22,3% de los casos. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con hipertrofia del lóbulo caudado fue superior al nuestro, del 20,33%, y el único signo que se valoró adicionalmente fue el flujo venoso hepático.

c. Variables de laboratorio

Con respecto a los resultados encontrados de los parámetros hematológicos y bioquímicos de la población global de estudio, los valores medios de todas las variables se encontraron dentro de los valores normales de referencia para pacientes sanos, excepto la ALT, cuyo valor medio fue superior.

Estos hallazgos entran dentro de lo esperado, puesto que es sabido que en muchas ocasiones los pacientes con hepatopatía crónica presentan una función hepática conservada, mostrando los valores analíticos dentro de la normalidad o con incrementos moderados hasta el momento en que se alcanza una cirrosis hepática descompensada (145). Este es el caso de nuestra población, donde ninguno de los pacientes se encontraba en este estadio terminal de la enfermedad.

Por otra parte, que la única anormalidad analítica sea un incremento de la ALT también supone algo lógico. Es más que conocido que las aminotransferasas son enzimas intracelulares que catalizan la interconversión de aminoácidos en alfa-oxoácidos mediante la transferencia de grupos amino, y que su concentración en plasma refleja la liberación debida a renovación celular fisiológica o a lesión celular. Aunque no son enzimas específicas del hígado, sus concentraciones se han utilizado clásicamente como marcadores de daño hepático. Concretamente la ALT es más específica del daño hepático, y en las hepatopatías crónicas frecuentemente su valor es más elevado que el de AST, tal como se observa en nuestros pacientes (145).

Estos resultados son muy concordantes con los reflejados en la mayoría de los estudios que incluyen poblaciones de pacientes con hepatopatía crónica por VHC, en donde no suelen encontrarse alteraciones en los resultados analíticos de la población global, o en todo caso se observan aumentos leves de las transaminasas, y generalmente a expensas de la ALT (200;202;204;217).

En cuanto a los algoritmos matemáticos existen bastantes estudios que han analizado uno o varios de ellos en cohortes de pacientes similares a la nuestra, aunque sin embargo no siempre se indican los resultados medios referidos a la población global, reflejándose únicamente los resultados en función de los estadios de fibrosis o directamente los resultados aportados por las curvas ROC. Este es el caso, por ejemplo, de los estudios donde se diseñaron originalmente los algoritmos.

Gomes y cols. (201) reflejan en su trabajo realizado en una población de 51 pacientes con VHC y publicado en 2014 unos resultados concordantes con los nuestros. Estos autores

escuentran un valor medio de Apri de 0,97, de 5,75 en el caso del Forns y de 2,41 en referencia al algoritmo Fib-4.

Por otro lado, *Yamada y cols.* (200) reflejan un valor medio de Apri de 0,90 y de Fib-4 de 2,80 en una población de 124 pacientes con hepatopatía crónica por VHC.

En el trabajo de *Zarski y cols.* (192) se muestran unos resultados bastante coincidentes con los nuestros. En una población de 507 pacientes con hepatopatía por VHC los resultados medios reflejados para los algoritmos Apri, Fibrotest, Fibrometer y Hepascore fueron 0,3, 0,05, 0,6 y 0,5 respectivamente.

Yilmaz y cols. (170) indican en un estudio llevado a cabo en una cohorte de pacientes con hepatopatía crónica de etiología mixta, que el valor medio del Apri referente al subgrupo de pacientes con VHC es de 0,49, muy similar al nuestro.

En el estudio de *Hsieh y cols.* (185) realizado en una población de 140 pacientes con hepatopatía de origen viral, correspondiendo el 81% a pacientes infectados por el VHC, se refleja un valor medio de 1,87 para el algoritmo Apri y de 2,66 en el caso del FibroQ.

Teniendo en cuenta los diversos estudios se deduce que de manera global los resultados muestran concordancia, aunque haya algún algoritmo cuyos resultados sean más discrepantes. Las diferencias son fácilmente atribuibles a las características intrínsecas de la población, especialmente en lo que al grado de fibrosis hepática se refiere, y que obviamente influirá en gran medida en los resultados referidos a la población global. Por otra parte, no debemos olvidar que el verdadero valor de los algoritmos radica en su capacidad de diferenciar los diversos estadios, más allá del resultado meramente descriptivo referido a la cohorte total.

ii. Características de los grupos de estudio

Como ya se ha explicado en el apartado de pacientes y métodos, la población global se dividió en tres grupos de estudio de acuerdo al valor de Vc obtenido mediante la técnica Arfi.

Existe un consenso claro acerca de que en la actualidad, la biopsia continúa siendo el estándar para el diagnóstico de la fibrosis hepática. Si bien sus inconvenientes y complicaciones también están demostrados. Por una parte es una técnica invasiva y que por tanto implica unos riesgos, que aunque no son frecuentes, pueden revertir gravedad. Esto hace que la técnica no pueda repetirse de manera periódica, y por tanto la información proporcionada, aunque valiosa, se refiera a un momento puntual y no refleje el proceso dinámico de la enfermedad. Por tanto la técnica se muestra como inviable para el control evolutivo continuo de la patología. Además de esto existe un importante error de muestreo, pues la muestra tomada no siempre es representativa de estado real del hígado, así como el error ligado a la subjetividad propia del observador. Y tampoco debemos olvidar que el coste asociado al procedimiento es elevado (89;97;99).

Por todo esto, aún concientes de la valiosa información que aporta la biopsia, los clínicos se muestran cada vez más reacios a indicarla, y además debe tenerse en cuenta que en muchas ocasiones son los propios pacientes los que rechazan el procedimiento. Así mismo, el hecho de que la biopsia no sea necesaria para establecer el origen de esta hepatopatía, y de que existan diversas técnicas no invasivas que han demostrado muy buenos resultados en la estimación del grado de fibrosis, y permitan por tanto, el control evolutivo de estos pacientes, hacen que el número de biopsias realizadas a los pacientes con hepatopatía crónica por VHC sea cada vez menor.

Estos son los motivos por lo que no disponemos de biopsia hepática en este grupo de pacientes. Somos conscientes de que este hecho supone una limitación importante, pero por otro lado creemos que estamos reflejando la situación clínica real de estos pacientes en nuestro hospital, extrapolable por otra parte a la mayoría de centros sanitarios. El porcentaje de pacientes de nuestra cohorte al que, al margen de nuestro estudio, se le había realizado una biopsia en el curso de su enfermedad era ínfimo, demostrando que el manejo clínico de estos pacientes se realiza de manera rutinaria mediante valoración clínica, analítica y radiodiagnóstica.

Por otra parte, el rendimiento de la técnica Arfi en comparación con la biopsia está suficientemente contrastado en este tipo de pacientes (198;199), por lo que se muestra como una técnica adecuada para la clasificación del grado de fibrosis. Sin embargo también

somos conscientes de que el hecho de utilizar la Vc para la estratificación de los pacientes implica no poder usar este parámetro posteriormente para la elaboración de un algoritmo diagnóstico, situación que hubiese sido la ideal.

a. Características demográficas y clínicas

Los grupos de estudio resultaron bastante homogéneos con respecto al número de pacientes, puesto que encontramos 33 pacientes sin fibrosis o con un grado de fibrosis mínimo (F0-F1), 40 pacientes correspondientes a un grado de fibrosis de moderado a severo (F2-F3) y 34 pacientes con cirrosis hepática (F4). Debe indicarse que ningún paciente presentó signos clínicos de cirrosis descompensada.

Al comparar los tres grupos de pacientes, encontramos diferencias significativas con respecto a la edad ($p=0,001$). Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura, donde se señala que la edad es un predictor importante del grado de fibrosis hepática. El valor de la edad como un marcador de fibrosis parece obvio teniendo en cuenta que la progresión de la fibrosis es dependiente del tiempo. Además, también se ha demostrado que la edad en el momento del contagio de la infección influye en el pronóstico de la enfermedad, encontrándose que los pacientes infectados después de la cuarta década de la vida tienen un mayor riesgo de progresión de la hepatopatía. Es evidente que la duración de la infección por VHC sería un indicador más preciso de la fibrosis que la edad en sí misma, pero sin embargo, en nuestra población el mecanismo de adquisición de la infección por VHC no se conocía con exactitud en un porcentaje elevado de los pacientes, y por lo tanto, la duración de la infección por VHC era difícil de establecer en muchos casos, por lo que decidimos no incluirla como variable (171).

Con respecto a las variables referidas al VHC no se observaron diferencias significativas. Aunque no existe un consenso absoluto, la mayoría de las publicaciones han reflejado la influencia de la carga viral, el genotipo y el polimorfismo de la IL28B en la respuesta al tratamiento antiviral, sin mostrar una relación clara con el curso de la hepatopatía (212;218). En general, el genotipo 1 se asocia con una enfermedad más agresiva, mala respuesta a la terapia y mayor riesgo de desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (36). Por otro lado, los pacientes con genotipo de la IL28B CC tienen mayores

probabilidades de alcanzar la respuesta viral sostenida con la terapia antiviral que aquellos con genotipo CT o TT.

b. Estudio radiodiagnóstico

Las diferencias encontradas con respecto a la Vc aportada por la técnica Arfi se presuponen obvias teniendo en cuenta que hemos utilizado esta variable para la distribución de los pacientes en los tres grupos de estudio, por lo que el resultado carece de valor.

Con respecto al estudio ecográfico se observaron diferencias significativas para la variable signos ecográficos de hepatopatía crónica ($p=0,0001$), que como ya se ha explicado se consideró positiva para aquellos pacientes que presentaron alguno de los signos ecográficos valorados. Por otra parte se constataron diferencias entre los grupos de estudio para las variables esplenomegalia ($p=0,040$), hipertrofia del lóbulo caudado ($p=0,010$), heterogeneidad del parénquima ($p=0,001$) y superficie hepática nodular ($p=0,0001$). Tal como se observa en la **tabla 19** de los resultados, estas diferencias son atribuibles al grupo 3 con respecto al 1 y al 2, pues entre estos dos últimos los porcentajes encontrados de los signos ecográficos son muy similares.

Estos signos ecográficos, aunque por sí solos carecen de valor suficiente para el diagnóstico y la cuantificación del grado de fibrosis hepática, son muy sugestivos de una hepatopatía crónica avanzada, y prueba de ello es que el porcentaje de pacientes que los presentan en el grupo 3, correspondiente a los pacientes con cirrosis, es significativamente superior al encontrado en los otros dos grupos.

Los signos en los que se observaron unas diferencias más marcadas fueron la superficie hepática nodular y la heterogeneidad del parénquima. La superficie hepática nodular es el signo ecográfico aislado más preciso en el diagnóstico de cirrosis hepática y puede estar presente incluso en fases muy precoces de la enfermedad. Este hallazgo tiene una sensibilidad variable en los estudios existentes, siendo las causas de los falsos negativos la cirrosis micronodular, el uso de transductores de baja frecuencia y la subjetividad del explorador. La especificidad media es del 88% (82-95%), siendo el hígado tumoral y la hiperplasia nodular las causas más frecuentes de los falsos positivos (104).

Zheng y cols. (219) estudiaron el valor de la ecografía en la evaluación de la fibrosis hepática y la cirrosis compensada en comparación con la serología e histología, y encontraron que la heterogeneidad de parénquima hepático, la superficie nodular y el grosor de la pared de la vesícula biliar son tres predictores independientes de la fibrosis hepática.

Por otro lado, Colli y cols. (102) reflejan en su estudio que la superficie hepática nodular es un signo preciso para identificar a los pacientes con fibrosis hepática grave o cirrosis.

Con respecto a la heterogeneidad del parénquima, es un signo ecográfico sujeto a una gran dependencia del operador y del ecógrafo, especialmente en sus estadios intermedios. No obstante, existe algún estudio donde la alteración de la ecoestructura hepática fue el mejor predictor de la presencia de cirrosis (107).

Por otra parte, existen algunas publicaciones que indican que los valores elevados de aminotransferasas, especialmente de ALT, podrían influir en las mediciones elastométricas, y por tanto restar eficacia diagnóstica al Arfi en la detección de la fibrosis hepática. Esta influencia sería debida a que el aumento de ALT estaría reflejando un aumento de la actividad necroinflamatoria, que podría provocar mayores valores de Vc, con independencia del grado de fibrosis. Sin embargo, no existe consenso en este punto, encontrándose resultados relativamente dispares en función de los diversos estudios.

En nuestro caso, para evaluar la posible influencia de los valores de ALT, dividimos dentro de cada uno de los tres grupos de estudio a los pacientes en función de los valores de ALT (**tabla 20** de resultados). Por un lado los pacientes con ALT dentro del intervalo de los valores de referencia (≤ 41 UI/L), y por otro lado aquellos pacientes con valores aumentados de ALT (>41 UI/L). Al estudiar los valores de Vc dentro de cada grupo de estudio, encontramos que no existían diferencias significativas en función de los valores de ALT. Si bien es cierto, que nuestros grupos están formados de acuerdo a los valores de Vc, por lo que la diferencia de Vc que podría esperarse intragrupo no debería ser muy grande.

Nishikawa y cols. (202) indican en su estudio que aunque los valores de AST y ALT correlacionaron con la Vc en el análisis univariado realizado en la cohorte total, no

resultaron factores independientes en el análisis multivariado de regresión logística. Además, las aminotransferasas tampoco mostraron una correlación significativa con la Vc al estratificar a los pacientes en función del grado de fibrosis obtenido en la biopsia, por lo que los autores concluyen que la actividad inflamatoria no afecta a los resultados del Arfi en pacientes con hepatitis C.

Así mismo *Rizzo y cols.* (204) reportan que los valores de ALT no están asociados con la Vc obtenida mediante la técnica Arfi.

También *Bota y cols.* (217) reflejan en su estudio una discordancia de al menos dos estadios de fibrosis entre el resultado de la Vc y el de la biopsia en función de los valores de AST y ALT en el análisis univariado, aunque sin embargo en el análisis multivariado los valores elevados de las aminotransferasas ya no se asocian con estas discrepancias.

En contraste *Yoon y cols.* (220) reportan en su trabajo diferentes puntos de corte de Vc en función de que los valores de ALT sean normales o se encuentren por encima del rango de normalidad. También *Chen y cols.* (203) reflejan que los valores de ALT se asocian de manera independiente con la Vc, indicando que un aumento sérico de 100 UI/L de ALT podría incrementar la Vc aproximadamente 0,155 m/s. *Sporea y cols.* (198) afirman que, en los pacientes con VHC con niveles elevados de aminotransferasas, la determinación del grado de fibrosis mediante métodos elastométricos como el Arfi utilizando los puntos de corte de Vc convencionales, podría aportar resultados poco confiables.

Los resultados de las diferentes publicaciones justifican realizar estudios en un futuro, donde en una cohorte mayor y estableciendo otro estándar de referencia, pudiésemos evaluar la influencia real de la actividad necroinflamatoria sobre el valor de la Vc.

c. Variables de laboratorio

Al analizar los parámetros hematológicos de los pacientes en función de los tres grupos de estudio observamos diferencias significativas para la hemoglobina ($p=0,022$), el VCM ($p=0,024$), el recuento de plaquetas ($p=0,0001$) y de leucocitos ($p=0,008$), así como el porcentaje de linfocitos ($p=0,001$), el porcentaje de actividad de protrombina ($p=0,002$) y

el INR ($p=0,002$). Todos estos hallazgos se enmarcan dentro las alteraciones habitualmente descritas en los pacientes con hepatopatía crónica.

Debemos tener en cuenta que aunque los valores medios de la población global se encontraron dentro de los intervalos de referencia, las diferencias encontradas entre los tres grupos señalan, que aun dentro de la normalidad, los valores analíticos de los grupos con mayor estado de fibrosis son indicativos de una hepatopatía más avanzada en comparación con el grupo de los pacientes sin fibrosis o con fibrosis mínima.

La anemia es un rasgo comúnmente observado en los enfermos con hepatopatía crónica, apareciendo generalmente en estadios avanzados de la enfermedad. Su patrón puede ser microcítico, debido a pérdidas gastrointestinales, macrocítico, por déficit de folato (asociado generalmente a alcoholismo) o mixto. En nuestro caso, los valores de VCM aumentan con el grupo de estudio, encontrándose los valores mayores en el grupo correspondiente a los pacientes con fibrosis. Con frecuencia, la anemia se asocia a leucopenia o trombocitopenia. Esta última aparece como resultado de la disminución de trombopoyetina y el desarrollo de hipertensión portal. Así mismo, tanto la leucopenia como la trombocitopenia podrían asociarse a la acción mielosupresora del VHC y al hiperesplenismo (221). Además, si existe leucopenia, pero el recuento total de los linfocitos se mantiene, el aumento de su porcentaje se produce a expensas de la disminución de los neutrófilos, que también podría deberse a la inmunosupresión provocada por el virus.

El tiempo de protrombina se ha utilizado clásicamente como marcador de la progresión de la fibrosis y la hepatopatía. Se ha comprobado que puede aparecer disminuido ya en estados iniciales de la enfermedad, antes incluso de que se observe una disminución de los niveles de albúmina. La utilización del porcentaje de actividad del tiempo de protrombina evita los problemas debidos a la variabilidad entre laboratorios (222).

En referencia a los parámetros bioquímicos encontramos diferencias significativas entre grupos para la glucosa ($p=0,036$), albúmina ($p=0,0001$), bilirrubina total ($p=0,011$), triglicéridos ($p=0,016$), $\alpha 2$ -macroglobulina ($p=0,0001$), AST ($p=0,0001$), ALT ($p=0,013$),

GGT ($p=0,001$) y ALP ($p=0,0001$). Estos resultados también entran dentro de lo esperado para una población de pacientes con hepatopatía crónica por VHC.

Las diferencias encontradas con respecto a la glucosa concuerdan con lo descrito en la literatura, donde se indica que la frecuencia observada de resistencia a la insulina y DM2 en pacientes con hepatitis C es mayor a la correspondiente a la población general o en pacientes con hepatitis crónica de otra etiología. Los estudios de corte transversal y caso-cohorte apoyan el papel de la hepatitis C como factor implicado en el desarrollo de DM2 en pacientes de alto riesgo (pacientes masculinos, mayores de 40 años y con sobrepeso). Se ha encontrado en modelos con ratones transgénicos que la proteína del core del VHC es capaz de inducir la resistencia a la insulina, que por otra parte se ha asociado con el desarrollo de esteatosis y con un incremento de la tasa de progresión de la fibrosis. Además, estas alteraciones metabólicas también se han relacionado con la respuesta al tratamiento antiviral (223;224). En esta tesis no hemos determinado los niveles de insulina ni reflejado la proporción de pacientes con DM2, por lo que no podemos contrastar adecuadamente nuestros resultados en este sentido, aunque las diferencias encontradas en los niveles de glucosa apuntan a que probablemente coincidiésemos con lo descrito.

La disminución de la albúmina en las hepatopatías crónicas está sobradamente demostrada, como consecuencia de la disminución de la síntesis hepática. Así mismo en el caso del aumento de la bilirrubina por lesión hepatocelular o fenómenos obstructivos en los canalículos biliares.

En el caso de los triglicéridos, en estados avanzados de hepatopatía sus niveles suelen disminuir, al igual que los de colesterol y lipoproteínas debido a una disminución sintética. Sin embargo también se ha documentado que en las hepatopatías de origen viral y alcohólico, antes de que exista un compromiso de la síntesis hepática, se produce un descenso de la actividad de las enzimas triglicéridolipasa y lecitin-colesterol-acil-transferasa, por lo que tiene lugar incremento de los niveles de triglicéridos y colesterol no esterificado (225).

Las causas que explican las diferencias encontradas en los niveles α 2-macroglobulina y en las enzimas AST, ALT, GGT y ALP entre los tres grupos de pacientes van en relación con la hepatopatía, y ya se han desarrollado en profundidad en la introducción. Estas alteraciones son un hallazgo común en la mayoría de los estudios en pacientes con VHC, y las discrepancias que en ocasiones se observan, cuando alguna de estas variables no resulta significativa, se atribuyen a las diferencias en los porcentajes de fibrosis de la población, que obviamente implican diferentes grados de hepatopatía (173;213;226).

Al comparar los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática entre los tres grupos de pacientes observamos diferencias en todos los casos. En primer lugar es importante mencionar, que el algoritmo Via Index contiene en su fórmula matemática a la V_c , por lo que, teniendo en cuenta que nuestros pacientes están divididos en grupos en función de la V_c , las diferencias encontradas para el Via Index se presuponen obvias, y el resultado carece de valor.

Por otro lado, las diferencias encontradas en el resto de algoritmos son lógicas, teniendo en cuenta que los tres grupos de pacientes reflejan tres grados de hepatopatía (mínima, intermedia y severa) y que los algoritmos se diseñaron con el objetivo de diferenciar estos estadios. Son muchos los estudios que han evaluado uno o varios de estos algoritmos y la mayoría han demostrado buenos resultados (186;203;221;227). Tal como ocurre para los biomarcadores, las diferencias encontradas entre las distintas publicaciones suelen reflejar las características intrínsecas de la población, especialmente en el grado de fibrosis hepática de los pacientes. Por otra parte no debemos olvidar, que el verdadero valor diagnóstico del algoritmo vendrá determinado por el valor de la curva ROC, y por los valores de sensibilidad y especificidad asociados al punto de corte escogido.

5.1.2 Objetivo 2

i. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF

Se determinaron las concentraciones de HA, PIIINP y TIMP-1, y se calcularon los valores del algoritmo ELF en la población total y en los tres grupos de estudio.

En la población global encontramos una concentración de 53,81 ng/mL de HA, 10,03 ng/mL en el caso del PIIINP y 216 ng/mL de TIMP-1. El valor medio de ELF fue de 9,93. Al comparar los resultados entre tres los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas para las cuatro variables ($p=0,0001$).

Se han publicado diversos estudios que evalúan los valores los valores de HA, PIIINP y TIMP-1 en pacientes con VHC, al igual que del algoritmo ELF. Sin embargo no todos indican los valores medios obtenidos en la población global o los grupos de estudio, limitándose a reflejar los valores del área bajo la curva al discriminar los distintos estadios de fibrosis, cuestión que nosotros abordaremos en el objetivo tres.

El trabajo de *Leroy y cols.* (161) realizado en 194 pacientes con VHC refleja unas concentraciones medias de HA, PIIINP y TIMP-1 de 81 ng/mL, 4,9 ng/mL y 1358 ng/mL respectivamente. Como puede observarse los resultados son relativamente discrepantes con los nuestros, encontrándose las diferencias más marcadas en las concentraciones de TIMP-1, que como explicaremos más adelante aportan resultados muy variables según las diferentes publicaciones. Debe tenerse en cuenta que el porcentaje de fibrosis es diferente al nuestro, ya que reflejan un 55,3% de pacientes con F0-F1 (frente a nuestro grupo 1, que supone el 28,97% de la población), un 37,2% de pacientes con F2-F3 (frente a nuestro grupo 2, el 37,38%) y un 7,4% de pacientes con F4 (frente a nuestro grupo 3, el 31,77%). Como puede observarse nosotros tenemos una proporción mayor de pacientes con cirrosis y menor de aquellos sin fibrosis o con fibrosis mínima.

Adams y cols. (181) aportan, en una cohorte de 117 pacientes con VHC, los valores de HA y TIMP-1 relativos a los pacientes con un grado de fibrosis F0-F1 (equivalente a nuestro grupo 1), que suponen el 56,41% de su población, frente al 43,58% restante, que corresponden a aquellos con F2-F4 (equivalente a nuestros grupos 2 y 3), encontrando diferencias significativas para ambos biomarcadores. Reportan una concentración de 20,7 ng/mL de HA y 880 ng/mL de TIMP-1 en el primer grupo, frente a 107,3 ng/mL de HA y 1404 ng/mL de TIMP-1 en el segundo grupo. Una vez más, se observan valores bastante discrepantes del biomarcador TIMP-1.

En el trabajo de *Fontana y cols.* (213) se indican unos resultados que concuerdan con los nuestros. En una población de 513 pacientes con VHC en los que hay un 38% de cirróticos, encuentran una concentración media de HA de 91,20 ng/mL, 6,2 ng/mL de PIIINP y 240,8 ng/mL en el caso del TIMP-1. Los tres biomarcadores aportaron diferencias significativas entre los distintos estadios de fibrosis.

Así mismo los resultados reflejados por *Valva y cols.* (228) son bastante coincidentes con los nuestros. Estos autores reportan una concentración media de 80,12 ng/mL de HA, 9,58 ng/mL de PIIINP y 302,6 ng/mL de TIMP-1 en una población de 22 pacientes con VHC. Sin embargo debe tenerse en cuenta que la población es relativamente pequeña, y por otro lado las diferencias entre grupos no son comparables ya que estratifican a los pacientes de diferente modo y utilizando otra escala histológica.

También los resultados del estudio de *Zarski y cols.* (192) se muestran coincidentes con los nuestros, ya que en una cohorte de 507 pacientes con hepatopatía crónica por VHC, encuentran una concentración media de 69,7 ng/mL de HA, 5,4 ng/mL de PIIINP y 173,8 ng/mL de TIMP-1.

Jeong y cols. (229) encuentran una concentración media de 62 ng/mL de HA en una población de 70 pacientes con hepatopatía crónica, donde el VHC es el agente etiológico responsable del 25,7% de los casos. En esta cohorte el 21,42% de los pacientes tenían un grado de fibrosis F0-F1, un 47,14% un grado F2-F3 y el 31,42% restante correspondían al estadio F4.

De la comparación entre los diferentes estudios, para el HA y el PIIINP se deducen resultados bastante concordantes, cuyas discrepancias pueden atribuirse a las características de la población, especialmente a los porcentajes encontrados de los distintos estadios de fibrosis. Sin embargo, en el caso del TIMP-1 las diferencias son más marcadas.

