



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 FACULTAD DE MEDICINA  
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
 HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**TESIS**

**CORRELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS  
 FIBROTEST-ACTITEST CON BIOPSIA HEPÁTICA EN EL  
 DÍAGNÓSTICO DE FIBROSIS Y ACTIVIDAD  
 NECROINFLAMATORIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON  
 HEPATITIS AUTOINMUNE EN EL HOSPITAL INFANTIL DE  
 MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:  
 GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA**

**PRESENTA:**

**Dra. Ivania Fabiola González Cerda**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Alejandra Consuelo Sánchez  
 Jefa del Departamento de Gastroenterología y  
 Nutrición Pediátrica**

**ASESOR DE TESIS:**

**Dr. Rodrigo Vázquez Frías M. en C.  
 Adscrito del Departamento de Gastroenterología y  
 Nutrición Pediátrica**

**MÉXICO, D. F. Febrero 2013.**



*[Firma manuscrita]*





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO  
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DR. AARÓN PACHECO RÍOS  
Subdirector de Enseñanza y Desarrollo Académico  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DRA. ALEJANDRA CONSUELO SÁNCHEZ  
Jefe del Departamento de Gastroenterología y Nutrición  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DR. RODRIGO VÁZQUEZ FRIAS  
Asesor de Tesis  
Adscrito al Departamento de Gastroenterología y Nutrición

## RESUMEN

**Antecedentes:** La evaluación histológica del tejido hepático es el estándar de oro en el diagnóstico y valoración de fibrosis hepática, pero es un procedimiento invasivo, costoso, doloroso, y que puede ocasionar complicaciones importantes; en ocasiones pueden carecer de utilidad diagnóstica, además que pueden existir diferentes interpretaciones entre observadores. Se han propuesto métodos diagnósticos no invasivos; de los biomarcadores séricos que se han utilizado, hay experiencia amplia en población adulta con una valoración serológica para fibrosis hepática y actividad inflamatoria con un panel de 5 marcadores:  $\alpha 2$  macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteínas A 1, gamma-glutamiltanspeptidasa, bilirrubina total. Esta combinación de marcadores constituye el FibroTest y al agregar alaninoaminotransferasa constituye el ActiTest.

**Objetivo:** Determinar la correlación entre los valores de FibroTest ActiTest para la evaluación de la fibrosis y actividad inflamatoria del parénquima hepático y el diagnóstico histopatológico de la biopsia hepática evaluada con la escala de METAVIR en pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune de inicio o en seguimiento.

**Pacientes y método:** Se realizó un estudio de correlación, con una muestra por conveniencia de 59 pacientes de los cuales se excluyó un caso. A todos los pacientes se les realizó biopsia hepática que fue evaluada por dos patólogos cegados a los resultados de biomarcadores y se tomó muestra sanguínea para la determinación de FibroTest ActiTest el mismo día de la biopsia o en los 14 días siguientes. Se determinó índice kappa de concordancia entre los dos patólogos y coeficiente de correlación de Spearman.

**Resultados:** Los 58 pacientes fueron divididos en dos grupos, grupo A (n=15) de inicio y grupo B (n=43) con diagnóstico de HAI establecido y en seguimiento. Hubo predominio del sexo femenino con relación mujer:hombre de 1.8 a 3.2: 1, la edad de inicio de hepatopatía fue de 69 meses en el grupo A y 60 meses en el grupo B. El 80% de los pacientes tenían antecedente de ictericia con duración de 2 meses (mediana) en el grupo A y 1 mes en el grupo B. Sólo 5 pacientes del grupo presentaban hipertensión portal al momento de la biopsia. El 86% de los pacientes del grupo B tenían el mínimo tratamiento inmunosupresor.

El índice kappa de concordancia entre patólogos fue de 0.608 para inflamación y 0.44 para fibrosis. En el grupo A hubo buena concordancia cuando se estableció sólo la presencia o ausencia de inflamación y de fibrosis. Al analizarlos según el grado de inflamación y fibrosis se encontró una correlación baja entre los patólogos y el ActiTest. Hubo una mejor correlación entre FibroTest cuantitativo y cualitativo y el patólogo 2 con significancia estadística sin embargo es regular, con coeficiente de Spearman 0.40 y 0.47 respectivamente. En el grupo B la concordancia en la presencia o ausencia de inflamación y fibrosis fue menor que en el grupo A, llegando a tener discordancia cercana al 40%. La correlación entre ActiTest y los patólogos fue baja; en relación a fibrosis mejora a una correlación regular pero sólo para el patólogo 2, con coeficiente de Spearman de 0.522 y 0.572 para FibroTest cuantitativo y cualitativo respectivamente.

**Conclusiones:** Las características de nuestra población son similares a las reportadas en series de casos de hepatitis autoinmune en niños. Es necesario encontrar un método de evaluación del estudio histopatológico que sea reproducible con una buena concordancia entre patólogos. Los biomarcadores ActiTest-FibroTest no pueden ser utilizados para sustituir al estudio histopatológico en la toma de decisiones en el seguimiento de los pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune.

## **Indice**

<b>I. Marco teórico y antecedentes</b>	<b>1</b>
<b>II. Planteamiento del problema</b>	<b>17</b>
<b>III. Pregunta de investigación</b>	<b>18</b>
<b>IV. Justificación</b>	<b>19</b>
<b>V. Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>VI. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>VII. Material y Métodos</b>	<b>22</b>
<b>VIII. Resultados</b>	<b>28</b>
<b>IX. Discusión de resultados</b>	<b>33</b>
<b>X. Conclusiones</b>	<b>37</b>
<b>XI. Bibliografía</b>	<b>38</b>

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermano por enseñarme que los sueños no se esperan, se construyen.

A mi esposo e hija por ser el motor que me impulsa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos mis maestros que me han acompañado en mi crecimiento profesional.

A los doctores Guillermo Ramón García y Pedro Valencia Mayoral por su tiempo y colaboración en la culminación de este proyecto.

## **I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES:**

Las enfermedades hepáticas ocasionan daño al hígado y un proceso de cicatrización en el mismo, con cúmulo de matriz extracelular que cambia la morfología hepática. La colágena es el componente primario de la matriz extracelular, en la que también se incluyen otros compuestos, como laminina, hialuronano, elastina y fibronectina, que se incrementan al existir fibrosis y cirrosis. Las células hepáticas estelares son activadas por las citocinas, el factor de crecimiento transformador (TGF- $\beta$ 1), y angiotensina II que se liberan como producto del daño hepático y la inflamación, iniciando en una primera etapa un proceso de regeneración, el cual al prolongarse por persistencia del daño hepático favorece cicatrización. El exceso de matriz extracelular puede ser removido por metaloproteinasas que son activadas por la proteasa plasmina sérica. Sin embargo la lesión repetida al hígado (toxinas o virus) lleva a un desbalance en el que predomina la fibrogénesis sobre la fibrolisis<sup>1,2</sup>.

El daño hepático que presentan adultos y niños con hepatopatías crónicas se valora con evaluación clínica, con la presencia de síntomas y signos clínicos de insuficiencia hepática, así como la presencia de hepatomegalia en un periodo inicial y posteriormente de disminución del tamaño y aumento de la consistencia del hígado asociado a signos de hipertensión portal cuando el daño hepático se encuentra muy avanzado. El análisis bioquímico de la función de síntesis hepática, puede realizarse a través de la síntesis de albúmina, de los factores de coagulación y de la regulación de glucosa, mientras que la actividad inflamatoria en ocasiones puede evaluarse a través del monitoreo de alaninoaminotransferasa y la capacidad de excreción biliar se evalúa con la determinación de bilirrubina directa y de gammaglutamiltranspeptidasa. Finalmente los hallazgos histológicos de tejido hepático obtenido por medio de una biopsia hepática, permiten definir la condición real del hígado ante la evidencia clínica y bioquímica de daño hepático.

### **Clasificación del daño hepático por histopatología.**

La primera clasificación histológica fue publicada por un grupo internacional en 1968 (22) en la describen la terminología de hepatitis crónica persistente y crónica activa. En esta primera clasificación la distinción la hacen basados en la intensidad de la necrosis en sacabocado, el infiltrado inflamatorio y la reestructuración o remodelamiento estructural hepático. Los criterios que utilizaron fueron poco claros. También vertieron el concepto de

que la hepatitis crónica persistente tiene un buen pronóstico y la crónica activa evoluciona hacia cirrosis. Posteriormente se propuso que para darle validez a los criterios utilizados al evaluar la biopsia hepática era necesario hacer una descripción y evaluación topográfica, se describieron los términos de hepatitis crónica lobulillar, crónica portal y periportal<sup>23</sup>. Hasta este momento ninguna de las clasificaciones se había interesado en hacer una descripción o escala para la evaluación de la hepatitis basada en el agente causal.

Los avances en el conocimiento etiológico pueden ser más significativos que la clasificación morfológica para predecir la historia natural en enfermedad hepática. En 1994 se revisó y se difundió el término de hepatitis crónica y en 1995 se produjo el término de hepatitis de interfase en lugar de la necrosis en sacabocado, ya que la muerte celular por apoptosis se presenta en la placa limitante, más que la necrosis<sup>5</sup>.

La recomendación para incluir la etiología en la clasificación de hepatitis crónica fue una contribución importante hecha en 1994<sup>3</sup> donde además se consideró que se pueden evaluar de forma sistemática la hepatitis virales B, C, D, y se incluyeron las hepatitis no infecciosas como la hepatitis autoinmune, la hepatitis relacionada a medicamentos y la hepatitis criptogénica.

Los sistemas para graduar y estadificar incorporaron el punto de vista de que el proceso necroinflamatorio no sólo evalúa la intensidad sino que también está relacionado con la progresión de la actividad de la enfermedad y es el parámetro que potencialmente responde a la terapia y este ha sido definido como grado. Las lesiones de fibrosis y del remodelamiento del parénquima o vascular están referidos como estadio e indican la progresión del enfermedad a largo plazo. El grado puede fluctuar con la actividad de la enfermedad o por la intervención terapéutica y el estadio es considerado relativamente constante.