Revisando la literatura hemos encontrado resultados bastante discrepantes acerca de los valores de TIMP-1. En el estudio de *Rosemberg y cols.* (190) reflejan una concentración media de TIMP-1 en sujetos sanos de 619 ng/mL, lo cual difiere en gran medida con nuestros resultados, ya que a los pacientes sanos se les presuponen valores inferiores

frente a aquellos con hepatopatía. Sin embargo debe tenerse en cuenta que en este estudio no indican los criterios de inclusión y exclusión de esta cohorte de pacientes “sanos”, lo cual podría influir significativamente en los resultados. En el trabajo de *Leroy y cols.* (161) los valores medios de TIMP-1 encontrados en el grupo control formado por pacientes sanos son incluso mayores, de 1233 ng/mL. Sin embargo estos resultados son muy discrepantes a los aportados por *Shin y cols.* (230), que indican una concentración media de TIMP-1 de 192,3 ng/mL en una población de adolescentes sanos. Las diferencias observadas en pacientes sanos son extrapolables a las poblaciones de pacientes con hepatopatía, donde pueden incluso incrementarse debido a la heterogeneidad de la patología, tal como hemos documentado acerca de las diferentes concentraciones de TIMP-1 referidas a pacientes con VHC. De todo esto se deduce que los valores aportados por los diferentes estudios son bastante discordantes, por lo que deben valorarse con cautela. Creemos que estas diferencias podrían deberse al hecho de que no se disponga de estándares de referencia, lo que implica que ante el uso de diferentes técnicas los resultados aportados puedan discrepar de manera significativa. El TIMP-1 no es un biomarcador comúnmente utilizado en la práctica clínica, por lo que no existen unos valores normales estandarizados y debidamente contrastados. Serían necesarios más estudios en este ámbito.

Con respecto a los valores de ELF en la población global, nuestros resultados son muy concordantes con los reflejados en el estudio de *Fernandes y cols.* (193). En una población de 120 pacientes con hepatopatía por VHC indican un valor medio de ELF de 9,62, prácticamente idéntico al nuestro. Además encuentran diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en los diferentes estadios de fibrosis.

Así mismo, nuestros resultados son bastante coincidentes con los de *Petersen y cols* (231). En este trabajo, realizado en una cohorte de 95 pacientes con VHC, aunque no reflejan los valores de ELF de la población global, indican un valor de 8,43 para el grupo de pacientes con grado de fibrosis F0-F1 y un valor de 10,28 en el grupo de aquellos con grado F2-F4. Indican también que los valores de ELF son significativamente distintos entre ambos grupos. A pesar de que estos autores dividen a su población de diferente manera a

nosotros, ya que únicamente tienen dos grupos, de los valores obtenidos se deduce una gran similitud.

El trabajo de *Lichtinghagen y cols.* (232) realizado en 79 pacientes con VHC divide a la población en grupos de acuerdo a los grados de fibrosis obtenidos mediante biopsia utilizando la clasificación de Ishak. Reflejan unos valores de ELF de 8,9 para el estadio F0, 9,4 para el estadio F1, 10 para los estadios F3-F4 y 12,2 para los estadios F5-F6, e indican que se encontraron diferencias significativas entre grupos. Aunque la comparación con nuestros resultados es difícil, ya que el sistema de gradación histológica es diferente y los grupos estratifican a los pacientes de modo distinto, el rango de valores de ELF obtenido en ambas poblaciones es muy similar.

ii. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF en función de las características clínicas, demográficas y ecográficas

Por otro lado, como parte del objetivo dos se estudiaron los valores de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y del algoritmo ELF en función de las características clínicas, demográficas y ecográficas de los pacientes.

No encontramos diferencias significativas para ninguno de los tres biomarcadores ni para el algoritmo ELF en función del sexo. En el caso del ELF, este resultado contrasta con el reflejado en el estudio de *Yoo y cols.* (233), que encuentra valores significativamente mayores del algoritmo en hombres que en mujeres, y establece dos rangos de valores normales en función del sexo. El estudio de *Lichtinghagen y cols.* (232) también corrobora los resultados de *Yoo y cols.*, puesto que refleja valores de ELF significativamente más altos en los pacientes del sexo masculino, e indica que estas diferencias también se observan para los biomarcadores HA y PIIINP. Al analizar estas diferencias con respecto a nuestro estudio debemos tener en cuenta algunas cuestiones. Primeramente las discrepancias en las características de la población, ya que el trabajo de *Yoo y cols.* se realizó en pacientes asiáticos, si bien es cierto que sus hallazgos se confirmaron en la cohorte europea de *Lichtinghagen y cols.* Además, ambos estudios se han llevado a cabo en pacientes sanos, lo que implica una limitación de la comparación, puesto que la progresión de enfermedad podría ser más homogénea en ambos sexos, lo que explicaría

la ausencia de diferencias significativas de los biomarcadores. Sin embargo, las diferencias encontradas con respecto a estos trabajos, junto con el tamaño limitado de nuestra población, obliga necesariamente a comprobar estos resultados en estudios posteriores.

El estudio de *Knudsen y cols.* (234), que establece unos valores de referencia para el biomarcador PIIINP en pacientes sanos, indica la ausencia de diferencias significativas en función del sexo, lo cual discrepa con los resultados de *Lichtinghagen y cols.* y va más en consonancia con los nuestros.

Por otra parte, al estudiar los valores de los tres biomarcadores y del algoritmo ELF en función del genotipo viral tampoco observamos diferencias significativas. Sin embargo, a pesar de la ausencia de resultados significativos, los valores mayores de HA, PIIINP y TIMP-1 corresponden a los pacientes con genotipo tres. Esto concuerda con lo reflejado en el trabajo de *Ripoli y cols.* (235), donde se indica que el genotipo viral, además de relacionarse con la respuesta al tratamiento, puede influir en la patogénesis de la enfermedad. Estos autores refieren que el genotipo 3 del VHC se asocia con niveles superiores de fibrosis con respecto a los demás genotipos. Sin embargo, no debemos olvidar que las diferencias encontradas no son significativas, y que además, nuestra población no contiene una distribución homogénea de los diferentes genotipos, pues se compone mayoritariamente de pacientes infectados por el genotipo 1.

Con respecto a los resultados de los tres biomarcadores y el algoritmo ELF en función del polimorfismo de la IL28B, encontramos diferencias significativas para el PIIINP y el TIMP-1, hallándose en ambos casos las menores concentraciones en los pacientes con el polimorfismo CT. No hemos encontrado estudios que hayan evaluado esta asociación, refiriéndose la mayoría de las publicaciones al efecto de los diferentes genotipos en la respuesta al tratamiento antiviral. Sin embargo sí existen algunas publicaciones que abordan la influencia de los diferentes genotipos de la IL28B en el desarrollo de fibrosis o el pronóstico de la hepatopatía, aunque los resultados no son totalmente concordantes. *Noureddin y cols.* (41) indican que el polimorfismo CC se asocia con mayores niveles de necroinflamación, niveles más altos de ALT y peor pronóstico de la enfermedad. En este sentido nosotros encontramos los valores más altos de PIIINP en los pacientes CC, pero no ocurre lo mismo los otros biomarcadores ni con el ELF. Por otro lado, *Fabris y cols.* (42)

reflejan en su estudio que el alelo T es más prevalente en los pacientes que desarrollan cirrosis, asociándose por tanto con un aumento del riesgo de desarrollar hepatocarcinoma. De acuerdo con esto, en nuestro estudio el mayor porcentaje de pacientes TT se encuentra en el grupo tres (**tabla 18** de resultados), correspondiente a los pacientes con cirrosis, aunque las diferencias no son significativas, y además los valores mayores de TIMP-1 se dan en el grupo de pacientes TT. En contraste, *Maribita y cols.* (43) refieren que el polimorfismo de la IL28B no se relaciona con la severidad de la fibrosis hepática. De todo esto se deduce que los resultados de las diferentes publicaciones no son totalmente concluyentes y por tanto deben realizarse estudios futuros que aborden en profundidad el valor de la IL28B en el desarrollo de la fibrosis, y por tanto su relación con el grado de hepatopatía.

Por otro lado, evaluamos el valor de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y del algoritmo ELF con respecto a la existencia de signos ecográficos de hepatopatía crónica, encontrando en todos los casos resultados significativamente mayores en los pacientes en los que se detectaron estigmas de hepatopatía. Estos hallazgos entran dentro de lo esperado teniendo en cuenta que ya hemos visto que el porcentaje de pacientes que presentan signos ecográficos de hepatopatía es superior en los grupos correspondientes al mayor grado de fibrosis, y por otro lado los valores más altos de estos biomarcadores y del ELF corresponden igualmente a los grupos con más fibrosis.

iii. Estudio de correlaciones

El estudio de correlaciones reveló resultados significativos del HA, el TIMP-1 y el ELF con la edad. Estos resultados coinciden con los aportados por *Lichtinghagen y cols.* (232), cuyo trabajo refleja que los valores de ELF y HA aumentan con la edad, aunque a diferencia de nosotros también indican estos resultados para el PIIINP. También en el estudio de *Rosenberg y cols.* (190), donde se diseñó el algoritmo ELF original, se indica la dependencia del HA y la edad, y así mismo se incluye la edad como parte del ELF. Igualmente el trabajo de *Fagan y cols.* (236) corrobora nuestros resultados, pues indica que el ELF aumenta con la edad y que en sujetos con edad ≥ 45 años los valores de ELF podrían sobreestimar el verdadero grado de fibrosis hepática. Ninguna de las publicaciones sin embargo indica una relación significativa entre la edad y el TIMP-1.

La relación entre los valores de ELF, HA, TIMP-1 y la edad no es inesperada, puesto que el aumento de la edad se asocia con la progresión de la fibrosis, tal vez debido a la mayor vulnerabilidad a los factores ambientales, particularmente el estrés oxidativo. Igualmente, los trastornos inflamatorios crónicos extrahepáticos, incluyendo las enfermedades cardiovasculares son más comunes en las poblaciones de edad avanzada (236). Sin embargo estos resultados discrepan con los aportados por *Yoo y cols.* (233), que indican que los valores de ELF son equivalentes en función de la edad y así mismo con los reflejados en los trabajos de *Guha y cols.* (71) y *Parkes y cols.* (191), que validaron el algoritmo ELF original y lo simplificaron eliminando la edad sin que la exactitud diagnóstica se viese afectada.

El estudio de *Knudsen y cols.* (234) refleja una discreta pero significativa diferencia en los valores de PIIINP en pacientes sanos en función de la edad, y establece dos rangos de referencia correspondientes a 18-40 y 41-70 años. Estos resultados discrepan con los nuestros, puesto que no encontramos diferencias en el caso del PIIINP, aunque debemos tener en cuenta que la media de edad de nuestros pacientes es 48 años, lo que explicaría la homogeneidad de los resultados en este sentido. Teniendo en cuenta todos estos datos, es obvio que los valores de ELF y también los de HA, PIIINP y TIMP-1, deben interpretarse con cautela en función de la edad.

No encontramos asociación entre la carga viral de los pacientes y las concentraciones de HA, PIIINP y TIMP-1, ni tampoco con los valores del algoritmo ELF. Inicialmente varios estudios sugerían la asociación entre la carga viral alta y una enfermedad más agresiva, pero en la actualidad se ha descartado esta hipótesis. La mayoría de estudios transversales no han demostrado que exista una correlación entre niveles altos de viremia y mayor grado de fibrosis (237). De hecho, pacientes con transaminasas normales y escasa actividad histológica en la biopsia pueden presentar niveles altos de viremia. Teniendo esto en cuenta, no es extraño que no exista correlación entre la carga viral y los biomarcadores o algoritmos que marcan la progresión de la fibrosis.

Respecto a las correlaciones de los tres biomarcadores directos entre sí obtuvimos un resultado positivo significativo en todos los casos. Aunque de acuerdo a la propia naturaleza de los biomarcadores, el PIIINP y el TIMP-1 reflejan mejor la tasa de progresión

de la fibrosis que la fibrosis ya establecida, al contrario del HA, las tres moléculas muestran una relación positiva con el grado de fibrosis, lo que hace lógica su correlación en una población de pacientes con distintos grados de la misma.

En referencia a los parámetros hematológicos observamos diversas correlaciones significativas: los tres biomarcadores directos y el HA mostraron una correlación negativa con el recuento de plaquetas y el porcentaje de actividad de protrombina, y positiva con el INR. Además, el HA y el ELF correlacionaron con el porcentaje de linfocitos, el PIIINP y el ELF con el recuento de leucocitos totales, el TIMP-1 con el VCM y el PIIINP con la hemoglobina y el hematocrito. La relación entre estas variables hematológicas y la hepatopatía crónica, o más concretamente el grado de fibrosis hepática, es conocida y ya ha sido desarrollada con anterioridad, y justifica en primera instancia las correlaciones encontradas. Es difícil explicar con exactitud porqué determinadas variables correlacionan únicamente con alguno de los biomarcadores, aunque probablemente la asociación responda a las características intrínsecas del biomarcador. Por otra parte, debemos tener en cuenta el peso de las correlaciones que se observan con los tres biomarcadores, y así mismo, el valor añadido de las correlaciones del ELF, puesto que al englobar a los tres biomarcadores, refleja de manera directa los resultados encontrados de modo individual.

En referencia a los parámetros bioquímicos, constatamos una correlación significativa de los tres biomarcadores directos estudiados y del algoritmo ELF con la glucosa, la albúmina, la AST, ALP y GGT, y la α 2-macroglobulina. Así mismo, el ELF y el PIIINP correlacionaron con la bilirrubina, y el PIIINP además con el colesterol y la haptoglobina. También observamos una correlación de los triglicéridos con todas las variables a excepción del PIIINP, de la ALT con todas excepto con el HA y de la apoA-1 con todas a excepción del TIMP-1. Al igual que se acaba de comentar en el caso de las correlaciones con los parámetros hematológicos, la asociación de todas estas variables bioquímicas con la hepatopatía crónica y la fibrosis ya se ha desarrollado anteriormente en esta tesis.

Estas correlaciones responden a la relación de cada biomarcador con la función hepática. Las moléculas de síntesis hepática verán disminuida su concentración cuando la hepatopatía comprometa la capacidad metabólica del hígado. Este es el caso de la albúmina, la haptoglobina, el colesterol y la apoA-1. En el caso de los lípidos, existen

además estudios que han reflejado, que de manera independiente a la síntesis hepática, que generalmente no se ve comprometida hasta estadíos avanzados de la enfermedad, factores relacionados con el virus provocan alteraciones en el perfil lipídico (171;173) y que por tanto podrían afectar también a los triglicéridos. En el caso de α 2-macroglobulina, se ha demostrado que aunque se sintetiza localmente por los hepatocitos y las HSC, su producción aumenta ante la presencia de inflamación y fibrosis hepática. Esta relación inversa con respecto al resto de proteínas de síntesis hepática, responde a la acción de diversas citoquinas, como es el caso del HGF, el cual estimula la síntesis de la α 2-macroglobulina durante la respuesta de fase aguda y la fibrogénesis, y por el contrario disminuye la producción de haptoglobina (153). En el caso de la bilirrubina, su aumento es el resultado de una reducción de la excreción hepática y de la disminución de la circulación enterohepática atribuible a la derivación sistémica portal (181). En referencia a la glucosa ya se ha indicado que su relación con la fibrosis podría corresponder a un estado de hiperinsulinismo, el cual se ha visto que aumenta la tasa de progresión de la fibrosis (224). Las enzimas hepáticas se relacionan de manera directa con la evaluación del daño hepático, englobando, en función de las características de cada una de ellas, el patrón de daño hepatocelular, colestásico o mixto. Estas razones explican la asociación positiva o negativa de las diferentes variables con el grado de fibrosis hepática, y por tanto con los biomarcadores que marcan la evolución de la fibrosis, como es el caso del HA, PIIINP y TIMP-1 y así mismo del ELF, que engloba a los tres.

Por otra parte estudiamos las correlaciones del HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF con el resto de algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis, y tal como se ha reflejado en los resultados, encontramos un valor significativo en todos los casos. Para evaluar estos resultados es necesario, en primer lugar, tener presente los biomarcadores incluídos en cada uno de los algoritmos, puesto que algunos de ellos incluyen el HA, lo que explicaría en primera instancia algunas correlaciones con el HA y el ELF; este es el caso de los algoritmos Fibrometer y Hepascore. Además, también se presupone la correlación con el ELF con aquellos algoritmos que muestran una correlación significativa con algunos de los tres biomarcadores directos, ya que el ELF los incluye en su fórmula. Partiendo de estas premisas, los resultados encontrados reflejan la capacidad de estos algoritmos para distinguir el grado de fibrosis hepática, propiedad que también se les

atribuye al HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF. Además, todos los algoritmos han sido diseñados con el mismo objetivo y en cohortes de pacientes con características similares. Aunque cada uno de ellos incluye en su fórmula distintos parámetros, todos son biomarcadores cuya relación con el grado de compromiso hepático y la fibrosis se ha demostrado. Por tanto, al margen de rendimiento diagnóstico que presenten, la asociación parece evidente.

En el caso de la velocidad de onda de corte proporcionada por la técnica Arfi, encontramos una correlación significativa con los tres biomarcadores directos y con el ELF, lo cual enfatiza la relación de la Vc con el grado de fibrosis hepática. Además, la correlación denota la asociación entre dos fenómenos distintos provocados por el mismo factor, la fibrosis, como son la alteración de las propiedades mecánicas del hígado, que implican una elasticidad determinada y por tanto una Vc concreta, y las alteraciones bioquímicas del tejido que reflejan los cambios en las concentraciones de los biomarcadores.

iv. Regresión lineal múltiple

Para estudiar la influencia que ejercen el resto de variables continuas, tanto clínicas como de laboratorio, sobre el HA, PIIINP y TIMP-1 y sobre el algoritmo ELF, realizamos un análisis de regresión lineal múltiple.

Mediante el análisis de regresión lineal del HA calculamos una ecuación que incluyó las variables edad, PIIINP, TIMP-1, recuento de plaquetas, ACTPR, albúmina, AST, ALP, α 2-macroglobulina y Vc, y que explicaba los valores de este biomarcador en un 46,9%. Sin embargo, de entre las variables incluidas en la ecuación, en el análisis multivariado únicamente resultaron significativas la albúmina y la AST.

El HA ha sido ampliamente estudiado como biomarcador de fibrosis hepática, atribuyéndosele principalmente la capacidad de discriminar cirrosis (155). Por tanto, es lógico que sus niveles se vean influenciados por las concentraciones de albúmina y AST, dos biomarcadores ampliamente descritos en este sentido. La progresión de la fibrosis hepática puede reducir el aclaramiento de AST, lo que lleva a un aumento de sus niveles en suero. Además, la enfermedad hepática avanzada suele estar asociada con lesión mitocondrial, lo que resulta en una liberación más marcada de AST, que está presente en

la mitocondria y el citoplasma, en relación con la ALT (168). Por otro lado la albúmina, debido a que se sintetiza exclusivamente en el hígado, es un indicador sensible de cirrosis hepática.

En el caso del PIIINP, la ecuación de regresión lineal incluyó las variables HA, TIMP-1, recuento de plaquetas, leucocitos totales, albúmina, colesterol, AST, ALP, α 2-macroglobulina y Vc, y explicaba los valores de este biomarcador en un 47,4%. En análisis multivariado reveló como significativos únicamente los valores de plaquetas y AST. Esta asociación refleja la capacidad de detectar fibrosis de los tres biomarcadores. En el caso del recuento de plaquetas y la AST debe indicarse que, de entre los biomarcadores indirectos, son dos de los que mayor capacidad predictiva de fibrosis, y especialmente de cirrosis han demostrado. Prueba de ello es que sean los dos únicos biomarcadores que conforman el algoritmo Apri (168).

En el análisis de regresión lineal del TIMP-1 se incluyeron las variables edad, HA, PIIINP, VCM, albúmina, AST, ALT, GGT, α 2-macroglobulina y Vc. La ecuación calculada definió la concentración de TIMP-1 en un 57,6%. Tras realizar el análisis multivariado resultaron significativas las variables VCM, α 2-macroglobulina y Vc. Este resultado enfatiza la asociación que ya se había encontrado en el estudio de correlaciones.

Mediante el análisis de regresión lineal del ELF calculamos una ecuación que incluyó las variables edad, recuento de plaquetas y de leucocitos totales, albúmina, AST, ALT, ALP, GGT, α 2-macroglobulina y Vc. La ecuación explicaba los valores de ELF en un 58,9%. En el análisis multivariado resultaron significativas únicamente la albúmina, la α 2-macroglobulina y la Vc. Con respecto a la edad, el hecho de que no resulte significativa en el análisis multivariado nos lleva de nuevo al dilema planteado en el estudio de correlaciones. Recordemos que los estudios de *Lichtinghagen y cols.* (232) y *Fagan y cols.* (236) indican que la edad del paciente afecta a los valores de ELF, mientras que *Yoo y cols.* (233) indican lo contrario. En nuestro caso, a pesar de existir una correlación positiva significativa, el análisis de regresión lineal multivariado no resulta significativo. Sin embargo no debemos olvidar que los estudios que indican que los valores de ELF aumentan con la edad utilizan una población con un rango de edad muy amplio, mientras

que nuestra población es homogénea en ese sentido, lo que limita el valor real de la influencia que podría ejercer la edad.

Así mismo, en el trabajo de *Yoo y cols.* (233) el análisis de regresión multivariado refleja que el recuento de plaquetas es el único factor predictor del valor de ELF, aunque la influencia ejercida es discreta. Estos autores indican sin embargo, que puesto que el estudio se ha realizado en pacientes sanos, con valores de plaquetas normales, esta influencia debe ser validada en otras poblaciones. Este hallazgo no ha sido reportado por otros autores. En nuestro caso, el recuento de plaquetas resultó significativo en el análisis univariado, pero no en el multivariado.

También se indica en el trabajo de *Lichtinghagen y cols.* (232) que los valores de ELF determinados en pacientes sanos podrían sufrir ligeras variaciones a lo largo del día, encontrándose valores más altos por la tarde. Este hallazgo parece ser dependiente de la ingesta alimentaria y originado fundamentalmente por fluctuaciones en el HA. Sin embargo, la variabilidad en los valores de ELF era discreta, y comparable a la encontrada en otras variables, como por ejemplo las aminotransferasas, por lo que los autores no creyeron necesario recomendar la determinación de ELF en condiciones de ayuno. En nuestro caso, todas las muestras de recogieron en ayunas, por lo que limitamos las interferencias en este sentido.

5.1.3 Objetivo 3

Con el propósito de evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores y de los algoritmos matemáticos en la evaluación de la hepatopatía de nuestra población realizamos un estudio de curvas ROC. Para ello tomamos como variables de estado la identificación de fibrosis significativa (grado $\geq F2$; es decir, identificación de los grupos dos y tres frente al grupo uno) y de cirrosis (grado F4; es decir, identificación del grupo tres).

La evaluación del grado de fibrosis hepática en los pacientes con hepatopatía crónica por VHC es determinante a la hora de establecer la progresión de la enfermedad, efectuar un pronóstico y tomar decisiones terapéuticas. Concretamente, la identificación de fibrosis significativa y cirrosis en estos pacientes reviste mucha importancia desde el punto de vista clínico.

Aunque todos los pacientes con VHC son candidatos potenciales a recibir tratamiento, el hecho de que el curso de la enfermedad sea generalmente lento e inicialmente sin complicaciones, y además, que los tratamientos actuales impliquen efectos adversos importantes, no aseguren un 100% de curación y supongan un elevado gasto económico, ha determinado que la mayoría de guías clínicas recomienden prescribir la terapia antiviral en el momento en el cual el enfermo presente un grado de fibrosis significativo. Aquí radica la importancia de controlar periódicamente al paciente y detectar el momento en el cual su fibrosis alcance el estadio F2. Por otra parte, la detección del momento en el que el paciente desarrolla cirrosis es de vital importancia. Ya se han desarrollado las implicaciones fisiopatológicas que conlleva la cirrosis hepática, pero también es importante la actuación clínica que implica su diagnóstico. En el momento en que se detecta cirrosis hepática en uno de estos pacientes, los controles periódicos de la enfermedad se hacen mucho más exhaustivos, sometiendo al enfermo a programas de cribado para la detección precoz de varices gastroesofágicas y carcinoma hepatocelular.

Estos son las razones por las que, hemos fijado como objetivo diagnóstico la identificación de fibrosis significativa y cirrosis. Así se han diseñado la inmensa mayoría de los estudios clínicos para evaluar métodos diagnósticos de fibrosis hepática, y aunque algunos de ellos también incluyen puntos de corte para la identificación de estadios intermedios, existe un consenso importante en que la verdadera importancia clínica radica en la correcta identificación de fibrosis significativa y cirrosis.

i. Biomarcadores indirectos

Al evaluar los biomarcadores indirectos para la identificación de fibrosis significativa encontramos que el recuento de plaquetas, la ACTPR, la albúmina, las enzimas AST y GGT y la α 2-macroglobulina aportaron un área bajo la curva (AUC) significativa. Sin embargo, el valor de las áreas en ninguno de los casos es demasiado elevado, y ni siquiera la albúmina, que es la variable que obtiene un valor más alto, alcanza el 0,8, punto que muchas publicaciones científicas refieren como el valor mínimo desde el punto de vista clínico.

Por otro lado, se estableció como punto de corte óptimo para cada una de las variables aquel que aportase la mejor relación entre sensibilidad y especificidad. Al igual que ocurrió al valorar las AUCs, los resultados de sensibilidad y especificidad asociados a los puntos de corte tampoco resultaron muy satisfactorios. Esto quedó patente al evaluar el índice de Youden de cada una de las variables. Este índice, cuyos valores oscilan entre (-1) y (1), evalúa de sensibilidad y especificidad de manera dual, y se considera mejor cuanto más se acerque su valor a uno, y en este caso la albúmina, aun aportando el mejor resultado, no alcanza el 0,5.

Por otra parte, al realizar una comparación entre estas variables que aportaron resultados significativos, no encontramos en ningún caso diferencias estadísticamente significativas. Si bien la albúmina, como ya se ha comentado, aportó el mejor valor de área bajo la curva y la mejor relación sensibilidad-especificidad.

Por tanto, estos resultados indican que, aunque alguno de los biomarcadores indirectos ha aportado valores de área bajo la curva significativos en la identificación de un estado de fibrosis $\geq F2$, desde el punto de vista clínico y valorando los resultados de sensibilidad y especificidad asociados al punto de corte escogido, ninguno se considera suficientemente confiable.

En el caso de la identificación de cirrosis, como es lógico, encontramos más variables que aportaron resultados de AUC significativos; el recuento de plaquetas, la ACTPR, la albúmina, las enzimas AST, ALT, GGT y ALP, la haptoglobina y la $\alpha 2$ -macroglobulina. Los valores de área bajo la curva son superiores a los encontrados en la identificación de fibrosis significativa, pero de nuevo ninguno de ellos alcanza el 0,8. Las variables que aportaron los valores más próximos fueron el recuento de plaquetas (AUC=0,771; $p=0,0001$) y la AST (AUC=0,788; $p=0,0001$).

Al valorar los índices de youden obtenidos de acuerdo a los puntos de corte fijados para cada una de las variables, el recuento de plaquetas y la AST aportaron de nuevo los mejores resultados, un índice de 0,52 y 0,50 respectivamente. Sin embargo no encontramos diferencias significativas al comparar las variables.

Los biomarcadores indirectos de fibrosis, son parámetros que de una u otra manera evalúan la función hepática. No son por tanto específicos del desarrollo de fibrosis, pero presentan sin embargo la enorme ventaja de ser magnitudes disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos y realizarse de manera rutinaria en el seguimiento de los enfermos con hepatopatía crónica. Su rendimiento en la estimación del grado de fibrosis es muy limitado, suponiendo su mayor utilidad, inicialmente el cribado de hepatopatía, y posteriormente su capacidad para descartar cirrosis. En este sentido, los biomarcadores indirectos seguirán realizándose de manera rutinaria a este tipo de pacientes, así como para la estimación del grado de fibrosis pero formando parte de algoritmos que combinen varios biomarcadores.

Existe bastante consenso acerca de que el valor de estos biomarcadores por sí solos en el diagnóstico de la fibrosis es muy bajo, especialmente teniendo en cuenta que en la actualidad existen diversos algoritmos y técnicas elastográficas que han demostrado ser muy eficaces.

La mayoría de los estudios que han evaluado la utilidad clínica de la AST o ALT por sí solas en el diagnóstico de fibrosis hepática han concluido que son mediocres y clínicamente poco exactas (143). Por otro lado, tanto el recuento de plaquetas como la AST se han identificado en varios estudios como predictores independientes del grado de fibrosis, aunque finalmente se recomienda su inclusión en algoritmos que combinan varios biomarcadores, ya que suelen aportar mejores resultados que los biomarcadores individuales (168;171;178).

El estudio reciente de *Kayadibi y cols.* (221), llevado a cabo en una población de 202 pacientes con VHC, indica que los valores de AUC aportados por el recuento de plaquetas y la AST son, 0,764 y 0,712 ($p < 0,001$) para el diagnóstico de fibrosis significativa, y 0,827 y 0,752 ($p < 0,001$) para el diagnóstico de cirrosis, aunque sin embargo únicamente el recuento de plaquetas se confirma como predictor independiente del grado de fibrosis y cirrosis. Los autores diseñan un algoritmo que combina las plaquetas, el Apri y el Forns, y el cual aporta el mejor resultado, por lo que recomiendan su uso frente al de biomarcadores individuales.

ii. *Biomarcadores directos*

Los valores de AUC para la identificación de fibrosis significativa aportados por los biomarcadores directos HA, PIIINP y TIMP-1 resultaron significativos en los tres casos. Aunque ninguna de las tres AUC alcanzó el 0,8, veremos que esto va en consonancia con lo encontrado en la mayoría de publicaciones.

En el caso del HA, un punto de corte de 75,31 ng/mL se asociaba a un 51,36% de sensibilidad y un 87,10% de especificidad. Para el PIIINP se fijó un punto de corte de 9,05 ng/mL, con un 74,32% de sensibilidad y un 67,74% de especificidad. Por último, para el TIMP-1, 285,9 ng/mL fue el punto de corte escogido, el cual se asoció con un 58,11% de sensibilidad y un 83,87% de especificidad. Al estudiar los índices de youden los tres resultados fueron muy similares (0,38, 0,42 y 0,43) y no encontramos diferencias significativas al comparar los tres biomarcadores.

En el caso de la identificación de cirrosis, de nuevo las AUCs de los tres biomarcadores resultaron significativas, aunque en este caso sí se apreciaron diferencias significativas, aportando los mejores resultados el TIMP-1 en comparación con los otros dos biomarcadores.

Los puntos de corte fijados para la identificación de cirrosis fueron 91,74 ng/mL (76,47% sensibilidad, 84,51% especificidad) para el HA, 12,31 ng/mL (64,71% sensibilidad, 84,51% especificidad) para el PIIINP y en el caso del TIMP-1, el mismo valor que para la identificación de fibrosis significativa, 285,9 ng/mL (97,06% sensibilidad, 78,87% especificidad). El mejor índice de youden (0,76) correspondió de nuevo al biomarcador TIMP-1.

Nuestros resultados son bastante concordantes con lo descrito en la literatura, aunque tampoco existe un consenso absoluto, y en muchos casos los resultados de las publicaciones muestran ciertas discrepancias.

En el trabajo de *McHutchison y cols.* (157) se establece que un punto de corte de 60 ng/mL de HA permite la detección cirrosis y/o fibrosis avanzada en un tercio de los pacientes.

Patel y cols. (238) analizan los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 en una cohorte de 294 pacientes con VHC para la identificación de fibrosis significativa, y refieren unos valores de AUC muy concordantes con nuestros resultados, de 0,821, 0,777 y 0,773 respectivamente.

En el estudio de *Leroy y cols.* (161) se analizan los biomarcadores HA, PIIINP, así como diversas metaloproteasas y sus inhibidores, incluido el TIMP-1, para la identificación de diversos grados de fibrosis en una cohorte de pacientes con VHC. Los autores indican que los mejores resultados de biomarcadores individuales son los aportados por el PIIINP y el HA. Reflejan que un punto de corte de 6 ng/mL de PIIINP permite la identificación de fibrosis significativa con un 47% de sensibilidad y un 93% de especificidad, mientras que para el HA el punto de corte escogido es 80 ng/mL, con una sensibilidad y especificidad asociadas del 43% y el 90% respectivamente. Estos datos están en la línea de nuestros resultados.

Así mismo, los resultados aportados con respecto al PIIINP en la publicación de *Parsian y cols.* (239), son bastante consonantes con los nuestros, aunque el valor del AUC, sensibilidad y especificidad que aportan estos autores son ligeramente superiores. Indican que el AUC del PIIINP para la detección de fibrosis significativa es de 0,911, estableciendo un punto de corte de 8,9 ng/mL, con una sensibilidad y especificidad del 89% y el 72% respectivamente.

Valva y cols. (228), al igual que nosotros, evalúan la utilidad de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 en una población de pacientes con VHC, e indican los siguientes puntos de corte para la detección de fibrosis significativa: 103,1 ng/mL para el HA (AUC=0,783, 66,7% sensibilidad, 90% especificidad), 9,1 ng/mL (AUC=0,792, 75% sensibilidad, 80% especificidad), para el PIIINP y 336,2 ng/mL en el caso del TIMP-1 (AUC=0,575, 41,7% sensibilidad, 80% especificidad).

En el trabajo de *Lichtinghagen y cols.* (232) se reflejan las AUCs de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 en la identificación de diversos estadios de fibrosis. Para la identificación de cirrosis indican unas AUCs de 0,96, 0,83 y 0,79 respectivamente. Aunque no indican los

puntos de corte óptimos, difieren con nuestros hallazgos, ya que nuestro mejor resultado es el referente al TIMP-1, mientras que en su caso es el correspondiente al HA.

Jeong y cols. (229) en su estudio publicado en 2014, aunque no reflejan los puntos de corte, indican unas AUCs correspondientes al HA similares a las nuestras, 0,812 y 0,879 para el diagnóstico de fibrosis significativa y cirrosis respectivamente. La población de estudio se compuso de 70 pacientes con hepatopatía crónica, de los cuales el 25,7% correspondían a pacientes infectados por el VHC.

De los datos reflejados en la literatura se deduce que estos tres biomarcadores directos aportan buenos resultados en la identificación de fibrosis significativa y cirrosis, aunque sin embargo no existe unanimidad en los puntos de corte escogidos ni tampoco en la decisión de cuál de los biomarcadores es más adecuado.

Debemos tener en cuenta que los valores de AUCs son en general buenos, especialmente para la identificación de cirrosis, y que en la mayoría de los casos no se observan diferencias significativas al comparar los tres biomarcadores, por lo que los autores no siempre de decantan por un único biomarcador.

Con respecto al punto de corte, no es del todo adecuado comparar los resultados de unos y otros estudios de manera absoluta, pues cada autor escoge el punto de corte de acuerdo a diferentes criterios, lo que puede provocar discrepancias significativas en los valores aportados de sensibilidad y especificidad. En nuestro caso, el punto de corte se eligió de acuerdo al índice de Youden, es decir, de acuerdo a la mejor relación sensibilidad-especificidad, pero no todos los autores de lo hacen de igual manera.

Así mismo debe tenerse en cuenta que las diferencias en las características de la población también pueden afectar a los resultados. Ya que en la mayoría de casos las poblaciones son de un tamaño diferente, presentan distintas proporciones de los diferentes estadios de fibrosis, pudiendo incluso utilizar distintos sistemas de gradación histológica que provocan sesgos en la comparación de los grupos, no es extraño encontrar variaciones en los valores de AUCs asociados a cada biomarcador, teniendo en cuenta además que todos aportan un resultado significativo.

Aunque según diversas publicaciones la mejor aportación del HA como biomarcador es la capacidad de distinguir cirrosis, en nuestro caso los mejores resultados en la identificación de cirrosis los aportó el TIMP-1. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el HA también aporta un valor de AUC significativo, y en realidad muy cercano al del TIMP-1. Además, también existen estudios que reflejan la utilidad del TIMP-1 en la identificación de cirrosis, indicando incluso su capacidad de predecir la aparición de complicaciones hemodinámicas relacionadas (240).

iii. Algoritmos matemáticos

El análisis de curvas ROC para la identificación de fibrosis significativa de los algoritmos matemáticos evaluados, es decir, ELF, Apri, Forns, Fibrotest, Fibrometer, Fib-4, Fibro-Q y Hepascore, aportó resultados significativos en todos los casos. El algoritmo Via Index no se tuvo en cuenta en este apartado, puesto que incluye en su fórmula la Vc, parámetro en base al cual nosotros hemos dividido a los pacientes en grupos.

Los algoritmos que reflejaron un mejor resultado fueron el ELF y el Fibrometer, con unas AUCs de 0,743 ($p=0,0001$) y 0,748 ($p=0,0001$) respectivamente. Por otra parte, el Apri y el Fibro-Q aportaron las AUCs más bajas, de 0,633 ($p=0,004$) y 0,688 ($p=0,003$) respectivamente. Sin embargo, el estudio de comparación de las curvas ROC de los algoritmos evaluados no reveló diferencias significativas.

En el caso del ELF, el punto de corte escogido fue 9,75, el cual permitía la identificación de fibrosis significativa con una sensibilidad del 59,46% y una especificidad del 87,10%, siendo además el índice de youden obtenido (0,46) el más alto con respecto a todos los demás algoritmos. El valor predictivo positivo fue muy elevado, del 91,7%, y el predictivo negativo del 47,4%.

En el caso de la identificación de cirrosis, de nuevo todos los algoritmos aportaron una AUC significativa, aunque en este caso los mejores resultados correspondieron al ELF y al Hepascore, con valores de 0,852 ($p=0,0001$) y 0,816 ($p=0,0001$) respectivamente. Los valores más bajos fueron los aportados por el Fibrotest (AUC=0,777, $p=0,0001$) y el FibroQ (AUC=0,754, $p=0,0001$). El estudio de comparación entre las AUCs de todos los algoritmos no mostró resultados significativos.

El punto de corte escogido para el algoritmo ELF para la detección de cirrosis fue de 10,04, con una sensibilidad y especificidad asociadas del 82,35% y 80,28% respectivamente, y de nuevo el índice de youden obtenido, 0,63, fue el superior con respecto a los demás algoritmos.

Aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas, es evidente que el algoritmo ELF aporta los mejores resultados, de acuerdo a los valores superiores de AUC, sensibilidad y especificidad, tanto para la identificación de fibrosis significativa como cirrosis. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura.

Friedrich-Rust y cols. (241) realizan un estudio en una población de 74 pacientes con hepatopatía crónica, de los cuales el 48,64% son enfermos con VHC y reflejan unos resultados muy coincidentes con los nuestros. Los valores que obtienen para el AUC del ELF en la identificación de fibrosis significativa y cirrosis son 0,78 y 0,92 respectivamente. Así mismo, cuando se limitan al grupo de pacientes con VHC, un punto de corte de 9,78 de ELF permite la identificación de fibrosis significativa con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 80%, mientras que un punto de corte de 10,31 supone la detección de cirrosis con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 63%.

En el trabajo de *Parkes y cols.* (191), un valor de ELF de 10,22 permite la identificación de fibrosis severa con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 85% en una población de validación de 347 pacientes con VHC. Debemos tener en cuenta que los autores incluyen en la denominación de fibrosis severa los estadios F3 y F4 de la escala Metavir, lo que no coincide exactamente con nuestros grupos de estudio, si bien el punto de corte de ELF se encuentra muy en la línea de nuestros resultados.

Así mismo, nuestros resultados son muy concordantes con los reflejados en el trabajo de *Crespo y cols.* (242), donde se señalan unos puntos de corte de ELF de 9,4 para la identificación de fibrosis significativa (75% sensibilidad, 68% especificidad) y de 10,3 para la identificación de cirrosis (92% sensibilidad, 72% especificidad).

Lichtinghagen y cols. (232) refieren con respecto al ELF en su trabajo llevado a cabo en una población de 79 pacientes con VHC, un valor de 9,8 para la identificación de fibrosis significativa con una sensibilidad del 84,6% y una especificidad del 75%, y un valor de 11,3

para detectar cirrosis, con una sensibilidad y especificidad asociadas del 32,9 y 100% respectivamente. Comparándolo con nuestros resultados observamos que el punto de corte bajo es prácticamente idéntico al nuestro (9,8 vs 9,75), pero el punto de corte alto para el diagnóstico de cirrosis es ligeramente superior (10,04 vs 11,3), aunque este incremento se produce a costa de aumentar la especificidad, pero disminuir drásticamente la sensibilidad con respecto a nuestros resultados (82,53% sensibilidad, 80,28% especificidad).

También nuestros resultados son muy concordantes con los de *Fernandes y cols* (193). Estos autores encuentran, en una cohorte de 120 pacientes con VHC, un AUC de 0,81 para la identificación de fibrosis significativa (punto de corte 9,55; 72,2% sensibilidad, 83% especificidad) y de 0,78 para la identificación de cirrosis (punto de corte 10,44; 87,5% sensibilidad, 77,6% especificidad).

De todo lo anterior se deduce que algoritmo ELF aporta buenos resultados en la identificación de fibrosis significativa y cirrosis en pacientes con hepatopatía por VHC. Además, los puntos de corte reflejados en las diferentes publicaciones son muy coincidentes. Las pequeñas variaciones observadas pueden atribuirse a las diferentes prevalencias de fibrosis significativa y cirrosis de las poblaciones de los diferentes estudios.

Por otro lado, como parte final del objetivo tres, realizamos un estudio de comparación entre las curvas ROC de los biomarcadores indirectos, los directos, y los algoritmos. Para ello incluimos las dos variables que hubiesen aportado los valores de AUC más altos de cada uno de los grupos, tanto para la detección de fibrosis significativa como de cirrosis. En el caso de fibrosis significativa no se observaron diferencias, mientras que en el caso de cirrosis el TIMP-1 aportó el mejor resultado, mostrando su AUC diferencias significativas con respecto a las demás variables.

Aunque no hemos encontrado ninguna publicación en la que se evalúen todos estos biomarcadores y algoritmos de manera conjunta, la mayoría de los estudios que incluyen varios de ellos aportan resultados bastante similares a los nuestros, indicando

AUCs muy semejantes que, o se muestran equivalentes, o en todo caso muestran diferencias discretas.

En el trabajo de *Koda y cols.* (226) los algoritmos Apri y Forns aportan valores de AUC idénticos para la detección de fibrosis significativa en pacientes con VHC. Así mismo, *Hsieh y cols.* (186) reflejan unos valores de AUC del los algoritmos Apri y Fib-4 muy similares (0,651 y 0,785), si bien no realizan el estudio de comparación entre ambos. Por otro lado, en el estudio de *Jeong y cols.* (229) el algoritmo Apri se muestra comparable al biomarcador directo HA para la identificación de fibrosis significativa, aunque por el contrario, en el caso de la identificación de cirrosis el HA aporta un AUC significativamente superior. El trabajo de *Petersen y cols.* (231) publicado en 2014 revela que no existen diferencias entre los algoritmos ELF y Apri para la identificación de fibrosis significativa.

5.1.4 Objetivo 4

Las técnicas de evaluación no invasiva de la fibrosis hepática han evolucionado enormemente en los últimos años. El diagnóstico y seguimiento de las enfermedades hepáticas ha dependido durante mucho tiempo de la biopsia, pero en la actualidad cada vez es más patente que el valor de esta técnica para evaluar la gravedad de las hepatopatías, y especialmente para el seguimiento de la progresión de la enfermedad, es muy limitado.

Aunque la biopsia continúa siendo el estándar de oro para la gradación de la fibrosis hepática, ya se ha explicado que este procedimiento tiene varias limitaciones. En primer lugar, la biopsia hepática supone una porción extremadamente pequeña del hígado, lo que provoca que puedan ocurrir errores de muestreo. Además, el examen histológico está sujeto a la variabilidad intra e interobservador. Por último, la biopsia hepática es un procedimiento invasivo con una morbilidad asociada, que va desde el dolor, que se produce en el 20% de los pacientes, a las complicaciones mayores, que pueden ocurrir en el 0,5% de los casos. Por esta última razón, la biopsia hepática es muy mal tolerada, teniendo en cuenta además, que en muchas ocasiones los pacientes son conscientes de la

disponibilidad de métodos no invasivos y por lo tanto son reacios a someterse al procedimiento (243).

La evaluación no invasiva de la fibrosis hepática ya es una realidad en pacientes con hepatitis crónica C, y prueba de ello es que, en una gran mayoría de los enfermos, el seguimiento evolutivo de la enfermedad se lleva a cabo sin realizar biopsia hepática. Sin embargo, los principales problemas en esta área incluyen la falta de un estándar de oro real para validar las pruebas y el constante crecimiento en el número de técnicas y algoritmos diagnósticos, que no siempre son correctamente validados por lo que no acaban de incorporarse a la práctica clínica diaria.

Las técnicas no invasivas desarrolladas hasta la actualidad incluyen los biomarcadores de laboratorio, y las técnicas de imagen. Aunque de manera global, los resultados obtenidos en ambos campos son buenos, diversos autores ya han señalado que los mejores resultados podrían obtenerse con la combinación de dos técnicas no invasivas (197;242;244). En este sentido diseñamos cuatro algoritmos diagnósticos que combinasen los biomarcadores directos, los indirectos y el estudio radiodiagnóstico, y evaluamos la utilidad que aportarían en la evaluación del grado de fibrosis hepática en nuestra cohorte de pacientes.

El hecho de que hubiésemos utilizado la Vc proporcionada por la técnica Arfi como parámetro para la clasificación del grado de fibrosis de los pacientes supuso una limitación para el desarrollo de este objetivo, ya que implicó el impedimento de su inclusión en los modelos diagnósticos. Creemos que un modelo combinado de los biomarcadores y la Vc hubiese aportado muy buenos resultados. En su lugar decidimos incluir los parámetros ecográficos, y, aunque a priori sabemos que la técnica Arfi aporta mejores resultados que la ecografía en la gradación de la fibrosis, creemos que la utilización de las variables ecográficas también supone ciertas ventajas. La ecografía es una técnica mucho más accesible y disponible que el Arfi, ya que esta última suele realizarse únicamente en centros de referencia. Además, el Arfi debe realizarse por radiólogos expertos entrenados en el procedimiento, mientras que la ecografía es una técnica menos limitada en este sentido. Por todo esto, un modelo que combinase los biomarcadores y la ecografía tendría la clara ventaja de una mayor disponibilidad,

pudiendo aplicarse incluso desde atención primaria, y derivando posteriormente a centros de referencia a los pacientes que lo precisasen.

Por tanto, elaboramos cuatro modelos diagnósticos que predijesen la probabilidad o riesgo de que un paciente con hepatopatía crónica por VHC tuviese fibrosis hepática significativa, equivalente a un grado \geq F2 de la escala Metavir. Para ello realizamos regresión logística binaria. El primer modelo comprendió variables clínicas, parámetros hematológicos y los biomarcadores utilizados en la práctica clínica habitual, es decir, los biomarcadores indirectos de fibrosis. El segundo modelo resultó de la inclusión en el modelo anterior de los parámetros derivados del estudio ecográfico. En el tercer modelo tuvimos en cuenta variables clínicas, parámetros hematológicos, y en referencia a los biomarcadores de fibrosis, los indirectos y el algoritmo ELF. El cuarto y último modelo supuso la adición de los parámetros ecográficos al modelo tres.

Se realizó un análisis de regresión logística tomando como variable dependiente el diagnóstico de fibrosis significativa. Como variables independientes, las variables comunes incluidas en los cuatro modelos fueron la edad, la hemoglobina, el recuento de plaquetas, la albúmina, la AST y la α 2-macroglobulina; a mayores se incluyó la presencia de superficie hepática nodular en los modelos dos y cuatro, y el porcentaje de linfocitos y el ELF en los modelos tres y cuatro. La implicación de estas variables con la fibrosis hepática ya se ha desarrollado en profundidad.

Al analizar el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes aportado por cada uno de los modelos, observamos que la adición de las variables ecográficas no supuso incremento con respecto al modelo homólogo conformado únicamente por biomarcadores (79% vs 78,1% en los modelos 1 y 2; 83,8% vs 83,8% en los modelos 3 y 4). Sin embargo, sí observamos un aumento del porcentaje de clasificación correcta al comparar el modelo con algoritmo ELF frente al que incluía únicamente biomarcadores indirectos, es decir, el tres frente al uno (83,% vs 78,1%). Por otro lado, de acuerdo a los coeficientes de determinación obtenidos, los porcentajes en los que los modelos explicaban la probabilidad de presentar fibrosis significativa fueron 39,7%, 41,1%, 53,1% y 54,3% respectivamente para los modelos 1, 2, 3 y 4, por lo que observamos que los modelos con algoritmo ELF (3 y 4) presentan los mayores porcentajes. Estos datos

concuerdan con las AUCs obtenidas para cada modelo, de entre las cuales, aunque todas resultaron significativas (0,820, 0,827, 0,886, 0,895; $p=0,0001$), los mejores resultados corresponden a los modelos con algoritmo ELF.

Por otro lado, los tres modelos presentaron un nivel de calibración adecuado de acuerdo al resultado del test de Hosmer-Lemeshow. La calibración es una medida que expresa la concordancia entre los resultados observados y las predicciones del modelo. En otras palabras, es la capacidad del modelo de producir estimaciones no sesgadas de la probabilidad del evento o variable de valoración, en nuestro caso la identificación de un grado de fibrosis hepática $\geq F2$.

Al comparar la utilidad de los cuatro modelos mediante la diferencia de áreas y el IDI, los resultados corroboraron los datos referentes al porcentaje de clasificación correcto. No se observaron diferencias significativas al comparar los modelos con ecografía frente a aquellos que solo incluían biomarcadores (1 vs 2 y 3 vs 4), pero por el contrario, los modelos con algoritmo ELF aportaron resultados significativamente superiores a los que incluían únicamente biomarcadores indirectos (1 vs 3 y 2 vs 4).

Es evidente, según los resultados aportados, que para la detección de fibrosis significativa la utilización de un modelo que combina biomarcadores indirectos y directos aporta mejores resultados que el uso de los biomarcadores individuales. Las AUCs de los cuatro modelos son superiores a cualquiera de las aportadas por los biomarcadores o algoritmos de manera aislada. Por otra parte, los modelos que incluyen los biomarcadores directos combinados mediante el algoritmo ELF aportan resultados significativamente mejores, y de entre ellos, la adición de parámetros ecográficos no supone un aumento del rendimiento diagnóstico. Esto va en relación con el hecho de que, la sensibilidad y especificidad de los signos ecográficos de hepatopatía crónica es limitada en los estadios poco avanzados de la enfermedad, por lo que no aportan un valor añadido en la determinación de un grado de fibrosis intermedio, como es el F2.

Teniendo en cuenta lo anterior, de manera global el modelo más conveniente es el tres, que incluye biomarcadores indirectos y el algoritmo ELF. Así mismo, los altos valores de

sensibilidad (85,14%), especificidad (80,65%), VPP (91,3%) y VPN (64,9%) avalan la utilización de este modelo para la identificación de fibrosis significativa.

Por otro lado evaluamos los cuatro modelos diseñados para la detección de fibrosis significativa, para la identificación de cirrosis. En este caso, los cuatro modelos aportaron AUCs significativas, y de acuerdo a los puntos de corte escogidos, valores elevados de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (**tabla 69** de resultados).

Al comparar los cuatro modelos en la identificación de cirrosis, a diferencia de los resultados obtenidos en la identificación de fibrosis significativa, sí observamos diferencias significativas entre los modelos con ecografía frente a aquellos que solo incluían biomarcadores (1 vs 2 y 3 vs 4). Estos resultados concuerdan con lo descrito en los pacientes cirróticos, dónde los signos ecográficos son más evidentes y se presentan en mayor proporción que en los pacientes con estadíos previos de hepatopatía. Además, el signo ecográfico incluido en los modelos, la presencia de superficie hepática nodular, es uno de los que mayores resultados de sensibilidad y especificidad tiene documentadas en la identificación de fibrosis y cirrosis hepática (102-104). Así mismo, los modelos con algoritmo ELF aportaron resultados significativamente superiores frente a los modelos compuestos únicamente por biomarcadores indirectos (1 vs 3 y 2 vs 4). Esto también va en consonancia con lo descrito en la mayoría de las publicaciones, que reflejan mejores resultados para los biomarcadores directos o los algoritmos que combinan directos e indirectos frente a los biomarcadores indirectos de manera individual.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el mejor modelo para la identificación de cirrosis es el modelo cuatro, que incluye biomarcadores indirectos, el algoritmo ELF, y la superficie hepática nodular como signo ecográfico de hepatopatía crónica. Además, los altos valores de sensibilidad (83,68%), especificidad (80,65%), VPP (91,2%) y VPN (67,6%) avalan la utilización de este modelo para la identificación de cirrosis.