### **Actividad inflamatoria**

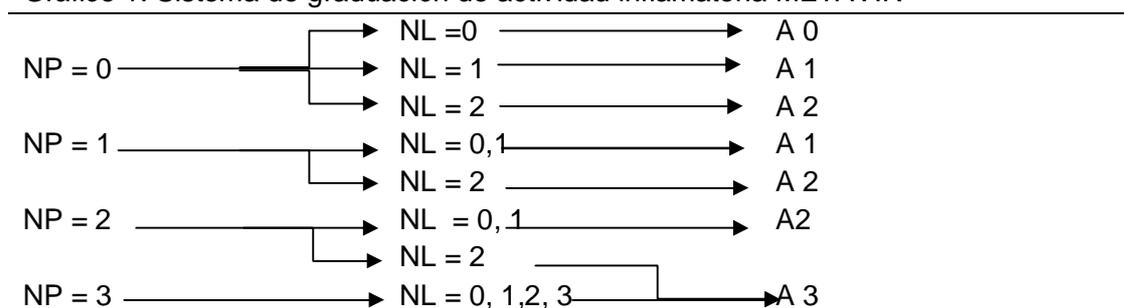
En 1981 se publicó una escala histológica semicuantitativa y reproducible para la evaluación de las biopsias hepáticas, conocida como Índice de Knodell<sup>4</sup>. Con esta forma de evaluación se obtuvo una metodología sistemática y se desarrolló una forma de evaluación de biopsias seriadas que permitiera identificar las lesiones y entender la progresión de la enfermedad así como la respuesta a la intervención terapéutica. Esta

descripción se basó en 14 biopsias de cinco pacientes, uno de ellos con hepatitis B y 4 con hepatitis no A no B. El índice histológico de actividad está basado en la evaluación necroinflamatoria con tres parámetros y un parámetro para evaluar la fibrosis. El índice de actividad histológica con un cambio mayor a  $\pm 4$  es considerado significativo. En esta forma de evaluación se le da un peso muy importante a la necrosis periportal y necrosis en puentes, ya que están relacionadas con la progresión de la enfermedad. La crítica más frecuente para este índice de actividad histológica de Knodell es que la suma del proceso de necroinflamación y fibrosis no distingue la hepatitis del remodelamiento del parénquima con fibrosis. Dentro de la clasificación original que se describe, esta puede ser dividida en sus diferentes componentes como necrosis, inflamación y fibrosis y puede proporcionar información adicional a la que se obtendría, si se tomara solamente el índice global de la escala.

Existe la de clasificación de Scheuer que es menos compleja que la de Knodell, da el mismo peso a los componentes portales y lobulillares, sin embargo, agrupa en una sola categoría a los componentes portal y periportal, lo cual proporciona información menos específica y por tanto no orienta hacia el origen del daño<sup>24</sup>.

El Grupo Cooperativo de Estudio francés METAVIR propone un sistema comprensivo pero complejo para la evaluación histológica tanto de la actividad inflamatoria como de la fibrosis orientado particularmente a la evaluación de la hepatitis C, que posteriormente se ha aplicado en otras lesiones hepáticas, por lo que actualmente es el índice de evaluación más comúnmente utilizado en hepatopatías crónicas<sup>25,26,41,42,43</sup>. Gráfico y Cuadro 1.

Gráfico 1: Sistema de graduación de actividad inflamatoria METAVIR



\*NP: Necrosis periseptal o periportal de interfase, NL: necrosis lobulillar.

Cuadro 1: Sistema de graduación de actividad inflamatoria METAVIR.

<b>Necrosis periportal o periseptal de interfase</b>	
Ausente	0
Alteración focal de la placa periportal en algunos espacios porta	1
Lesiones focales en todos los espacios porta	2
Alteración difusa de la placa periportal en todos los espacios porta	3
<b>Necrosis lobulillar</b>	
Menos de un foco necroinflamatorio por lobulillo	0
Al menos un foco necroinflamatorio por lobulillo	1
Varios focos necroinflamatorios por lobulillo	2
Necrosis en puente	3

Grados de actividad inflamatoria:

A0: no actividad.

A1: actividad leve.

A2: actividad moderada.

A3: actividad grave.

Finalmente una modificación al sistema de Knodell es referido como el sistema de Ishak<sup>5</sup>, el cual promueve una evaluación consecutiva de lesiones bien definidas dentro de cuatro categorías separadas que se unen para el grado de actividad. Existen algunas dificultades para la utilización de este sistema, ya que los objetivos 10x para evaluar los focos necroinflamatorios varían de área de observación de microscopio a microscopio. Las definiciones de focos de agregados de linfocitos, hepatocitos en apoptosis o necrosis confluyente pueden variar entre patólogos. Usa indicadores cuantitativos poco precisos como “poco”, “algo”, “mucho” introducen un grado de subjetividad. (Cuadro 2)

Cuadro 2: Sistema Ishak para graduación de actividad inflamatoria.

<b>Hepatitis periportal o periseptal de interface</b>	
Ausente	0
Leve (focal)	1
Leve/moderada (focal, mayoría de áreas portales)	2
Moderada (continuas, menos del 50% de los septos)	3
Grave (más del 50% de los septos)	4
<b>Necrosis confluyente</b>	
Ausente	0
Necrosis focal confluyente	1
Necrosis en zona 3 en algunas áreas	2
Necrosis en zona 3 en mayoría de las áreas	3
Necrosis en zona 3 más puentes porto centrales ocasionales	4

Necrosis en zona 3 más puentes porto centrales múltiples	5
Necrosis panacinar o multiacinar	6
<b>Necrosis lítica focal, apoptosis e inflamación focal</b>	
Ausente	0
Un foco por objetivo x10	1
Dos o más focos por campo x10	2
Cinco o más focos por campo x10	3
Más de 10 focos por campo x10	4
<b>Inflamación portal</b>	
Ausente	0
Leve, algunas o todas las áreas portales	1
Moderado, algunas o todas las áreas portales	2
Moderada/marcada, todas las áreas portales	3
Marcadas, todas las áreas portales	4

#### **Estadio de fibrosis:**

En todos los sistemas la cirrosis coincide con el grado más alto de fibrosis. El diagnóstico histológico de cirrosis no es representativo de su gravedad clínica. Los grandes avances en la comprensión de la biología hepática celular y molecular han desafiado el concepto estático de la fibrosis/cirrosis. No existe un consenso acerca de cuál sistema es el mejor para establecer el grado de actividad y fibrosis en la hepatitis crónica en la práctica rutinaria. No importando el sistema que se utilice, se recomienda tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- a. Al menos se deben analizar muestras con dos tinciones diferentes.
- b. No es aconsejable reemplazar términos descriptivos con números.
- c. El nombre del sistema utilizado debe expresarse claramente en el reporte.
- d. Todos los sistemas fueron diseñados para hepatitis no complicadas por lo que pueden no ser precisas en la presencia de comorbilidades.

Los sistemas de evaluación que se utilizan de forma rutinaria en los diversos trabajos que evalúan la magnitud de la fibrosis son el METAVIR y el sistema de ISHAK. (cuadro 3)

Cuadro 3. Sistemas de estadificación de fibrosis hepática.

METAVIR		ISHAK	
F0	No fibrosis	F0	No fibrosis
F1	Fibrosis portal sin septos	F1	Expansión fibrosa de algunos espacios porta, con o sin septos cortos
F2	Fibrosis portal con escasos septos	F2	Expansión fibrosa de la mayoría de los espacios porta, con o sin septos cortos
F3	Numerosos septos sin cirrosis	F3	Expansión fibrosa de la mayoría de los espacios porta con puentes porta-porta ocasionales
F4	Cirrosis	F4	Expansión fibrosa de espacios porta con puentes marcados porta-porta o porta-central
		F5	Puentes con nódulos ocasionales
		F6	Cirrosis

El estudio histológico del tejido hepático se ha considerado el estándar de oro en el diagnóstico y valoración de fibrosis hepática, pero es un procedimiento invasivo, doloroso, que puede ocasionar complicaciones en el 1% a 5% de los casos, cuyo riesgo de muerte va de 1 en 1000 hasta 1 en 10000, agregando su alto costo por gastos de hospitalización, anestesia y material. En ocasiones puede no ser de utilidad diagnóstica, al obtener muestras demasiado pequeñas para su análisis, lo que sucede hasta en un 15 a 20% de casos en población general<sup>1,2,20</sup>. Además pueden existir diferentes interpretaciones entre diferentes observadores aunado a que el reporte de los hallazgos también puede variar de acuerdo a la escala de evaluación semicuantitativa de hepatitis crónica que se utilice.

El método diagnóstico ideal para cuantificar la fibrosis hepática debiera ser de fácil ejecución, barato, seguro, exento de efectos secundarios, específico, sensible, reproducible, fácil de realizar, no influenciado por la eliminación biliar o urinaria y capaz de reflejar la fibrosis independientemente de la causa que la origine. Con este objetivo, durante los últimos años, se han desarrollado diversos modelos de evaluación de la fibrosis basados en determinaciones serológicas relativamente sencillas, que han demostrado su utilidad para valorar el grado de fibrosis hepática de pacientes con hepatitis C crónica, aunque no cumplen todas las características descritas con anterioridad. Ejemplos de estos son:<sup>6,21,46</sup>.

**Relación AST:ALT.** El índice normal de aspartato aminotransferasa (AST)/alanina aminotransferasa (ALT) es de aproximadamente 0,8. Una razón >1,0 proporciona evidencia de cirrosis. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes.

**Índice de la relación AST: recuento de plaquetas (APRI).** Se utiliza comúnmente y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$\frac{\text{AST}/\text{límite superior normal para AST}}{\text{Recuento de plaquetas}} \times 100$

Recuento de plaquetas ( $\times 10^9$  L)

En los estudios de hepatitis C y hepatitis C-VIH, el APRI ha mostrado una sensibilidad del 37% al 80% y una especificidad del 45% al 98%, dependiendo del valor de corte y si el diagnóstico de fibrosis o de cirrosis grave ya estaba establecido. Estas sensibilidades y especificidades son decepcionantes y no proporcionan la misma información que la que ofrece la biopsia hepática en la mayoría de los pacientes con enfermedad hepática crónica.