A pesar de los buenos resultados obtenidos, tanto para la identificación de fibrosis significativa como de cirrosis, creemos que para la implantación en la práctica clínica diaria de estos modelos serían necesarios estudios adicionales, que validasen su utilidad

en cohortes independientes de pacientes. Además, sería interesante establecer su utilidad en la evaluación del pronóstico de la hepatopatía, que en última instancia, es el punto final más relevante clínicamente.

La continuación de la investigación en esta área nos dará la oportunidad de ofrecer a nuestros pacientes herramientas de diagnóstico no invasivas más precisas. La biopsia hepática seguirá siendo parte de la práctica clínica en los próximos años, pero los avances en biomedicina desafiarán muchos de los supuestos asumidos desde hace décadas y probablemente cambiarán el enfoque actual de las enfermedades hepáticas. Todavía puede llegar el momento en que la biopsia hepática sea historia.

5.2 PACIENTES OBESOS SOMETIDOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA

La EHGNA es una de las causas más comunes de hepatopatía crónica en los países occidentales y se considera actualmente la enfermedad hepática pandémica del siglo XXI. Se calcula una incidencia aproximada de la enfermedad del 30% en la población general (245), estimándose que alrededor de mil millones de personas en el mundo la padecen. Se considera una condición compleja cuyo fenotipo refleja la interacción de factores ligados al estilo de vida, ambientales y genéticos.

La EHGNA abarca un espectro de enfermedades, incluyendo la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica, la fibrosis hepática, cirrosis y en última instancia el carcinoma hepatocelular. Se estima que alrededor de entre uno o dos de cada diez pacientes con EHGNA padece esteatohepatitis no alcohólica, entidad que con frecuencia evoluciona a los estadios más graves de la enfermedad. Un estudio reciente mostró que la cirrosis asociada a la esteatohepatitis no alcohólica es la tercera indicación de trasplante de hígado en los Estados Unidos, y se espera que sea para el año 2020 sea la primera indicación (77).

La obesidad se asocia de manera importante con el síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2, resultando en un incremento del riesgo de desarrollar EHGNA. La EHGNA es muy común en los pacientes con obesidad mórbida, en los cuales se ha encontrado una prevalencia de la enfermedad de entre el 75-100% (76).

El principal objetivo del manejo clínico de la EHGNA es mejorar la esteatosis y prevenir la fibrosis. Aunque no existe un tratamiento estándar, el manejo de los factores de riesgo como la obesidad, la dislipemia y la resistencia a la insulina es actualmente el abordaje terapéutico utilizado con mayor frecuencia. En este marco de actuación, la cirugía bariátrica se contempla como parte del tratamiento de la enfermedad, en aquellos pacientes con obesidad mórbida, o en grados menos importantes pero con comorbilidades asociadas.

La pérdida de peso después de la cirugía bariátrica tiene efectos beneficiosos sobre los componentes del síndrome metabólico incluyendo la mejora de sensibilidad a la insulina, el perfil lipídico, así como una reducción de la mortalidad a largo plazo. También tiene efectos específicos sobre la histología hepática, incluyendo la reducción de la esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis. La mayoría de los beneficios histológicos se producen dentro del primer año después de la cirugía (76;246).

La combinación de la alta prevalencia de la EHGNA dentro de los pacientes obesos, junto con la intervención de cirugía bariátrica a la que se someten, que permite obtener una muestra de biopsia hepática en el contexto de la cirugía, convierten a esta población en adecuada para la investigación de métodos no invasivos para la valoración de su hepatopatía crónica.

5.2.1 Objetivo 1

i. Características de la población global de estudio

a. Características demográficas y clínicas

La población de pacientes obesos incluida en este estudio es representativa de la población de pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica en nuestro hospital. Se incluyeron en este trabajo todos aquellos pacientes que se ajustaban a nuestros criterios de inclusión y no cumplían ninguno de los criterios de exclusión, suponiendo finalmente alrededor del 75% de la totalidad de los pacientes sometidos a este tipo de cirugía en nuestro hospital durante doce meses consecutivos.

La edad media de los 57 pacientes incluidos en nuestro estudio fue de 43,95 años, siendo el 75,4% de ellos mujeres. El IMC medio de la población fue 49,09 kg/m². Estos resultados se asemejan a los obtenidos en un reciente estudio de *Naevau y cols.*, que incluyó 100 pacientes obesos con sospecha de EGHNA sometidos a cirugía bariátrica (247), aunque el porcentaje de mujeres de este estudio fue ligeramente superior al nuestro (81%) y el IMC medio algo inferior (42,30 kg/m²).

Díez-Rodríguez y cols. publicaron en 2014 un estudio llevado a cabo en un hospital de nuestro país, cuyo objetivo era estudiar la relación entre el índice de adiposidad visceral y la EHGNA (248). Para ello se valieron de una población de 139 pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica. Los datos referentes a la edad, el sexo y el IMC de los pacientes encontrados en este estudio (edad media de 43,81 años, 71,9% de pacientes del sexo femenino e IMC medio de 46,83 kg/m²) también mostraron una gran concordancia con los nuestros.

Así mismo, se encontraron datos muy coincidentes en el estudio de *Feijó y cols.* (249), diseñado de manera similar al nuestro, que incluyó a sesenta pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica, donde se encontró una edad media de 38,4 años, un 73% de mujeres y un IMC medio de 44,2 kg/m².

En el año 2012 *Guzmán-Aroca y cols.* (250) publicaron otro estudio llevado a cabo por los servicios de cirugía y radiodiagnóstico de nuestro hospital, con el objetivo de evaluar la validez de la técnica Arfi en la valoración de la hepatopatía de este tipo de pacientes. Utilizaron una población de pacientes obesos mórbidos con sospecha de EHGNA sometidos a cirugía bariátrica, con criterios de inclusión y exclusión idénticos a los nuestros. En este caso la población se compuso de 32 pacientes, siendo un 56,25% hombres. Este porcentaje de pacientes varones discrepa no solo con el constatado en nuestro estudio, sino también con el reflejado en la mayoría de estudios de este tipo, donde el porcentaje de mujeres suele ser superior al de hombres. Esta diferencia podría deberse al reducido número de pacientes. En cuanto a la edad, en este estudio la media fue de 43,45 años, prácticamente idéntica a la nuestra. El IMC medio fue discretamente inferior al nuestro, 44,7 kg/m².

La edad, el sexo y el IMC medio de nuestros pacientes también fueron muy concordantes con los encontrados en otro estudio similar de *Pulzi y cols.* que incluyó 66 pacientes (40,7 años de edad media, 83,3% de mujeres y un IMC medio de 46,4 kg/m²) (251).

La coincidencia de la edad y el sexo de los pacientes de nuestra población de estudio con otros estudios similares confirman que nuestra población es representativa del tipo de paciente que se somete a este tipo de cirugía. La similitud en el IMC se presupone obvia, puesto los criterios de indicación de cirugía bariátrica se ciñen a un IMC determinado (≥ 40 kg/m² o ≥ 35 kg/m² en presencia de comorbilidades).

En cuanto a las comorbilidades que presentaban los pacientes, se observó la existencia de diabetes mellitus tipo 2 en el 24,6% de los pacientes, dislipemia en el 64,9%, hipertensión arterial en el 47,4% y síndrome metabólico en el 45,6%.

Estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura, donde se indica que la EHGNA se asocia de manera muy significativa con los componentes del síndrome metabólico. La asociación con la diabetes es muy fuerte, siendo ésta entre 5 y 9 veces más frecuente en pacientes con EHGNA frente a la población general. Por otra parte, más de dos tercios de los pacientes con DM2 padecen EHGNA, asociándose además con un peor pronóstico de la enfermedad (77). En referencia a la hipertensión arterial, se calcula que hasta el 70% de los pacientes con EHGNA son hipertensos (246). Por otro lado, la sobreproducción de VLDL que tiene lugar en la EHGNA se traduce en un perfil de dislipemia caracterizado por niveles elevados de triglicéridos, bajos de colesterol HDL y un aumento en las partículas de LDL pequeñas y densas, siendo la hipertrigliceridemia la alteración analítica más frecuente (252). Aproximadamente el 90% de los pacientes con EHGNA tienen más de un componente del síndrome metabólico, entre el 35 y el 75% cumple con los criterios diagnósticos y un tercio posee los cinco. Por ello, comparado con la población general, la prevalencia del SM se multiplica entre dos y tres veces en la EHGNA. Por otra parte, la presencia del SM predice un mayor riesgo de desarrollo de la EHGNA en ambos sexos, haciendo improbable la regresión de la infiltración grasa del hígado y facilitando la progresión hacia esteatohepatitis y fibrosis. Además, se ha comprobado que la prevalencia de EHGNA aumenta a medida que lo hacen los componentes del SM (77).

Los porcentajes de estas comorbilidades encontrados en nuestra población muestran ciertas discrepancias con los reflejados en el estudio de *Naveau y cols.* (247), donde se constata un 15% de diabetes, un 31% de HTA y un 38% de dislipemia. Los mayores porcentajes de estas comorbilidades existentes en nuestros pacientes podrían deberse al mayor IMC (49,09 vs 42,30 kg/m²) que presentan, lo cual va en íntima relación con el padecimiento de los criterios diagnósticos del síndrome metabólico.

La frecuencia de pacientes diabéticos, hipertensos y afectados de síndrome metabólico reflejada en el estudio español de *Díez-Rodríguez y cols.* (248) muestra una concordancia excelente con nuestros resultados. Nuestros resultados también se asemejan a los publicados por *Pulzi y cols.* (251), aunque nuestro porcentaje de pacientes con síndrome metabólico es ligeramente inferior (45,6% vs 56,06%).

En el estudio de *Feijó y cols.* (249) la mayoría de pacientes no son diabéticos (67%) y presentan dislipemia (51,7%), lo que coincide con nuestra población de estudio. Sin embargo sus pacientes son mayoritariamente hipertensos y presentan síndrome metabólico (56,6% y 65% respectivamente), lo que difiere con nuestra población. Si bien es cierto que la diferencia es pequeña y que nuestro porcentaje de pacientes hipertensos y con SM está muy próximo a alcanzar el 50%.

En referencia al estudio de *Guzmán-Aroca y cols.* (250) llevado a cabo en nuestro hospital, nuestros resultados concurren con respecto al porcentaje de pacientes hipertensos, pero si embargo discrepan en cuanto al porcentaje de pacientes diabéticos, que en su estudio supone el 62,5%. Teniendo en cuenta que el tamaño de su población supone prácticamente el 50% de la nuestra, al igual que con el IMC, estas diferencias podrían ser debidas al menor número de pacientes, que en ocasiones puede causar un sesgo en los resultados.

b. Estudio radiodiagnóstico

Con respecto al estudio radiodiagnóstico de nuestros pacientes, constatamos una Vc media de 1,97 m/s. Además, la ecografía abdominal reveló que únicamente el 19,3% (n=4) de los pacientes presentó un hígado ecográficamente normal, frente al 80,7% de los pacientes que presentaban al menos un signo de hepatopatía crónica, siendo este en la

mayoría de los casos esteatosis (66,7%). El segundo signo ecográfico observado con mayor frecuencia fue la existencia de un parénquima heterogéneo (29,8%), y el tercer signo objetivado en mayor frecuencia (8,8%), aunque presente únicamente en cinco de los pacientes, fue la existencia de hepatomegalia. Tan solo un hubo un paciente en el que se observó hipertrofia del lóbulo caudado y otro con superficie hepática nodular. Ningún paciente presentó signos ecográficos de esplenomegalia, hipertensión portal o ascitis.

En el trabajo de *Naveau y cols.* (247), con respecto al estudio ecográfico, únicamente evalúan la presencia de esteatosis, como signo sugestivo de EHGNA y justificante de indicación de biopsia hepática. Constatan que el 74% de los pacientes incluidos presentaban signos ecográficos de esteatosis hepática. Nuestro porcentaje de pacientes con esteatosis es ligeramente inferior (66,7%), si bien nuestro estudio ecográfico es más completo, pues incluye además de la esteatosis, el resto de signos sugestivos de hepatopatía crónica, los cuales pueden estar presentes en el espectro de la EHGNA.

En el trabajo de *Guzmán-Aroca y cols.* (250) se evaluó tanto la técnica Arfi como el estudio ecográfico básico. Reflejaron una Vc media ligeramente inferior a la nuestra ($1,57 \pm 0,79$ m/s). Además constataron una ecografía hepática normal en el 46,8% de los pacientes y la presencia de signos ecográficos de esteatosis en el 53,2% restante de los pacientes. *Pulzi y cols.* reflejan en su estudio (251) que el 53,22% de los pacientes presentaron un estudio ecográfico sugestivo de EHGNA.

El número de estudios que evalúa la técnica Arfi en la EHGNA es limitado y además los resultados son relativamente discrepantes en función de la publicación. También es limitado el número de publicaciones que ha evaluado la técnica en sujetos sanos para establecer unos valores de referencia. Además, normalmente los estudios dividen a los pacientes en grupos en base a diferentes criterios. Estas son las razones que restan homogeneidad a las conclusiones y hacen difícil el contraste de resultados entre estudios.

El estudio de *Popescu y cols.* (125) refleja una Vc media en sujetos sanos de $1,15 \pm 0,21$ m/s, y otro estudio de *Guzmán-Aroca y cols.* (215) realizado en voluntarios sanos concluye una Vc media de $1,03 \pm 0,17$ - $1,01 \pm 0,17$ m/s en función del observador. Es sabido que los signos de hepatopatía crónica producen un aumento de la Vc, siendo el valor de

ésta directamente proporcional a la gravedad de la lesión. Esto va en concordancia con los valores de Vc medios obtenidos en nuestra población, superiores a los objetivados en sujetos sanos.

Con referencia al estudio ecográfico básico, las diferencias observadas en el porcentaje de pacientes con signos ecográficos de EHGNA entre los diferentes estudios pueden ser explicadas por varias razones (245). En primer lugar, la subjetividad del resultado en función del observador puede originar diferencias significativas. Un estudio retrospectivo de 168 exámenes ecográficos mostraron una concordancia intra e inter-observador de 54,7%-67,9% y 47,0%-63,7% respectivamente a la hora de evaluar la gravedad de la esteatosis hepática, lo que confirma la fuerte dependencia del observador. En segundo lugar, el sistema de gradación para la clasificación de la esteatosis generalmente utilizado, que clasifica el porcentaje de esteatosis encontrado en normal, medio, moderado y severo, es demasiado simplista para explicar pequeñas alteraciones en la gravedad de la esteatosis. Este es el motivo de que la ecografía abdominal no sea una técnica recomendada para el seguimiento de los pacientes después de intervenciones terapéuticas. En tercer lugar, el rendimiento diagnóstico de la ecografía en la detección de la esteatosis hepática es muy variable dependiendo de la definición exacta de la esteatosis y la presencia de otros signos ecográficos de hepatopatía crónica coexistentes. En los pacientes sin otros signos de hepatopatía coexistentes, la ecografía ofrece un diagnóstico bastante preciso de la esteatosis hepática de moderada a grave (definida como un grado histológico ≥ 30 -33%), con una sensibilidad entre el 81,8-100,0% y una especificidad de alrededor del 98%. Por el contrario, si se considera cualquier porcentaje de esteatosis hepática (es decir, ≥ 3 -5%), la precisión de la ecografía disminuye de forma importante, mostrando una sensibilidad de entre el 53,3 - 66,6% y una especificidad comprendida entre el 77% y el 93,1%. Además, cuando el paciente presenta otros signos ecográficos de hepatopatía crónica, algo frecuente en la EHGNA, la precisión de la ecografía en la detección de la esteatosis también disminuye. Por ejemplo, la fibrosis hepática también puede aumentar la ecogenicidad hepática, provocando un falso aumento en el porcentaje de esteatosis detectado. Todas estas razones, además de explicar las limitaciones de la ecografía en la valoración de la esteatosis, y en general de la

hepatopatía derivada de la EHGNA, justifican las diferencias encontradas entre los resultados que arrojan estudios con diseño y poblaciones muy similares.

Dentro del espectro de lesiones hepáticas que puede originar la EHGNA, la esteatosis es el signo observado con mayor frecuencia, considerado en cierto modo patognomónico de la enfermedad. Este es el motivo por el que los estudios en los que se incluye la evaluación ecográfica de los pacientes, frecuentemente solo valoren la esteatosis, obviando otros signos de hepatopatía crónica. En nuestro estudio se incluyó una valoración ecográfica exhaustiva de los signos de hepatopatía crónica, detectando un parénquima heterogéneo en el 29,8% de los pacientes, hepatomegalia en el 8,8% e hipertrofia del lóbulo caudado y superficie hepática nodular en el 1,8% de los pacientes respectivamente. Estos signos ecográficos son debidos a un aumento de ecogenicidad del parénquima hepático como consecuencia del depósito de grasa en los hepatocitos, así como a la existencia de una ecoestructura heterogénea y una superficie nodular que reflejan la presencia de fibrosis. Además el aumento de tamaño del hígado y la hipertrofia del lóbulo caudado reflejan los cambios de la microcirculación hepática como consecuencia del desarrollo progresivo de fibrosis. Todo ello va en consonancia con el espectro de lesiones ecográficas típicamente descritas en la hepatopatía crónica. Por otro lado, ningún paciente presentó signos ecográficos de esplenomegalia, hipertensión portal, ascitis o cirrosis hepática. Nuestros resultados se asemejan a los reflejados en el estudio de *Guzmán-Aroca y cols. (250)*, donde se detecta la presencia de parénquima hepático heterogéneo en el 21,8% de los pacientes y de hepatomegalia en el 15,6%. El bajo porcentaje encontrado de estos signos ecográficos de hepatopatía es frecuente en pacientes asintomáticos y/o con estadios leves de la EHGNA, que presentan una hepatopatía crónica silente con alteraciones de la ecoestructura hepática poco expresivas y ausencia de signos de hipertensión portal. Esta hepatopatía incipiente pasa desapercibida frecuentemente en el estudio ecográfico, y esta es la razón por la que hasta un 25% de los pacientes que se someten a una biopsia hepática presentan una hepatopatía crónica hasta ese momento no sospechada.

c. Estudio anatomopatológico

Con respecto al estudio anatomopatológico de la biopsia hepática de nuestros pacientes, encontramos un hígado histológicamente normal en cuatro de ellos (7,01%). Además, en

referencia a la esteatosis, la mayoría de los pacientes, el 57,9%, presentaba un porcentaje de esteatosis inferior al 33%, clasificándose por tanto en el estadio uno de la clasificación de *Brunt* (60). El 28,1% de los pacientes presentaban un porcentaje de esteatosis comprendido entre el 33-66%, y en el 3,5% se encontró un porcentaje de esteatosis mayor al 66%, clasificándose por tanto en los estadios 2 y 3 del sistema de *Brunt* respectivamente.

Para categorizar del resto de alteraciones histológicas utilizamos la clasificación de *Matteoni* (63). De acuerdo a esta clasificación, encontramos el 45,3% de los pacientes en el estadio uno, puesto que la única alteración hepática que presentaban era esteatosis. Por orden decreciente de frecuencia, el 24,5% de los pacientes se clasificaron en el estadio dos, dado que presentaban además de esteatosis, signos de inflamación hepática. En el estadio tres se encontraban el 17% de nuestros pacientes, ya que en ellos se detectó la presencia de núcleos vacuolados en los hepatocitos periportales. Y por último, en el estadio cuatro se clasificaron el 13,2% de los pacientes, en cuya biopsia hepática se detectó la presencia de fibrosis y/o hialina de Mallory.

Se considera el diagnóstico de esteatohepatitis cuando concurren en la biopsia hepática esteatosis, inflamación y daños en los hepatocitos, comúnmente en forma de balonización (62). Se correspondería por tanto con el estadio tres de la clasificación de *Matteoni* (63). Teniendo esto en cuenta, en nuestro estudio encontramos esteatohepatitis en 9 de los pacientes, lo que supone un 17%. Si embargo, en el estadio cuatro de *Matteoni* también podrían encontrarse pacientes con esteatohepatitis, puesto que ésta puede también coexistir con la presencia de fibrosis y/o hialina de Mallory, por lo que este porcentaje podría estar infraestimándose. La clasificación de *Matteoni* no contempla la esteatohepatitis como un estadio único, y esto debe tenerse en cuenta a la hora de comparar la biopsia de pacientes en los que se haya utilizado esta clasificación con la de otros en los que la clasificación sí gradúa específicamente la esteatohepatitis.

Nuestros resultados muestran bastantes discrepancias con respecto a los aportados en el estudio de *Naveau y cols.* (247). Con respecto a la esteatosis hepática encontrada en la biopsia, en su estudio la mayoría de los pacientes presentaban un porcentaje mayor al

66% (estadío tres de *Brunt*). Además, el 72% de sus pacientes presentaban fibrosis hepática (estadío cuatro de *Matteoni*), un porcentaje mucho mayor al encontrado en nuestro estudio. Esta disimilitud en los resultados podría deberse a las diferencias en las características basales de los pacientes, por ejemplo en el IMC (49,09 vs 42,30 kg/m²), así como a la variabilidad y subjetividad intrínseca a la biopsia hepática. Además el número de pacientes incluidos en el estudio es superior al nuestro, lo que también podría contribuir a las diferencias encontradas.

Los hallazgos de la biopsia hepática constatados en el trabajo de *Díez-Rodríguez y cols.* (248) se asemejan a los nuestros. En este estudio reflejan un 15,8% de hígados histológicamente normales. Al igual que en nuestro estudio, la mayoría de sus pacientes (43,2%) se clasificaron en el estadío uno de la clasificación de *Brunt*. Además el porcentaje de pacientes en los que se detectó fibrosis hepática (13%) fue muy similar al nuestro. Los porcentajes encontrados de inflamación y balonización de los hepatocitos son ligeramente superiores a los nuestros, aunque no comparables puesto que el sistema de gradación histológica utilizado es diferente. El porcentaje de pacientes con esteatohepatitis que detectan (18%), que es prácticamente igual al nuestro si consideramos el estadío tres de *Matteoni*.

También son semejantes a los nuestros los resultados aportados por *Feijó y cols.* (249), aunque deben compararse con cautela pues el sistema de clasificación utilizado difiere en algunos puntos. Ellos encuentran un 5% de pacientes con un hígado sin alteraciones histológicas. Al igual que nosotros, sus pacientes se clasifican mayoritariamente (57,9%) en el estadío uno de la clasificación de *Brunt* (60) para la esteatosis. El porcentaje de fibrosis hepática que detectan (7,5%) es ligeramente inferior al nuestro, y constatan un 66,7% de pacientes diagnosticados de esteatohepatitis, aunque la gran mayoría de ellos presentan el grado más leve.

Los hallazgos histológicos reportados en el estudio de *Guzmán-Aroca y cols.* (250) presentan alguna discrepancia con los nuestros. En este estudio no encuentran ningún hígado con características anatomopatológicas normales, todos presentan alguna alteración. Reflejan, al igual que nosotros, un porcentaje mayoritario de pacientes (56,2%) con menos del 33% de esteatosis hepática. Con respecto a la clasificación de *Matteoni*

(63), la mayoría de sus pacientes se encuentran en el estadio dos, pues presentan esteatosis e inflamación, frente a nuestros pacientes que mayoritariamente presentan esteatosis de manera aislada. El porcentaje encontrado de pacientes con fibrosis y/o hilaina de Mallory (18,7%) es muy similar al nuestro.

En el estudio de *Pulzi y cols.* (251) utilizan la clasificación de *Brunt* (60) tanto para la esteatosis como para la inflamación y la fibrosis hepática. Reportan un porcentaje mayor al nuestro, 11,6%, de pacientes sin alteraciones en la histología hepática. Coinciden con nosotros en que la mayoría de pacientes presentan un porcentaje de esteatosis inferior al 33%. El porcentaje que reflejan de fibrosis hepática, 19,6%, es similar al nuestro.

De la comparación de los hallazgos de la biopsia hepática de nuestros pacientes con los encontrados en otros estudios se concluyen ciertas discrepancias. El porcentaje de esteatosis encontrado es bastante concordante, pero sin embargo se aprecian más diferencias en la frecuencia encontrada de inflamación y/o fibrosis hepática. Estas diferencias pueden justificarse de manera razonable teniendo en cuenta las limitaciones intrínsecas a la técnica (62). En primer lugar, la variabilidad de la enfermedad en sí misma puede ser la causa de las diferencias en los resultados. La EHGNA es un proceso difuso en el hígado, que puede originar diferencias, especialmente en el grado de fibrosis, en función de la ubicación de la muestra tomada para la biopsia. La distribución no homogénea de las lesiones histológicas puede originar una exclusión errónea de esteatohepatitis en una cuarta parte de los pacientes y errores en la clasificación de la fibrosis hasta en un tercio (77). La localización exacta del sitio de toma de la muestra también es importante, ya que por ejemplo, el tejido subcapsular hepático es generalmente más fibroso, y el lóbulo hepático izquierdo tiene áreas portales más grandes cerca de la cápsula que el lóbulo derecho. Por lo tanto, la información del punto de dónde se ha tomado la biopsia, que no siempre aparece reflejado, es importante, especialmente a la hora de comparar estudios, o al evaluar a los mismos pacientes antes y después de aplicar medidas terapéuticas. La falta de homogeneidad en este sentido explica en muchas ocasiones las discrepancias encontradas en los resultados entre distintos estudios con pacientes con características similares. En este aspecto, los estudios de *Díez-Rodríguez y cols.* (248) y *Pulzi y cols.* (251) no indican la localización de

dónde se ha tomado la biopsia, el trabajo de *Naveau y cols.* (247) refleja que la biopsia se ha tomado del lóbulo hepático izquierdo y en el estudio de *Guzmán-Aroca y cols.* (250) se indica que la biopsia pertenece, al igual que ocurrió en nuestro trabajo, al lóbulo derecho.

Además de la localización, es recomendable un tamaño mínimo de biopsia, de al menos 1,6 cm de longitud y entre 1,2-1,8 mm de diámetro conteniendo al menos diez espacios porta. Este requisito, además de no poder cumplirse siempre en la práctica clínica, puede originar discrepancias entre los resultados arrojados por unos y otros estudios. Por otro lado, es bien conocida la variabilidad en los resultados de la biopsia en función del observador, siendo la causa de resultados significativamente diferentes. Son varios los estudios que han evaluado las diferencias en función del patólogo en la valoración de biopsias de pacientes con EHGNA, aportando resultados variables, pero en todo caso concluyendo la necesidad de tener en cuenta la relativa subjetividad de la técnica a la hora de comparar resultados de estudios distintos (62).

d. Variables de laboratorio

Con respecto a los resultados encontrados de los parámetros hematológicos y bioquímicos en la población global de nuestro estudio, no se encontraron resultados fuera de los rangos de normalidad. Muchos de los pacientes con EHGNA, especialmente aquellos con estadios leves de la enfermedad, permanecen asintomáticos, mostrando pocas o ninguna alteración analítica. Las alteraciones encontradas con mayor frecuencia son las relacionadas con la función hepática, generalmente elevaciones de las transaminasas, si bien en un porcentaje no despreciable de los pacientes los niveles de enzimas hepáticas permanecen dentro del rango de normalidad, y cuando aparecen alteradas, el aumento suele ser medio y fluctuante, y se da mayoritariamente en los enfermos con esteatohepatitis o estadios más avanzados (77). Elevaciones discretas de las aminotransferasas en ausencia de otras enfermedades hepáticas y con clínica sugestiva de la enfermedad, pueden apoyar el diagnóstico de EHGNA, pudiendo encontrarse en alrededor del 50% de los pacientes con esteatosis simple y hasta el 80% de aquellos con esteatohepatitis. Sin embargo, tal como se ha comentado, la ausencia de alteraciones analíticas en la función hepática no excluye la enfermedad (76).

En cuanto a los algoritmos matemáticos para la estimación del grado de fibrosis hepática, existen muy pocos estudios que aporten datos referentes a la población global. Además, en la mayoría de los casos, estos algoritmos han sido evaluados con el objetivo de discriminar distintos grados de fibrosis hepática, por lo que las cohortes de estudio suelen presentar porcentajes elevados de pacientes con fibrosis. Esto es un inconveniente a la hora de comparar nuestros resultados, puesto que en nuestro estudio el porcentaje de pacientes con fibrosis es pequeño y los algoritmos han sido evaluados con el objetivo de diferenciar un grupo mixto, que también incluye pacientes sin fibrosis. Además algunos de los algoritmos que fueron originalmente diseñados en pacientes con hepatopatía de etiología viral, como es el caso del Hepascore, el FibroQ o el Via Index, no han sido evaluados posteriormente en pacientes con EHGNA, por lo que no existen datos comparativos.

Yilmaz y cols. (170) reportan un valor medio de Apri discretamente superior al nuestro (0,43 vs 0,21) en una población de 140 pacientes con EHGNA. Sin embargo, en este estudio no especifican el porcentaje de pacientes de la población global que presentaron fibrosis en la biopsia, lo cual en caso de ser superior al nuestro, podría explicar el mayor valor encontrado del algoritmo.

En el estudio de *McPherson y cols.* (253), cuyo objetivo es comparar la utilidad de varios algoritmos en la detección de fibrosis hepática en una cohorte de 145 pacientes con EHGNA, encuentran resultados medios mayores que los nuestros para el algoritmo Apri (0,7 vs 0,21) y el Fib-4 (1,54 vs 0,86). Estas diferencias pueden justificarse por el porcentaje significativamente más elevado de pacientes que presentan fibrosis en comparación con nuestro estudio (75% vs 13,2%).

Lo mismo ocurre en el trabajo de *Shah y cols.* (254), donde encuentran un valor medio del algoritmo Apri de 0,59 y de 1,11 para el Fib-4 en una población de 541 pacientes con EHGNA. En este caso detectan mediante biopsia hepática esteatohepatitis en el 59% de los pacientes y fibrosis en el 74,12% (además, de entre estos últimos, el 23,1% de los pacientes presentaba un grado severo de fibrosis).

ii. Características de los grupos de estudio

La población global de pacientes se dividió en dos grupos de estudio de acuerdo a los hallazgos de la biopsia hepática. Se incluyeron en un grupo los pacientes en los que la anatomía patológica no reveló ninguna alteración, junto con aquellos que presentaban esteatosis simple. El otro grupo englobó el resto de pacientes, cuyo análisis histológico hepático, además de esteatosis mostró alteraciones como inflamación, balonización hepatocitaria, fibrosis o hialina de mallory. El diseño de los grupos no se realizó de forma arbitraria, si no después de estudiar en profundidad la relación entre la fisiopatología y la evolución propia de la enfermedad, y las características de nuestra población.

Una de las razones por las que el campo de estudio de los biomarcadores en la EHGNA se ha quedado atrás con respecto a la hepatitis C es la incertidumbre sobre qué punto de la enfermedad debe detectarse exactamente. Actualmente la mayoría de los estudios están planteados para tratar de distinguir entre la esteatosis simple y la esteatohepatitis, entre la esteatohepatitis y la fibrosis o bien entre las distintas etapas de fibrosis.

Una revisión sistemática de 10 estudios con 221 pacientes sometidos a biopsias pareadas con una diferencia promedio de 5 años, mostró que la progresión de la fibrosis, de al menos una etapa, se produjo en un poco más de un tercio de los pacientes. En general, la tasa media de progresión de la fibrosis fue de 0,03 etapas por año. Sin embargo, al analizar sólo aquellos pacientes en los que la fibrosis había avanzado, la tasa de incremento fue de 0,41 etapas anuales. El predictor más fuerte de la progresión de la fibrosis fue la presencia de necroinflamación en la primera biopsia, que aumentaba en 2,5 veces la probabilidad de desarrollar fibrosis avanzada. Por el contrario, la severidad de esteatosis no se correlacionó con la progresión de la fibrosis (77). Esto demuestra que, aunque la fibrosis marca en gran medida la progresión de la enfermedad, la presencia de inflamación en ausencia de esteatohepatitis también cobra especial importancia en la evolución de la misma, mientras que sin embargo la esteatosis simple presenta generalmente un curso clínico benigno y con carácter reversible.

Este es el motivo por el que incluimos en un grupo los pacientes con esteatosis simple junto con aquellos cuatro sin alteraciones histológicas, y en el otro, que representa más el

estatus de hepatopatía crónica, los que presentaban además de esteatosis, inflamación lobular, signos de esteatohepatitis y/o fibrosis. Consideramos una limitación el número de pacientes, puesto que con una cohorte mayor podrían haberse planteado grupos independientes de pacientes con inflamación, esteatohepatitis y fibrosis, o incluso grupos según el estadio de fibrosis.

Aunque muchos estudios plantean grupos aislados de pacientes con fibrosis, puesto que sugieren que la fibrosis tiene la mayor implicación en el pronóstico de la enfermedad, nuestro grupo dos representa de manera más homogénea las alteraciones hepáticas más patológicas ligadas a la EHGNA, puesto que incluye las etapas previas a la esteatohepatitis, representadas fundamentalmente por la inflamación hepatocitaria, la esteatohepatitis propiamente dicha y la fibrosis.

La detección de las etapas previas a la esteatohepatitis o bien los grados más leves de la misma permitiría anticiparse al curso natural de la enfermedad, pudiendo proponer acciones terapéuticas antes de la aparición de la fibrosis.

a. Características demográficas y clínicas

Al comparar las características clínicas y demográficas de los pacientes en función de los grupos de estudio únicamente se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes hipertensos y en el de afectos de síndrome metabólico. Estos resultados se asemejan a los encontrados en otros estudios como el de *Diez-Rodríguez y cols.* (248), donde encuentran un porcentaje significativamente más alto de SM entre los pacientes con esteatohepatitis con respecto a aquellos con una biopsia sin alteraciones. Por otro lado, *Naveau y cols.* (247) encuentran un porcentaje significativamente más alto de diabéticos e hipertensos entre los pacientes con fibrosis significativa ($\geq F2$) frente a aquellos sin fibrosis o con grados leves ($< F2$). En el estudio de *Pulzi y cols.* (251), en donde clasifican a los pacientes en dos grupos según criterios histológicos muy similares a los nuestros, no encuentran diferencias significativas en la frecuencia de pacientes hipertensos, diabéticos o con síndrome metabólico, pero sí en la edad.

Aunque con discrepancias con respecto al grado exacto de asociación, la mayoría de publicaciones coinciden en que la edad avanzada, el sexo masculino, la hipertensión, la

obesidad, la DM2, y por tanto el síndrome metabólico, se asocian con un aumento del riesgo de desarrollar un estadio avanzado de la enfermedad, especialmente fibrosis hepática (77;247;255). Por tanto, aunque con diferencias entre los distintos estudios, que podrían ser debidas al diseño del mismo o las características propias de la población, es lógico encontrar una mayor incidencia de estas condiciones clínicas en los grupos con mayor grado de hepatopatía (necroinflamación, esteatohepatitis o fibrosis) frente a aquellos con grados más leves de las mismas entidades o bien frente esteatosis simple o hígados sanos.

b. Estudio radiodiagnóstico

Al comparar los hallazgos del estudio radiodiagnóstico entre ambos grupos de pacientes únicamente se observaron diferencias significativas para la Vc proporcionada por la técnica Arfi. Estos resultados coinciden con los aportados en el estudio de *Guzmán-Aroca y cols.* (250), donde encuentran valores significativamente diferentes de Vc al comparar a los pacientes con esteatosis simple frente a aquellos con inflamación hepatocitaria o fibrosis, aunque nuestros valores de Vc son ligeramente superiores en ambos grupos. En este estudio indican que el aumento de la Vc observado en la fibrosis e inflamación hepatocitaria es debido al aumento de reticulación de la matriz extracelular hepática y a la presencia de células inflamatorias, que se traducen en un aumento de la densidad y rigidez hepática. Por otro lado, los valores inferiores de Vc observados en los pacientes con esteatosis simple podrían deberse a la presencia de vacuolas grasas en el hígado, que aumentan el espacio entre los hepatocitos, lo que implica una reducción de la densidad y la dureza del tejido.

Datos similares se observan en el estudio de *Fierbinteanu Braticevici y cols.* (256), donde los valores de Vc correlacionan positivamente con el grado de inflamación hepática y negativamente con la esteatosis. El trabajo de *Palmeri y cols.* (257) indica que para el diagnóstico de fibrosis, la Vc aportada por la técnica Arfi no se ve afectada por la presencia simultánea de balonización o inflamación hepatocitaria.

Con referencia a los signos ecográficos de hepatopatía crónica, como ya se ha comentado, la mayoría de publicaciones se limitan a la evaluación de la esteatosis, dada la baja

prevalencia del resto de alteraciones. Así ha sucedido en nuestro estudio, donde el porcentaje de pacientes que presentaron signos de hepatopatía distintos a esteatosis fue pequeño, y en su caso no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. También son pocos los estudios que evalúan de manera aislada el rendimiento diagnóstico de la ecografía debido a las ya conocidas limitaciones. De acuerdo a lo descrito en la literatura, el signo ecográfico observado con mayor frecuencia en nuestros pacientes fue la presencia de esteatosis hepática. Teniendo en cuenta, que según el estudio histológico nuestros pacientes presentaban mayoritariamente un porcentaje de esteatosis menor al 33% y que en estos casos es conocida la falta de sensibilidad de la ecografía, es lógico que ésta no nos aporte resultados significativos al comparar ambos grupos.

En contraste con nuestros resultados, en el estudio de *Pulzi y cols.* (251) sí encontraron diferencias significativas para la presencia de esteatosis detectada ecográficamente al comparar a los pacientes con esteatohepatitis frente al resto de aquellos con EHGNA, si bien el grado de significación no fue muy elevado ($p=0,048$). Al estudiar la capacidad diagnóstica de la esteatosis detectada ecográficamente en el diagnóstico de esteatohepatitis, reportan una sensibilidad y especificidad del 76,9% y 46,9% respectivamente.

c. Variables de laboratorio

En referencia a los parámetros hematológicos y bioquímicos encontrados en ambos grupos no se encontraron diferencias significativas en ningún caso, si bien estuvieron cerca de alcanzar la significación las variables VCM y AST ($p=0,072$ y $p=0,068$ respectivamente).

Ya se ha comentado que la ausencia de alteraciones analíticas específicas puede observarse en un porcentaje no despreciable de los pacientes con EHGNA. En los casos en los que aparecen alteraciones, frecuentemente se dan en parámetros relacionados con la función hepática y mayoritariamente en los estadios más avanzados de la enfermedad. Aproximadamente el 50% de nuestros pacientes presentó únicamente esteatosis simple, el grado más leve de la enfermedad, y el otro 50%, a pesar de tener signos histológicos relacionados con estadios más patológicos, tampoco incluyó los grados más avanzados de

la enfermedad, puesto que el porcentaje de fibrosis detectado fue muy pequeño y ningún enfermo presentó signos de cirrosis. Por tanto, no es raro encontrar las variables hematológicas y bioquímicas dentro del rango de normalidad, así como no observar diferencias entre ambos grupos con respecto a éstas. Por otro lado, la mayoría de biomarcadores indirectos para la valoración de la hepatopatía, además de ser distintivos de las etapas más avanzadas de la enfermedad, suelen ceñirse a la presencia de fibrosis, lo que “a priori” los convierte en poco adecuados para evaluar a nuestra población de estudio.

En el estudio de *Nobili y cols.* (258), donde se evaluó la utilidad de varios biomarcadores y algoritmos para diferenciar los distintos estadios de fibrosis en una población de pacientes pediátricos con EHGNA, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables correspondientes a biomarcadores indirectos. Aunque se evaluó específicamente el grado de fibrosis, el porcentaje mayoritario de pacientes correspondían al grado cero (ausencia de fibrosis), lo que confirma la poca rentabilidad diagnóstica de los biomarcadores indirectos cuando porcentaje de pacientes que presenta fibrosis es pequeño.

Por otro lado, nuestros resultados contrastan con los reflejados en el trabajo de *Dvorak y cols.* (195), donde comparan la utilidad de varios biomarcadores séricos para el diagnóstico de esteatohepatitis en una población de 112 pacientes con EHGNA. En este estudio reflejan diferencias significativas en los niveles de triglicéridos, GGT y AST al comparar a los pacientes con esteatohepatitis frente a los demás. Sin embargo el diagnóstico de esteatohepatitis únicamente se confirmó histológicamente en 56 de los 112 pacientes, mientras que ésta se diagnosticó de acuerdo a criterios clínicos y analíticos en el resto de los casos. Esto es un sesgo importante y una limitación a la hora de comparar los resultados con los de otros estudios en los que se realizó una biopsia hepática a todos los pacientes, como es nuestro caso.

Nuestros resultados, así como los de *Dvorak y cols.* (195), difieren con los aportados por otros estudios, en los que se indica que, al contrario que en la esteatohepatitis alcohólica, las elevaciones de las aminotransferasas observadas en los pacientes con EHGNA suelen afectar principalmente a la ALT (251;259). Si bien es cierto que los resultados de AST y

ALT obtenidos en nuestros pacientes se encuentran dentro de los valores de referencia, y que el aumento diferencial de cada una de las enzimas debe valorarse en los casos en que se encuentren por encima de los valores normales.

Por otro lado debe comentarse el hallazgo referente al VCM. De manera general, la hepatopatía crónica se ha relacionado con la presencia de macrocitosis, especialmente la hepatopatía alcohólica. Sin embargo, los valores de nuestros pacientes se encuentran dentro del rango de referencia, pero más cercanos al límite bajo, aunque al comparar ambos grupos de pacientes se observa una clara tendencia a la significación estadística, con valores mayores en el grupo dos. Estos datos podrían estar en relación con los reflejados en el estudio de *Cengiz y cols.* (260), donde encuentran valores significativamente más altos de un parámetro estrechamente relacionado con el VCM, el ancho de distribución eritrocitaria, al comparar pacientes con esteatohepatitis frente a pacientes con esteatosis simple y controles sanos. Estos autores indican que la relación entre el aumento del ancho de distribución eritrocitaria y la esteatohepatitis podría deberse al estatus inflamatorio de la enfermedad, que tiene un efecto supresor sobre la maduración de los eritrocitos provocando la salida de glóbulos rojos más jóvenes, y generalmente más grandes, a la circulación, lo que se traduce en anisocitosis. Del mismo modo, la inflamación crónica que presentan estos pacientes, especialmente los incluidos en el grupo dos, podría ser la responsable del aumento del VCM observado. Estos datos sin embargo deben ser interpretados con cautela, ya que los valores de VCM se encuentran dentro de la normalidad y la diferencia entre ambos grupos no llega a alcanzar el nivel de significación estadística.

En referencia a los resultados obtenidos al comparar los algoritmos matemáticos entre ambos grupos de estudio, no obtuvimos diferencias significativas en ninguno de los casos. La mayoría de estos algoritmos fueron diseñados en cohortes de pacientes con VHC con el objetivo de discriminar los diferentes estadios de fibrosis, y aunque posteriormente muchos de ellos han sido evaluados en pacientes con EHGNA, en estos casos generalmente también ha sido con el objetivo de diferenciar fibrosis. En nuestro estudio encontramos un porcentaje pequeño de pacientes que presentaban fibrosis en la biopsia, y esta fué una de las razones por la que diseñamos un grupo mixto, que además de

fibrosis incluía otras alteraciones histológicas. Por tanto, aunque como veremos más adelante, el algoritmo ELF si mostró diferencias significativas entre ambos grupos, no es extraño que la mayoría de algoritmos no aporten resultados satisfactorios, puesto que fueron diseñados para detectar fibrosis.

Nuestros resultados concuerdan con los del estudio de *Dvorak y cols.* (195), donde no se obtuvieron diferencias significativas para los algoritmos Apri y Fib-4 al comparar a los pacientes con presencia o ausencia de signos histológicos de esteatohepatitis. Si bien debe tenerse en cuenta que la clasificación de los pacientes no se realizó del mismo modo que en nuestro estudio.

Igualmente, aunque con diferencias en la clasificación histológica de los pacientes, nuestros resultados se mostraron coincidentes con los aportados en el estudio de *Shah y cols.* (189), que indican que el algoritmo Fib-4 no es útil para diferenciar esteatosis de esteatohepatitis.

En el estudio de *Kruger y cols.* (169) tampoco obtuvieron diferencias significativas para el algoritmo Apri al comparar a los pacientes con esteatohepatitis frente a aquellos con esteatosis simple.

Los estudios en los cuales los algoritmos se evaluaron con el objetivo de diferenciar distintos estadios de fibrosis aportan resultados variables, aunque de manera global puede decirse que satisfactorios (261;262).

5.2.2 Objetivo 2

i. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF

Se determinaron las concentraciones de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1, y se calcularon los valores del algoritmo ELF, tanto en la población global como en ambos grupos de pacientes.

En la población global las concentraciones medias encontradas fueron de 25,10 ng/mL (mediana) para el HA, 7,66 ng/mL para el PIIINP y 226,34 ng/mL en el caso del TIMP-1. El valor medio del algoritmo ELF fue de 8,67. Al comparar los resultados entre ambos grupos

de pacientes únicamente se encontraron diferencias significativas en el caso del HA ($p=0,016$) y del ELF ($p=0,002$).

No son demasiados los estudios que aportan los resultados de estos biomarcadores y del algoritmo ELF referidos a la población global, y apenas existen estudios que hayan evaluado los niveles en individuos sanos, lo que hace el contraste de resultados muy limitado.

En el estudio de *Dvorak y cols.* (195) reportan una concentración media de HA superior a la nuestra, de 49,5 ng/mL, en una población de 112 pacientes con EHGNA. Con respecto al TIMP-1 indican unos niveles medios de 69,5 ng/mL en los pacientes con esteatosis simple y 91,6 ng/mL en aquellos con esteatohepatitis, lo cual concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, tal como ya se ha comentado, dentro de esta cohorte de pacientes, únicamente disponen de biopsia hepática en 56 de ellos, de entre los cuales detectan esteatohepatitis en 38. Los pacientes en los que no se dispone de biopsia se clasifican en función de parámetros clínicos y analíticos. En referencia a los pacientes de los que sí disponen de biopsia, comparan los resultados de la concentración de HA, PIIINP y TIMP-1 entre aquellos que presentan esteatohepatitis y los que no, y encuentran diferencias significativas para el HA y el TIMP-1. El hecho de no disponer de biopsia en todos los pacientes implica unos criterios de clasificación heterogeneos, lo que supone un sesgo importante y limita la comparación de resultados con otros estudios. Esto podría explicar en parte las diferencias encontradas. Además, el estudio histológico reveló que el 30% de los pacientes presentó fibrosis severa, un porcentaje superior al nuestro, lo cual también contribuye a las diferencias encontradas.

Nuestros resultados se asemejan a los aportados por el estudio de *Toyoda y cols.* (263), donde en una cohorte de 64 pacientes con EHGNA, al comparar a los que presentaban esteatosis simple frente a aquellos con esteatohepatitis, encontraron que el TIMP-1 no aportaba diferencias significativas, al contrario que el HA, que sí discriminaba significativamente ambos grupos de pacientes.

En el trabajo de *Tanwar y cols.* (264) estudian, entre otros biomarcadores, el HA, PIIINP y TIMP-1, en una población de pacientes con EHGNA. Los valores de estos biomarcadores

encontrados en la población global muestran una gran concordancia con los nuestros, a excepción del TIMP-1, cuyos niveles medios son superiores (733 vs 209,95 ng/mL). Además en este estudio concluyen que los valores de PIIINP discriminan a los pacientes con esteatosis simple frente a aquellos con esteatohepatitis o fibrosis avanzada, lo que también discrepa con nuestros resultados y con los de *Dvorak y cols* (195).

Tal como ya se ha comentado en el apartado de los pacientes con hepatopatía por VHC, en referencia a los valores de TIMP-1 hemos encontrado resultados bastantes discrepantes en la literatura, debidos probablemente a la ausencia de estándares de referencia, que implica que, frente a diferentes técnicas se puedan obtener resultados muy diferentes. Teniendo esto en cuenta, la comparación de los valores medios de TIMP-1 entre diferentes estudios debe valorarse con cautela.

Con referencia a los valores observados del algoritmo ELF en la población total, nuestros resultados muestran una gran concordancia con los aportados en el estudio de *Alkhoury y cols* (265). Este estudio llevado a cabo en una población de 111 niños y adolescentes con EHGNA refleja un valor de ELF de 8,6 en la cohorte total. A pesar de la diferencia de edad de la población, que supone una gran diferencia con nuestro trabajo, el estudio histológico muestra semejanzas con el nuestro, lo que podría explicar el valor de ELF prácticamente idéntico. Además comparan los valores de ELF de un grupo formado por los pacientes en los que se detectó fibrosis en la biopsia frente a otro grupo con ausencia de la misma, y obtienen diferencias significativas.

No hemos encontrado más publicaciones en las que se indique el valor de ELF referido a la población total o los grupos de estudio. La gran mayoría de los estudios se limitan a reseñar los valores de AUC obtenidos en la discriminación de los estadios establecidos, lo que en nuestro caso se abordará en el objetivo tres.

ii. Valores de HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF en función de las características clínicas y demográficas

Por otro lado, como parte del objetivo dos se estudiaron los valores de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y del algoritmo ELF en función de las características clínicas y demográficas de los pacientes.

No encontramos diferencias significativas para ninguno de los tres biomarcadores ni para el algoritmo ELF en función del sexo. En el caso del ELF, este resultado contrasta con el reflejado en el estudio de *Yoo y cols.* (233), que encuentra valores significativamente mayores del algoritmo en hombres que en mujeres, y establece dos rangos de valores normales en función del sexo. El estudio de *Lichtinghagen y cols.* (232) también corrobora los resultados de *Yoo y cols.*, puesto que refleja valores de ELF significativamente más altos en los pacientes del sexo masculino, e indica a mayores que estas diferencias también se observan para los biomarcadores HA y PIIINP. Al analizar estas diferencias con respecto a nuestro estudio debemos tener en cuenta algunas cuestiones. Primeramente las discrepancias en las características de la población, ya que el trabajo de *Yoo y cols.* se realizó en pacientes asiáticos, si bien es cierto que sus hallazgos se confirmaron en la cohorte europea de *Lichtinghagen y cols.* Además, ambos estudios se han llevado a cabo en pacientes sanos, lo que implica una limitación de la comparación, puesto que la progresión de enfermedad podría ser más homogénea en ambos sexos, lo que explicaría la ausencia de diferencias significativas de los biomarcadores. Sin embargo, las diferencias encontradas con respecto a estos trabajos, junto con el tamaño limitado de nuestra población, obliga necesariamente a comprobar estos resultados en estudios posteriores.

El estudio de *Knudsen y cols.* (234), que establece unos valores de referencia para el biomarcador PIIINP en pacientes sanos, indica la ausencia de diferencias significativas en función del sexo, lo cual discrepa con los resultados de *Lichtinghagen y cols.* (232) y va más en consonancia con los nuestros.

Por otro lado estudiamos los valores de los tres biomarcadores y del algoritmo en función del índice de masa corporal. Para ello establecimos tres subgrupos en función del IMC según los criterios de la SEEDO (80): 35-39,9 kg/m² (obesidad de tipo II; candidatos a cirugía bariátrica si además padecen comorbilidades), 40-49,9 kg/m² (obesidad tipo III o mórbida) y ≥ 50 kg/m² (obesidad tipo IV o extrema). No observamos diferencias significativas en ningún caso, aunque para el algoritmo ELF el valor de la *p* estuvo próximo a alcanzar la significación (*p*=0,085). El análisis de correlaciones no mostró resultados significativos de ninguno de los tres biomarcadores ni del algoritmo ELF con el IMC. En el estudio de *Lichtinghagen y cols.* (232) no encontraron correlación significativa entre los

valores de ELF y los de IMC, pero sin embargo los resultados de *Yoo y cols.* (233) indican la existencia de una correlación significativa entre estas variables. Las poblaciones de estos dos estudios estaban formadas por pacientes sanos y mayoritariamente normopesos, lo que difiere en gran medida de nuestra población, dónde todos los pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión presentan obesidad grave. Además esta obesidad va en relación con la fisopatología de la enfermedad. También debemos tener en cuenta que de acuerdo a los tres subgrupos establecidos, solo encontramos tres pacientes con IMC comprendido entre 35 y 39,9, y que los valores más altos de ELF se observaron en los pacientes con obesidad tipo III o mórbida. Por tanto, teniendo en cuenta que nuestros resultados no llegaron a ser significativos, y que además los datos encontrados en la literatura tampoco son esclarecedores, sería conveniente comprobar estos resultados en una población con mayor número de pacientes.