**La combinación de los niveles de protrombina, gammaglutamil y apolipoproteína A1 (PGA índice)** ha sido validada en pacientes con muchos tipos de enfermedad hepática crónica; su precisión para detectar la cirrosis es más elevada (66% -72%) en los pacientes con enfermedad hepática alcohólica.

El **FibroIndex** utiliza el recuento de plaquetas, el nivel de AST y el nivel de gamma globulina para detectar la fibrosis importante en la hepatitis C crónica, pero su precisión aún no ha sido validada.

El **índice FIB-4** se basa en 4 predictores independientes de fibrosis (edad, recuento de plaquetas, nivel de AST y nivel de ALT). En dos estudios de pacientes con hepatitis C se demostró que esta prueba posee buena precisión para la detección de la fibrosis avanzada.

**Elastografía transitoria ultrasonora o FIBROSCAN**, que es una técnica basada en la medida por ultrasonido de la velocidad de propagación en el hígado de una onda mecánica que permite estimar un coeficiente de elasticidad. Ledinghen y colaboradores realizaron un estudio en Francia en 2007 con el objetivo de evaluar factibilidad de medición de rigidez hepática y comparar FibroScan, Fibrotest, APRI y biopsia hepática para el diagnóstico de cirrosis en niños con hepatopatía crónica. Su estudio incluyó a 116 pacientes pero sólo a 33 de ellos se les realizó biopsia hepática. Encontraron que para el estadio de cirrosis el FibroScan correlaciona con el resultado por biopsia<sup>27</sup>.

**Biomarcadores:**

Finalmente se han diseñado otras pruebas denominadas biomarcadores, iniciando su desarrollo con:

El **ácido hialurónico**(AH) es un polisacárido de alto peso molecular que se encuentra ampliamente distribuido en el tejido conectivo, que se produce por fibroblastos y aumenta en casos de enfermedad hepática. Es eliminado en el hígado gracias a una glicoproteína de transmembrana (CD44) que se adhiere a este y que gracias a la permeabilidad de la membrana sinusoidal, logra pasar al interior de los hepatocitos. En situaciones de fibrosis el endotelio sinusoidal está engrosado y pierde la permeabilidad por lo que la eliminación del ácido hialurónico está disminuida<sup>10</sup>. Se ha encontrado una correlación significativa entre la concentración del AH, el grado de fibrosis hepática y las pruebas de funcionamiento hepático, en adultos con cirrosis biliar primaria, enfermedad hepática alcohólica y hepatitis C crónica. En adultos se ha mostrado una correlación significativa entre las concentraciones del AH y varias pruebas de función hepática que incluyen albúmina sérica y bilirrubinas<sup>8</sup>.

Saltk-Temizel<sup>9</sup> en un grupo de 22 niños de 1 a 17 años de edad con cirrosis comprobada por biopsia hepática realizada en los 6 meses previos al estudio, con diagnósticos de atresia de vías biliares, enfermedad de Wilson, hepatitis autoinmune, hepatitis criptogénica, y colestasis intrahepática familiar, determinó niveles séricos de AH por micro ELISA y los encontró elevados en 36.4% y correlacionaron con el nivel de bilirrubina directa. Hartley<sup>10</sup> evaluó la utilidad del AH como marcador de fibrosis hepática en 93 niños no seleccionados que fueron sometidos a biopsia hepática. Utilizaron la escala de Ishak para estatificar la fibrosis y determinaron fibrosis significativa en el 25% de pacientes y en este grupo los niveles de AH fueron significativamente más altos que en los que tenían fibrosis leve. Los niveles séricos de AH normales fueron de 0 a 75 ng/ml y concluyeron que niveles de 200 ng/ml sugieren fuertemente fibrosis significativa. Los niveles de 50 ng/ml identifican a aquellos que no tiene fibrosis significativa. Xu y cols estudiaron el valor diagnóstico de niveles séricos de AH, pre-colágena III, Colágena IV y laminina en la fibrosis hepática en niños con beta-talasemia mayor. Estos autores sugieren que en esta enfermedad, los niveles de AH y de pre-colágena III son útiles en el diagnóstico de fibrosis<sup>11</sup>. Estos mismos marcadores fueron valorados por Li y

colaboradores<sup>12</sup> en un grupo de 40 lactantes con síndrome de hepatitis neonatal, en los que el 95.1% tuvieron fibrosis hepática de diversos grados y el AH mostró un aumento progresivo de acuerdo al grado de fibrosis.

**FibroTest-ActiTest:** En el año 2001<sup>13</sup> el grupo MULTIVIRC de Francia realizó el primer estudio utilizando 11 biomarcadores séricos encontrando que la combinación de 5 de ellos podría ser usada para reducir significativamente el número de biopsias hepáticas en pacientes con hepatitis crónica por virus de hepatitis C, desde entonces se conoce como a esta combinación como FibroTest, cuyos marcadores son:

1.-  $\alpha$  2 macroglobulina: proteína producida en sitios de inflamación y fibrosis hepática por los hepatocitos y células estelares. Incrementa durante la activación de las células estelares y por lo tanto, se incrementa en la fibrosis hepática. También es un inhibidor de la proteinasa y su síntesis aumentada puede inhibir el catabolismo de las proteínas de la matriz extracelular con lo que aumenta el proceso de fibrosis hepática.

2.-Haptoglobina: proteína de fase aguda tipo II producida en el sitio de inflamación de los hepatocitos, células estelares y granulomas y que disminuye en la fibrosis hepática.

3.-Apolipoproteína A1: proteína sintetizada por los hepatocitos cuya salida está obstaculizada en la fibrosis hepática, por lo que disminuye al existir fibrosis.

4.- $\gamma$  glutamil transferasa: su aumento en fibrosis hepática se asocia a que su producción se estimula por aumento del factor de crecimiento epidérmico, durante la fibrogénesis hepática.

5.-Bilirrubina total: se incrementa en la fibrosis hepática y en hepatitis C existe una disminución en la expresión del MRP2, implicado en el transporte de bilirrubina.

Esta combinación de marcadores serológicos, que toma también en cuenta edad y sexo, inicialmente valorada en adultos con hepatitis C crónica<sup>2,13,14,15</sup> y denominada FibroTest ha sido desarrollada como un algoritmo matemático por el laboratorio francés Bio Predictive, actualmente comercializada en México por una compañía farmacéutica (laboratorio UCB de México SA de CV).

Junto con el FibroTest, el índice de actividad (**ActiTest**) combina los marcadores referidos previamente con los niveles séricos de alaninoaminotransferasa(ALT) que evalúa la

actividad necroinflamatoria y ha sido muy útil en hepatitis viral crónica, especialmente en hepatitis C.

Para la realización del FibroTest-Actitest, se siguen los siguientes pasos:

- 1) Después de la indicación médica, el paciente se toma una prueba simple de sangre en un laboratorio local
- 2) Los datos de la prueba de sangre se ingresan directamente en línea a [www.biopredictive.com](http://www.biopredictive.com) por el bacteriólogo y los resultados se generan inmediatamente.
- 3) Se proporciona el informe al médico tratante. De acuerdo a los resultados que se reportan, se ha sugerido un algoritmo que clasifica a los pacientes:

En relación a fibrosis:

Fibrosis hepática mínima o no fibrosis (FibroTest 0-0.31): F0-F1

Fibrosis moderada (FibroTest 0.31-0.58): F1-F2

Fibrosis grave (FibroTest 0.59-1.00): F3-F4

En relación a actividad necroinflamatoria:

Sin actividad necroinflamatoria: (Actitest 0.00-0.17) A0

Mínima actividad necroinflamatoria: (Actitest 0.18-0.52) A1

Moderada actividad necroinflamatoria: (Actitest 0.53-0.63) A2

Grave actividad necroinflamatoria: (Actitest 0.64-1.00) A3

En relación a la asociación de resultados del FibroTest y ActiTest y la evaluación por diversas escalas de la biopsia hepática, en 2004 Poynard<sup>33</sup> realizó una investigación para responder esta interrogante. Incluyó 16 publicaciones construyendo una base de datos de 1570 individuos. Para el diagnóstico de fibrosis significativas usando METAVIR el área bajo la curva ROC fue de 0.73 a 0.87, el valor predictivo negativo del FibroTest para excluir fibrosis fue de 91% con un punto de corte de 0.36. Para el diagnóstico de actividad necroinflamatoria significativa usando METAVIR el área bajo la curva ROC fue de 0.75 a 0.86 y el valor predictivo negativo de ActiTest para excluir necrosis significativa fue de 85% con un punto de corte de 0.31. Los valores bajo la curva ROC del FibroTest y ActiTest para estadios y grados consecutivos fueron los mismos para los grados intermedios y extremos de actividad y fibrosis. Con estos resultados se construyó una

tabla con los valores continuos de FibroTest ActiTest y los estadios y grados semicuantitativos esperados. Cuadro 4 y 5.

Cuadro 4.Comparación de estadio de fibrosis por FibroTest, METAVIR e Ishak.

FIBROTEST	METAVIR	ISHAK
0.75-1.00	F4	F6
0.73-0.74	F3-F4	F5
0.59-0.72	F3	F4
0.49-0.58	F2	F3
0.32-0.48	F1-F2	F2-F3
0.28-0.31	F1	F2
0.22-0.27	F0-F1	F1
0.00-0.21	F0	F0

Cuadro 5.Comparación de grado de actividad inflamatoria por ActiTest, METAVIR e Ishak.

ACTITEST	METAVIR	ISHAK
0.64-1.00	A3	A4
0.61-0.62	A2-A3	A3
0.53-0.60	A2	A2
0.37-0.52	A1-A2	A1-A2
0.30-0.36	A1	A1
0.18-0.29	A0-A1	A0-A1
0.00-0.17	A0	A0

Se refiere que son factores de riesgo para resultados falsos negativos y positivos del FibroTest la presencia de hemólisis, enfermedad de Gilbert, inflamación aguda y colestasis extrahepática<sup>17</sup>.