Con respecto a los valores del HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF en función de la existencia de síndrome metabólico así como de sus componentes individuales, únicamente se observaron diferencias significativas en el caso del HA y el ELF en función de la hipertensión arterial y del ELF en función del síndrome metabólico. De esto puede deducirse que las diferencias de ELF encontradas con respecto al síndrome metabólico reflejan fundamentalmente las variaciones debidas al HA y a la hipertensión. Además, estos resultados concuerdan con la existencia de diferencias significativas en el porcentaje de pacientes hipertensos y con síndrome metabólico entre ambos grupos de pacientes, así como con los valores significativamente superiores de HA y ELF en el grupo dos. Los pacientes de este grupo, correspondientes a aquellos con el grado más severo de hepatopatía, son mayoritariamente hipertensos y con síndrome metabólico y presentan valores mayores del biomarcador HA y del algoritmo ELF.

iii. Estudio de correlaciones

El estudio de correlaciones reveló la existencia de resultados significativos en el caso del HA y el ELF con la edad. Estos resultados coinciden con los aportados por *Lichtinghagen y cols.* (232), cuyo trabajo refleja que los valores de ELF y HA aumentan con la edad, aunque a diferencia de nosotros también indican estos resultados para el PIIINP. También en el estudio de *Rosenberg y cols.* (190), donde se diseñó el algoritmo ELF original, se

indica la dependencia del HA y la edad, y así mismo se incluye la edad como parte del ELF. Igualmente el trabajo de *Fagan y cols.* (236) corrobora nuestros resultados, pues indica que el ELF aumenta con la edad y que en sujetos con edad ≥ 45 años los valores de ELF podrían sobreestimar el verdadero grado de fibrosis hepática. La relación entre los valores de ELF y HA y la edad no es inesperada, puesto que el aumento de la edad se asocia con la progresión de la fibrosis, tal vez debido a la mayor vulnerabilidad a los factores ambientales, particularmente el estrés oxidativo. Igualmente, los trastornos inflamatorios crónicos extrahepáticos, incluyendo las enfermedades cardiovasculares son más comunes en las poblaciones de edad avanzada (236). Sin embargo estos resultados discrepan con los aportados por *Yoo y cols.* (233), que indican que los valores de ELF son equivalentes en función de la edad y así mismo con los reflejados en los trabajos de *Guha y cols.* (71) y *Parkes y cols.* (191), que validaron el algoritmo ELF original y lo simplificaron eliminando la edad sin que la exactitud diagnóstica se viese afectada. El estudio de *Knudsen y cols.* (234) refleja una discreta pero significativa diferencia en los valores de PIIINP en pacientes sanos en función de la edad, y establece dos rangos de referencia correspondientes a 18-40 y 41-70 años. Estos resultados discrepan con los nuestros, puesto que no encontramos diferencias en el caso del PIIINP, aunque debemos tener en cuenta que la media de edad de nuestros pacientes es 43 años, lo que explicaría la homogeneidad de los resultados en este sentido. Teniendo en cuenta todos estos datos, es obvio que los valores de ELF y también los de HA y PIIINP deben interpretarse con cautela en función de la edad, si bien en nuestro estudio ambos grupos de pacientes no muestran diferencias significativas para la edad, por lo que la comparación de nuestros resultados entre ambos grupos no se verá afectada por este motivo.

En cuanto a las correlaciones entre los tres biomarcadores directos se constató un resultado significativo entre el PIIINP y el TIMP-1. Esta correlación atiende a las características propias de los biomarcadores. Tal como se ha comentado en la introducción, el PIIINP y el TIMP-1 reflejan mejor el proceso de fibrogénesis y su tasa de progresión que la fibrosis ya establecida, al contrario que el HA, lo que explica que la capacidad de este último para detectar la cirrosis sea mayor, y la correlación entre PIIINP y TIMP-1.

Con respecto a las correlaciones con los parámetros hematológicos se observaron varios resultados significativos. El PIIINP y el ELF mostraron una correlación significativa con el VCM. El volumen corpuscular medio es un parámetro frecuentemente utilizado para la valoración de las anemias y también es conocida su elevación en las hepatopatías crónicas, incluidas aquellas que no se asocian con anemia (266). Por tanto, a pesar de que nuestros pacientes no presentan anemia y el VCM de la población general se encuentra dentro del intervalo de referencia, no es extraño que sus valores muestren una correlación positiva con variables cuyo aumento en presencia de hepatopatía es conocido, como es el caso del PIIINP y el ELF.

También encontramos una correlación discreta del TIMP-1 y el fibrinógeno. El fibrinógeno se sintetiza en el hígado, pero al igual que ocurre con el resto de las proteínas de la coagulación de síntesis hepática, sus niveles no suelen alterarse hasta que el paciente presenta una hepatopatía grave. Por otro lado el fibrinógeno es un reactante de fase aguda positivo, lo que explicaría, en ausencia de compromiso hepático grave, su aumento en el contexto del estatus inflamatorio que tiene lugar en la hepatopatía crónica, y por tanto su correlación con biomarcadores que valoran la enfermedad.

Al estudiar las correlaciones con los parámetros bioquímicos también nos encontramos diversos resultados significativos. El HA y el ELF mostraron una correlación negativa con la haptoglobina, proteína de síntesis hepática en la que está descrita una asociación negativa con el grado de fibrosis hepática (152). Por otro lado, es sabido que los pacientes con hepatopatía crónica, especialmente en estadios graves, presentan una menor capacidad de metabolizar el nitrógeno proteico y de sintetizar urea (267), lo que explica la correlación negativa observada entre esta última, el PIIINP y el TIMP-1. Así mismo encontramos una correlación negativa del PIIINP con la albúmina y el colesterol, moléculas de síntesis hepática cuyo descenso se ha descrito en las hepatopatías, aunque no suele hacerse evidente hasta estadios avanzados de la enfermedad, lo que explicaría que a pesar de la correlación, los valores medios de la población se encuentren dentro de los niveles normales. Por otro lado observamos una discreta correlación del TIMP-1 con la ALP. La elevación de los niveles de esta enzima se produce mayoritariamente debido a procesos colestásicos, pero también ante lesiones hepatocelulares, como es el caso de la

hepatopatía crónica, pueden producirse elevaciones, aunque los aumentos serán siempre más moderados que los acontecidos debido a procesos colestásicos (146). También el algoritmo ELF mostró una correlación positiva con las proteínas totales, cuyo aumento en las hepatopatías suele deberse al aumento de inmunoglobulinas.

Por otra parte evaluamos las correlaciones del HA, PIIINP, TIMP-1 y ELF con el resto de algoritmos matemáticos. Tal como hemos comentado en el caso de los pacientes con hepatitis crónica C, para valorar estos resultados debemos tener en cuenta que los algoritmos Fibrometer y Hepascore contienen el HA en su fórmula, lo que explica entonces su correlación, así como la observada con el ELF. Ocurre lo mismo con aquellos algoritmos que muestran una correlación significativa con alguno de los tres biomarcadores directos, y que por tanto implica a su vez la correlación con el ELF. Partiendo de estas observaciones, encontramos que el ELF mostró una correlación significativa con el resto de algoritmos a excepción del Apri. Estas correlaciones observadas, con mayor o menor grado de significación, eran esperables, ya que todos estos algoritmos se diseñaron con el mismo objetivo y estamos aplicándolos a la misma población de pacientes. Cosa diferente es el grado de exactitud diagnóstica que presentan en la clasificación de un grupo concreto de los pacientes, valorada en el objetivo tres. En el caso del Apri, suponemos que el hecho de ser el algoritmo más sencillo y que además únicamente incluye dos biomarcadores indirectos (AST y plaquetas) que tampoco mostraron correlación con ninguno de los biomarcadores directos ni con el ELF, explica la ausencia de correlación del propio algoritmo.

En el caso de la velocidad de onda de corte proporcionada por la técnica Arfi, encontramos que mostró una correlación significativa con el PIIINP y con el ELF. La Vc guarda relación con la matriz hepática, y se cree que su aumento en los pacientes con hepatopatía se produce por la mayor reticulación hepática producida por la fibrosis y a la presencia de edemas y células inflamatorias asociadas, lo cual implica por otro lado el incremento de los valores de PIIINP (y por tanto del ELF), que como ya se ha explicado, reflejan el proceso de generación de la fibrosis y la inflamación hepática (156).

iv. *Regresión lineal múltiple*

Para estudiar la influencia que ejercen el resto de variables continuas, tanto clínicas como de laboratorio, sobre los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 y sobre el algoritmo ELF, realizamos un análisis de regresión lineal múltiple.

El análisis de regresión de lineal del HA nos permitió calcular una ecuación que incluyó las variables edad, GGT, haptoglobina, Apo-A1 y Vc, y que define los valores de este biomarcador en un 24,2%. Sin embargo, dentro de esta ecuación la única variable que resultó significativa en el análisis multivariado, y que por tanto se identifica como el único factor que influencia los valores de HA, fue la edad. Este resultado va en relación con la correlación ya evidenciada con la edad, y reflejada también en los estudios de *Lichtinghagen y cols. (232)* y *Rosenberg y cols (190)*.

En el caso del PIIINP, la ecuación calculada definió sus concentraciones en un 51,4%, e incluyó las variables IMC, VCM, urea, albúmina, colesterol y TIMP-1, de las cuales resultaron significativas en el análisis de regresión lineal multivariado el VCM, la urea, la albúmina y el colesterol. Esta asociación ya se había puesto de manifiesto en el estudio de correlaciones.

En el análisis de regresión lineal realizado para el TIMP-1, se incluyeron las variables TTPAr, fibrinógeno, urea, bilirrubina total, fosfatasa alcalina y PIIINP. La ecuación calculada definió los valores de TIMP-1 en un 32,7%, si bien ninguna de las variables se confirmó como factor influyente independiente de sus concentraciones, puesto que ninguna resultó significativa en el análisis multivariado.

En el caso del ELF se incluyeron en el modelo de regresión lineal como variables independientes las variables edad, VCM, urea, proteínas totales, haptoglobina y velocidad de onda de corte, y la ecuación obtenida definió los valores de ELF en un 39%. El análisis multivariado reveló que la edad y la Vc son factores influyentes independientes de los valores de ELF, lo cual va en consonancia con las correlaciones significativas encontradas.

El resultado de la edad, como ya se ha comentado coincide con lo aportado por los estudios de *Lichtinghagen y cols. (232)* y *Fagan y cols (236)* y discrepa con lo indicado por

Yoo y cols (233). Este último estudio indica además que el recuento de plaquetas es el único factor influyente en los valores de ELF, aunque la influencia ejercida es discreta. Este resultado, que no hemos encontrado en nuestra población, no se ha reportado por otros autores.

Por otra parte, el estudio de *Fagan y cols.* (236) refleja que, además de la edad, la presencia de inflamación hepática moderada-severa podría influir en los valores de ELF, provocando clasificaciones discordantes en el estadio de fibrosis en comparación con la clasificación de la biopsia. Por el contrario la presencia de esteatosis disminuía la probabilidad de clasificación errónea. En nuestro caso, puesto que hemos diseñado un grupo mixto, en el que se incluyen los pacientes con inflamación y/o fibrosis, se minimizan los errores en este sentido.

5.2.3 Objetivo 3

Con la finalidad de evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores, de los algoritmos matemáticos y de la velocidad de onda de corte realizamos un estudio de curvas ROC. Para ello tomamos como variable de estado la identificación de los pacientes de nuestro estudio clasificados en el grupo dos, es decir, aquellos que presentaron una hepatopatía más severa, de acuerdo a que se detectó en la biopsia hepática la presencia de, además de esteatosis, infiltrados inflamatorios, hepatocitos vacuolados, hialina de mallory y/o fibrosis.

i. Biomarcadores indirectos

Al realizar las curvas ROC de cada uno de los biomarcadores indirectos, ninguna de las AUC obtenidas resultó significativa (tabla 40 de resultados). Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura y en la mayoría de estudios publicados al respecto, que indican que los biomarcadores indirectos por sí solos no son sensibles ni suficientemente específicos en el diagnóstico de la EHGNA (261;262).

Los biomarcadores indirectos son parámetros comúnmente utilizados en el laboratorio clínico de rutina, generalmente para la valoración de la función hepática o la existencia de inflamación. Esto les confiere la gran ventaja de estar disponibles en la mayoría de los

laboratorios y además, a un coste económico bajo. Sin embargo su especificidad y sensibilidad para detectar fibrosis es baja, por lo que su máxima utilidad radica en descartar la existencia de cirrosis. Teniendo en cuenta esto, la utilidad de este tipo de biomarcadores en el diagnóstico de la EHGNA es obvio que será poca. Además, ya se ha comentado, que un porcentaje elevado de estos pacientes, tal como ocurrió en nuestro estudio, no presenta alteraciones en la analítica de rutina, por lo que difícilmente estos parámetros podrán utilizarse para diagnosticar o estratificar la enfermedad. Además, si la sensibilidad para la detección de fibrosis ya es baja, menos aun lo será si tratamos de indentificar pacientes en estadíos pre-fibróticos, como por ejemplo aquellos que presenten esteatohepatitis. Este es el caso de nuestro grupo dos de estudio, donde el porcentaje de pacientes con fibrosis es bajo y ninguno de ellos presentó cirrosis.

De todo lo anterior se deduce que, los biomarcadores indirectos, debido a su elevada disponibilidad y al hecho de estar generalmente incluidos en los análisis de rutina, seguirán realizándose a prácticamente todos los pacientes. Sus resultados permitirán, junto con otros hallazgos clínicos compatibles, sospechar la existencia de EHGNA en algunos casos, así como monitorizar a pacientes ya diagnosticados, pero sin embargo, la ausencia de alteraciones analíticas no permite la exclusión de la enfermedad y en todo caso sus resultados deberán ser contrastados con otro método diagnóstico.

ii. Biomarcadores directos

El análisis de curvas ROC de los biomarcadores HA, PIIINP y TIMP-1 reveló que únicamente la AUC del HA resultó significativa (AUC=0,688; $p=0,016$). Un valor de HA por encima de 15,89 ng/mL permite, con una sensibilidad del 92,9% y una especificidad del 50%, la detección de los pacientes clasificados en el grupo dos de nuestro estudio. Los VPP y VPN fueron 65% y 86% respectivamente.

Dentro de los biomarcadores directos, el HA es quizás uno de los que, de manera aislada, mejores resultados ha aportado, especialmente en pacientes con VHC o hepatopatía alcohólica, pero también en la EHGNA (155). Si bién la utilidad que generalmente se le ha atribuido, es la de confirmar o descartar fibrosis severa y/o cirrosis. Esta no es la situación de nuestro estudio, donde pretendemos discriminar a pacientes con grados de

hepatopatía previos. La diferencia de los resultados radica fundamentalmente en el punto de corte de HA elegido.

El trabajo de *Suzuki y cols.* (268) refleja que un punto de corte de 46 ng/mL de HA permite la detección de fibrosis severa en pacientes con EHGNA con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 79,7%.

Por otro lado, *Sakugawa y cols.* (269) indican un punto de corte de HA de 43 ng/mL para la detección de esteatohepatitis en pacientes con EHGNA (65,7% sensibilidad; 90,5% especificidad), y de 50 ng/mL para la detección de pacientes con fibrosis (68,8% sensibilidad; 82,8% especificidad).

La diferencia con nuestro punto de corte, que es claramente inferior, se debe a que nuestro objetivo no se circunscribe únicamente a la detección de pacientes con fibrosis, si no que abarca estadíos patológicos propios de la enfermedad que pueden darse de manera conjunta con la fibrosis, o bien previamente, pero que como ya se ha explicado, podría ser importante detectar para anticiparse al curso natural de la enfermedad.

Nuestro punto de corte se asocia a una especificidad no demasiado alta, que implica por tanto la existencia de un número importante de falsos positivos, pero esto se ve compensado con una muy buena sensibilidad, lo que asegura la detección de prácticamente todos los pacientes que presenten las características elegidas.

iii. Algoritmos matemáticos

El análisis de las curvas ROC de los algoritmos matemáticos solo aportó resultados significativos en el caso del ELF (AUC=0,741; $p=0,002$) y el Fibrometer (AUC=0,726; $p=0,004$). Estos resultados van en consonancia con el hecho de que ya eran los dos únicos algoritmos cuyo valor presentaba diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes.

En el caso del ELF un punto de corte de 8,72 permite la detección de los pacientes del grupo dos con una sensibilidad del 71,4% y una especificidad del 74,1% (73,38% VPP y 72,15% VPN). El punto de corte para el Fibrometer fue -2,75, con una sensibilidad del 58,6% y una especificidad del 82,1% (76,01% VPP y 66,47% VPN).

El algoritmo ELF original fue diseñado a partir de una cohorte de pacientes con hepatopatía de etiología mixta (190), pero su efectividad se comprobó, además de en la población global, en los subgrupos de pacientes de cada una de las etiologías específicas. En el caso de los pacientes con EHGNA, el algoritmo obtuvo un AUC para la detección de fibrosis moderada-severa de 0,870 con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 96%. Posteriormente, el estudio de *Guha y cols.* (71) simplificó el algoritmo y lo validó en una cohorte independiente de pacientes con EHGNA. En este caso el algoritmo simplificado obtuvo valores de AUC de 0,90 para la detección de fibrosis severa (80% sensibilidad, 90% especificidad), 0,82 en el caso de fibrosis moderada (70% sensibilidad, 80% especificidad) y 0,76 para detectar la ausencia de fibrosis (61% sensibilidad, 80% especificidad).

El trabajo de *Nobili y cols.* (258) también evaluó la validez del algoritmo ELF para la detección de fibrosis en la EHGNA, pero en una población de pacientes pediátricos. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, con un AUC para la detección de fibrosis de cualquier grado, fibrosis significativa y fibrosis avanzada de 0,92, 0,98 y 0,99 respectivamente. Los puntos de corte elegidos para cada uno de los estadios fueron 9,28 (88% sensibilidad, 81% especificidad), 10,18 (94% sensibilidad, 93% especificidad) y 10,51 (100% sensibilidad, 98% especificidad).

Alkhouri y cols. (265) igualmente estudiaron la capacidad del ELF en la detección de fibrosis hepática en la EHGNA en pacientes pediátricos. Este estudio indica que un punto de corte de 8,49 permite la detección de cualquier grado de fibrosis con una sensibilidad del 77% y una especificidad del 97%.

Por otro lado, en el trabajo de *Dvorak y cols.* (195) evalúan el algoritmo ELF para la discriminación de fibrosis significativa en una población de 56 pacientes con EHGNA, obteniendo un AUC de 0,97, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 97%.

Recopilando los resultados de todos estos estudios, podemos deducir que el algoritmo ELF ha sido evaluado en cohortes de pacientes con diferentes características, pero con la finalidad común de detectar fibrosis. Se han aportado diferentes puntos de corte, en función del tipo de pacientes, y sobre todo, del estadio de fibrosis fijado como objetivo,

obteniendo en la mayoría de los casos buenos resultados de sensibilidad y especificidad. El punto de corte propuesto en nuestro estudio se asocia a valores óptimos de sensibilidad y especificidad (71,4% y 74,1% respectivamente), buenos resultados teniendo en cuenta que el algoritmo se ha evaluado con el objetivo de detectar un grupo de pacientes en el que el porcentaje de fibrosis es pequeño.

El algoritmo Fibrometer se desarrolló a partir de una cohorte mixta que incluía pacientes con hepatopatía de origen viral y etanólica, y se obtuvieron buenos resultados para la detección de fibrosis significativa (178). Posteriormente este algoritmo no ha sido validado en una cohorte independiente de pacientes con EHGNA. Sin embargo, los autores del algoritmo original diseñaron posteriormente otro, al que denominaron “*Fibrometer NAFLD*”, en una cohorte de pacientes con EHGNA, para la detección de fibrosis significativa obteniendo igualmente buenos resultados (179). Nosotros hemos incluido en nuestro estudio el algoritmo original, y aunque hemos observado diferencias entre ambos grupos de pacientes, además de un AUC significativa, debemos tener en cuenta que el valor de sensibilidad obtenido es bajo (58,6%). Esto se debe posiblemente al hecho de que el algoritmo se diseñó específicamente para la detección de fibrosis, mientras que nuestro objetivo implica la detección conjunta de otros grados de hepatopatía y nuestra población presenta un porcentaje relativamente bajo de pacientes con fibrosis.

iv. Estudio radiodiagnóstico

Con referencia al estudio radiodiagnóstico, realizamos curva ROC de la Vc aportada por la técnica Arfi. El AUC de la Vc resultó significativa (AUC=0,729, $p=0,003$), y se estableció un punto de corte de 1,9 m/s, que permitía la detección de los pacientes clasificados en el grupo dos con una sensibilidad del 72,4% y una especificidad del 67,9% (69,28% VPP, 71% VPN).

Existen varios estudios que evaluado la utilidad de la técnica Arfi en la EHGNA, aunque al igual que ocurre con los biomarcadores, generalmente lo que se ha testado es su capacidad para detectar fibrosis. Los resultados son globalmente satisfactorios, aunque existen diferencias en los puntos de corte aportados.

El trabajo de *Yoneda y cols.* (126), realizado en una población de 54 pacientes con EHGNA, señala puntos de corte para la detección de fibrosis severa y cirrosis de 1,77 y 1,90 m/s respectivamente. La sensibilidad en ambos casos es del 100%, y la especificidad es de 91% para la detección de fibrosis severa y 96% en el caso de cirrosis.

Palmeri y cols. (257) publicaron un estudio llevado a cabo en una cohorte de 172 pacientes con EHGNA, en el que se reflejaba un punto de corte para la Vc aportada por la técnica Arfi de 2,06 m/s para detección de fibrosis en estadio equivalente a $\geq F3$. La sensibilidad y especificidad diagnóstica indicada era del 90%.

Guzmán-Aroca y cols. (250) evaluaron una población compuesta por 32 pacientes con obesidad mórbida y diagnóstico de EHGNA, mediante la técnica Arfi, de manera previa a la realización de cirugía bariátrica. Reportaron un punto de corte de 1,3 m/s, para la detección de pacientes con esteatohepatitis y/o fibrosis, con una sensibilidad y especificidad de 85% y 83,3% respectivamente.

El trabajo de *Fierbinteanu Braticevici y cols.* (256), llevado a cabo en una población de 64 pacientes con EHGNA, indicó los siguientes puntos de corte para la detección de los estadios de fibrosis $\geq F1$, $\geq F2$, $\geq F3$ y F4: 1,105 m/s (76,70% sensibilidad; 71,40% especificidad), 1,165 m/s (84,80% sensibilidad; 90,30% especificidad), 1,480 m/s (86,40% sensibilidad; 95,20% especificidad) y 1,635 m/s (91,70% sensibilidad; 92,30% especificidad).

Nuestro estudio muestra bastantes semejanzas con el de *Guzmán-Aroca y cols.* (250), puesto que en ambos casos los pacientes son obesos mórbidos y además los dos estudios evalúan la técnica con la finalidad de discriminar a pacientes con esteatopatitis y/o fibrosis. Sin embargo los puntos de corte muestran discrepancias (1,9 vs 1,3 m/s), aunque los valores de sensibilidad y especificidad son más semejantes. La disparidad encontrada podría ser debida a los diferentes porcentajes encontrados en el estudio histológico de la biopsia de los pacientes en ambos estudios, pero serían necesarios más estudios con características similares para realizar un contraste más adecuado de los resultados.

De acuerdo con los estudios descritos, la técnica Arfi ha demostrado su utilidad en la detección de fibrosis en pacientes con EHGNA, aunque los puntos de corte aportados en

las publicaciones muestran ciertas discrepancias. Sin embargo, la efectividad de la técnica para detectar esteatohepatitis u otros estadios prefibróticos no está suficientemente contrastada, y los efectos que podrían tener sobre los resultados aportados la presencia de esteatosis, inflamación o balonización hepatocitaria no han sido adecuadamente estudiados (270).

Finalmente se realizó un análisis de comparación entre las variables cuya AUC resultó significativa (HA, ELF, Fibrometer y Vc) mediante la diferencia de áreas, y no se encontraron diferencias significativas en ningún caso. Sin embargo, a pesar de que todas estas variables aportaron un AUC significativa, y a la ausencia de diferencias al comparar las áreas bajo la curva, también debemos tener en cuenta los valores de sensibilidad y especificidad. El HA es la variable que presenta el valor de sensibilidad más alto (92,9%) y el Fibrometer el mejor valor de especificidad (82,1%). Sin embargo la variable que presenta el mejor índice de Youden, que como se ha explicado evalúa la capacidad diagnóstica relacionando la sensibilidad y la especificidad, es el ELF.

5.2.4 Objetivo 4

La biopsia hepática es actualmente el estándar de referencia para el diagnóstico y la estratificación de la EHGNA. Sin embargo es un método invasivo, por lo que entraña riesgos y limitaciones que pueden llegar a ser graves, y además lleva intrínsecas una serie de limitaciones, como son el error de muestreo y la variabilidad en función del observador. Todos estos inconvenientes han aumentado el interés y propiciado la investigación de métodos alternativos, que permitan la evaluación no invasiva de la enfermedad. Estos métodos no invasivos son los biomarcadores de laboratorio y las técnicas de imagen.

Como ya se ha descrito, actualmente existen diversos marcadores serológicos y técnicas de imagen que han aportado resultados prometedores en los estudios clínicos, y cada vez parecen imponerse más como una herramienta útil en la evaluación de la enfermedad. Sin embargo, unos de los errores comunes acerca de estas pruebas no invasivas es la creencia de que gracias a ellas podremos obviar la realización de la biopsia hepática.

La idea de que las técnicas no invasivas pueden sustituir completamente a la biopsia hepática como herramienta de diagnóstico es, hoy por hoy, poco realista. La biopsia ofrece una gran cantidad de información sobre el hígado, incluyendo la severidad de esteatosis, necroinflamación y fibrosis, la presencia de múltiples condiciones patológicas, así como una descripción exhaustiva de la perturbación de la arquitectura hepática. Sin embargo, pensar que esta información se requiere en todos aquellos pacientes en los que exista una sospecha clínica o en los que se constaten anomalías en la analítica de la función hepática, es igual de desacertado, además de realmente inconveniente para los pacientes y el sistema de salud.

Más allá de la información aportada, la principal ventaja de las técnicas no invasivas frente a la biopsia, además de la obvia ausencia de invasividad, es la posibilidad de realizarlas de forma periódica, lo que permite un control evolutivo y continuo, ofreciendo una visión dinámica de la enfermedad. La biopsia, a pesar de proporcionar una valiosa información del estado fisiopatológico del hígado, debido a su naturaleza invasiva es una técnica inviable para el control periódico que debe realizarse en esta enfermedad. Por tanto el uso de técnicas no invasivas, permitiría reducir en gran medida el número de biopsias realizadas, y en cualquier caso supondría una herramienta eficaz para el control evolutivo de los pacientes con EHGNA.