Desde el año 2002, las Autoridades francesas de Salud han recomendado en forma oficial el FibroTest como valoración de fibrosis de primera línea, en pacientes con hepatitis C para evitar biopsia hepática en el manejo de los mismos<sup>18</sup>. Poynard pronostica un futuro muy positivo para estos estudios<sup>15</sup> y refiere que la clasificación de METAVIR es la más recomendada, ya que ha sido una de las mejor validadas y recomendadas en guías clínicas de pacientes adultos. Plantea las siguientes limitantes de estos estudios novedosos:

1) Existen controversias entre el sistema de valoración de fibrosis METAVIR, la cantidad de fibrosis, y la progresión lineal de la misma.

2) la prevalencia de estadio de fibrosis 0 en estudios observacionales es baja, y con el Fibrotest puede llegar a ser de 29%.

3) Es difícil comparar los diferentes marcadores, sobretodo porque van apareciendo cada vez más marcadores de fibrosis.

La información publicada acerca de FibroTest-ActiTest está enfocada a población adulta.

Halfon<sup>19</sup> y colaboradores realizaron un estudio prospectivo independiente multicéntrico en 5 centros de Francia, con pacientes adultos con hepatitis C para validar el FibroTest ActiTest y estudiar las discordancias entre estos y la biopsia hepática. Plantea para el futuro que las decisiones de tratamiento probablemente se basarán en una combinación (después de validación) de escalas diseñadas en base a las pruebas de Fibrotest y otras, en lugar de biopsias hepáticas y al desarrollo de marcadores genéticos para fibrogénesis.

La mayoría de estudios publicados evalúan al FibroTest ActiTest como prueba diagnóstica comparándola con la biopsia hepática como estándar de oro, en su mayoría los estudios son con pacientes adultos con hepatitis C. Rossi, en un estudio de 125 pacientes reportó que el FibroTest tenía un VPN (valor predictivo negativo) de 85% y VPP (valor predictivo positivo) de 78% para fibrosis con estadio entre F2 y F4.(28) Poynard en una revisión sistemática de 16 estudios al respecto encuentra que el VPN del FibroTest para excluir fibrosis significativa era del 91% y el VPN del ActiTest para excluir necrosis significativa era del 85%<sup>29</sup>. Estos resultados son similares a los reportados por Morali en Israel, en un estudio en el que incluyó algunos niños, utilizando punto de corte F2 para fibrosis significativa y A2 para actividad significativa, que mostró valores bajo la curva ROC de 0.85 y 0.79 comparando FibroTest ActiTest con la biopsia hepática<sup>30</sup>.

En relación a los diferentes grados y estadios los estudios han mostrado que el FibroTest ActiTest tiene mejores VPP y VPN en los grados y estadios extremos y menor en los intermedios. El estudio de El-Shabrawi en 2010 en Egipto incluyó 50 niños entre 2 y 18 años con hepatitis crónica por virus de hepatitis C, encontró que el FibroTest puede diagnosticar fibrosis leve y discriminar entre ausente, leve y moderada. El ActiTest puede discriminar a los pacientes con actividad leve de la moderada pero es menos efectivo para discriminar entre actividad leve y ausente<sup>31</sup>. Así mismo el estudio de Usluer con 77 pacientes con hepatitis C en el cual comparó 9 biomarcadores incluyendo FibroTest

ActiTest con la biopsia hepática (evaluada con la escala de Ishak) y encontró que los valores de FibroTest fueron significativamente diferentes entre F0-F2 y F3-F4 con un VPN de 95% para F3-F4, concluyendo que fue inadecuado para detectar fibrosis en estadios iniciales<sup>32</sup>.

### **Discordancia**

Otro de los puntos de investigación en relación a FibroTest ActiTest ha sido el grado de concordancia que guardan con el patrón de referencia (biopsia hepática) y los factores que se han demostrado que intervienen en las diferencias. La discordancia descrita va del 16% al 38%. Ha sido atribuida a los marcadores en casos de inflamación, hemólisis, Gilbert y sepsis. Las atribuidas a la biopsia se deben al tamaño y a esteatosis. En el estudio que se reportó la discordancia más alta (38%) el tiempo entre la toma de la biopsia y el FibroTest ActiTest fue hasta de 8 meses lo que pudo haber influido en los resultados<sup>17,33,34</sup>.

Inicialmente el uso de estas pruebas se limitaba a la hepatitis C, sin embargo en los últimos años se ha ampliado con el objetivo de validar su uso en hepatitis B, infección vertical por VIH y hepatitis autoinmune. Se ha diseñado un nuevo biomarcador para evaluar esteatohepatitis, hepatitis alcohólica y obesidad mórbida<sup>35,36,37,38,39</sup>. En México ya se cuenta con una experiencia de un estudio multicéntrico en 3 hospitales pediátricos del sistema de seguridad social en el cual incluyeron 68 pacientes con hepatopatía crónica de diferentes etiologías. Buscaban establecer la capacidad del FibroTest y APRI para identificar fibrosis hepática en niños. El FibroTest mostró una sensibilidad del 88% y especificidad del 80% para detectar fibrosis mayor de F3 versus F0<sup>40</sup>.

Se ha determinado en estudios recientes que el FibroTest es útil para identificar fibrosis avanzada, pero no permite discernir entre la ausencia de fibrosis o fibrosis leve.

No se ha precisado la utilidad del FibroTest en la evaluación de la respuesta terapéutica de los pacientes con hepatitis autoinmune, en la identificación de pacientes con fibrosis leve o moderada sin evidencia de alguna complicación secundaria a la hepatopatía, ya sea disfunción hepática o hipertensión portal. No se ha definido la participación del ActiTest en la identificación de la actividad inflamatoria en los pacientes con hepatopatía crónica.

## Hepatitis Autoinmune (HAI):<sup>44,45</sup>

Es un desorden inflamatorio progresivo del hígado caracterizado serológicamente por niveles altos de aminotransferasas e inmunoglobulina G (IgG), la presencia de autoanticuerpos, histológicamente por hepatitis de interfase, y la ausencia de una etiología conocida.

Clasificación: La hepatitis autoinmune juvenil está dividida en 2 tipos de acuerdo a la seropositividad de anticuerpos antinucleares y/o anti músculo liso (HAI tipo 1) o anticuerpos anti LKM (HAI tipo 2).

Diagnóstico: El diagnóstico es difícil debido a la presentación clínica tan variada y a que no hay una prueba diagnóstica específica aplicable a todos los pacientes. En 1993 el grupo internacional de Hepatitis Autoinmune propuso los criterios diagnósticos que fueron revisados en 1999, y simplificados en 2007. Los nuevos criterios simplificados incorporan 4 parámetros: presencia de autoanticuerpos asociados, niveles de IgG, hallazgos histológicos y ausencia de hepatitis viral.(Cuadro 6)

Cuadro 6. Criterios diagnósticos simplificados para el diagnóstico de HAI.

<u>Parámetros</u>	<u>Puntuación</u>
ANA o SMA	
≥ 1:40	+1
≥ 1:80	+2
o anti LKM-1 ≥ 1:40	+2
o anti SLA +	+2
IgG o gammaglobulinas	
> Normalidad	+1
> 1,10 normalidad	+2
Histología	
Compatible HAI +1	+1
Típica HAI +2	+2
Infección virus hepatotropos	
Ausente +2	+2
Diagnóstico definitivo ≥ 7	
Diagnóstico probable ≥ 6	

Diagnóstico histológico: La HAI es un trastorno hepático necroinflamatorio crónico, siendo el estudio histológico necesario para establecer el diagnóstico, determinar el estadio y la actividad. La biopsia hepática es importante, también para comprobar la remisión y la ausencia de actividad antes de suspender el tratamiento inmunosupresor. Se caracteriza histológicamente por los siguientes hallazgos que no son específicos:

- Infiltrado inflamatorio de células mononucleares y plasmáticas, que sobrepasa la limitante entre el espacio porta y el lobulillo hepático con erosión de la misma y destrucción de los hepatocitos lobulillares periféricos (**hepatitis de la interfase**).
- En algunas ocasiones, el infiltrado inflamatorio puede aparecer de manera predominante en los sinusoides hepáticos (**hepatitis acinar**).
- Regeneración hepática con formación de “rosetas”.
- Un 25% de los pacientes presentan cambios en los ductos biliares.
- Excepto en las formas más leves, la fibrosis está presente en todos los pacientes con HAI. En las formas avanzadas, se forman puentes de tractos fibrosos entre los espacios porta y las regiones centrolobulillares que evolucionan a cirrosis.

Tratamiento: La terapia inmunosupresiva con corticosteroides es la primera línea de tratamiento, debe ser iniciada prontamente para evitar progresión de la enfermedad. El objetivo del tratamiento es reducir o eliminar la inflamación hepática, inducir remisión, mejorar los síntomas y prolongar la sobrevida. Sin un tratamiento apropiado generalmente progresa a la cirrosis. La cirrosis hepática se detecta al momento del diagnóstico entre el 44% y 80% de los niños con HAI.

Con excepción de los casos que se presentan como falla hepática fulminante con encefalopatía, la HAI responde satisfactoriamente a la terapia inmunosupresora, con una tasa de remisión reportada alrededor del 80%. La remisión se define como la recuperación clínica completa, niveles normales de aminotransferasas y de IgG, títulos negativos o extremadamente bajos de autoanticuerpos y resolución histológica de la inflamación. La resolución clínica y bioquímica no necesariamente refleja la resolución histológica por lo que se hace necesario el control histológico.

Después de un periodo de 4 años de tratamiento, la mejoría de la intensidad de la inflamación portal se ve hasta en un 95% de los casos y se acompaña de mejoría en el estadio de fibrosis.

La recaída se caracteriza por aumento en las aminotransferasas después de haber alcanzado la remisión. La recaída durante el tratamiento es común y ocurre alrededor del 40% de los pacientes requiriendo aumento temporal en la dosis de esteroides. Juega un papel importante la no adherencia frecuente en los adolescentes.

## **II. Planteamiento del problema:**

En el Departamento de Gastroenterología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez se tiene un volumen elevado de pacientes pediátricos con enfermedades hepáticas crónicas y se realizan biopsias hepáticas en un promedio de 6 biopsias por mes. El procedimiento de biopsia hepática percutánea con aguja de Menghini o Tru-cut es doloroso, tiene riesgos y un costo monetario alto; frecuentemente, se utiliza para la toma de decisiones terapéuticas, como es el caso de la hepatitis autoinmune, la hepatitis crónica por virus de hepatitis B y C, lo cual implica que un mismo paciente pueda requerir varias biopsias hepáticas durante su evolución representando riesgos y costos elevados, aún más en algunas ocasiones, el estado clínico de los pacientes no permite la realización de biopsia hepática y se pospone o definitivamente se obvia este estudio limitando el seguimiento apropiado de estos pacientes. El uso de biomarcadores séricos de fibrosis hepática y de actividad necroinflamatoria está bien establecido en pacientes adultos, particularmente con hepatitis C, y por tanto podría ser una alternativa útil en la valoración diagnóstica y de pronóstico de pacientes pediátricos con enfermedades hepáticas crónicas como hepatitis autoinmune, reduciéndose con éstas pruebas la necesidad de realizar biopsias hepáticas percutáneas, con los riesgos y costos que ésta representa.

### **III. Pregunta de investigación:**

En pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune ¿Existe una correlación positiva entre los valores de los biomarcadores séricos FibroTest-ActiTest para la evaluación de la fibrosis y actividad inflamatoria del parénquima hepático y el diagnóstico histopatológico de la biopsia hepática evaluada con la escala de METAVIR?

#### **IV. JUSTIFICACIÓN:**

La utilización de biomarcadores séricos en el diagnóstico de fibrosis y actividad necroinflamatoria en pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune puede ser un método diagnóstico alternativo a la realización de una biopsia hepática por punción. Es un recurso diagnóstico menos agresivo y de menor costo. El contar con una prueba que brinde información en relación a la actividad y progreso de la enfermedad hepática, sobre todo en aquellas hepatopatías en donde se puede modificar la evolución a través de un tratamiento sería de gran beneficio en el seguimiento de estos pacientes. El Hospital Infantil de México Federico Gómez es un centro de referencia nacional y en el departamento de Gastroenterología existen aproximadamente 100 pacientes cautivos con enfermedad hepática crónica por lo que es completamente factible y además necesario estandarizar una prueba de biomarcación sérica para el diagnóstico de fibrosis y de actividad necroinflamatoria del hígado, ya que en un futuro, podría sustituir en algunos casos la realización de la biopsia hepática.

## **V. HIPÓTESIS:**

En pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune de inicio o bien bajo tratamiento específico los resultados de los biomarcadores séricos FibroTest-ActiTest tendrán una correlación positiva con el diagnóstico del grado de fibrosis hepática y de actividad inflamatoria del parénquima hepático teniendo como estándar de oro la evaluación histopatológica de la biopsia hepática evaluada con la escala de METAVIR.

## **VI. OBJETIVOS**

### **a. GENERAL:**

Determinar la correlación entre los valores de los biomarcadores séricos FibroTest ActiTest para la evaluación de la fibrosis y actividad inflamatoria del parénquima hepático y el diagnóstico histopatológico de la biopsia hepática evaluada con la escala de METAVIR en pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune de inicio o bien bajo tratamiento específico.

### **b. ESPECÍFICOS:**

1. Establecer concordancia de presencia y ausencia de actividad inflamatoria y fibrosis entre los dos patólogos participantes.
2. Establecer concordancia entre el grado actividad inflamatoria y fibrosis obtenido por ActiTest-FibroTest y el estudio histopatológico (METAVIR) por cada uno de los patólogos participantes.
3. Obtener la correlación de concordancias entre ActiTest-FibroTest tanto cualitativo como cuantitativo y el estudio histopatológico para el grado de actividad inflamatoria y fibrosis.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **1. Diseño del estudio**

Estudio de correlación.

### **2. Fuentes para la obtención de pacientes:**

Pacientes que asistieron a la consulta externa del Departamento de Gastroenterología y Nutrición, o que se encontraban hospitalizados en el Hospital Infantil de México con diagnóstico de hepatitis autoinmune.

### **3. Tipo de muestreo:**

No probabilístico, por conveniencia.

### **4. Tamaño de la muestra:**

Estuvo constituida por 59 casos.

### **5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de pacientes**

#### a.- Criterios de inclusión

- 1.-Pacientes pediátricos de 6 meses a 18 años de edad, de ambos sexos.
- 2.-Pacientes con diagnóstico de hepatitis autoinmune a quienes se realizó toma de biopsia hepática para confirmar el diagnóstico o para evaluar la respuesta al tratamiento.
- 3.-Aceptación por los familiares mediante firma de la carta de consentimiento de la toma de una muestra de sangre adicional, en ayuno para la determinación de alfa-2 macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína AI, bilirrubina total, gamma glutamiltranspeptidasa y alaninoaminotransferasa para realización de FibroTest y ActiTest dentro de los 14 días posteriores a la toma de biopsia hepática.

#### b.-Criterios de exclusión

- 1.-Pacientes con hiperbilirrubinemia indirecta.

2.-Pacientes en quienes el resultado de ActiTest-FibroTest fuera reportado como no valorable.

c:-Criterios de eliminación

1.-Pacientes en los que la muestra de hígado obtenida por biopsia hepática no fuera valorable según la apreciación del patólogo.

**6. Descripción del procedimiento de todo el estudio:**

La biopsia hepática percutánea se realizó en la sala de ultrasonido en el departamento de rayos X o en quirófano según fuera el caso por los médicos gastroenterólogos o cirujanos pediatras de acuerdo al protocolo establecido y vigente disponible en el Manual de Procedimientos del Departamento de Gastroenterología y Nutrición.

Muestra histológica: El tejido obtenido de biopsias hepáticas se procesó de acuerdo a técnicas estandarizadas en el departamento de Patología del Hospital. Fueron valoradas por dos patólogos (G.R.G y P.F.V.M), que no conocían los resultados de los marcadores serológicos de los pacientes y evaluaron el estadio de fibrosis y el grado de actividad inflamatoria de acuerdo a la escala METAVIR.

Para la realización del estudio de sangre, se siguieron los siguientes pasos:

1) Después de la indicación médica, al paciente se le tomó una muestra de sangre para la determinación de alfa-2 macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubina total, gamma glutamiltranspeptidasa y alaninoaminotransferasa en el Departamento de Gastroenterología y Nutrición. Fue transportada por personal del laboratorio Biomédica de Referencia.

2) Los datos de la prueba de sangre se ingresaron directamente en línea a [www.biopredictive.com](http://www.biopredictive.com) por el bacteriólogo para realización de FibroTest y ActiTest y los resultados se generaron inmediatamente.

3) El laboratorio informó los resultados a los responsables del protocolo de investigación.

## **7. Definición operativa de las variables: definición, instrumentos y escalas de medición**

Demográficas:

Edad: Edad del paciente transcurrida en meses desde el nacimiento hasta el momento del estudio. Escala: Cuantitativa continua. Unidades: Meses.

Sexo: género del paciente Escala: Cualitativa nominal. Unidades: Hombre y Mujer.

Diagnósticas:

Grado de actividad necroinflamatoria: Grado de actividad necroinflamatoria evaluado en muestra de tejido hepático según la escala METAVIR o determinado en muestra de sangre por el biomarcador ActiTest. Escala: cualitativa nominal y cuantitativa.

Estadio de fibrosis: Estadio del grado de fibrosis evaluado en muestra de tejido hepático según la escala METAVI o determinado en muestra de sangre por el biomarcador FibroTest. Escala: cualitativa nominal y cuantitativa.

*Medición de fibrosis y actividad necroinflamatoria por Fibrotest-ActiTest:*

En relación a fibrosis cualitativo:

F0: Sin fibrosis.

F1: Fibrosis leve

F2: Fibrosis moderada.

F3: Fibrosis avanzada.

F4: Cirrosis.

En relación a fibrosis cuantitativo:

Fibrosis hepática mínima o no fibrosis: FibroTest 0-0.31

Fibrosis moderada: FibroTest 0.31-0.58

Fibrosis grave: FibroTest 0.59-1.00

En relación a actividad necroinflamatoria cualitativo:

A0: Sin actividad necroinflamatoria.

A1: Mínima actividad necroinflamatoria.

A2: Moderada actividad necroinflamatoria.

A3: Grave actividad necroinflamatoria.

En relación a actividad necroinflamatoria cuantitativo:

Sin actividad necroinflamatoria: Actitest 0.00-0.17

Mínima actividad necroinflamatoria: Actitest 0.18-0.52

Moderada actividad necroinflamatoria: Actitest 0.53-0.63

Grave actividad necroinflamatoria: Actitest 0.64-1.00

*Medición de fibrosis y actividad necroinflamatoria en biopsia hepática con escala de METAVIR:*

En relación a fibrosis:

F0: no fibrosis.

F1: fibrosis portal, sin septos.

F2: fibrosis con poco septos.

F3: fibrosis con muchos septos, sin cirrosis.

F4: cirrosis.

En relación a actividad:

A0: no actividad.

A1: actividad leve.

A2: actividad moderada.

A3: actividad grave.

VARIABLE	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Sexo	Cualitativa	Nominal	Femenino Masculino
Edad	Cuantitativa	Discreta	Meses
Grados de fibrosis y actividad necroinflamatoria por FibroTest, ActiTest	Cualitativa	Nominal	F0: Sin fibrosis. F1: Fibrosis leve. F2: Fibrosis moderada. F3: Fibrosis avanzada. F4: Cirrosis. A0: Sin actividad. A1: Mínima actividad. A2: Moderada actividad. A3: Grave actividad.
Grados de fibrosis y actividad necroinflamatoria por FibroTest, ActiTest	Cuantitativa	Nominal	Sin actividad: 0.00-0.17 Mínima actividad: 0.18-0.52 Moderada actividad: 0.53-0.63 Grave actividad: 0.64-1.00 Fibrosis mínima o no fibrosis: 0-0.31 Fibrosis moderada: 0.31-0.58 Fibrosis grave: 0.59-1.00
Grados de fibrosis y actividad necroinflamatoria por escala METAVIR	Cualitativa	Nominal	F0: no fibrosis. F1: fibrosis portal, sin septos. F2: fibrosis con poco septos. F3: fibrosis con muchos septos, sin cirrosis. F4: cirrosis. A0: no actividad. A1: actividad leve. A2: actividad moderada. A3: actividad grave.

**8. Tecnología utilizada:** recolección de datos en sistemas operativos Word, Excel, SPSS.

**9. Instrumentos para la recolección de datos.**

Los datos de los pacientes se extrajeron de los expedientes y se vaciaron en una base de datos que contenía las variables a estudiar.

**10. Análisis estadístico:**

Para encontrar la correlación de los resultados obtenidos por FibroTest ActiTest con los del estudio histopatológico por cada patólogo se usaron programas de computación Excel y SPSS. Se determinó índice de concordancia entre los dos patólogos participantes en el estudio, índice de correlación (Kappa) y posteriormente índice de correlación (Spearman) entre ellos y el FibroTest ActiTest.

**11. Consideraciones éticas:**

El realizar la toma de muestra de sangre representa un riesgo mínimo para los pacientes. La biopsia hepática formó parte del estudio habitual del paciente y por tanto la indicación de la misma no tomó parte en el presente trabajo, solo se utilizó la información obtenida de la biopsia tomada por indicación médica. Se anexa la carta de consentimiento informado. El protocolo se ajustó a las normas del acuerdo de Helsinki.

**12. Consideraciones de bioseguridad:**

Al realizar toma de muestras biológicas, estas fueron transportadas por personal del servicio al laboratorio seleccionado y al departamento de patología.

**13. Factibilidad:**

Se contó con fondos federales previamente aprobados para asumir los costos de la realización de FibroTest-ActiTest.

**14. Limitaciones del estudio:**

No contamos con cálculo del tamaño de muestra.

## VIII. RESULTADOS.

En total se incluyeron en el estudio 59 casos con diagnóstico de Hepatitis Autoinmune, de los cuales se excluyó uno por cumplir con criterio de exclusión. Los resultados se mostrarán considerando dos grupos de pacientes, el grupo A que corresponde a los casos con hepatitis autoinmune que no contaban con tratamiento porque el diagnóstico se realizó a través de la biopsia hepática motivo del presente estudio, constituido por 15 pacientes. El grupo B, correspondía a los casos que ya eran conocidos con hepatitis autoinmune y que se les realizó la biopsia como control del seguimiento de su enfermedad, 43 pacientes (Cuadro 1).

En ambos grupos hubo predominio del sexo femenino. Una relación mujer:hombre de 1.8 a 3.2: 1. Nueve de los pacientes tenían asociado el diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico desde antes de su incorporación al estudio.

Cuadro 1. Características generales de los 58 pacientes con diagnóstico de hepatitis autoinmune.

	Grupo A* n 15	Grupo B** n 43
Femenino	11	28
Masculino	4	15
Mediana de edad al momento del ingreso al estudio (mínimo-máximo) meses	69 (14-190)	108 (28-213)

Se realizó una caracterización de la hepatopatía de cada uno de los grupos en el estudio, la cual incluyó datos de edad del inicio, su evolución al momento de la biopsia, número de biopsias previas, ictericia, hipertensión porta, los cuales se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Características de hepatopatía en los 58 pacientes con hepatitis autoinmune por grupo de estudio

	Grupo A n = 15	Grupo B n= 43
Mediana de edad del inicio de la hepatopatía (mínimo-máximo) meses	69 (1*-189)	60 (1*-158)
Tiempo transcurrido entre el inicio de la hepatopatía y biopsia hepática, mediana (mínimo-máximo)	9 (1-31)	41 (3-152)
Frecuencia de pacientes con evolución de la hepatopatía menor de 6 meses, n (%)	5 (33%)	0
Antecedente de biopsias previas		
Una	3	30
Dos	0	8
Tres	0	2
Más de cuatro	0	3
Frecuencia de pacientes con antecedente de ictericia	12(80%)	30(70%)
Ictericia al momento de la biopsia	5 (33%)	2 (5%)
Duración de la ictericia mediana (mínimo- máximo) meses	2 (0.5-24)	1 (0.5-24)
Ictericia intermitente n(%)	1 (7%)	12 (28%)
Hipertensión portal al momento del primer contacto en el Hospital Infantil de México, n(%)	4 (27%)	4 (9%)
Hipertensión portal al momento de la biopsia: n	5 (33%)**	1 (2%)
Tratamiento inmunosupresor previo a la biopsia	2	43

\* Iniciaron como hepatitis neonatal por citomegalovirus

\*\* Coinciden los 4 pacientes que tenían hipertensión portal al primer contacto con los que tenían al momento de la biopsia. Otro paciente que no tenía hipertensión portal de inicio la desarrolló en el periodo transcurrido entre el primer contacto hospitalario y a la realización de la biopsia tenía justo 6 meses de evolución.

Dentro de las manifestaciones de hipertensión portal ninguno de los pacientes del grupo A tuvieron várices esofágicas y en el grupo B hubo sólo un paciente con várices esofágicas, la mayoría de ellos tenían la asociación de ascitis y esplenomegalia.

En relación al tratamiento recibido antes de la biopsia en el grupo A sólo 2 pacientes habían recibido tratamiento inmunosupresor, uno de ellos porque cursaba con Lupus eritematoso como condición agregada y el otro porque inició su padecimiento como una falla hepática fulminante, por lo que se dio el tratamiento en forma urgente aún sin tener la

biopsia, ya que cumplía con criterios serológicos para el diagnóstico, el cual se confirmó posteriormente con la biopsia.

Todos los pacientes del grupo B se encontraban bajo tratamiento inmunosupresor (Cuadro 3). La mediana de duración del tratamiento fue de 24 meses, con un mínimo de 7 meses y máximo de 73 meses.

Cuadro 3. Tipo de tratamiento recibido antes de la biopsia en el grupo B (43 pacientes en seguimiento por hepatitis autoinmune).

<b>Tipo de tratamiento recibido el mes previo a la biopsia</b>	<b>n (%)</b>
Prednisona en dosis basal	1 (2)
Azatioprina	14 (32)
Prednisona en dosis basal + Azatioprina	17 (39)
Otra dosis de prednisona + Azatioprina	3 (7)
Micofenolato	5 (11)
Micofenolato + otro inmunosupresor	2 (4)
Ninguno	1 (2)
Total	43 (100)

La mayoría de nuestros pacientes (84%) se encontraban al momento de la biopsia con el tratamiento mínimo necesario para mantenerlos sin actividad bioquímica. La paciente que no tenía tratamiento al momento de la biopsia, había recibido 8 años de tratamiento inmunosupresor y la biopsia se hizo 2 meses después de haberlo suspendido, debido a que había permanecido con dosis de mantenimiento con azatioprina por 4 años y medio y se encontraba asintomática, con biopsias previas de control sin alteraciones.

Una vez que se revisó cada caso con los dos patólogos por separado se estableció primeramente el índice de concordancia simple entre ellos.

Como se observa en el cuadro 4, el índice de concordancia para la presencia de inflamación y fibrosis es muy similar en el grupo A entre ambos patólogos, siendo más notoria la similitud para la inflamación, sin embargo el Kappa obtenido entre ellos al considerar el grado de inflamación y fibrosis en este grupo fue muy bajo (cuadro 5). En el caso del grupo B el índice de concordancia es diferente entre patólogos cuando se evalúa tan sólo la presencia o ausencia de inflamación, sin embargo al considerar la magnitud se observa una buena concordancia para la inflamación y regular para la fibrosis (Cuadro 5).

Cuadro 4. Índice de concordancia para la presencia o ausencia de inflamación y fibrosis, entre patólogos en los 58 pacientes con hepatitis autoinmune.

	Grupo A n 15		Grupo B n 43			Grupo A n 15		Grupo B n 43	
	Patólogo 1	Patólogo 2	Patólogo 1	Patólogo 2		Patólogo 1	Patólogo 2	Patólogo 1	Patólogo 2
Presencia de Inflamación	14 (93%)	13 (86%)	22 (51%)	14 (33%)	Presencia de Fibrosis	13 (87%)	10 (67%)	25 (58%)	20 (47%)
Ausencia de Inflamación	1 (7%)	2 (14%)	21 (49%)	29 (67%)	Ausencia de Fibrosis	2 (13%)	5 (33%)	18 (42%)	23 (53%)

Cuadro 5. Kappa entre patólogos en la evaluación de la biopsia hepática utilizando la escala de METAVIR en los 58 pacientes con hepatitis autoinmune.

	Inflamación		Fibrosis	
	Kappa	p	Kappa	p
Todos	0.608	0.000	0.449	0.000
Grupo A	0.371	0.024	0.379	0.006
Grupo B	0.618	0.000	0.457	0.000

Como se observa en el cuadro 6 el índice de concordancia existente entre el ActiTest y e la presencia o no de inflamación determinada en la biopsia hepática de acuerdo a la valoración de cada patólogo fue alto para la presencia de inflamación en el grupo A, mientras que un poco más de la mitad de los pacientes del grupo B concordaron en la presencia o ausencia de inflamación. No obstante al correlacionar la magnitud de la inflamación evaluada por escala de METAVIR en la biopsia hepática y el Actitest se observa un bajo grado de correlación en ambos grupos (Cuadro 7).

Cuadro 6. Índice de concordancia entre el ActiTest y la biopsia hepática evaluada por cada patólogo para la presencia y ausencia de actividad inflamatoria en los 58 pacientes con hepatitis autoinmune.

Concordancia	Grupo A n 15		Grupo B n 43	
	Patólogo 1	Patólogo 2	Patólogo 1	Patólogo 2
Presencia de inflamación con ActiTest	14 (93%)	13 (86%)	12 (28%)	8 (19%)
Ausencia de inflamación con ActiTest	0	0	14 (32%)	16 (38%)
No concordancia en inflamación con ActiTest	1 (7%)	2 (14%)	17 (40%)	19 (44%)

Curadro 7. Actividad Inflamatoria: Coeficiente de correlación de Spearman

		Actitest Cuantitativo		Actitest Cualitativo	
		Rho	p	Rho	p
Grupo A	Patólogo 1	0.282	0.067	0.280	0.069
	Patólogo 2	0.226	0.145	0.272	0.078
Grupo B	Patólogo 1	0.295	0.285	0.116	0.681
	Patólogo 2	0.303	0.272	0.208	0.457

En el cuadro 8 se observa que el índice de concordancia entre el FibroTest y la presencia de fibrosis de acuerdo a la valoración de la biopsia hepática por cada patólogo fue mayor del 60% para el grupo A, al evaluar el grado de fibrosis por biopsia y Fibrotest se observó que la correlación es regular para el Fibrotest cualitativo en ambos patólogos y cuando es cuantitativo, la correlación es baja para el patólogo 1 y regular para el patólogo 2 (Cuadro 9). En el grupo B el índice de concordancia fue mayor para la ausencia de fibrosis, pero menor del 50%, resaltando que en más de una tercera parte de los pacientes del grupo B no hubo concordancia entre la fibrosis de la biopsia y el FibroTest. Al evaluar el grado de fibrosis por biopsia y Fibrotest, el índice de correlación fue bajo para el patólogo 1 tanto para la forma cuantitativa como cualitativa del Fibrotest, mientras que para el patólogo 2 fue regular en ambos casos.

Cuadro 8. Índice de concordancia entre el FibroTest y la biopsia hepática valorada por cada patólogo para la presencia y ausencia de fibrosis en los 58 pacientes con hepatitis autoinmune.

Concordancia	Grupo A n 15		Grupo B n 43	
	Patólogo 1	Patólogo 2	Patólogo 1	Patólogo 2
Presencia de fibrosis con Fibrotest	10 (67%)	9 (60%)	12 (28%)	11 (26%)
Ausencia de fibrosis con FibroTest	4 (27%)	3 (20%)	14 (33%)	18 (42%)
No concordancia en fibrosis con FibroTest	1 (6%)	3 (20%)	17 (40%)	14 (33%)

Cuadro 9. Coeficiente de correlación de Spearman.

		FibroTest Cuantitativo		FibroTest Cualitativo	
		Rho	p	Rho	p
Grupo A	Patólogo 1	0.369	0.015	0.408	0.007
	Patólogo 2	0.404	0.007	0.467	0.002
Grupo B	Patólogo 1	0.342	0.212	0.363	0.184
	Patólogo 2	0.522	0.046	0.572	0.026

## **IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.**

Este es el primer estudio en donde se evalúa la utilidad de los biomarcadores en pacientes con hepatitis autoinmune, hasta ahora los trabajos que han utilizado estas pruebas han incluido a pacientes adultos con hepatitis C, o bien pacientes pediátricos con diferentes hepatopatías crónicas, generalmente en estadio avanzado y lo que se ha obtenido hasta ahora en relación al FibroTest es que se correlaciona mejor con los grados avanzados de fibrosis, con respecto al ActiTest los estudios han mostrado que tiene un valor predictivo negativo que oscila entre 65% y 85%, un poco menor que el FibroTest cuyo valor predictivo negativo oscila entre 85% y 92%,(28,29,49,38) e incluso que puede discriminar a los pacientes con actividad leve de la moderada pero es menos efectivo para discriminar entre actividad leve y ausente.(31) Sin embargo no se ha realizado estudio alguno en donde se determine si tanto el Fibrotest como el Actitest pueden ser herramientas útiles en el seguimiento de los pacientes con hepatitis autoinmune, los cuales son portadores de una enfermedad crónica del hígado en la que tanto la actividad inflamatoria como la fibrosis secundaria son susceptibles de ser modificadas por el tratamiento. Aún más, en este estudio solo el 8% de nuestros casos tenían datos clínicos de hipertensión porta e ictericia al momento de la realización de la biopsia y por ende en la mayoría de los casos era poco predecible tanto por clínica como por hallazgos bioquímicos el grado de daño hepático, actividad inflamatoria y fibrosis, lo que implicaba un reto para los biomarcadores Fibrotest-Actitest ya que hasta ahora estos parecen correlacionarse mejor con estadios avanzados de fibrosis e inflamación pero se desconoce cómo podrían funcionar en pacientes con enfermedad hepática con diferentes grado de daño del parénquima.

Está claramente establecido que los pacientes en tratamiento con hepatitis autoinmune a pesar de la estabilidad clínica y bioquímica en la que se encuentren, es necesario realizar una biopsia hepática, para normar la conducta del tratamiento a seguir, pues la correlación clínico-bioquímica- histológica es pobre. (44,45). En el presente trabajo la mayoría de los pacientes se encontraban en mantenimiento con dosis basal de esteroides o incluso ya sin esteroides, sólo con otro manejo inmunosupresor como azatioprina o micofenolato. Una tercera parte de nuestros pacientes en seguimiento tenían dos o más biopsias previas y teniendo en cuenta que se trata de pacientes pediátricos, sin duda estos niños requerirán en el seguimiento de su enfermedad muchas más biopsias y este es el punto en donde se sospechó que los biomarcadores podrían tener una

participación en el seguimiento de estos pacientes si es que efectivamente se lograba documentar que podrían ser una herramienta de seguimiento menos invasiva que la biopsia hepática y por tanto pudieran sustituir en ocasiones la realización de alguna biopsia, teniendo en cuenta, desde luego que nunca sustituirían ni la primera ni la última, pero si algunas intermedias.

La mayoría de los casos incluidos en el presente estudio fueron del sexo femenino en edad escolar de acuerdo con lo que la mayoría de series reportan en la hepatitis autoinmune de presentación en la edad pediátrica. (45,50)

En relación a la mediana de edad del inicio de la hepatopatía es importante mencionar que en ambos grupos fue alrededor de los cinco años de vida, en la literatura clásicamente se consideraba la máxima incidencia de aparición en niños después de los 3 años, pero en algunas series el 30% de los niños tenían menos de 3 años y se han descrito casos en niños menores de un año (48). Tuvimos dos pacientes con el antecedente de hepatitis neonatal por citomegalovirus que evolucionaron a hepatitis autoinmune, esto ha sido reportado en muy pocos casos en la literatura (47).

Llama la atención que en el grupo que incluyó a los pacientes con diagnóstico inicial de hepatitis autoinmune el tiempo que transcurrió entre el inicio de síntomas y la realización de la biopsia con la que se estableció el diagnóstico fue muy prolongado, lo cual probablemente se explique por la demora en la referencia a un hospital de tercer nivel como el nuestro. La mayoría de estos pacientes tenía el antecedente de haber presentado ictericia continua, con una mediana de duración de 2 meses y signos clínicos inespecíficos para la sospecha de hepatitis autoinmune lo que obliga al clínico a descartar otras causas de hepatitis, destacando las infecciosas que son más frecuentes antes de sospechar en etiología autoinmune.

Al evaluar los resultados de concordancia y de correlación la mayoría de los estudios establecen concordancia en los resultados cuando la diferencia no es mayor a dos grados de inflamación o de fibrosis. En el presente estudio decidimos establecer que existía concordancia cuando los resultados fueron exactamente iguales debido a que en nuestra práctica diaria se toman decisiones terapéuticas en estos pacientes según sus resultados de histopatología, por lo que un biomarcador ideal debería brindar la información igual que la biopsia hepática.

El estudio histopatológico es el estándar de oro para el diagnóstico de actividad inflamatoria y fibrosis, sin embargo existen diferencias intra e interobservador lo que hace que algunos sistemas de clasificación no sean reproducibles. Los estudios al respecto han determinado que una clasificación basada en evaluación semicuantitativa de fibrosis y necroinflamación ofrece mayor reproducibilidad (26), como es el caso de METAVIR, sin embargo se deberá tomar en cuenta que la discordancia entre patólogos puede estar relacionada a que en su práctica diaria éste no sea el sistema utilizado para la evaluación de hepatitis crónica ya que su terminología es un poco exacta al utilizar términos como “algunos”, “varios” al referirse a la afectación de los espacios porta y a la cantidad de focos necroinflamatorios por lobulillo. Esto pudo haber influido en los resultados del índice de concordancia kappa entre ambos patólogos. Encontramos mejor concordancia entre patólogos en el grupo B, siendo buena para la inflamación y regular para la fibrosis mientras que en el grupo A la concordancia entre patólogos fue regular tanto para la inflamación como para la fibrosis.

En relación a la utilidad de los biomarcadores en el grupo de pacientes de inicio consideramos que estaría orientada a tener un valor basal con el cual comparar en el seguimiento de su hepatopatía ya que la biopsia hepática es imperativa en ellos. En este grupo hubo buena concordancia entre la biopsia y el Fibrotest-Actitest, cuando se estableció sólo la presencia o ausencia de inflamación y de fibrosis. Al analizarlos según el grado de inflamación y fibrosis se encontró una correlación baja entre los patólogos y el ActiTest llamando la atención que la correlación fue mejor correlación para el caso del FibroTest cuantitativo y cualitativo pero solo con uno de los patólogos sin embargo esta solo puede considerarse como regular de acuerdo al coeficiente de Spearman obtenido.

En el grupo de inicio es importante mencionar que existió discordancia en una décima parte de los casos en determinar si había inflamación o no entre el ActiTest y la biopsia, aspecto con relevancia clínica ya que basado en la presencia de inflamación se toman decisiones terapéuticas, peor aún cuando la correlación fue baja.

En el grupo de seguimiento la utilidad de los biomarcadores idealmente estaría orientada a sustituir la toma de biopsia hepática para los controles durante tratamiento, sin embargo con los resultados obtenidos su utilidad se ve limitada. La concordancia entre los biomarcadores y la biopsia hepática en relación a la presencia o ausencia de inflamación y fibrosis fue menor que en el grupo de inicio, llegando a tener discordancia cercana al

40%. La correlación cuantitativa y cualitativa entre el ActiTest y la biopsia hepática fue baja; en relación a fibrosis esta correlación mejora, sin embargo solo es regular y con un solo patólogo, Resultados similares a los nuestros se encontraron en dos estudios previos en los cuales se trató de establecer si estos mismos biomarcadores podrían ser una alternativa a la biopsia hepática en el seguimiento de niños con hepatitis B y C, encontraron que el FibroTest tenía concordancia con la biopsia en los casos de hepatitis B, no así el ActiTest, y en hepatitis C no encontraron concordancia de ninguno de los dos. (36,37)

En la literatura se mencionan causas de discordancias FibroTest ActiTest y la biopsia hepática, los que se refieren a los biomarcadores son cuadros de inflamación, sepsis y tiempo entre las tomas de muestra prolongados (8 meses), sin embargo nuestros pacientes no parecían tener estos factores presentes, todos fueron valorados previo a la toma de biopsia hepática, de haber tenido un cuadro infeccioso en ese momento se hubiera suspendido el procedimiento, y en relación al tiempo entre las tomas de muestra, todos tuvieron la toma de la muestra el mismo día de la biopsia, excepto una a quien se le tomó con dos semanas de diferencia. Las causas de discordancia atribuidas a la biopsia en estudios previos son tamaño insuficiente y presencia de esteatosis, sin embargo en nuestro estudio no tuvimos biopsias que se hayan reportado como material insuficiente por los patólogos y los casos de esteatosis no fueron incluidos.

Un punto más a considerar en relación a la baja correlación encontrada entre la biopsia hepática y los biomarcadores es que las comparaciones se hicieron comparando directamente los grados de actividad inflamatoria y fibrosis de los biomarcadores con los estadios de actividad inflamatoria y fibrosis de la biopsia hepática es decir, no se agruparon como ocurrió con otros estudios.

Nuestro estudio es pionero en la búsqueda de la correlación entre los biomarcadores y la biopsia hepática como estándar de oro en pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune, es necesario realizar más investigaciones con otras escalas de evaluación de la biopsia hepática diferentes al METAVIR, las cuales pudieran ayudar a incrementar esta correlación además de identificar otros factores asociados a la discordancia entre ellos. Por el momento no podemos concluir que la biopsia se pueda sustituir con los biomarcadores en el seguimiento a largo plazo de estos pacientes.

## **X. CONCLUSIONES**

- Las características de nuestra población son similares a las reportadas en series de casos de hepatitis autoinmune en niños.
- Es necesario encontrar un método de evaluación del estudio histopatológico que sea reproducible con una buena concordancia entre patólogos.
- Los biomarcadores ActiTest-FibroTest hasta ahora, no pueden ser utilizados para sustituir al estudio histopatológico en la toma de decisiones en el seguimiento de los pacientes pediátricos con hepatitis autoinmune.
- Son necesarios más estudios comparando los biomarcadores con otros sistemas de evaluación de biopsia hepática.

## **XI. Bibliografia:**

- 1) Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18
- 2) Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N. Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2007; 53(10): 1792-1799
- 3) Desmet V, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19(6): 1513-1520
- 4) Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N et al. Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435
- 5) Ishak K, Baptista L, Bianchi L, Callea R, De Groote J, Gudat F et al. Histology grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- 6) Heller S, Valencia-Mayoral P. Treatment of viral hepatitis in children. *Arch Med Resarch* 2007;38: 702-710
- 7) Guéchet J. Groupe de Travail "Marqueurs biologiques de fibrose hépatique. *Presse Med* 2006;35(9 Pt 2): 1317-26
- 8) Plevris JN, Haydon GH, Simpson KJ, Dawkers R, Ludlum CA, Harrison Dj et al. Serum hyaluronan( a non-invasive test for diagnosing liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 1121-7
- 9) Saltik-Temizel I, Koçak N, Özen H, Demir H. Serum hyaluronic acid concentrations in children with cirrhosis. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23: 129-130.
- 10) Hartley JL, Brown RM, Tybulewicz A, Hayes P, Wilson DC, Gillet P, McKiernan P. Hyaluronic acid predicts hepatic fibrosis in children with hepatic disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43(2):217-21
- 11) Xu HG, Fang JP, Huang SL, Li HG, Zhong FY, Guo HX et al. Diagnostic values of serum levels of HA, PC III, C IV and LN to the liver fibrosis in children with beta-thalassemia major. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2003; 41(8):603-6) Abstract
- 12) Li ZX, He Y, Wu J, Liang DM, Zhang BL, Yand H et al. Noninvasive evaluation of hepatitis fibrosis in children with infant hepatitis syndrome. *World J Gastroenterol* 2006; 12(44): 7155-60
- 13) Imbert-Bismut F, Ratziu 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; 357: 1069-75
- 14) Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, THabut D, et al. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers(Fibrotest) in patient with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006; 52(10): 1887-1896

- 15) Poynard T, Halfon P, Castera L, Munteanu M, Imber-Bismut F, Ratziu V et al. Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages. *Clin Chem* 2007; 53(9):1615-1622
- 16) Ratziu V, Massard J, Charlotte D, Messous D, Imert-Bismut F, Bonyhay L. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BCM Gastroenterology* 2006;6(6): 9-13
- 17) Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, et al. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(3): 547-55
- 18) Website de la Autoridad Francesa de Salud (La Haute Autorité de Santé-HAS) [http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c\\_476347](http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c_476347)
- 19) Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G, Cacoub P. Noninvasive methods for predicting liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: alternatives to liver biopsy. *Presse Med* 2007; 36( 3 Pt 2):453-5
- 20) Smith JO, Sterlin RK. Systematic review: non-invasive methods of fibrosis analysis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 557–576
- 21) Crespo J. El arte de la predicción de la fibrosis en la hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98(3): 153-160.
- 22) de Groote J, Desmet VJ, Gedik P, Korb G, Popper H, Puolse H. Morphological criteria in hepatitis. *Lancet* 1968; 2: 626- 628
- 23) Popper H, Schaffner F, Scheuer P. The vocabulary of chronic hepatitis. *N Eng J Med* 1971; 284: 1154-1156
- 24) Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-4
- 25) Bedossa P, Poynard T and the French METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289-293
- 26) French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsies in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 20: 15-20
- 27) Lèdinghen Liver Stiffness Measurement in Children Using FibroScan: Feasibility Study and Comparison With Fibrotest, Aspartate Transaminase to Platelets Ratio Index, and Liver Biopsy. *JPGN* 45:443–450, 2007.
- 28) Rossi E, et al. Validation of the FibroTest Biochemical Markers Score in Assessing Liver Fibrosis in Hepatitis C Patients. *Clinical Chemistry* 2003; 49(3): 450–454

- 29) Poynard T, et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comparative Hepatology* 2004; 3:8
- 30) Morali G. Fibrotest-Actitest™: The Biochemical Marker of Liver Fibrosis –The Israeli Experience. *IMAJ* 2007;9:588–591
- 31) El-Shabrawi MH, et al. Noninvasive assessment of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in Egyptian children with chronic hepatitis C virus infection using FibroTest and ActiTest. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22:946–951
- 32) Usluer G, et al. Comparison of non-invasive fibrosis markers and classical liver biopsy in chronic hepatitis C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012
- 33) Poynard T, et al. Prospective Analysis of Discordant Results between Biochemical Markers and Biopsy in Patients with Chronic Hepatitis C. *Clinical Chemistry* 2004; 50(8): 1344–1355.
- 34) Hermeziu B. Evaluation of FibroTest-ActiTest in children with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* (2010) 34, 16–22.
- 35) Rubio A. Noninvasive Procedures to Evaluate Liver Involvement in HIV-1 Vertically Infected Children. *JPGN* 2009; 49(5):599–606.
- 36) Uyar C, et al. Comparison of FibroTest-ActiTest with histopathology in demonstrating fibrosis and necroinflammatory activity in chronic hepatitis B and C. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:470-5.
- 37) Sökücü S, Gökçe S, Güllüoğlu M, Aydoğan A, Celtik C, Durmaz O. The role of the non-invasive serum marker FibroTest-ActiTest in the prediction of histological stage of fibrosis and activity in children with naïve chronic hepatitis B infection. *Scand J Infect Dis* 2010 Sep;42(9):699-703.
- 38) Anastasiou J. Noninvasive markers of fibrosis and inflammation in clinical practice: prospective comparison with liver biopsy. *Eur J Gastro Hep* 2010; 22(4):474-480.
- 39) Poynard T, et al. Performance of Biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in Patients with Severe Obesity: Meta Analysis of Individual Patient Data. *PLoS ONE* 2012; 7 (3).
- 40) Flores-Calderón J, Morán-Villota S, Ramón-García G, González-Romano B, Bojórquez-Ramos M, Cerdán-Silva L, Hernández-Frías P. Non invasive markers of liver fibrosis in chronic liver disease in a group of Mexican children: a multicenter study. *Ann Hepat* 2012; 11(3):364-368.
- 41) Halfon P, Munteanu M, Poynard T. FibroTest-ActiTest as a non-invasive marker of liver fibrosis. *Gastroenterol Clin Biol* 2008;32:22-39
- 42) Poynard T, Ngo Y, Perazzo H, Munteanu, M, Lebray P, Moussalli J, et al. Prognostic value of liver fibrosis biomarkers. *Gastroenterol Hepatol* 2011;7:445-454.

- 43) Lassailly G, Caiazzo R, Hollebecque A, Buob D, Leteurtre E, Arnalsteen L, et al. Validation of non-invasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity. *Europ J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:499-506.
- 44) Hiejima E, Komatsu H, Sogo T, Inui A, Fujisawa T. Utility of Simplified Criteria for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis in Children. *JPGN* 2011;52: 470–473.
- 45) Mieli-Vergani G, et al. Autoimmune Hepatitis. *JPGN* 2009; 49:158–164.
- 46) Carey E, Carey W. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Clev Clin J Med* 2010; 77 (8): 519.
- 47) Vares González M, Ramos Merino L, Martínez Quintanilla M, Freire Martínez R. Hepatitis autoinmune precedida por infección aguda por citomegalovirus en una mujer inmunocompetente. *Galicia Clin* 2012; 73 (2): 64-66.
- 48) Consuelo-Sánchez A, Baca-Rodríguez, L, Roque-Lee G, Valencia-Mayoral P. Colestasis neonatal no obstructiva asociada a infección por citomegalovirus. Seguimiento a largo plazo de una serie de casos del Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2009; 66: 141-152.
- 49) Fontanges T, et al. Discordance between biochemical markers of liver activity and fibrosis Actitest-Fibrotest and liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 2008, 32: 858-865.
- 50) García Novo M, Acuña D, Martínez Gómez J, Pedrón C, Martínez Pérez A, de Vicente Prada I. Hepatitis autoinmune: revisión de una serie de 11 casos pediátricos. *An Pediatr (BARc)* 2001; 54(supl 3): 21-25.