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de los biomarcadores y las técnicas de imagen, ya algunos autores han propuesto de combinación de ambos como una herramienta útil en la valoración de la hepatopatía crónica.

Castera y cols. (244) publicaron en 2010 un estudio en el que se demostraba la utilidad de un algoritmo que combinaba el Fibroscan con el Fibrotest para la detección de fibrosis significativa y cirrosis en pacientes con hepatitis C. Los resultados reflejaron que este algoritmo era efectivo en la estratificación de la fibrosis, y que además el número de biopsias evitadas era superior en comparación con otros algoritmos que solo incluían biomarcadores.

El estudio de *Crespo y cols.* (242) demostró en 2012 que la combinación sincrónica de ELF con Arfi o Fibroscan, aumenta los valores predictivos tanto positivos como negativos de

los métodos individuales en la detección de fibrosis significativa y cirrosis en pacientes trasplantados y no trasplantados con hepatopatía crónica de diversa etiología.

Por otro lado, tal como ya se ha comentado, el trabajo de *Takaki y cols.* (197) publicado en 2014, reseñó la utilidad de un algoritmo denominado *Via Index*, que combinaba la técnica Arfi con los biomarcadores, en la evaluación del grado fibrosis hepática en pacientes con hepatopatía por VHC.

La combinación de dos métodos no invasivos distintos implica un enfoque más amplio y probablemente más adecuado, ya que a la hora de intentar limitar el número de biopsias realizadas, el hecho de utilizar de forma conjunta dos métodos complementarios con bases biológicas diferentes, supone una ventaja frente al uso de técnicas individuales y aumenta la seguridad diagnóstica. Partiendo de esta premisa creemos que la combinación del algoritmo ELF y la técnica Arfi, que ya de manera aislada han demostrado su utilidad diagnóstica en los pacientes de nuestro estudio, podría suponer un modelo diagnóstico apropiado en la valoración de la hepatopatía de este tipo de pacientes.

Por tanto, elaboramos tres modelos diagnósticos que predijesen la probabilidad o riesgo de que un paciente obeso con sospecha de EHGNA sometido a cirugía bariátrica se clasificase en el grupo dos de nuestro estudio, es decir, de que presentase en la biopsia hepática infiltrados inflamatorios, balonización hepatocitaria, fibrosis, o hialina de Mallory, además de esteatosis. Para ello realizamos un análisis de regresión logística.

Se elaboraron, evaluaron y compararon tres modelos para la valoración de la hepatopatía crónica en este tipo de pacientes. El primer modelo, denominado *modelo clásico*, comprendió las variables utilizadas actualmente en nuestro hospital, es decir, variables clínicas, parámetros hematológicos, biomarcadores indirectos de fibrosis y la Vc proporcionada por la técnica Arfi. El segundo modelo, denominado *modelo con algoritmo ELF*, supuso la sustitución de la Vc en el modelo clásico por el algoritmo ELF. Por último, diseñamos un tercer modelo denominado *modelo combinado*, que combinaba los dos anteriores, incluyendo por tanto las variables clínicas, los parámetros hematológicos, los biomarcadores indirectos de fibrosis, la Vc y el algoritmo ELF.

Se realizó un análisis de regresión logística tomando como variable dependiente el diagnóstico de hepatopatía crónica, entendido como la clasificación en el grupo dos de nuestro estudio. En el análisis univariado resultaron significativas ($p < 0,15$) las variables edad, IMC, SM, VCM, AST, ALT, ELF y Vc. La implicación de estas variables en la hepatopatía crónica ya se ha descrito convenientemente con anterioridad. Teniendo en cuenta las características de cada modelo, se incluyeron de entre estas las variables adecuadas para la realización del análisis multivariado. En el modelo clásico y en el modelo con algoritmo ELF las variables clínicas (edad, IMC y SM) no mejoraron el rendimiento diagnóstico, por lo que se eliminaron con el fin de simplificar el modelo.

Al analizar el porcentaje de clasificación correcta de los pacientes obtenido con los tres modelos, observamos que el porcentaje más alto correspondía al modelo combinado (74,1% vs 71,9% y 70,9%). Además, de acuerdo con los coeficientes de determinación obtenidos, los porcentajes en que los tres modelos explicaban la probabilidad de clasificación en el grupo dos fueron 38,9%, 38,8% y 57,5% para el modelo clásico, el modelo con algoritmo ELF y el modelo combinado respectivamente. Por tanto, de nuevo el modelo combinado aportaba un resultado claramente mejor con respecto a los otros dos modelos. Estos datos concuerdan con las AUC obtenidas para cada uno de los modelos, de entre las cuáles la única que resultó significativa fue la del modelo combinado (AUC=0,890, $p=0,044$), lo que indica una buena capacidad de discriminación de este modelo.

Por otro lado, los tres modelos presentaron una calibración adecuada, de acuerdo al resultado obtenido en el test de Hosmer-Lemeshow.

Al realizar la comparación de los tres modelos mediante la diferencia de áreas y el IDI, observamos que no existen diferencias entre el modelo clásico y el modelo con algoritmo ELF, lo que supone que no existiría compromiso del rendimiento diagnóstico si sobre el modelo actual o clásico se sustituyese la Vc por el algoritmo ELF. En este caso sería conveniente clarificar, de acuerdo a las características de los pacientes y a la metodología y los recursos disponibles en el centro sanitario, cuál sería la técnica no invasiva más adecuada. De acuerdo con esto, debe mencionarse que la técnica Arfi solo está disponible en centros de referencia, debe realizarse por radiólogos entrenados en el procedimiento,

y además esta sujeta a una no despreciable lista de espera. Por tanto, si tenemos en cuenta que la Vc podría sustituirse por el ELF sin que el modelo perdiese eficacia, y que además la realización del test ELF podría incluirse como parte de la analítica ordinaria de estos pacientes, sin ni siquiera precisar del desplazamiento del paciente hasta el hospital, esta opción parece adecuada, al menos para el control periódico ambulatorio de estos pacientes.

Por otro lado, hemos observado diferencias significativas, de acuerdo a la diferencia de áreas y el IDI, entre el modelo clásico y el combinado, y el modelo con algoritmo ELF y el combinado, siendo en ambos casos el modelo combinado el que ofrece una eficacia diagnóstica mayor (tabla 55 de resultados). Además, tal como reflejan los resultados, el modelo combinado aporta una mejora de la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos con respecto a los otros dos modelos. Estos resultados vienen a confirmar, que la combinación de dos técnicas no invasivas distintas mejora la exactitud diagnóstica frente al uso de las técnicas individuales, suponiendo una mayor seguridad a la hora de intentar limitar la realización de la biopsia.

La evidencia presentada en este estudio demuestra claramente que la combinación de marcadores no invasivos, como son los biomarcadores directos de fibrosis y la técnica Arfi, pueden utilizarse para identificar a los pacientes con EHGNA con principios de esteatohepatitis y fibrosis, por lo que su utilización resultaría muy conveniente para la evaluación del creciente número de pacientes con sospecha de EHGNA, que pueden presentar anomalías en las pruebas de función hepática, obesidad y síndrome metabólico.

Además, en el caso concreto de los pacientes que van a someterse a cirugía bariátrica, el uso de este algoritmo combinado permitiría identificar de manera pre-quirúrgica a aquellos pacientes con hepatopatía más grave, estableciendo por tanto una población de riesgo en la cual podrían proponerse acciones terapéuticas previas, para reducir la morbilidad y mortalidad post-quirúrgica relacionada con la hepatopatía.

Este estudio tiene sin embargo una serie de limitaciones. En primer lugar el reducido número de pacientes. Además, el porcentaje de pacientes que presentaron fibrosis en la

biopsia fue pequeño, y ninguno de ellos presentó cirrosis. Si bien estos datos muestran bastante concordancia con la frecuencia descrita de estas alteraciones histopatológicas en la EHGNA, podrían suponer un sesgo a la hora de la valoración global de los resultados. Además debe tenerse en cuenta, que el estudio se ha realizado en pacientes obesos mórbidos, y aunque la EHGNA se asocia de manera muy significativa con la obesidad, no siempre se dan de forma conjunta. Sin embargo, los resultados obtenidos son esperanzadores, y justifican la realización de estudios posteriores para poder confirmar y extrapolar los resultados obtenidos a todos los pacientes con EHGNA.

VI. CONCLUSIONES

6.1 PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC

1a. Las características de nuestra población de estudio son comparables a las recogidas en la bibliografía y extrapolables a la población afectada de esta patología en nuestro medio. El grupo se compuso de pacientes con una edad media de 48 años, correspondiendo el 60% a individuos del sexo masculino. De forma mayoritaria los pacientes eran naive, estaban infectados por el genotipo 1 del VHC y presentaban el genotipo CT del polimorfismo de la IL28B. La población global presentó una Vc media concordante con la publicada en estudios semejantes, y el porcentaje de pacientes en los que se detectaron signos ecográficos de hepatopatía crónica fue mayoritario, siendo la superficie hepática nodular el más frecuente de estos. Los hallazgos analíticos de la población total se encontraron, a excepción de la ALT, dentro del intervalo de referencia para pacientes sanos.

1b. Los pacientes con un grado significativo de fibrosis hepática presentaron una edad significativamente más alta que el resto, así como un mayor porcentaje de signos ecográficos de hepatopatía crónica y mayores concentraciones de la mayoría de los biomarcadores indirectos.

2. Los valores del algoritmo ELF y de los biomarcadores directos HA, PIIINP y TIMP-1 fueron más altos en los pacientes con fibrosis significativa y en aquellos que presentaban signos ecográficos de hepatopatía crónica.

3. Los biomarcadores directos, los algoritmos matemáticos y los biomarcadores indirectos albúmina, recuento de plaquetas, ACTPR, AST, GGT y α 2-macroglobulina demostraron su eficacia clínica en la identificación de fibrosis significativa. De entre todos los anteriores, el HA y el ELF aportaron los mejores resultados. Por otro lado, el TIMP-1 y el ELF demostraron ser las variables más eficaces en la identificación de cirrosis.

4. La combinación del algoritmo ELF con variables clínicas y biomarcadores indirectos supone una opción válida y más eficaz que cualquiera de las variables de manera individual en la identificación de fibrosis significativa. En la identificación de cirrosis hepática, la opción más eficaz es la combinación del algoritmo ELF, con variables clínicas, biomarcadores indirectos y signos ecográficos de hepatopatía crónica. La utilización de

estos algoritmos resultaría muy conveniente en la evaluación del grado de fibrosis hepática en pacientes con hepatopatía crónica por VHC.

6.2 PACIENTES OBESOS SOMETIDOS A CIRUGÍA BARIÁTRICA

1a. La población total de estudio es representativa de la patología estudiada. El grupo se compuso predominantemente de mujeres de mediana edad con obesidad mórbida, que presentaban en alrededor de la mitad de los casos síndrome metabólico, hipertensión arterial, dislipemia, y en menor frecuencia diabetes mellitus. La velocidad de onda de corte media encontrada en la población fue mayor a la descrita en estudios en pacientes sanos, y en la mayoría de los pacientes se constataron signos ecográficos de hepatopatía crónica, siendo la esteatosis el más frecuente de ellos. Prácticamente la totalidad de los pacientes presentó alteraciones en la biopsia hepática, correspondiendo en la mayoría de los casos a esteatosis, seguido de esteatohepatitis y fibrosis. Los hallazgos analíticos de la población total se encontraron dentro del intervalo de referencia para pacientes sanos.

1b. El porcentaje de sujetos hipertensos o con síndrome metabólico fue significativamente superior en el grupo de estudio compuesto por los pacientes cuya biopsia hepática correspondió a los estadios dos, tres y cuatro de la clasificación de *Matteoni*, con respecto al encontrado en el grupo de pacientes cuya biopsia se clasificó en el estadio uno o no presentó alteraciones. Además, este último grupo presentó un valor de velocidad de onda de corte significativamente más bajo.

2. Los valores encontrados del algoritmo ELF y del biomarcador HA fueron significativamente más altos en el grupo de pacientes que presentaron en la biopsia, además de esteatosis, infiltrados inflamatorios, balonización hepatocitaria, hialina de mallory o fibrosis, así como en los pacientes hipertensos. Por otro lado, los pacientes afectados de síndrome metabólico presentaron mayores valores de ELF.

3. El biomarcador HA, los algoritmos ELF y Fibrometer y la velocidad de onda de corte demostraron su eficacia clínica en la evaluación de la hepatopatía crónica de la población de estudio. El algoritmo ELF fue, de entre estas, la variable que presentó una mejor relación sensibilidad-especificidad.

4. La combinación de los biomarcadores directos de fibrosis y la técnica Arfi representan una opción válida y más eficaz que el uso de biomarcadores o técnicas individuales, para la identificación de pacientes con EHGNA con principios de esteatohepatitis y fibrosis, por lo que su utilización resultaría muy conveniente en la evaluación y estratificación del creciente número de pacientes con sospecha de esta enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005 Feb; 115 (2):209-18.
- (2) Roulot D, Costes JL, Buyck JF, Warzocha U, Gambier N, Czernichow S, et al. Transient elastography as a screening tool for liver fibrosis and cirrhosis in a community-based population aged over 45 years. *Gut* 2011 Jul; 60 (7):977-84.
- (3) Odena G, Bataller R. Liver fibrogenesis: physiopathology. *Gastroenterol Hepatol* 2012 Dec; 35 Suppl 2:3-9.
- (4) Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21 (4):475-90.
- (5) Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008 Jan; 88 (1):125-72.
- (6) Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007 Jun; 381 (2):107-13.
- (7) Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003 Jul; 200 (4):504-15.
- (8) Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:425-56.
- (9) Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Jul; 23 (7 Pt 1):1024-35.
- (10) Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008 May; 134 (6):1655-69.
- (11) Gressner AM, Gao CF, Gressner OA. Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: a short survey. *World J Gastroenterol* 2009 May 28; 15 (20):2433-40.
- (12) Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000 Jan 28; 275 (4):2247-50.
- (13) Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1:S38-S53.
- (14) Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002 Apr 1; 7: d793-d807.
- (15) Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004 Feb; 16 (2):123-6.

- (16) Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001 Jul 5; 345 (1):41-52.
- (17) Bialek SR, Terrault NA. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2006 Nov; 10 (4):697-715.
- (18) Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002 Nov; 36 (5 Suppl 1):S35-S46.
- (19) Sharma P, Lok A. Viral hepatitis and liver transplantation. *Semin Liver Dis* 2006 Aug; 26 (3):285-97.
- (20) Soriano V, Perelson AS, Zoulim F. Why are there different dynamics in the selection of drug resistance in HIV and hepatitis B and C viruses? *J Antimicrob Chemother* 2008 Jul; 62 (1):1-4.
- (21) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr 3; 104 (14):5848-53.
- (22) Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol* 2013 Mar; 19 (1):17-25.
- (23) Soriano V, Vispo E, Poveda E, et al. Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1673-86.
- (24) Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993 Nov; 74 (Pt 11): 2391-9.
- (25) Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994 May; 19 (5):1321-4.
- (26) Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997 Mar 22; 349 (9055):825-32.
- (27) Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.
- (28) Bone-Larson CL, Simpson KJ, Colletti LM, Lukacs NW, Chen SC, Lira S, et al. The role of chemokines in the immunopathology of the liver. *Immunol Rev* 2000 Oct; 177: 8-20.
- (29) Ando K, Guidotti LG, Wirth S, Ishikawa T, Missale G, Moriyama T, et al. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 1994 Apr 1; 152 (7):3245-53.

- (30) Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, et al. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001 Dec 17; 194 (12):1755-66.
- (31) Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004 Feb; 126 (2):529-40.
- (32) Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006 Jan; 55 (1):123-30.
- (33) Guido M, Mangia A, Faa G. Chronic viral hepatitis: the histology report. *Dig Liver Dis* 2011 Mar; 43 Suppl 4:S331-S343.
- (34) Lefkowitz JH. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. *Arch Med Res* 2007 Aug; 38 (6):634-43.
- (35) Butt AA, Kanwal F. Boceprevir and telaprevir in the management of hepatitis C virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 2012 Jan 1; 54 (1):96-104.
- (36) Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2014 Nov 21; 20 (43):15992-6013.
- (37) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009 Sep 17; 461 (7262):399-401.
- (38) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009 Oct; 41 (10):1105-9.
- (39) McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010 Jun; 138 (7): 2307-14.
- (40) Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, bad-Molina C, Romero-Gomez M, Barroso N, guilar-Reina J, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010 Jul; 52 (1):33-7.
- (41) Nouredin M, Wright EC, Alter HJ, Clark S, Thomas E, Chen R, et al. Association of IL28B genotype with fibrosis progression and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C: a longitudinal analysis. *Hepatology* 2013 Nov; 58 (5):1548-57.

- (42) Fabris C, Falletti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol* 2011 Apr; 54 (4):716-22.
- (43) Marabita F, Aghemo A, De NS, Rumi MG, Cheroni C, Scavelli R, et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology* 2011 Oct; 54 (4):1127-34.
- (44) Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 2010 Jul; 59 (7):969-74.
- (45) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980 Jul; 55 (7):434-8.
- (46) Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005 Jul; 42 (1):44-52.
- (47) Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol* 2012 May; 47 (5):586-95.
- (48) Marzuillo P, Miraglia Del GE, Santoro N. Pediatric fatty liver disease: role of ethnicity and genetics. *World J Gastroenterol* 2014 Jun 21; 20 (23):7347-55.
- (49) Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; 28 (1):155-61.
- (50) Miele L, Valenza V, La TG, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009 Jun; 49 (6):1877-87.
- (51) Bugianessi E, McCullough A, Marchesini G. Insuline resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 987-1000.
- (52) Almeda P, Cuevas D, Aguilar CA. Metabolic Syndrome and non alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatology. Hepatology* 2009; 8 suppl:s18-s24.
- (53) Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005 May; 115 (5):1139-42.
- (54) Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic JL, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007 Sep 14; 13 (34):4539-50.

- (55) Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002 Apr; 35 (4):898-904.
- (56) Musso G, Gambino R, De MF, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003 Apr; 37 (4):909-16.
- (57) Brea A, Puzo J. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl* 2010; 22(6):259-71.
- (58) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998 Apr; 114 (4):842-5.
- (59) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003 May; 37 (5):1202-19.
- (60) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999 Sep; 94 (9):2467-74.
- (61) Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007 Feb; 11 (1):1-16, vii.
- (62) Nalbantoglu IL, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014 Jul 21; 20 (27):9026-37.
- (63) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999 Jun; 116 (6):1413-9.
- (64) Solis-Herruzo JA, Solis-Munoz P. [Genetic factors in non-alcoholic fatty liver disease]. *Rev Esp Enferm Dig* 2008 Apr; 100 (4):195-201.
- (65) Angulo P. Long-Term Mortality in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Is Liver Histology of Any Prognostic Significance? *Hepatology* 2010; 51: 373-5.
- (66) Hashimoto E, Tokushige K. Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. *J Gastroenterol* 2011 Jan; 46 Suppl 1:63-9.
- (67) Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia* 2008 Nov; 51 (11):1947-53.
- (68) Baršić N, Lerotić I, Smirčić-Duvnjak L, Tomašić V, Duvnjak M. Overview and developments in noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (30):3945-54.
- (69) Fierbinteanu-Braticevici C, Dina I, Petrisor A, Tribus L, Negreanu L, Carstoiu C. Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis 1. *World J Gastroenterol* 2010 Oct 14; 16 (38):4784-91.

- (70) Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase AR, Mandolesi D, Montrone L, et al. Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease, availability and accuracy of non-invasive methods. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 Feb; 37 (4):392-400.
- (71) Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008 Feb; 47 (2):455-60.
- (72) Mishra P, Younossi ZM. Abdominal ultrasound for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Am J Gastroenterol* 2007 Dec; 102 (12):2716-7.
- (73) Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *AJR Am J Roentgenol* 2007 Dec; 189 (6):W320-W323.
- (74) Bohte AE, van W, 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 Jan; 21 (1):87-97.
- (75) 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 Jun; 259 (3):749-56.
- (76) Schwenger KJ, Allard JP. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014 Feb 21; 20 (7):1712-23.
- (77) Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know. *World J Gastroenterol* 2014 Sep 28; 20 (36):12956-80.
- (78) Angulo P. GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Apr 15; 25 (8):883-9.
- (79) Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006 Mar; 40 Suppl 1:S5-10.
- (80) Salas-Salvado J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B. [SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]. *Med Clin (Barc)* 2007 Feb 10;128(5):184-96.
- (81) Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2007 Aug 23; 357 (8):753-61.
- (82) Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, et al. Swedish Obese Subjects Study. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007; 375:741-52.

- (83) Mattar SG, Velcu LM, Rabinovitz M, Demetris AJ, Krasinskas AM, Barinas-Mitchell E, et al. Surgically-induced weight loss significantly improves nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Ann Surg* 2005 Oct; 242 (4):610-7.
- (84) Verna EC, Berk PD. Role of fatty acids in the pathogenesis of obesity and fatty liver: impact of bariatric surgery. *Semin Liver Dis* 2008 Nov; 28 (4):407-26.
- (85) Leslie D, Kellogg TA, Ikramuddin S. Bariatric surgery primer for the internist: keys to the surgical consultation. *Med Clin North Am* 2007 May; 91 (3):353-81, x.
- (86) Camberos-Solis R, Jimenez-Cruz A, Bacardi-Gascon M, Culebras JM. [Long-term efficacy and safety of Roux-en-Y gastric bypass and gastric banding: systematic review]. *Nutr Hosp* 2010 Nov; 25 (6):964-70.
- (87) Poynard T, Ratziu V, Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol* 2000 Jun; 14 (6):543-8.
- (88) Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001 Feb 15; 344 (7):495-500.
- (89) Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 Dec; 38 (6):1449-57.
- (90) Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981 Sep; 1 (5):431-5.
- (91) Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991 Nov; 13 (3):372-4.
- (92) Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995 Dec; 19 (12):1409-17.
- (93) Ludwig J. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary. *Gastroenterology* 1993 Jul; 105 (1):274-8.
- (94) Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995 Jun; 22 (6):696-9.
- (95) Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996 Aug; 24 (2):289-93.
- (96) Puri P, Sanyal AJ. Definiciones, factores de riesgo y pruebas diagnósticas en la enfermedad por hígado Graso No Alcohólico. *Clinical Liver Disease* 2013; 2: S48Š-S52Š.

- (97) Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002 Oct; 97 (10):2614-8.
- (98) Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, et al. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986 Mar 8; 1 (8480):523-5.
- (99) Afdhal NH. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood tests? *Hepatology* 2003 May; 37 (5):972-4.
- (100) Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology* 2009 Mar; 49 (3):1017-44.
- (101) Zwiebel WJ. Sonographic diagnosis of diffuse liver disease. *Semin Ultrasound CT MR* 1995 Feb; 16 (1):8-15.
- (102) Colli A, Fraquelli M, Andreoletti M, Marino B, Zuccoli E, Conte D. Severe liver fibrosis or cirrhosis: accuracy of US for detection--analysis of 300 cases. *Radiology* 2003 Apr; 227 (1):89-94.
- (103) Di LA, Cestari C, Lomazzi A, Beretta L. Cirrhosis: diagnosis with sonographic study of the liver surface. *Radiology* 1989 Aug; 172 (2):389-92.
- (104) Marin-Serrano E., Segura-Cabral JM. Usefulness of ultrasonography for the diagnosis of difuse liver diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 2011 May; 103 (5):227-31.
- (105) Caturelli E, Castellano L, Fusilli S, Palmentieri B, Niro GA, del Vecchio-Blanco C, et al. Coarse nodular US pattern in hepatic cirrhosis: risk for hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2003 Mar; 226 (3):691-7.
- (106) Joseph AE, Saverymuttu SH, al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol* 1991 Jan; 43 (1):26-31.
- (107) Macías-Rodríguez MA, Rendon-Unceta P, Ramos-Clemente-Romero MT, Troiteiro-Carrasco LM, Serrano-Leon MD. Prospective validation of two models for ultrasonographic diagnosis of cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2011 May; 103 (5):232-7.
- (108) Goyal AK, Pokharna DS, Sharma SK. Ultrasonic diagnosis of cirrhosis: reference to quantitative measurements of hepatic dimensions. *Gastrointest Radiol* 1990; 15 (1):32-4.
- (109) Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging* 1991 Apr; 13 (2):111-34.

- (110) 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 Apr 1; 48 (7):963-72.
- (111) Gheonea IA, Stoica Z, Bondari S. Differential diagnosis of breast lesions using ultrasound elastography. *Indian J Radiol Imaging* 2011 Oct; 21 (4):301-5.
- (112) Mansor M, Okasha H, Esmat S, Hashem AM, Attia KA, El-din HH. Role of ultrasound elastography in prediction of malignancy in thyroid nodules. *Endocr Res* 2012; 37 (2):67-77.
- (113) Barr RG, Memo R, Schaub CR. Shear wave ultrasound elastography of the prostate: initial results. *Ultrasound Q* 2012 Mar; 28 (1):13-20.
- (114) 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 Jun; 46 (6):843-53.
- (115) Yamakoshi Y, Sato J, Sato T. Ultrasonic imaging of internal vibration of soft tissue under forced vibration. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 1990; 37 (2):45-53.
- (116) Parker KJ, Huang SR, Musulin RA, Lerner RM. Tissue response to mechanical vibrations for "sonoelasticity imaging". *Ultrasound Med Biol* 1990; 16 (3):241-6.
- (117) Faria SC, Ganesan K, Mwangi I, Shiehmorteza M, Viamonte B, Mazhar S, et al. MR imaging of liver fibrosis: current state of the art. *Radiographics* 2009 Oct; 29 (6):1615-35.
- (118) Krouskop TA, Dougherty DR, Vinson FS. A pulsed Doppler ultrasonic system for making noninvasive measurements of the mechanical properties of soft tissue. *J Rehabil Res Dev* 1987; 24(2):1-8.
- (119) Wilson LS, Robinson DE. Ultrasonic measurement of small displacements and deformations of tissue. *Ultrason Imaging* 1982 Jan; 4 (1):71-82.
- (120) Dickinson RJ, Hill CR. Measurement of soft tissue motion using correlation between A-scans. *Ultrasound Med Biol* 1982; 8 (3):263-71.
- (121) Tissue Strain Analytics Virtual Touch Tissue Imaging and Quantification ACUSON S2000 Ultrasound System, Siemens. Disponible en <http://www.healthcare.siemens.com/ultrasound/radiology/acuson-s2000-ultrasound-system> 2014.
- (122) Zhai L, Palmeri ML, Bouchard RR, Nightingale RW, Nightingale KR. An integrated indenter-ARFI imaging system for tissue stiffness quantification. *Ultrason Imaging* 2008 Apr; 30 (2):95-111.

- (123) 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 Feb; 34 (2):309-25.
- (124) 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 Nov 28; 15 (44):5525-32.
- (125) Popescu A, Sporea I, Sirli R, Bota S, Focsa M, Danila M, et al. The mean values of liver stiffness assessed by Acoustic Radiation Force Impulse elastography in normal subjects. *Med Ultrason* 2011 Mar; 13 (1):33-7.
- (126) 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 Aug; 256 (2):640-7.
- (127) 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 Jul; 11 (7):532-8.
- (128) 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 Sep; 22 (9):1074-84.
- (129) 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 Dec; 29 (12):1705-13.
- (130) Beaugrand M. [Fibroscan: instructions for use]. *Gastroenterol Clin Biol* 2006 Apr; 30 (4):513-4.
- (131) Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, et al. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008 Apr; 134 (4):960-74.
- (132) Degos F, Perez P, Roche B, Mahmoudi A, Asselineau J, Voitot H, et al. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: a multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *J Hepatol* 2010 Dec; 53 (6):1013-21.
- (133) Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, Douvin C, Poupon R, de L, V, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009 Feb; 29 (2):242-7.
- (134) Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2014 Sep 14; 20 (34):12031-8.

- (135) Kwok R, Tse YK, Wong GL, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther* 2014 Feb; 39 (3):254-69.
- (136) Sanchez-Conde M, Montes-Ramirez ML, Miralles P, Alvarez JM, Bellon JM, Ramirez M, et al. Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers. *J Viral Hepat* 2010 Apr; 17 (4):280-6.
- (137) Foucher J, Castera L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006 Apr; 18 (4):411-2.
- (138) de FR, Dell'Era A. Non-invasive diagnosis of cirrhosis and the natural history of its complications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21 (1):3-18.
- (139) Talwalkar JA, Yin M, Fidler JL, Sanderson SO, Kamath PS, Ehman RL. Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis: emerging clinical applications. *Hepatology* 2008 Jan; 47 (1):332-42.
- (140) Yin M, Talwalkar JA, Glaser KJ, Manduca A, Grimm RC, Rossman PJ, et al. Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007 Oct; 5 (10):1207-13.
- (141) Bonekamp S, Kamel I, Solga S, Clark J. Can imaging modalities diagnose and stage hepatic fibrosis and cirrhosis accurately? *J Hepatol* 2009 Jan; 50 (1):17-35.
- (142) Romero-Gomez M, Gomez-Gonzalez E, Madrazo A, Vera-Valencia M, Rodrigo L, Perez-Alvarez R, et al. Optical analysis of computed tomography images of the liver predicts fibrosis stage and distribution in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008 Mar; 47 (3):810-6.
- (143) Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004 Jun; 99 (6):1160-74.
- (144) Henry J.B. Proteínas específicas. *El laboratorio en el diagnóstico clínico*. 20 ed. Madrid: 2005. p. 249-64.
- (145) Henry J.B. Evaluación de la función y el daño hepático. *El laboratorio en el diagnóstico clínico*. 20 ed. Madrid: 2005. p. 264-80.
- (146) Henry J.B. Enzimología Clínica. *El laboratorio en el diagnóstico clínico*. Madrid: 2005. p. 281-303.

- (147) Park GJ, Lin BP, Ngu MC, Jones DB, Katelaris PH. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? *J Gastroenterol Hepatol* 2000 Apr; 15 (4):386-90.
- (148) Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998 Jan; 93 (1):44-8.
- (149) Tellez-Avila FI, Chavez-Tapia NC, Torre-Delgadillo A. Coagulation disorders in cirrhosis. *Rev Invest Clin* 2007 Mar; 59 (2):153-60.
- (150) Croquet V, Vuillemin E, Ternisien C, Pilette C, Oberti F, Gallois Y, et al. Prothrombin index is an indirect marker of severe liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 Oct; 14 (10):1133-41.
- (151) Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, Simpson J, Bray G, Catterall AP, et al. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993 Oct 9; 342 (8876):895-8.
- (152) Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001 Apr 7; 357 (9262):1069-75.
- (153) Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002 Mar; 9(2):128-33.
- (154) Naveau S, Poynard T, Benattar C, Bedossa P, Chaput JC. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest. *Dig Dis Sci* 1994 Nov; 39 (11):2426-32.
- (155) Rostami S, Parsian H. Hyaluronic Acid: from biochemical characteristics to its clinical translation in assessment of liver fibrosis. *Hepat Mon* 2013; 13 (12):e13787.
- (156) Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996 Apr; 42 (4):558-63.
- (157) McHutchison JG, Blatt LM, de MM, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000 Aug; 15 (8):945-51.
- (158) Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, Deydier R, Renou C, Botta-Fridlund D, et al. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol* 2005 Jul 11; 4:6.

- (159) Serejo F, Costa A, Oliveira AG, Ramalho F, Batista A, De Moura MC. Alpha-interferon improves liver fibrosis in chronic hepatitis C: clinical significance of the serum N-terminal propeptide of procollagen type III. *Dig Dis Sci* 2001 Aug; 46 (8):1684-9.
- (160) Mitsuda A, Suou T, Ikuta Y, Kawasaki H. Changes in serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 after interferon alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000 Apr; 32 (4):666-72.
- (161) Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004 Feb; 99 (2):271-9.
- (162) Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002 Feb; 316 (1-2):71-81.
- (163) Flisiak R, Maxwell P, Prokopowicz D, Timms PM, Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1: possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2002 Sep; 49 (47):1369-72.
- (164) Kanzler S, Baumann M, Schirmacher P, Dries V, Bayer E, Gerken G, et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J Viral Hepat* 2001 Nov; 8 (6):430-7.
- (165) Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000 Jun; 32 (6):911-20.
- (166) Gressner OA, Gao C. Monitoring fibrogenic progression in the liver. *Clin Chim Acta* 2014 Jun 10; 433:111-22.
- (167) Rosa H, Parise ER. Is there a place for serum laminin determination in patients with liver disease and cancer? *World J Gastroenterol* 2008 Jun 21; 14 (23):3628-32.
- (168) Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 Aug; 38 (2):518-26.
- (169) Kruger FC, Daniels CR, Kidd M, Swart G, Brundyn K, van RC, et al. APRI: a simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S Afr Med J* 2011 Jul; 101 (7):477-80.
- (170) Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Bayrak M, Aktas B, Ozdogan O. Noninvasive assessment of liver fibrosis with the aspartate transaminase to platelet ratio

- index (APRI): Usefulness in patients with chronic liver disease: APRI in chronic liver disease. *Hepat Mon* 2011 Feb; 11 (2):103-6.
- (171) Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002 Oct; 36 (4 Pt 1):986-92.
- (172) Erdogan S, Dogan HO, Sezer S, Uysal S, Ozhamam E, Kayacetin S, et al. The diagnostic value of non-invasive tests for the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients. *Scand J Clin Lab Invest* 2013 Mar 20.
- (173) Guzelbulut F, Cetinkaya ZA, Sezikli M, Yasar B, Ozkara S, Ovunc AO. AST-platelet ratio index, Forn index and FIB-4 in the prediction of significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Turk J Gastroenterol* 2011 Jun; 22 (3):279-85.
- (174) Hadi P, Maryam A, Yousef Y. *Clinical Application of Non-Invasive Markers of Liver Fibrosis*. 2013.
- (175) Kim BK, Kim SU, Kim HS, Park JY, Ahn SH, Chon CY, et al. Prospective validation of FibroTest in comparison with liver stiffness for predicting liver fibrosis in Asian subjects with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2012; 7 (4):e35825.
- (176) Ratzu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006; 6:6.
- (177) Naveau S, Raynard B, Ratzu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, et al. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005 Feb; 3 (2):167-74.
- (178) Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005 Dec; 42 (6):1373-81.
- (179) Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, et al. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2009 Jan; 50 (1):165-73.
- (180) Leroy V, Sturm N, Faure P, Trocme C, Marlu A, Hilleret MN, et al. Prospective evaluation of FibroTest(R), FibroMeter(R), and HepaScore(R) for staging liver fibrosis in chronic hepatitis B: comparison with hepatitis C. *J Hepatol* 2014 Jul; 61 (1):28-34.
- (181) Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005 Oct; 51 (10):1867-73.

- (182) Adams LA, George J, Bugianesi E, Rossi E, De Boer WB, van der PD, et al. Complex non-invasive fibrosis models are more accurate than simple models in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2011 Oct; 26 (10):1536-43.
- (183) Raftopoulos SC, George J, Bourliere M, Rossi E, De Boer WB, Jeffrey GP, et al. Comparison of noninvasive models of fibrosis in chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2011 Jul 12.
- (184) Chrostek L, Panasiuk A. Liver fibrosis markers in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2014 Jul 7; 20 (25):8018-23.
- (185) Hsieh YY, Tung SY, Lee IL, Lee K, Shen CH, Wei KL, et al. FibroQ: an easy and useful noninvasive test for predicting liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis. *Chang Gung Med J* 2009 Nov; 32 (6):614-22.
- (186) Hsieh YY, Tung SY, Lee K, Wu CS, Wei KL, Shen CH, et al. Routine blood tests to predict liver fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2012 Feb 28; 18 (8):746-53.
- (187) Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006 Jun; 43 (6):1317-25.
- (188) Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007 Jul; 46 (1):32-6.
- (189) Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 Oct; 7 (10):1104-12.
- (190) Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004 Dec; 127 (6):1704-13.
- (191) Parkes J, Guha IN, Roderick P, Harris S, Cross R, Manos MM, et al. Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test accurately identifies liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2011 Jan; 18 (1):23-31.
- (192) Zarski JP, Sturm N, Guechot J, Zafrani ES, Vaubourdolle M, Thoret S, et al. Contribution of the ELFG test in algorithms of non-invasive markers towards the diagnosis of significant fibrosis in chronic hepatitis C. *PLoS One* 2013; 8(3):e59088.
- (193) Fernandes FF, Ferraz ML, Andrade LE, Dellavance A, Terra C, Pereira G, et al. Enhanced Liver Fibrosis Panel as a Predictor of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients. *J Clin Gastroenterol* 2014 Apr 5.

- (194) Trembling PM, Lampertico P, Parkes J, Tanwar S, Vigano M, Facchetti F, et al. Performance of Enhanced Liver Fibrosis test and comparison with transient elastography in the identification of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2014 Jun; 21 (6):430-8.
- (195) Dvorak K, Stritesky J, Petrtyl J, Vitek L, Sroubkova R, Lenicek M, et al. Use of non-invasive parameters of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in daily practice - an exploratory case-control study. *PLoS One* 2014; 9(10):e111551.
- (196) Mayo MJ, Parkes J, ms-Huet B, Combes B, Mills AS, Markin RS, et al. Prediction of clinical outcomes in primary biliary cirrhosis by serum enhanced liver fibrosis assay. *Hepatology* 2008 Nov; 48 (5):1549-57.
- (197) Takaki S, Kawakami Y, Miyaki D, Nakahara T, Naeshiro N, Murakami E, et al. Non-invasive liver fibrosis score calculated by combination of virtual touch tissue quantification and serum liver functional tests in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2014 Mar; 44 (3):280-7.
- (198) Sporea I, Bota S, Peck-Radosavljevic M, Sirli R, Tanaka H, Iijima H, et al. Acoustic Radiation Force Impulse elastography for fibrosis evaluation in patients with chronic hepatitis C: an international multicenter study. *Eur J Radiol* 2012 Dec; 81 (12):4112-8.
- (199) Friedrich-Rust M, Nierhoff J, Lupsor M, Sporea I, Fierbinteanu-Braticevici C, Strobel D, et al. Performance of Acoustic Radiation Force Impulse imaging for the staging of liver fibrosis: a pooled meta-analysis. *J Viral Hepat* 2012 Feb; 19 (2):e212-e219.
- (200) Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Morishita N, Harada N, Miyazaki M, et al. Significance of liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse (ARFI) among hepatitis C patients. *J Med Virol* 2014 Feb; 86 (2):241-7.
- (201) Silva Junior RG, Schmillevitch J, Nascimento MF, Miranda ML, Brant PE, Schulz PO, et al. Acoustic radiation force impulse elastography and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2014 Aug; 49 (8):986-92.
- (202) Nishikawa T, Hashimoto S, Kawabe N, Harata M, Nitta Y, Murao M, et al. Factors correlating with acoustic radiation force impulse elastography in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2014 Feb 7; 20 (5):1289-97.
- (203) Chen SH, Li YF, Lai HC, Kao JT, Peng CY, Chuang PH, et al. Effects of patient factors on noninvasive liver stiffness measurement using acoustic radiation force impulse elastography in patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol* 2012; 12:105.
- (204) Rizzo L, Calvaruso V, Cacopardo B, Alessi N, Attanasio M, Petta S, et al. Comparison of transient elastography and acoustic radiation force impulse for

- non-invasive staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2011 Dec; 106 (12):2112-20.
- (205) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002 Dec 17; 106 (25):3143-421.
- (206) Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology* 2005 Jan; 16 (1):73-81.
- (207) Youden W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950 Jan; 3 (1):32-5.
- (208) DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988 Sep; 44 (3):837-45.
- (209) Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York, Wiley. 2000.
- (210) Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med* 2008 Jan 30; 27 (2):157-72.
- (211) Wedemeyer H, Duberg AS, Buti M, Rosenberg WM, Frankova S, Esmat G, et al. Strategies to manage hepatitis C virus (HCV) disease burden 1. *J Viral Hepat* 2014 May; 21 Suppl 1:60-89.
- (212) Graells-Ferrer M. Hepatitis C e interleukina 28B (IL28B). Estudio de coste/beneficio de su determinación y frecuencia de polimorfismos en nuestro entorno. *Gest y Eval Cost Sanit* 2013; 14 (1):71-99.
- (213) Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadham D, Sterling RK, et al. Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008 Mar; 47 (3):789-98.
- (214) Rojas A, del Campo JA, Maraver M, Aparcero R, Garcia-Valdecasas M, Diago M, et al. Hepatitis C virus infection alters lipid metabolism depending on IL28B polymorphism and viral genotype and modulates gene expression in vivo and in vitro. *J Viral Hepat* 2014 Jan; 21 (1):19-24.
- (215) Guzman-Aroca F, Reus M, Berna-Serna JD, Serrano L, Serrano C, Gilabert A, et al. Reproducibility of shear wave velocity measurements by acoustic radiation force impulse imaging of the liver: a study in healthy volunteers. *J Ultrasound Med* 2011 Jul; 30 (7):975-9.

- (216) Shen L, Li JQ, Zeng MD, Lu LG, Fan ST, Bao H. Correlation between ultrasonographic and pathologic diagnosis of liver fibrosis due to chronic virus hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006 Feb 28; 12 (8):1292-5.
- (217) Bota S, Sporea I, Sirli R, Popescu A, Jurchis A. Factors which influence the accuracy of acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography for the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Ultrasound Med Biol* 2013 Mar; 39 (3):407-12.
- (218) Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009 Apr; 49 (4):1335-74.
- (219) Zheng RQ, Wang QH, Lu MD, Xie SB, Ren J, Su ZZ, et al. Liver fibrosis in chronic viral hepatitis: an ultrasonographic study. *World J Gastroenterol* 2003 Nov; 9 (11):2484-9.
- (220) Yoon KT, Lim SM, Park JY, Kim dY, Ahn SH, Han KH, et al. Liver stiffness measurement using acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography and effect of necroinflammation. *Dig Dis Sci* 2012 Jun; 57 (6):1682-91.
- (221) Kayadibi H, Yasar B, Ozkara S, Serdar MA, Kurdas OO, Gonen C. The diagnostic accuracy of the Forns index, platelet count and AST to Platelet Ratio Index derived fibrosis index for the prediction of Hepatitis C virus-related significant liver fibrosis and cirrhosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2014 Apr; 74 (3):240-7.
- (222) Cadranel JF, Mathurin P. Prothrombin index decrease: a useful and reliable marker of extensive fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 Oct; 14 (10):1057-9.
- (223) Romero-Gomez M. Hepatitis C and insulin resistance: steatosis, fibrosis and non-response. *Rev Esp Enferm Dig* 2006 Aug; 98 (8):605-15.
- (224) Aparcero LR, Campo JA, Romero-Gomez M. Hepatitis C and metabolic syndrome. *Gastroenterol Hepatol* 2010 Aug; 33 (7):530-40.
- (225) Sastre Gallego A. Planteamientos nutricionales en pacientes con hepatopatía crónica. *Tratado de Nutrición*. 1999. p. 993-1008.
- (226) Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007 Feb; 45 (2):297-306.
- (227) Kalantari H, Hoseini H, Babak A, Yaran M. Validation of hepascore as a predictor of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection 2. *Hepat Res Treat* 2011; 2011:972759.
- (228) Valva P, Casciato P, az Carrasco JM, Gadano A, Galdame O, Galoppo MC, et al. The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. *PLoS One* 2011; 6 (8):e23218.

- (229) Jeong JY, Kim TY, Sohn JH, Kim Y, Jeong WK, Oh YH, et al. Real time shear wave elastography in chronic liver diseases: accuracy for predicting liver fibrosis, in comparison with serum markers. *World J Gastroenterol* 2014 Oct 14; 20 (38):13920-9.
- (230) Shin YH, Kim KE, Lee YJ, Nam JH, Hong YM, Shin HJ. Associations of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and their inhibitor, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, with obesity-related biomarkers in apparently healthy adolescent boys. *Korean J Pediatr* 2014 Dec; 57 (12):526-32.
- (231) Petersen JR, Stevenson HL, Kasturi KS, Naniwadekar A, Parkes J, Cross R, et al. Evaluation of the aspartate aminotransferase/platelet ratio index and enhanced liver fibrosis tests to detect significant fibrosis due to chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2014 Apr; 48 (4):370-6.
- (232) Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol* 2013 Aug; 59 (2):236-42.
- (233) Yoo EJ, Kim BK, Kim SU, Park JY, Kim dY, Ahn SH, et al. Normal enhanced liver fibrosis (ELF) values in apparently healthy subjects undergoing a health check-up and in living liver donors in South Korea. *Liver Int* 2013 May; 33 (5):706-13.
- (234) Knudsen CS, Heickendorff L, Nexø E. Measurement of amino terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) employing the ADVIA Centaur platform. Validation, reference interval and comparison to UniQ RIA. *Clin Chem Lab Med* 2014 Feb; 52 (2):237-41.
- (235) Ripoli M, Paziienza V. Impact of HCV genetic differences on pathobiology of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011 Sep; 9 (9):747-59.
- (236) Fagan KJ, Pretorius CJ, Horsfall LU, Irvine KM, Wilgen U, Choi K, et al. ELF score ≥ 9.8 indicates advanced hepatic fibrosis and is influenced by age, steatosis and histological activity. *Liver Int* 2014 Dec 14.
- (237) Aguilera V, Berenguer M. Hepatitis C and fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2004 Jun; 96 (6):402-8.
- (238) Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004 Dec; 41 (6):935-42.
- (239) Parsian H, Nouri M, Rahimipour A, Somi MH, Qujeq D. Comparison of five liver fibrosis indexes with serum levels of laminin and N terminal peptide of procollagen type III in chronic hepatitis patients. *Liver Biopsy*. Rijeka, Croatia: InTech 2011.

- (240) Busk TM, Bendtsen F, Nielsen HJ, Jensen V, Brunner N, Moller S. TIMP-1 in patients with cirrhosis: relation to liver dysfunction, portal hypertension, and hemodynamic changes. *Scand J Gastroenterol* 2014 Sep; 49 (9):1103-10.
- (241) Friedrich-Rust M, Rosenberg W, Parkes J, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C. Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol* 2010; 10:103.
- (242) Crespo G, Fernandez-Varo G, Marino Z, Casals G, Miquel R, Martinez SM, et al. ARFI, FibroScan, ELF, and their combinations in the assessment of liver fibrosis: a prospective study. *J Hepatol* 2012 Aug; 57 (2):281-7.
- (243) Martinez SM, Crespo G, Navasa M, Forns X. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 2011 Jan; 53 (1):325-35.
- (244) Castera L, Sebastiani G, Le BB, de L, V, Couzigou P, Alberti A. Prospective comparison of two algorithms combining non-invasive methods for staging liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2010 Feb; 52(2):191-8.
- (245) Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014 Jun 21; 20 (23):7392-402.
- (246) Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterol* 2014 Oct; 5 (4):277-86.
- (247) Naveau S, Lamouri K, Pourcher G, Njike-Nakseu M, Ferretti S, Courie R, et al. The diagnostic accuracy of transient elastography for the diagnosis of liver fibrosis in bariatric surgery candidates with suspected NAFLD. *Obes Surg* 2014 Oct; 24 (10):1693-701.
- (248) Díez-Rodríguez R, Ballesteros-Pomar MD, Calleja-Fernandez A, Gonzalez-De-Francisco T, Gonzalez-Herraez L, Calleja-Antolin S, et al. Insulin resistance and metabolic syndrome are related to non-alcoholic fatty liver disease, but not visceral adiposity index, in severely obese patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2014 Dec; 106 (8):522-8.
- (249) Feijo SG, Lima JM, Oliveira MA, Patrocinio RM, Moura-Junior LG, Campos AB, et al. The spectrum of non alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: prevalence and associate risk factors. *Acta Cir Bras* 2013 Nov; 28 (11):788-93.
- (250) Guzman-Aroca F, Frutos-Bernal MD, Bas A, Lujan-Mompean JA, Reus M, Berna-Serna JD, et al. Detection of non-alcoholic steatohepatitis in patients with morbid obesity before bariatric surgery: preliminary evaluation with acoustic radiation force impulse imaging. *Eur Radiol* 2012 Nov; 22 (11):2525-32.
- (251) Pulzi FB, Cisternas R, Melo MR, Ribeiro CM, Malheiros CA, Salles JE. New clinical score to diagnose nonalcoholic steatohepatitis in obese patients. *Diabetol Metab Syndr* 2011; 3 (1):3.

- (252) Koruk M, Savas MC, Yilmaz O, Taysi S, Karakok M, Gundogdu C, et al. Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003 Aug; 37 (2):177-82.
- (253) McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010 Sep; 59 (9):1265-9.
- (254) Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 Oct; 7 (10):1104-12.
- (255) Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011 Aug; 34 (3):274-85.
- (256) Fierbinteanu BC, Sporea I, Panaitescu E, Tribus L. Value of acoustic radiation force impulse imaging elastography for non-invasive evaluation of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ultrasound Med Biol* 2013 Nov; 39 (11):1942-50.
- (257) Palmeri ML, Wang MH, Rouze NC, Abdelmalek MF, Guy CD, Moser B, et al. Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis using acoustic radiation force-based shear stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011 Sep; 55 (3):666-72.
- (258) Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2009 Jan; 136 (1):160-7.
- (259) Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014 Dec; 28(11):607-14.
- (260) Cengiz M, Candir BA, Yilmaz G, Akyol G, Ozenirler S. Is increased red cell distribution width an indicating marker of nonalcoholic steatohepatitis and fibrotic stage? *World J Gastroenterol* 2013 Nov 14; 19 (42):7412-8.
- (261) Fitzpatrick E, Dhawan A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future. *World J Gastroenterol* 2014 Aug 21; 20 (31):10851-63.
- (262) Wilkins T, Tadmok A, Hepburn I, Schade RR. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2013 Jul 1; 88 (1):35-42.
- (263) Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, et al. Higher hepatic gene expression and serum levels of matrix metalloproteinase-2 are associated with steatohepatitis in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biomarkers* 2013 Feb; 18 (1):82-7.

- (264) Tanwar S, Trembling PM, Guha IN, Parkes J, Kaye P, Burt AD, et al. Validation of terminal peptide of procollagen III for the detection and assessment of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013 Jan; 57 (1):103-11.
- (265) Alkhoury N, Carter-Kent C, Lopez R, Rosenberg WM, Pinzani M, Bedogni G, et al. A combination of the pediatric NAFLD fibrosis index and enhanced liver fibrosis test identifies children with fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011 Feb; 9 (2):150-5.
- (266) Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clin Med Res* 2006 Sep; 4 (3):236-41.
- (267) Burtis CA, Ashwood Edward R. Liver Function. In: W.B.Saunders Company, editor. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Third ed. 1999. p. 1125-77.
- (268) Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005 Aug; 25 (4):779-86.
- (269) Sakugawa H, Nakayoshi T, Kobashigawa K, Yamashiro T, Maeshiro T, Miyagi S, et al. Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2005 Jan 14; 11 (2):255-9.
- (270) Yoshioka K, Hashimoto S, Kawabe N. Measurement of liver stiffness as a non-invasive method for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2015 Jan; 45 (2):142-51.

VIII. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Autorización del Comité Ético de Investigación Clínica para la realización del estudio en le grupos de pacientes con hepatopatía crónica por VHC



Arrixaca
Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"
 Ctra. Madrid - Cartagena · Telf. 968 36 95 00
 30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/11/2014, acta 11/14 ha evaluado la propuesta de la investigadora **Dra. Iria Cebreiros López** referida al estudio:

Título: Utilidad de los Biomarcadores en el diagnóstico no invasivo de la fibrosis hepática en pacientes de hepatitis C

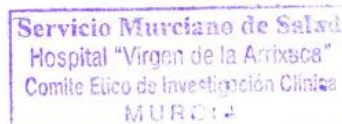
1º. Considera que

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Lo que firmo en Murcia, a 24 de noviembre de 2014

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

8.2 Anexo 2

Autorización del Comité Ético de Investigación Clínica para la realización del estudio en le grupos de pacientes obesos mórbidos sometidos a cirugía bariátrica.



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/11/2014, acta 11/14 ha evaluado la propuesta de la investigadora **Dra. Iria Cebreiros López** referida al estudio:

Título: Utilidad de los biomarcadores en el diagnóstico no invasivo de la fibrosis hepática en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica

1º. Considera que

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Lo que firmo en Murcia, a 24 de noviembre de 2014

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca