

**VALIDACIÓN DE LOS  
MARCADORES NO INVASIVOS DE  
FIBROSIS EN ENFERMEDAD  
GRASA HEPÁTICA NO  
ALCOHÓLICA**

**Dra. Ome Zitlalli Pérez Gutiérrez**

**Tutor: Dr. Misael Uribe Esquivel**

**Co-Tutor: Dr. Javier Lizardi Cervera**



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.

## ÍNDICE

Generalidades .....	3
Historia de la EGHNA.....	8
Epidemiología.....	10
Patogénesis.....	14
Histología de la EGHNA.....	19
Estadificando y clasificando las lesiones en EGHNA.....	26
Historia Natural del EGHNA.....	28
Métodos diagnósticos de fibrosis en EGHNA.....	36
Justificación.....	55
Objetivo.....	56
Hipótesis.....	56
Material y Métodos.....	56
Análisis estadístico.....	60
Resultados.....	61
Discusión.....	66
Conclusiones.....	75
Referencias.....	76

## GENERALIDADES

La enfermedad grasa hepática no alcohólica (EGHNA) hace referencia a un amplio espectro de daño hepático, que varía de solamente infiltración por grasa en el hígado (esteatosis) hasta el daño inflamatorio crónico (esteatohepatitis). Este grupo de pacientes están en riesgo de desarrollar fibrosis y por evolución natural de la enfermedad hasta el estadio más avanzado como lo es la cirrosis. El diferenciar entre un estadio y otro, solo es posible mediante el estudio histológico (Tabla 1).

<b>CATEGORIA</b>	<b>PATOLOGÍA</b>	<b>CORRELACIÓN CLINICOPATOLÓGICA</b>
Tipo 1	Esteatosis simple	Asintomático, ¿benigno?
Tipo 2	Esteatosis + inflamación lobular	Probablemente benigno (no considerado EHNA)
Tipo 3	Esteatosis, inflamación lobular y degeneración balonoide	EHNA sin fibrosis; puede progresar a cirrosis
Tipo 4	Esteatosis, degeneración balonoide y cuerpos de Mallory y/o fibrosis	EHNA con fibrosis; puede progresar a cirrosis y falla hepática

El desarrollo de la EGHNA esta intensamente relacionado a la resistencia a la insulina, por lo que en la actualidad, se hace referencia que la EGHNA es la manifestación hepática del síndrome metabólico [1]. Los criterios actuales para el síndrome metabólico requiere la presencia de tres o más factores: niveles de glucosa anormales (> 110 mg/dl), hipertensión sistémica (> 130/ 83 mmHg), dislipidemia (triglicéridos mayor a 150 mg/dl, HDL < a 45 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres) y una obesidad abdominal (circunferencia de cintura > 102 cm en hombres y > 88 cms en mujeres [2].El incremento de la obesidad y la prevalencia de DM2 en los últimos 10 años nivel mundial, han condicionado paralelamente el aumento del hígado graso y el

desarrollo de una enfermedad crónica hepática más. En EU, un estudio reciente mostró un incremento del 11% de enfermedad grasa no alcohólica como causa de hepatopatía crónica en el transcurso de 20 años, misma relación que se ha observado paralelamente al incremento de su población con índices de masa corporal superior a 30 [3] . En pacientes con DM2 se ha encontrado una incidencia de EHGNA entre el 10% y el 78% en los distintos reportes [4-6].

También es importante recalcar, que recientemente se ha asociado a la EHGNA al incremento del riesgo cardiovascular [7-9]. Así pues, la sumatoria de todas las morbilidades en pacientes con EHGNA, ha mostrado que éstos pacientes están en mayor riesgo de desarrollar mortalidad relacionadas a enfermedades hepáticas (ej. Hepatocarcinoma) [10].

En nuestro país, la principal causa de muerte son las relacionadas a las enfermedades cardiovasculares, en la mayor parte relacionada a diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. Esto toma más importancia ya que en estudios realizados en poblaciones mexicanas, se ha documentado una prevalencia de EHGNA de aproximadamente 14% al 16% [11, 12], y aun mayor en sujetos con síndrome metabólico y obesidad mórbida [13].

Es importante iniciar definiendo lo que es la enfermedad grasa hepática no alcohólica. Como ya se ha mencionado, la EHGNA comprende varios espectros de enfermedad, desde solamente la infiltración grasa del hígado sin ocasionar datos de inflamación, hasta lesión hepatocelular con fibrosis, lo que conocemos como esteatohepatitis. No solamente existe infiltración grasa del hígado por EHGNA, sino que también existen otras condiciones que llevan a desarrollar hígado graso (Tabla 2.). Para definir mejor el hígado graso no alcohólico, o la enfermedad grasa hepática no alcohólica (EGHNA)

vamos a denominar de ésta manera cuando encontramos una acumulación de grasa de más del 5% del total del peso de la masa hepática, todo esto descartando causas que lleven a infiltración grasa y se cuente con una ingesta de alcohol menor a 20 gramos al día [14].

---

### **Tabla 2. Nomenclatura de los trastornos grasos del hígado**

---

#### **Nomenclatura histológica**

1. Hígado graso
2. Esteato hepatitis
  - A) Grado: estado de actividad necro inflamatoria
  - B) Estadio: graso de fibrosis

#### **Asociación clínica**

1. Alcohol
  2. Resistencia a la insulina
  3. Drogas
  4. Trastornos de los lípidos
  5. Tóxicos
  6. Pérdida de peso
  7. Idiopático
- 

Dentro de otros puntos, es importante preguntarnos cuál es la relevancia en nuestros días de la EGHNA. A nivel mundial, el encontrar alteración en las pruebas de funcionamiento hepático se ha atribuido en gran parte a la EGHNA, con lo que se ha convertido en la causa de hepatopatía crónica más común, reportándose prevalencias que varían según el grupo étnico de hasta el 30% [15]. Encontramos una alta prevalencia en ciudades urbanizadas con economías de primer mundo, aumentando el riesgo de mortalidad por enfermedades modificables, además que se ha convertido en una consulta frecuente al médico especialista y por lo que tenemos que contar con el conocimiento para informar a los pacientes acerca del riesgo de esta enfermedad ahora común. También es importante tener en mente, que el riesgo de desarrollar

cirrosis y sus complicaciones, puede llegarse a presentar en pacientes con EHNA, por lo que se tiene que llevar un adecuado seguimiento para prevenir estadios avanzados. Así también, se ha documentado que la evolución de cualquier otra hepatopatía (hepatitis virales, hepatopatías de depósito) puede verse complicada o ser más tórpida en aquellos pacientes que además tienen EGHNA; así como tener presente que la cirrosis por EGNHA se ha convertido en la cuarta causa de indicación de trasplante hepático[16]; el hígado graso puede ser una causa de rechazo al injerto en pacientes con trasplante hepático [17] y puede recurrir después en el órgano trasplantado.

Los recientes hallazgos de la relación entre la EGHNA y el aumento del riesgo cardiovascular y pacientes con DM2 son muy importantes, tomando en cuenta que en México contamos con una prevalencia de DM2 según la última Encuesta Nacional de Salud realizada en el 2001, del 7.5% en sujetos mayores a 20 años, con una distribución por sexo del 7.2% para hombres y 7.8% para mujeres, siendo el grupo de edad entre los 50 y 79 años con mayor concentración porcentual, así como en el 2008 se reportó la DM2 y sus complicaciones como la primera causa de mortalidad a nivel nacional y las cardiovasculares como la segunda causa.

Se ha documentado que existe un riesgo 4 veces mayor de mortalidad relacionada a eventos coronarios si los pacientes cuentan con todos los componentes del síndrome metabólico (obesidad central, triglicéridos elevados, hipertensión y resistencia a la insulina) comparado con quienes solamente tienen un componente [18]. Estudios prospectivos han reportado la asociación entre el incremento de la enzimas hepáticas, principalmente GGT como un marcador de EGHNA y la ocurrencia de eventos coronarios tanto en sujetos diabéticos como en sujetos no diabéticos [19]. También la elevación de ALT se ha estudiado como un factor de riesgo para el desarrollo de

enfermedad cardiovascular y se ha considerado como un factor independiente de los riesgos tradicionales del síndrome metabólico para riesgo cardiovascular, sugiriendo que la EGHNA/EHNA está asociada con enfermedad coronaria eliminando los demás factores del síndrome coronario para eventos cardiovasculares [20]. Fracanzani y cols. [21] estudiaron en sujetos sanos y con EGHNA las diferencias entre los calibres de la íntima de la carótida, encontrando que la esteatosis era un factor predictor independiente para encontrar calibres mayores de 0.64 mm de la íntima de la carótida con un riesgo de 6.9 veces.

Así pues, la presencia de hígado graso es un indicador no sólo una enfermedad hepática, sino también de una enfermedad sistémica que puede aumentar el riesgo de muerte por la presencia de eventos cardiovasculares y por tal motivo se debe de centrar en reducir la prevalencia mundial que cada día crece más, incluyendo nuestro país, controlando y reduciendo los factores que lo condicionan.



## HISTORIA DE LA EGHNA

Durante la década de los 50s, se describió la presencia de hallazgos de esteatosis macro vesicular con datos de inflamación y fibrosis en sujetos obesos que no tenían ingesta de alcohol [22] y posteriormente los mismos hallazgos fueron reportados en otras series de pacientes. Peters y cols [23], describe los hallazgos histológicos en 5 pacientes que desarrollaron falla hepática aguda seguido de cirugía para obesidad mórbida. Lo que ellos describen es hialinización centro lobulillar o focal, con colagenosis intrasinusoidal, degeneración grasa e infiltrado por neutrófilos. Lo que ellos observaron es que no todos los pacientes tenían ingesta de alcohol y contaban con los hallazgos similares a aquellos que ingerían alcohol.

Estos hallazgos se fueron describiendo con el paso del tiempo, en sujeto obesos que no se sometían a cirugías para control de peso ni tenían historia de consumo de alcohol [24, 25] y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [26, 27].

La primera descripción de la EGHNA en forma de esteatohepatitis, se realizó en los 80s, donde Ludwig describe en una serie de pacientes, hallazgos histológicos muy similares a aquellos que se encontraban en los pacientes que tenían una ingesta importante de alcohol. Ya se conocía previamente, que una proporción de pacientes diabéticos, desarrollaban cirrosis sin ningún factor de riesgo para el desarrollo de la hepatopatía [28]. Es aquí, en donde por primera vez, se utiliza el término de esteatohepatitis no alcohólica, con hallazgos histológico de infiltración grasa del hígado con inflamación. Después de la publicación de Ludwig, no tardaron varios autores en iniciar la búsqueda y la clasificación de esta nueva enfermedad hepática, sin embargo, la relevancia de la EHNA ha tomado aún más importancia en los últimos 20

años, ya que el aumento de enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina, como la diabetes mellitus y el aumento tan importante de la obesidad a nivel mundial, ha tomado la EGHNA una relevancia clínica para la práctica diaria. La EGHNA no solamente es un componente más del síndrome metabólico, sino que es una enfermedad que puede llevar a un estado de mayor morbi/mortalidad para el paciente.

## EPIDEMIOLOGÍA

A pesar de las limitaciones de la amplia variedad de metodología de diagnóstico para la EGHNA, es claro que hay un incremento de ésta patología a nivel mundial. La mayoría de los estudios a nivel mundial, han utilizado el ultrasonido como método diagnóstico. Los resultados basados en hallazgos histopatológicos están limitados en su mayoría, a poblaciones de alto riesgo, como pacientes con diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, obesos mórbidos sometidos a cirugía bariátrica (Figura 1). La prevalencia por países es variable: en EU se reportó una prevalencia del 31% por resonancia magnética (RM), en Asia del 9.3% al 29%, en México de 16%, en Italia del 23% y 30% en Israel [22]. La estimación de la esteatosis utilizando biopsia hepática en la población en general o en sujetos de bajo riesgo se han reportando en series de autopsias en pacientes sin mortalidad relacionada a hepatopatías. En estos estudios se ha mostrado una prevalencia que varía del 16% al 24%, hasta el 38% en un estudio que se realizó en EU en donadores vivos y cadavericos de hígado [29].

Por otro lado, la prevalencia de EGHNA en sujetos de alto riesgo ha sido estudiado extensamente. Más frecuentemente, contamos con estos datos en sujetos a lo que se somete a cirugía bariátrica, que son aquellos con índice de masa corporal (IMC) por arriba de  $40 \text{ kg/m}^2$  o mayor a  $35 \text{ kg/m}^2$  con morbilidades como DM2. Los pacientes en las series publicadas son generalmente mujeres que se encuentran en la edad media. En promedio, estos estudios reportan una prevalencia que varía del 33% al 99% con una media de 76% de esteatosis en sujetos que son sometidos a cirugía bariátrica, teniendo el 37% (rango que van del 9.8 % al 72.5%) hallazgos concordantes con

esteatohepatitis no alcohólica, el 23% con algún grado de fibrosis (con rangos del 7.3% al 49%) y una prevalencia del 5.8% (rangos 1.6% al 10%) de hallazgo de cirrosis.

En estudios de pacientes con diabetes mellitus comparado con pacientes sin diabetes, la prevalencia de esteatosis en un rango que va desde el 40% hasta el 69.5%. Un estudio reciente que utilizó resonancia magnética con espectroscopia mostró que sujetos con DM2 tiene un 80% más grasa hepática que sujetos controles pareados para sexo, peso y edad [30].



**Figura 1. Estudios epidemiológicos de EGHNA por biopsias en pacientes de alto riesgo**

Algo aún más preocupante, es el incremento de esta patología en niños. La prevalencia real de la EGHNA en niños es difícil de determinar ya que no se ha establecido aún, guías de escrutinio para esta población y el diagnóstico definitivo es por biopsia hepática. Los niveles de ALT es un marcador inespecífico de daño hepático pero se ha

utilizado como un marcador en la mayoría de los estudios de prevalencia de EGHNA en la población pediátrica. Desafortunadamente, los rangos de normalidad de los niveles de ALT para esta población no han sido aún bien determinados. La evidencia sugiere que el valor de corte de niveles anormales de ALT en la mayoría de los hospitales infantiles en E.U. es de 53 U/l, y que este valor es muy alto, por lo que ocasiona error al calcular la prevalencia real de EGHNA en población pediátrica [31]. Otros estudios han mostrado que pacientes con niveles normales de ALT pueden tener EGHNA con fibrosis significativa [32]. Los niveles de ALT por lo tanto, es un marcador poco confiable como herramienta de escrutinio. Los datos que se obtuvieron de National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) que se realizó en 5586 niños de 12 a 19 años de edad, se encontró una elevación de los niveles de ALT en el 8% de la población en estudio. Los niveles elevados de ALT correlacionaron con el sexo masculino, etnicidad Mexicano/americano, circunferencia de cintura y niveles de insulina en ayuno [33]. En una cohorte europea de 16 390 niños con sobrepeso y adolescentes, el 11% de la población en estudio se encontró con niveles anormales de ALT y/o AST. En este estudio, la elevación de ALT y AST correlacionó significativamente con niveles elevados de insulina, mayor edad, obesidad y sexo masculino [34]. Es importante recalcar que en la mayoría de estos pacientes con alteración de las pruebas de funcionamiento hepático en este estudio probablemente se atribuía a EGHNA, sin embargo las demás causas de elevación de ALT no fueron excluidas.

Como ya sabemos, el único método diagnóstico confiable para elaborar el corroborar la existencia de EGHNA es la biopsia hepática, y dado que este procedimiento es invasivo para estandarizarla como una herramienta de escrutinio, el único método adecuado para estudiar la prevalencia de EGHNA es en estudio de autopsias. El estudio

más grande se realizó en pacientes de 2 a 19 años que murieron de una forma no natural en la ciudad de San Diego. En este estudio, se incluyeron un total de 742 pacientes en donde se encontró una prevalencia de EGHNA en niños de 15 a 19 años del 17.3%. La EGHNA también se encontró que era más común en el sexo masculino, niños asiáticos (10.2%) e hispanos (11.8%). Los niños afro-americanos tuvieron la tasa más baja de EGHNA de 1.5%. Otros estudios han confirmado que el sexo masculino y la edad, así como la descendencia asiática y mexicana tienen mayor riesgo de EGHNA, aun teniendo menos componentes del síndrome metabólico [35-37]. También se ha demostrado, que a pesar de que los niños desarrollan más EGHNA, tanto las niñas como los niños lo desarrollan en igual proporción EGHNA [38].

## PATOGÉNESIS

Podemos dividir los factores etiológicos de la EGHNA en dos: mecanismos hepáticos y mecanismos no hepáticos.

### Mecanismos no hepáticos:

La EGHNA ha emergido concurrentemente con la epidemia de obesidad y diabetes mellitus tipo 2. El incremento de la obesidad, ha condicionado la aparición de trastornos como el hígado graso, ya que las hipótesis indican que el adipocito, que actúa como un órgano endócrino, juega un papel central en la etiología de la resistencia a la insulina en la EGHNA (Figura 2).



**Figura 2. Resistencia a la insulina e hígado graso**

El cambio en el estilo de vida ha tenido sus repercusiones en la etiología del hígado graso. Existen estudios en donde se muestra evidencia que la disminución de la

actividad física y los modernos patrones de consumo de alimentos esta involucrados en el desarrollo de la obesidad y la DM2 [39, 40]. Así también, es evidente este mecanismo en estudios epidemiológicos que han mostrado que culturas que migran y adoptan estilos de vida de occidente tienen mayor riesgo de desarrollar obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad grasa hepática no alcohólica.

El incremento de la masa grasa en el organismo es un factor esencial para el desarrollo de EGHNA. El adipocito, es reconocido como un órgano endócrino que puede secretar proteínas, llamadas adipocinas, que tienen una gran variedad de efectos locales, periféricos y hepáticos en las fases de respuesta aguda inflamatoria, en la homeostasis de la energía, en la regulación de los vasos, en el metabolismo de las lipoproteínas y de la matriz extracelular [41]. Con la expansión de la masa grasa y la diferenciación de los adipocitos, esta células producen Citocinas incluyendo la leptina, factor de necrosis tumoral (FNT $\alpha$ ), angiotensinógeno y ácidos grasos libres, mientras que la adiponectina esta disminuida [42-44]. Además también se ha observado que la leptina se encuentra incrementada y juega un papel importante en la fibrogénesis [45], al igual que el angiotensinógeno, que al dar antagonistas de angiotensinógeno II en modelos animales, mejoran las pruebas de funcionamiento hepático y la fibrosis [46]. El FNT también se encuentra incrementado en sujetos que tienen EGHNA y que son obesos, pero no se ha visto esta tendencia en sujetos que tienen peso normal y tienen diabetes [47]. El FNT causa resistencia hepática a la insulina a través del incremento de la regulación de la señalización supresora de citocina (SOCS) de las proteínas 1 y 3 que se unen a la tirosina JAK y atenúan su habilidad para fosforilar señalamientos traductores y activadores de las proteínas de transcripción. Esto, disminuye la capacidad de la insulina para activar las vías de señalización, además, el FNT incrementa la



permeabilidad mitocondrial, disminuye la capacidad de respiración de la mitocondria y depleta el citocromo mitocondrial, ocasionando apoptosis [48].

La adiponectina, se ha convertido en una citocina metabólica muy importante. Los niveles bajos de adiponectina, preceden y predicen la aparición de la DM2, y el incremento de los niveles séricos de adiponectina, mejoran la sensibilidad a la insulina por medio del incremento de la oxidación de los ácidos grasos vía AMP cinasa y suprime la glucogenogénesis [49, 50]. Los niveles de adiponectina están disminuidos en los pacientes obesos y en los pacientes con EGHNA, y si se le administra de manera exógena, mejora la esteatosis hepática en modelos animales[51]. En la EHNA, la expresión del mensajero de RNA del receptor de la adiponectina (adip RII) en el hígado, correlaciona negativamente con el grado histológico de fibrosis. Además, en modelos animales con niveles de adiponectina bajos, se ve un desarrollo más extenso de fibrosis cuando se exponen a hepatotoxinas.

También la distribución de la grasa tiene una etiología muy importante, ya que el incremento en la grasa visceral, incrementa el abasto de ácidos grasos libre al hígado. La grasa visceral, más que la grasa total, predice la esteatosis hepática [52], mayor daño hepático y mayor mortalidad intrahospitalaria en pacientes con cirrosis.

Otro factor es el desarrollo de la resistencia a la insulina. Saltiel demostró resistencia a la insulina en el músculo, tejido adiposo e hígado. Encontró que anomalías en los sustratos, principalmente ácidos grasos libres y el depósito de grasa ectópica en el músculo, así como múltiples Citocinas como el FNT y la IL-6, pueden ser mediadores en la resistencia a la insulina, a través de mecanismos intracelulares complejos. El mecanismo primario de resistencia a la insulina es la sustitución de una serina por una

tirosina en la cinasa que previene la señalización intracelular normal para la glucosa hacia la célula [53].

Otro mecanismo que se ha propuesto en la etiología de la EGHNA es el sobrecrecimiento bacteriano. Existen estudios en donde se muestra que existe sobrecrecimiento bacteriano en una proporción de pacientes con EGHNA [54]. Se piensa que el sobrecrecimiento bacteriano incrementa el estrés oxidativo hepático incrementando la producción endógena de metano y por activación directa de citocinas inflamatorias, de las células hepáticas no parenquimatosas (macrófagos) o ambos por la vía de la liberación de lipopolisacáridos [55].

### **Mecanismos hepáticos:**

La capacidad de la resistencia a la insulina de incrementar la captación de glucosa en el músculo y suprimir la lipólisis resulta en hiperinsulinemia y en un flujo aumentado de ácidos grasos libres hacia el hígado. La esteatosis hepática resultante causada por estos factores (incremento en la insulina y en los niveles de ácidos grasos libres) pueden resultar en tres vías de metabolismo: disminución de la oxidación hepática de ácidos grasos libres, incremento en la producción de novo de lipogénesis hepática, o disminución del transporte de lípidos desde el hígado. En pacientes con EGHNA se han demostrado dos de los tres mecanismos, incremento en la lipogénesis y disminución en el transporte de lípidos, a pesar de que puede existir un incremento en la oxidación de ácidos grasos libres [56]. La esteatosis incrementa la resistencia a la insulina, sin embargo se ha planteado que la resistencia primaria ocurre a nivel periférico y posteriormente, al desarrollar esteatosis hepática, el hígado exacerba el grado de resistencia a la insulina (Tabla 3).

---

**Tabla 3. Resistencia a la insulina en EGHNA**

---

**Progresión más aceptada**

Resistencia periférica a la insulina

- Lipólisis no suprimida normalmente
- Hiperinsulinemia

Afluencia de ácidos grasos libres al hígado

Incremento de triglicéridos hepáticos

Resistencia a la insulina hepática super impuesta a la resistencia periférica

---

Como ya se mencionó previamente, la esteatosis hepática se considera que tiene un curso benigno. Esta esteatosis “benigna” no se mantiene quieta. Existe una activación de células estelares [57], estimulación de proteínas apoptóticas y una activación de la regulación de la proteína 2 de desacoplamiento, que tienen el potencial de causar fibrosis, muerte celular y deficiencia intracelular de ATP respectivamente [58]. Además, parece ocurre la peroxidación lipídica y la deformación morfológica mitocondrial, pero en menos intensidad que la que se observa en EHNA. A pesar de estos procesos insidiosos, la histología hepática y la función son normales. Esto indica, que existen procesos citoprotectores regulatorios que deben estar implicados y mantienen la salud hepática ante el estrés celular. No está claro por qué solo una pequeña cantidad de pacientes que tienen EGHNA desarrollan EHNA. Se ha propuesto que los hepatocitos cargados de lípidos actúan como reservorio de los agentes hepatotóxicos y son más susceptibles a un segundo golpe, al estrés oxidativo causado por componentes como las endotoxinas, citocinas y toxinas ambientales [59].

## HISTOLOGIA DE LA EGHNA

La EGHNA se caracteriza histológicamente por un espectro de hallazgos. En el hígado no cirrótico, estos incluyen algunos grados de esteatosis y, variablemente, la presencia de:

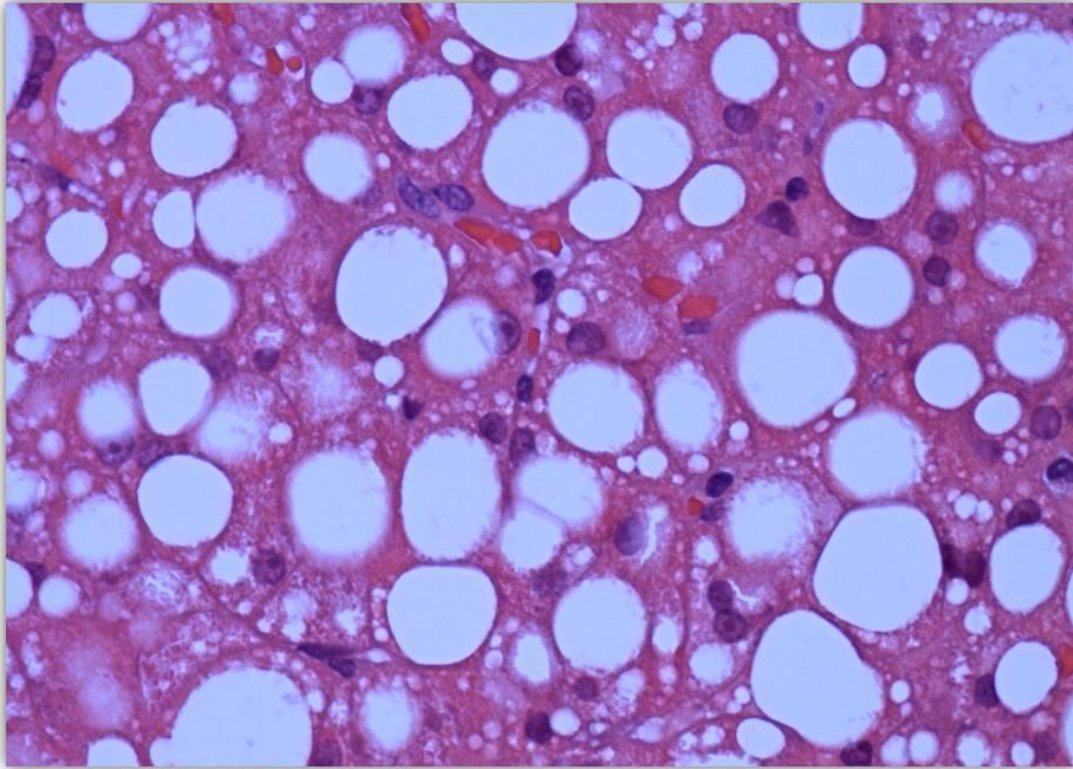
1. Balonización con o sin cuerpos de Mallory-Denk (MDB)
2. Inflamación lobular y/o portal
3. Fibrosis

Otros hallazgos que se pueden observar son núcleos celulares glucogeneizados, agregados de células de Kupffer, cuerpos acidófilos, megamitocondrias y depósitos de hierro. La combinación de estos hallazgos, nos llevan al diagnóstico de esteatohepatitis.

### LA ESTEATOSIS

La esteatosis, no es específica de la EGHNA, puede ser encontrada en diversas patologías que en algunos casos, comparten el mecanismo de la resistencia a la insulina. Los trastornos más frecuentemente asociados con esteatosis son el daño inducido por medicamentos, la hepatitis viral por virus C, trastornos hereditarios del metabolismo de las lipoproteínas, trastornos nutricionales, desordenes endocrinos sistémicos como el golpe de calor. La esteatosis es el criterio mínimo para el diagnóstico de EGHNA en un hígado no cirrótico (Figura 3). En la EGHNA, el tipo predominante de esteatosis es la macrovesicular, y en la mayoría de los adultos, se presenta en la zona 3 (perivenular). Otro trastorno que puede contener esteatosis en

esta zona es el hígado graso alcohólico. A pesar de que en esta zona vamos a encontrar la mayoría de esteatosis en EGHNA, también podemos llegar a ver esteatosis en la zona 1 principalmente en niños.

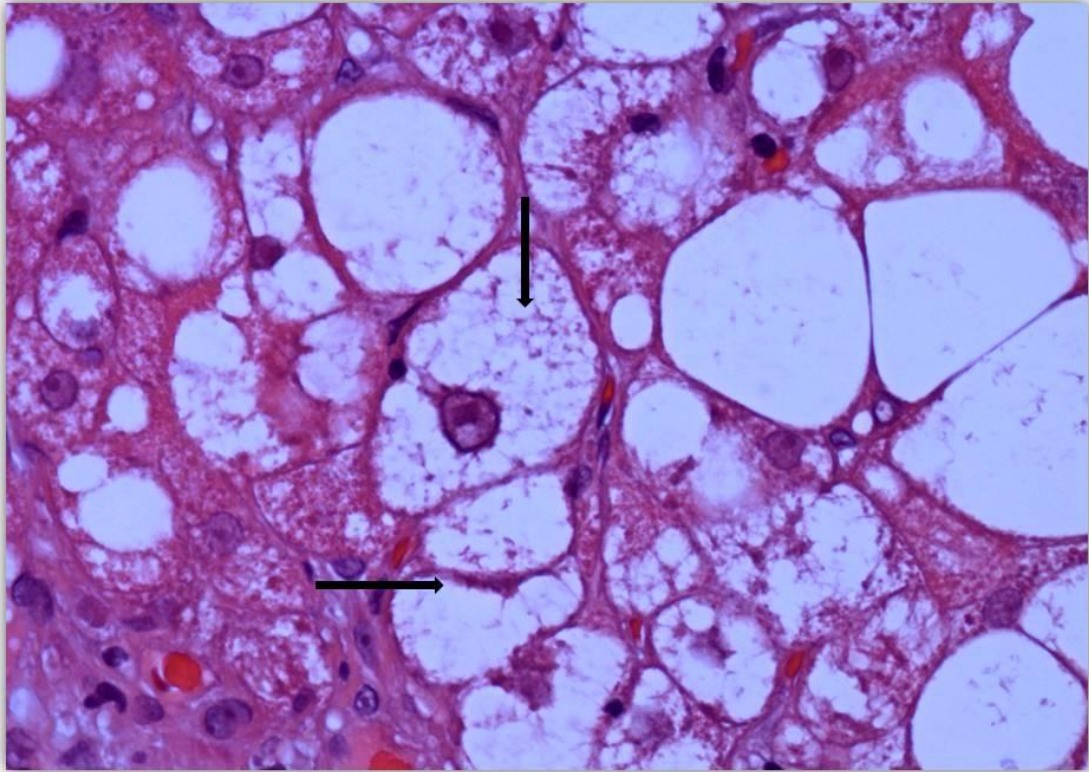


**Figura 3. Esteatosis simple**

La esteatosis que vamos a encontrar en la EGHNA está caracterizada por acumulo de gotas grandes de grasa intra citoplasmática y desplazamiento excéntrico del núcleo celular. Algunos estudios han mostrado que por arriba del 5.5% de la masa total del hígado es normal en algunos sujetos [60], sin embargo, como ya mencionamos, la EGHNA se define como el hallazgo de más del 5% de los hepatocitos con esteatosis. Es importante mencionar, que aún no se conoce el mecanismo por el cual sucede, pero que al momento de tener cirrosis en un hígado con EGHNA, la evidencia de la EHNA desaparece [61].

## **BALONIZACIÓN DE LOS HEPATOCITOS**

Uno de los marcadores de daño celular en EGHNA es la balonización de los hepatocitos (Figura 4) que está caracterizado por la apariencia de edema de y rodeados de citoplasma reticulado, núcleos alargados y un nucléolo prominente. Ocasionalmente, se pueden observar cuerpos de Mallory pobremente formados en los hepatocitos balonizados. Algunos estudios, han mostrado que este cambio en la morfología de los hepatocitos es la manifestación de la pérdida de la estructura del cito esqueleto normal [62]. Al igual que la esteatosis, la balonización en adultos con EGHNA la vamos a encontrar más frecuentemente en la zona 3, mientras que en niños la balonización puede estar ausente en todas las zonas. Como marcador de daño celular, para los patólogos la balonización de los hepatocitos, es un hallazgo fundamental para el diagnóstico de EHNA. La balonización la podemos encontrar también en conjunto con la fibrosis peri sinusoidal. Matteoni [63] encontró que la balonización es un hallazgo que está asociado con la progresión clínica de la EGHNA, y a la elevación de colesterol sérico y resistencia a la insulina, así pues, se ha asociado el hallazgo de balonización a un incremento de marcadores séricos necro inflamatorios [64].



**Figura 4. Degeneración balonoide de los hepatocitos**

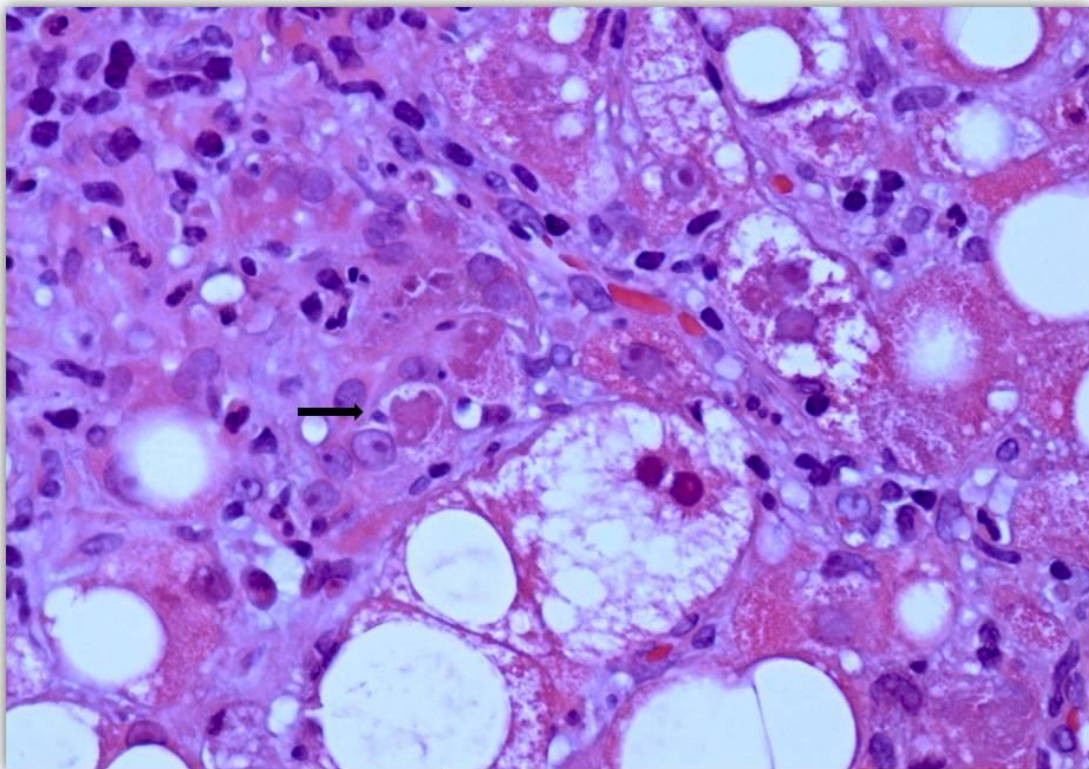
La inflamación lobular en EGHNA es usualmente leve y es un factor importante para el diagnóstico de EHNA. En la mayoría de los casos, la inflamación lobar está compuesta de células inflamatorias mixtas, pequeños agregados de células de Kupffer y ocasionalmente de neutrófilos. Los neutrófilos localizados alrededor de los hepatocitos conteniendo cuerpos de Mallory se les denomina satelitosis; esta es una lesión menos común en EHNA que en la esteatohepatitis por alcohol (EHA).

La inflamación portal esta frecuentemente presente en la EGHNA pero es usualmente leve y menos sobresaliente que los hallazgos de inflamación lobar de la zona 3. Se ha encontrado mayor inflamación portal en niños con EGHNA y en adultos con EHNA clínicamente e histológicamente severo [65].



## CUERPOS DE MALLORY

Son agregados viscosos de material de cito esqueleto que se encuentran en los hepatocitos en pacientes con EHA y EHNA (Figura 5). Comparados con aquellos que se ven en la EHA, los cuerpos de Mallory de la EHNA usualmente no están bien formados, se encuentran en los hepatocitos balonzados y requieren de tricrómico de masson o inmunohistoquímica para identificarlos. Los cuerpos de Mallory son quimiotácticos y atraen a los neutrófilos, y forman la lesión previamente descrita como satelitosis. Los cuerpos de Mallory los podemos encontrar más frecuentemente en grados altos de inflamación por EHNA y es una de las características que se ha utilizado para dividir los tipos de EGHNA en 4 grupos: EGHNA tipo 1 y tipo 2 y la EGHNA tipo 3 y tipo 4, en donde ya se encuentra EHNA y como consecuencia progresión a fibrosis, cirrosis y sus complicaciones [63].



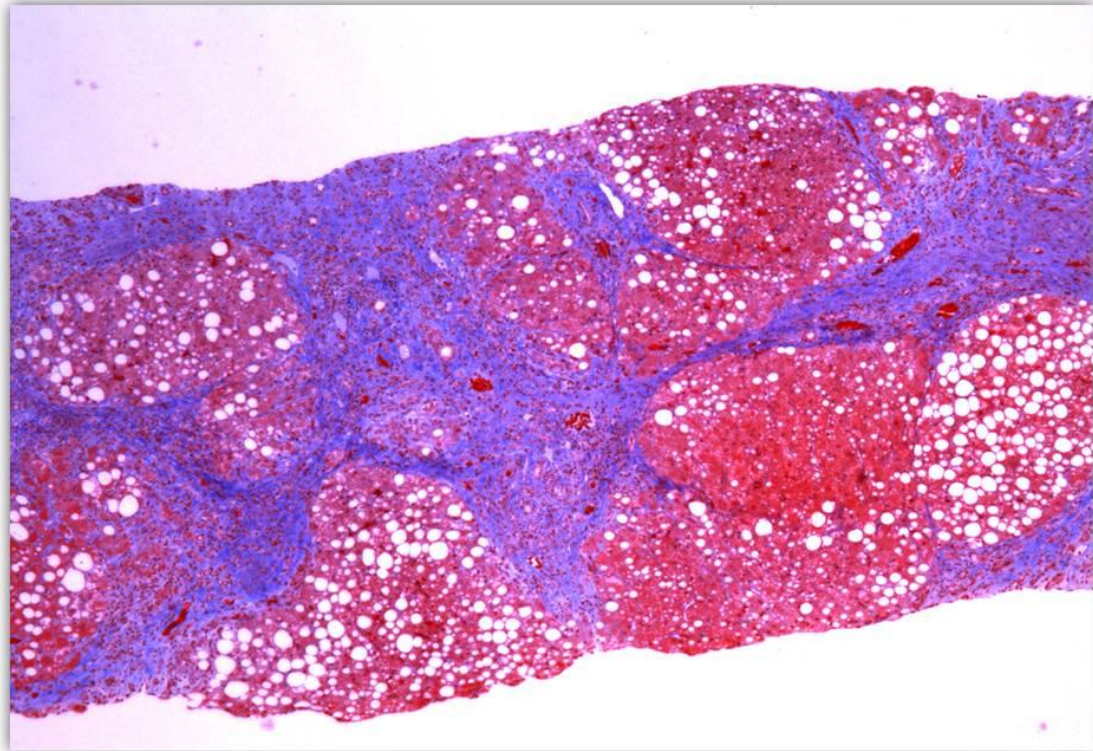
**Figura 5. Cuerpos de Mallory**



A pesar de que la apoptosis no es una característica definitoria de la EHNA y no se requiere para el diagnóstico, se pueden llegar a encontrar cuerpos acidófilos aislados. Los estudios han mostrado, que comparado con la EGHNA, controles y EHA, la EHNA tiene un incremento en la apoptosis celular [66]. La apoptosis tiene una correlación clara con la actividad inflamatoria y el grado de fibrosis.

## **FIBROSIS Y CIRROSIS**

La fibrosis no se considera un criterio necesario para establecer el diagnóstico de EHNA. En adultos, el depósito inicial de colágeno se da en la zona 3 peri sinusoidal en el espacio de Disse; con el tiempo, se puede observar una fibrosis peri celular. Esta fibrosis temprana puede ser muy fina y apreciarse mejor con tinciones especiales o puede ser tan densa y ser visible en una tinción de hematoxilina/eosina convencional, pero para una mejor visualización, podemos identificarla con tinción de Masson. Los depósitos de fibras elásticas de nueva formación pueden ser identificados con tinciones como la tinción de Shikata [67]. Seguido de la deposición inicial de colágeno en la zona 3, se observa una expansión del tracto portal y peri portal de la fibrosis; en algunos casos, se puede ver puentes de fibrosis central-central, central-portal o portal-portal y llevar hasta la cirrosis (Figura 6).



**Figura 6. Cirrosis por EHNA**

Algunos estudios han mostrado resultados conflictuantes en cuanto a las células estelares en EGHNA, ya que han mostrado que existe una activación incrementada de las células estelares en EHNA por incremento del antígeno alfa en musculo liso detectado en la zona 3, lo que se relaciona directamente con fibrosis pero no así con la actividad inflamatoria o la esteatosis, y en otros estudios se ha encontrado que está relacionada con la inflamación [68].

## ESTADIFICANDO Y CLASIFICANDO LAS LESIONES EN EGHNA

Esquemas de estadiaje y clasificación se han desarrollado para los estudios clínicos de enfermedades crónicas hepáticas y no son aplicables a la EGHNA porque difieren de la naturaleza de las lesiones necro inflamatorias y de la fibrosis, como ya se describió anteriormente. La primera escala de clasificación específicamente creado para EGHNA fue publicado en 1999 por Matteoni y cols. [63]. Este esquema, sin embargo, no realizó valoraciones semicuantitativas. Brunt y cols. [69] propusieron un esquema semicuantitativo para asignar grados histológicos (evaluación global de la actividad necro inflamatoria) y el estadio (extensión de la fibrosis) a las biopsias con EHNA. Los hallazgos que el autor describe como más significativo en EHNA son:

1. Esteatosis macrovesicular
2. Balonización hepatocelular
3. Inflamación intra-acinar (lobular)
4. Inflamación portal
5. Cuerpos de Mallory
6. Cuerpos acidófilos
7. Células de Kupffer teñidas con PAS
8. Núcleos glucogenados
9. Lipogranulomas
10. Hierro hepatocelular

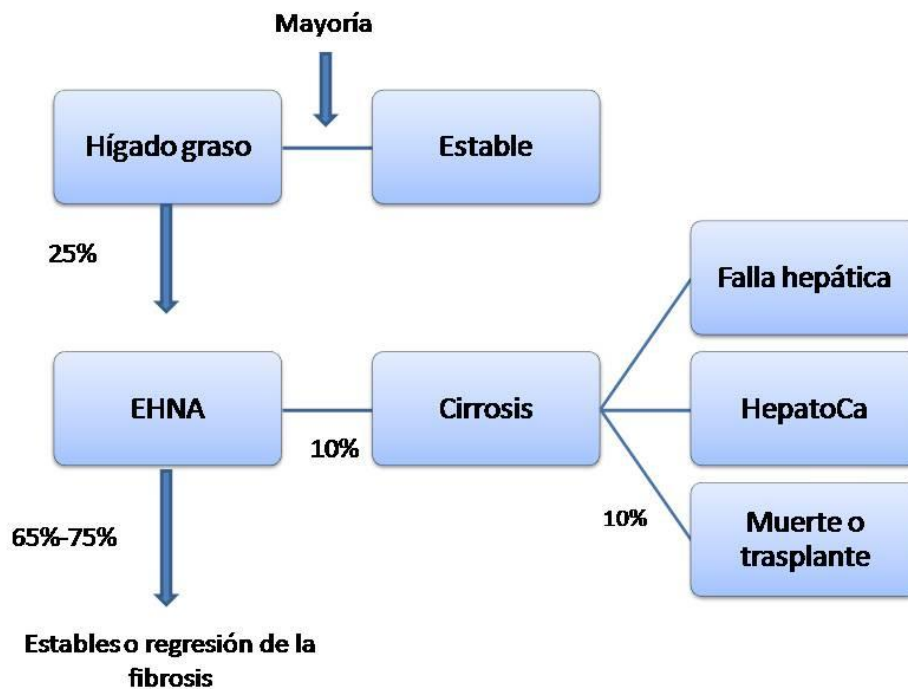
La esteatosis se gradúa como 0: sin involucro de los hepatocitos; 1: menos del 33% de involucro hepático; 2: 33% al 66%; y 3: mayor al 66%. La inflamación portal se gradúa en 0: ninguna; 1; leve; 2: moderada; 3; severa. La combinación de hallazgos se usan

para designar un estadiaje global como grado 1 (leve), grado 2 (moderada) y grado 3 (severa) (Tabla 4).

<b>Tabla 4. Estatificación de BRUNT</b>					
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Porcentaje de esteatosis</b>	0	33%	33%- 66%	> 66%	
<b>Balonización</b>	Ninguna	Algunos	Muchos		
<b>Inflamación lobar (no. De focos por campo 200x)</b>	0	1-2	≤ 4	> 4	
<b>Inflamación portal</b>	Ninguno	Leve	Moderada	Severa	
<b>Fibrosis</b>		Zona 3 perisinusoidal/ pericelular	Zona 3 y periportal	Puentes de fibrosis	Cirrosis

## HISTORIA NATURAL DEL EGHNA

Durante la última década, se ha visto un incremento en el entendimiento de la historia natural en EGHNA. La figura 7 muestra la historia natural de la EGHNA. La historia natural parece depender del subtipo de EGHNA en el momento de la presentación. Aquellos que solamente tienen hígado graso tienen generalmente buen pronóstico, al contrario de aquellos que debutan o desarrollan EHNA ya que pueden progresar a fibrosis y desarrollar cirrosis.



**Figura 7. Evolución de la EGHNA**

El pronóstico a largo plazo de los pacientes con EGHNA depende principalmente del tipo histológico que muestra la biopsia al momento de la presentación. La esteatosis simple se desarrolla lentamente y la incidencia de cirrosis es baja (0.6-3%) después de 10 a 20 años de seguimiento; sin embargo, la tasa de cirrosis alcanza el 15-25% en un

transcurso de 10 a 15 años en los pacientes con EHNA [70]. Algunos marcadores, incluyendo edad mayor a 50 años, obesidad (principalmente obesidad visceral), hipertensión, DM2, elevación de ALT, elevación de la relación ALT/AST mayor a 1 y plaquetas disminuidas, son factores de riesgo para EHNA y fibrosis [70]. Durante el curso crónico de la EGHNA, el desarrollo de EHNA es un estadio inevitable en el camino de la esteatosis simple a cirrosis. Comparado con hepatitis crónica por virus C y hepatitis alcohólica, la fibrosis hepática en los pacientes con EHNA progresa relativamente más lento, y la cirrosis compensada y el carcinoma hepatocelular se presentan en sujetos de edad más avanzada [71]. Los individuos con resistencia a la insulina, la esteatosis simple es la precondición para el desarrollo de EHNA y cirrosis, y un hígado graso disminuye la tolerancia a las toxinas hepáticas, isquemia e hipoxia. Un hígado con esteatosis que se usa para trasplante puede ser una causa primaria de no funcionamiento del órgano trasplantado. Más aún, en los pacientes con otra hepatopatía crónica, la co-existencia de la esteatosis puede contribuir al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular, así como reducir la respuesta al tratamiento con interferón en pacientes con hepatitis C que no son genotipo 3 [72].

Pocos estudio prospectivos han encontrado que la expectativa de vida en los pacientes con EGHNA, incluyendo aquellos con elevación criptogénica de los niveles de ALT o GGT, o ambos, se acorta y las causa de muerte son principalmente malignidad, enfermedad cardiovascular aterosclerótica y cirrosis [73]. De todas las causas de mortalidad en esteatosis simple no es significativamente menor que los pacientes con EHNA, pero para los últimos, la mortalidad relacionada a enfermedades hepáticas es marcadamente superior que el grupo control. La enfermedad grasa no alcohólica y el síndrome metabólico puede ser una causa recíproca y la EGHNA puede ser un

predicador de riesgo comparado con obesidad reflejado por el IMC y la obesidad visceral medido por la circunferencia de la cintura [74]. Aun si los pacientes con EGHNA tienen peso normal, la incidencia de DM2 y enfermedad cardiovascular se incrementa significativamente después de 6 a 15 años de seguimiento.

Teli y cols. [75] realizaron el seguimiento clínico de 40 pacientes que tenían únicamente esteatosis simple identificada por una base de datos histológica. Estos pacientes no tenían evidencia de esteatohepatitis o fibrosis. Catorce pacientes murieron al concluir el periodo de seguimiento. Ninguno de estos pacientes murió de alguna enfermedad relacionada al hígado y ninguna tenía evidencia clínica de enfermedad hepática al momento de su muerte. En los 26 pacientes que sobrevivieron al periodo de seguimiento, 12 tenían biopsias de seguimiento con una mediana de intervalo de 11 años entre las biopsias y ninguno mostró progresión a cirrosis. Un paciente obeso desarrolló fibrosis moderada peri celular y leve perivenular en el seguimiento a 9.8 años después de la primera biopsia. En los 14 pacientes restantes que continuaban vivo al momento del término del seguimiento pero que no contaban con biopsia, ninguno tenía evidencia bioquímica o radiológica de enfermedad hepática. En otro estudio más reciente, también se obtuvieron pacientes de una base de datos histológicas, solo uno de 109 pacientes que tenían esteatosis hepática desarrolló cirrosis, con una mediana de seguimiento de 16.7 años [76]. Este paciente murió de complicaciones de la cirrosis. Dos pacientes desarrollaron EHNA en el periodo de seguimiento. La mortalidad en los pacientes que tenían esteatosis simple no fue significativamente diferente que la población en general. Matteoni y cols. [63] observaron que dos pacientes (4%) desarrollaron cirrosis y un paciente (2%) murió de enfermedad relacionada al hígado de 49 pacientes que tenían esteatosis hepática.

Estos estudios resaltan el pronóstico benigno en la mayoría de los pacientes que presentan esteatosis hepática, sin embargo, la progresión a EHNA y cirrosis puede ocurrir.

Por otro lado, los pacientes con EHNA tienen un desenlace clínico distinto de aquellos pacientes que solamente cursan con esteatosis. Lee [77] siguió a 39 pacientes que tenían el diagnóstico de EHNA. La media de seguimiento fue corta, de 3.8 años. A pesar de que 8 pacientes ya tenían cirrosis al momento del diagnóstico, solo uno desarrollo descompensación hepática. Esto se puede explicar por el periodo de seguimiento tan corto. En 13 pacientes, las biopsias de seguimiento se realizaron en un periodo de una media de 3.5 años; cinco pacientes tuvieron progresión de la fibrosis y de éstos dos desarrollaron cirrosis. En un estudio más grande, en donde se realizó el seguimiento a pacientes con confirmación histológica de varios espectros de EGHNA, Matteoni y cols. [63] confirmaron la naturaleza progresiva de la EHNA y la naturaleza benigna de la esteatosis simple. En este estudio, los investigadores dividieron a los pacientes en cuatro subtipos histológicos. Tipo 1 y 2 con esteatosis simple e inflamación inespecífica y leve respectivamente. Tipos 3 y 4 aquellos que tenían EHNA. Aquellos que tenían EHNA comparados con los que tenían otro tipo de EGHNA, fueron más propensos a desarrollar cirrosis (25%) o murieron de alguna causa relacionada al hígado (11%) durante la media de seguimiento que fue de más de 8 años. Los hallazgos preocupantes en este estudio fueron que las muertes relacionadas a enfermedad hepática fueron la segunda causa de muerte en esta población, casi comparables a las muertes por riesgo cardiovascular y las muertes relacionadas a cáncer. Un estudio publicado de la Clínica Mayo trató de abordar el desenlace clínico de la EGHNA en una comunidad no hospitalaria [78] . El diagnóstico de EGHNA fue



confirmado por estudio de imagen o biopsia. La supervivencia de la cohorte con EGNA fue significativamente menor que la población en general. El desarrollo de cirrosis se asoció con una más alta mortalidad, sugiriendo tal vez un incremento en la mortalidad en la cohorte con EGNA se pueda explicar por un mayor número de muertes ocasionadas por enfermedades relacionadas al hígado. Matteoni y cols. [63] tuvieron similares hallazgos, siendo la cirrosis la tercera causa de muerte en este estudio después de las muertes cardiovasculares y cáncer. La morbilidad relacionada a enfermedad hepática fue de 5% y la mortalidad del 1.7% durante un periodo de seguimiento de 7 años en este estudio.

Una vez que la cirrosis se desarrolla en los pacientes que tienen EHNA, el pronóstico se altera significativamente. Ratzu y cols. [79] encontraron que el curso clínico de los pacientes en los que se sospechó cirrosis ocasionada por EHNA era similar a un grupo de pacientes pareado que tenían cirrosis por virus C. En este estudio, los pacientes se consideraban con cirrosis por EHNA si ellos tenían el diagnóstico de cirrosis criptogénica y eran obesos. El tamaño de la muestra de los casos de cirrosis aparentemente por EHNA era pequeño y queda poco claro si los resultados de éste estudio refleja un estadio de enfermedad hepática más avanzada, ya que los pacientes de este estudio con cirrosis relacionada a EHNA eran mayores en edad a los pacientes con los que se parearon que tenían cirrosis por virus de hepatitis C. En otro estudio con cirrosis por EHNA confirmada, cerca del 40% de los pacientes con cirrosis por EHNA desarrollaron complicaciones de la cirrosis después de una mediana de seguimiento de 5 años [80]. Comparado con el grupo pareado de los pacientes que no habían sido tratados y los tratados para infección por virus C, el grupo que tenía cirrosis relacionada a EHNA tenía tasas de supervivencia libre de complicaciones

similares. Más significativo, no hubo diferencias en las tasas de muerte relacionadas a enfermedad hepática o trasplante entre aquellos que tenían cirrosis por EHNA y los que tenían cirrosis por virus de hepatitis C. Cinco pacientes (22%) murieron de falla hepática en este estudio. Entre los 21 pacientes que tenían cirrosis relacionada a EHNA, Adam y cols. [78] reportaron complicaciones de la cirrosis en un 62% durante una mediana de seguimiento de aproximadamente 7 años. La mortalidad relacionada a enfermedad hepática en los pacientes con cirrosis fue marcadamente alta, alrededor del 33% durante ese periodo de seguimiento. Las tasas elevadas de morbilidad y mortalidad relacionada a enfermedades hepáticas en este estudio, comparadas con las del estudio de Hui y col[80] puede ser el resultado de la diferencia en el tiempo de seguimiento y por las diferencias del estadio de la enfermedad hepática al momento del inicio del estudio. Sin embargo, estos estudios resaltan el hecho de que una vez que la cirrosis se establece en los pacientes con EHNA, el pronóstico es pobre y parece que no existe diferencia comparado con aquellos pacientes que tienen cirrosis por infección crónica por el virus de la hepatitis C.

Hablar acerca del tema de hepatocarcinoma (HCC) en los pacientes con EGHNA es importante. La asociación entre HCC y EGHNA se describió por primera vez en reportes de casos en donde se describía el desarrollo de HCC en pacientes con EGHNA y se les realizó seguimiento a largo plazo [81]. Estudios transversales han evaluado la asociación entre la EHNA y HCC. Estos estudios utilizan el enlace entre EHNA y cirrosis criptogénica. Biopsias hepática seriadas en pacientes con EHNA muestran pérdida lenta de esteatosis como manifestación de progresión de EHNA a cirrosis, las cuales entonces pueden ser interpretadas como cirrosis criptogénica porque ya no se encuentran datos de esteatosis [82]. Además, varios estudios han mostrado que

pacientes que tienen cirrosis criptogénica se parecen más a los pacientes que tienen EHNA que a aquellos que tienen cirrosis por virus de hepatitis C [83].

Bugianesi y cols. reportaron que los pacientes que tenían HCC asociado a cirrosis criptogénica eran más similares a aquellos pacientes con EHNA que a los que tenían HCC secundario a cirrosis por ingesta de alcohol o infección viral [84]. Ratziu y cols. notaron una frecuencia similar de HCC en sujetos obesos que tenían cirrosis criptogénica comparada con aquellos pacientes que tenían cirrosis por virus de hepatitis C [79]. En una cohorte más grande de pacientes con HCC, la cirrosis criptogénica era la segunda causa de HCC. Marrero y cols. describieron que al menos la mitad de los pacientes que tenían cirrosis criptogénica en esta cohorte tenían hallazgos clínicos e histológicos de EHNA y estimaron que la EHNA era la causante de al menos el 13% de todas las causas de HCC en esta cohorte. Estos estudios sugieren que el HCC es parte del espectro de la EGHNA que ocurre en pacientes con cirrosis [85]. Estos datos son consistentes con los datos que mostraron el incremento en el riesgo de HCC en pacientes que son obesos o diabéticos, ambos con factores de riesgo bien establecidos para el desarrollo de EHNA [86]. Por lo tanto, es sorprendente que un estudio longitudinal de Australia encontró que no se desarrolló HCC en 23 pacientes con cirrosis relacionada a EHNA después de una mediana de seguimiento de 5 años [80]. En otro estudio que se realizó en los Estados Unidos, el 10% de los pacientes que tenían cirrosis relacionada a EHNA desarrollaron HCC en una mediana de seguimiento de 7 años [78]. Este estudio tiene una duración un poco mayor de seguimiento que la cohorte de Australia. Los investigadores también notaron que a pesar de que los datos no se mostraron, sus pacientes tenían evidencia por laboratorio de enfermedad más avanzada que los pacientes de la cohorte australiana, indicado por niveles de albumina

y de plaquetas más bajas y niveles de bilirrubinas más altos. Como resultado de estos estudios, es resaltable que el HCC se desarrolla en pacientes que tienen cirrosis relacionada a EHNA, a pesar de que no se ha determinado el riesgo carcinogénico exacto. En los pacientes que tienen EGHNA con progresión a cirrosis, se debe de realizar escrutinio para búsqueda de HCC, como se realiza en los pacientes con cirrosis por otras etiologías.

Así como en las demás formas de enfermedad hepática terminal, la que se origina por EGHNA es mejor manejada con trasplante hepático. La supervivencia post trasplante en pacientes con cirrosis por EGHNA parece ser similar a los trasplantados por otras causas de hepatopatía crónica [87, 88]. Más importante aún, la recurrencia de esteatosis hepática y EHNA después del trasplante hepático ocurre y puede ser tan severo para ocasionar pérdida el injerto [88].

## MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE FIBROSIS EN EGHNA

### *Biopsia vs marcadores no invasivos*

La biopsia hepática es actualmente el estándar de oro para la evaluación de la fibrosis, esta nos provee además información directa acerca de la inflamación, grado de fibrosis, esteatosis, depósitos de hierro y otros hallazgos. Sin embargo, la biopsia hepática tiene ciertas limitaciones, incluyendo los costos, las complicaciones, la variabilidad del observador y las variaciones de la muestra, así como la técnica de obtención de la muestra por el médico gastroenterólogo.

Realizar una biopsia hepática para estratificar el grado de fibrosis tiene sus beneficios, como confirmar la etiología de la hepatopatía, evaluar los co-factores potenciales como la esteatosis hepática, el hierro hepatocelular y la actividad necro inflamatoria. La biopsia hepática también examina la extensión de la distorsión de la arquitectura asociada a la fibrosis. Sin embargo, la biopsia hepática es un procedimiento invasivo con riesgo de dolor, sangrado o perforación (1/1000) y raramente causa de muerte (1/10 000) [89]. Además, la biopsia hepática es costosa, inconveniente y no está ampliamente accesible.

Los factores que mejoran la exactitud diagnóstica de la biopsia hepática incluyen técnicas cuantitativas, la presencia de una enfermedad uniforme hepática, pases múltiples con una aguja de tru-cut (15 gauge) y una biopsia igual o mayor a 2 cms de largo (logrando una exactitud del 75%) [90, 91]. La estatificación de Brunt, se utiliza para la evaluación morfológica de la EGHNA. En este sistema de estatificación, la evaluación de la fibrosis es subjetiva con una variabilidad intra e inter-observador alta

(0.68-0.85 y 0.84 respectivamente)[92], y resulta difícil comparar los resultados entre estudios distintos utilizando este sistema. Estudios de biopsias hepáticas han mostrado falla en el estadiaje de fibrosis que va desde el 22- al 37% de los casos de pacientes con biopsias con EGHNA [93]. En el estudio realizado por Ratziu y cols en 51 pacientes a los cuales se les realizaron dos tomas de biopsias, encontraron una gran variabilidad en el resultado de las biopsias. El acuerdo entre las biopsias fue moderada para la mayoría de las características, incluyendo balonización de los hepatocitos y fibrosis perisinusoidal, mientras que, para otros parámetros como los cuerpos acidófilos, inflamación lobular o los cuerpos de Mallory, la similitud entre las muestras fue pobre. A pesar de que la concordancia de los resultados entre las dos muestras fue mayor para la fibrosis que para el grado de inflamación o el daño hepático, el estadiaje de EGHNA también fue considerablemente influenciado por el error de muestreo. Hubo un 41% de tasa de discordancia en al menos un estadio entre las dos muestras. En 6 de 17 pacientes con puentes de fibrosis (33%) en una muestra, tenían solamente fibrosis leve o sin fibrosis en la otra muestra que se obtuvo [92]. Esta discordancia puede resultar en implicaciones clínicas en cuanto al manejo de los pacientes con EHNA y la relación del desarrollo de fibrosis y la progresión a las complicaciones propias de la evolución de la enfermedad.

A pesar de esta limitaciones de exactitud, la biopsia hepática continua siendo el estándar de oro al cual los nuevos métodos no invasivos se desarrollan y se comparan. Se debe de recordar que a pesar de la variabilidad que se puede encontrar en la biopsia, comparada con el método no invasivo diagnóstico más confiable, no se puede replicar perfectamente los hallazgos de la biopsia. Se ha estimado que incluso si la

biopsia obtiene una sensibilidad y especificidad del 90%, un biomarcador solamente obtener una máxima AUROC de 0.90 [94].

### **Indicaciones de toma de biopsia hepática en EGHNA**

Una ventaja significativa de tomar una biopsia hepática en un paciente en el que clínicamente se sospecha EGHNA o EHNA es tener la confirmación (o excluir) el diagnóstico. En una revisión de 354 biopsias hepáticas que fueron tomadas por elevación inexplicable de los niveles de pruebas de funcionamiento hepático, Skelly y cols. documentaron que el 66% de estas muestras tenían hallazgos de hígado graso, y el 50% de ellos, tenían esteatohepatitis con distintos grados de fibrosis [95]. Por el contrario, el 12.7% tenían hallazgos histológicos de enfermedades diagnosticables por marcadores serológicos o clínicos incluyendo cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune y hemocromatosis hereditaria; todos estos diagnósticos fueron confirmados durante el seguimiento de los pacientes. Los investigadores también notaron que el 9% de las biopsias mostraban evidencia de enfermedad hepática criptogénica, mientras que el 5.9% de las biopsias mostraban una histología normal. Por lo tanto, una tercera parte de los pacientes que fueron biopsiados tenían algún otro diagnóstico más que solo EGHNA.

Otro escenario clínico es la presencia de más de una enfermedad hepática. Una serie grande de biopsias documentó que más del 5% de los pacientes con diagnóstico serológico de alguna hepatopatía, como hepatitis crónica por virus C, hepatitis autoinmune o cirrosis biliar primaria, tenían evidencia histológica de esteatohepatitis concomitante [96].

Estudios en pacientes con obesidad mórbida que son sometidos a cirugía bariátrica también han mostrado la utilidad y el beneficio de la toma de biopsia hepática. La esteatohepatitis y cirrosis se ha documentado hasta en un 25% y en un 1-3% de estos pacientes respectivamente [97] y usualmente son hallazgos incidentales. Más interesante es que series de más de 100 pacientes sometidos a cirugía bariátrica, muestren que los cirujanos son incapaces de que por observación directa del hígado sospechen estas condiciones que se diagnostican por biopsia [98]. El desarrollo de sistemas de probabilidad predictiva para el diagnóstico de fibrosis, constituye una herramienta muy importante para considerar que pacientes podrían ser candidatos a toma de biopsia [99].

### **Marcadores no invasivos predictores de fibrosis en EGHNA**

Las variables clínica y biológicas más frecuentemente asociadas con una fibrosis avanzada en EGHNA son : edad avanzada, índice de masa corporal (IMC) elevado, presencia de diabetes mellitus, presencia de síndrome metabólico, incremento en la hemostasia de la resistencia a la insulina (HOMA-IR), incremento del radio AST/ALT, disminución de la cuenta plaquetaria y la cantidad de ácido hialurónico [100].

Comparado con otras hepatopatías, solamente se han evaluado un número limitado de marcadores séricos para predecir el grado de fibrosis en pacientes con EGHNA. Estos marcadores se han validado contra el actual estándar de oro que es la biopsia hepática, utilizando, como expresión de efectividad, el área bajo la curva (AUROC) [101] , que traza la sensibilidad sobre 1- especificidad, con valores óptimos más cercanos a 1. Los rendimientos diagnósticos de la mayoría de los índices propuestos se



pueden observar en la tabla 5.

**Tabla 5. Rendimientos de los distintos marcadores no invasivos en EGHNA**

Método diagnóstico	Tamaño de la cohorte usada en los estudios/ comentarios	Popularidad
<b>ELF test + marcadores simples</b>	Estudio de validación que incluyó 196 pacientes con EGHNA. Con AUROCs de 0.84, 0.93 y 0.98 para detectar no fibrosis, fibrosis moderada y fibrosis severa respectivamente	Uso limitado principalmente a centros de hígado especializados.
<b>FibroMeter</b>	Estudio de 235 pacientes con EGHNA demostró una AUROCs de 0.943 para fibrosis significativa, 0.937 para fibrosis severa y 0.904 para cirrosis. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para el diagnóstico de fibrosis significativa fueron de 79%, 96%, 88% y 92% respectivamente.	Uso limitado principalmente a centros de hígado especializados.
<b>Fibroscan</b>	El estudio más largo incluye 246 pacientes con EGHNA, con AUROCs de 0.84, 0.93 y 0.95 para el diagnóstico de fibrosis $\geq$ F2, $\geq$ F3, y F4 respectivamente. Meta-análisis en herramientas no invasivas en EGHNA ha mostrado curvas acumuladas, sensibilidad y especificidad de 0.94, 0.94 y 0.95.	Uso limitado principalmente a centros de hígado especializados, equipo caro.
<b>FibroTest</b>	Meta-análisis incluye 267 pacientes con EGHNA demostrando medias de AUROC de 0.84 para detectar fibrosis avanzada.	Uso limitado principalmente a centros de hígado especializados.
<b>NAFLD score</b>	El estudio de validación incluyó un total de 773 pacientes con biopsia concordante con EGHNA: 480 pacientes en el grupo de estimación y 253 en el grupo de validación; se obtuvieron VPPs de 90% y 82% para predecir fibrosis avanzada y VPNs de 93% y 88% para excluir fibrosis avanzada en los grupos de estimación y validación respectivamente. Para el diagnóstico de fibrosis avanzada, AUROC de 0.768 se demostró en un estudio con 541 pacientes, una AUROC de 0.81 en un estudio con 145 pacientes con EGHNA. En otro estudio con 235 pacientes, la AUROC fue de 0.884 para fibrosis significativa, 0.932 para fibrosis severa y 0.902 para cirrosis. Se demostró la misma eficacia en estudios asiáticos y en cohortes de pacientes obesos mórbidos.	Ampliamente usado en la práctica médica básica. Si accesibilidad de incremento debido a la disponibilidad en internet de calculadores. Se recomienda su uso para excluir fibrosis avanzada.
<b>FIB-4</b>	Un estudio de 541 pacientes con EGHNA demostró una AUROC de 0.802, con un VPP del 80% y un VPN del 90% para el diagnóstico de fibrosis avanzada. Otro estudio con 145 pacientes mostro una AUROC de 0.86, una sensibilidad del 85%, especificidad del 65% y un VPN del 95%.	Se recomienda su uso para excluir fibrosis avanzada.
<b>APRI</b>	Un estudio con 235 pacientes con EGHNA mostro AUROCs de 0.866 para fibrosis significativa, 0.861 para fibrosis severa y 0.842 para cirrosis. AUROC de 0.73 para fibrosis avanzada en un estudio de 541 pacientes con EGHNA, y 0.67 en otro estudio de 145 pacientes.	Fue desarrollado para su uso en infección por VHC. No es específico para EGHNA.
<b>AST/ALT</b>	Utilizando un valor de corte de 0.8, un estudio con 145 pacientes con EGHNA demostró una AUROC de 0.83, sensibilidad del 74%, especificidad del 78% y VPN del 93% para el diagnóstico de fibrosis avanzada. AUROC de 0.74 para fibrosis avanzada en otro estudio con 541 pacientes con EGHNA.	Fácil para calcular. También es un componente de otros sistemas de evaluación de fibrosis como el NAFLD score y el BARD. Su uso se recomienda para la exclusión de fibrosis avanzada.
<b>BARD</b>	El estudio original incluyó un total de 827 paciente con EGHNA encontrando un VPN del 95% para excluir fibrosis avanzada. Una AUROC de 0.70 para fibrosis avanzada en otro estudio con 541 pacientes con EGHNA. Otro estudio con 145 pacientes mostro una AUROC de 0.77, con una sensibilidad del 89%, especificidad 44%, VPN del 95% y VPP del 25%.	Método sencillo para utilizar en la práctica médica rutinaria. Su uso se recomienda para la exclusión de fibrosis avanzada.

**Los biomarcadores:**

Los biomarcadores de fibrosis se dividen típicamente en marcadores directos e indirectos de fibrogénesis y fibrinólisis (Tabla 6). Los marcadores indirectos incluyen las pruebas de funcionamiento hepático (aminotransferasas), medidas indirectas de hipertensión portal como la cuenta plaquetaria o medidas de deterioro de síntesis como la albumina o tiempo de protrombina [102]. Los marcadores directos están más directamente involucrados en la patogénesis molecular de la fibrogénesis y fibrinólisis. Estos incluyen niveles séricos de las metaloproteinasas de la matriz y el ácido hialurónico, citocinas pro inflamatorias y citocinas pro-fibróticas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y el factor de crecimiento beta (TGF $\beta$ )[103].

**Tabla 6. Biomarcadores de fibrosis hepática**

<b>Marcadores indirectos</b>	
•Pruebas de funcionamiento hepático	ALT, AST, GGT, bilirrubina, albumina
•Variables hematológicas	Cuenta de plaquetas, tiempo de protrombina Globulinas, glucosa, insulina, apolipoproteína, col esterol, haptoglobina
•Otros	
<b>Marcadores directos</b>	
•Colágena y moléculas y enzimas de MEC	Péptido N-terminal de pro- colágena, hialuronato, colagena tipo IV, laminina, fibronectina, YKL-40, TIMP-1, TIMP- 2, MMP2, MMP-6
•Citocinas	TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , angiotensina-II
•Marcadores proteómicos	Proteína de union galectina-3, proteína 4 asociada a microfibril, tropomiosina
•Marcadores genéticos	Polimorfismos sencillos nucleares de AZIN1, TLR4, TRPM5, AQP2, STXBP5L

Un biomarcador ideal no invasivo de fibrosis hepática debe de contar con los siguientes requerimientos:

- Ser específicos para el hígado;
- Ser fácil de elaborar en cualquier laboratorio;

- Deben de reflejar el estadio de la fibrosis;
- Deben de ser costo/efectivo;
- Deben de estar estandarizados entre laboratorio;
- Los resultados deben de ser independientes y sin asociación al grado de inflamación.

Por lo tanto, es importante realizar estudios clínicos en los diferentes grupos de pacientes con fibrosis hepática de diferentes etiologías dentro de éstas la EGHNA. Diversos biomarcadores previamente mencionados se han evaluado su sensibilidad y especificidad para diagnosticar fibrosis utilizando AUROC:

1. **Apolipoproteína A1:** ésta es la mayor proteína encontrada en las lipoproteínas de alta densidad. Las concentraciones plasmáticas se asocian negativamente a la fibrosis [104]. Los sitios de degradación del tejido son probablemente el hígado y el riñón. Las anomalías en la concentración de apolipoproteína sérica A1 son ocasionadas por la dieta, el consumo de alcohol y otras drogas, y por trastornos metabólicos, hormonales e infecciosos.
2. **Haptoglobina:** Es una proteína que se une a la hemoglobina libre en el plasma. Las concentraciones de haptoglobinas se incrementa como marcador de respuesta de fase aguda y en el síndrome nefrótico, pero se ha asociado negativamente con la fibrosis [105].
3.  **$\alpha$ -2-macroglobulina:** Es un inhibidor de proteasa intravascular, se sintetiza en los hepatocitos y en las células hepáticas estelares, que su función es inhibir el

catabolismo de las proteínas de la matriz. Los valores de ésta correlacionan positivamente con los grados de fibrosis [106].

4. **Ácido hialurónico:** Es un mucopolisacárido presente principalmente en las articulaciones y en algunos otros tejidos, el cual es degradado por la enzima hialuronidasa. Los niveles séricos de ácido hialurónico se incrementan en la enfermedad hepática crónica por la síntesis de éste mucopolisacárido por los fibroblastos y las células estelares. Un nivel de hialuronato  $< 60\mu\text{g/L}$  excluye cirrosis y fibrosis significativa con valores predictivos positivos y negativos de 99% y 93% respectivamente [107].
5. **Proteínas de colágena:** Los niveles séricos de los péptidos de pro-colágena y la colágena tipo I, III y tipo IV se encuentran incrementadas en enfermedades del tejido conectivo y en la fibrosis hepática [108]. El metabolito de la colágena, la laminina, es uno de los principales componentes de la membrana basal. Los niveles séricos elevados de laminina se han reportado en los pacientes con enfermedad hepática alcohólica [109].
6. **Relación ALT/AST:** Esta relación se encuentra incrementada con el avance de la progresión de la enfermedad hepática, probablemente relacionada con la alteración del aclaramiento de AST por las células sinusoidales hepáticas. Un ratio mayor a uno tiene una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de cirrosis, y cuando se compara con la cuenta de plaquetas en pacientes con hepatitis C, solo algunos quedan sin clasificar [110]. Esta relación también se ha utilizado para separar EHNA de la EHA, cuando los valores son menores a 1 sugieren EHNA y valores  $\geq 2$  sugieren EHA [111].

Se han desarrollado múltiples modalidades de sistemas y marcadores para el estudio de la forma menos invasiva para el diagnóstico de fibrosis en EGHNA:

a) Biomarcadores de fibrosis:

El original **ELF** (European Liver Fibrosis) es un panel de exámenes de inmunoensayos para detectar tres marcadores séricos del recambio de la matriz extracelular: ácido hialurónico (AH), inhibidor tisular de metaloproteinasas (ITMP), y péptido amino terminal de pro-colágeno III (P3NP), usado en combinación con edad [103]. El panel ELF simplificado excluye la edad, pero tiene una exactitud diagnóstica similar. La adición de cinco marcadores sencillos (IMC, presencia de DM o intolerancia a carbohidratos, relación AST/ALT, plaquetas y albumina) a la prueba de ELF mejora más aún la exactitud diagnóstica con AUROCs de 0.98, 0.93 y 0.84 para el diagnóstico de fibrosis severa, fibrosis moderada y no fibrosis respectivamente [112]. El panel ELF también puede representar una herramienta útil para el pronóstico, ya que con el cambio de una unidad en el puntaje de ELF, se ha visto una asociación con el incremento del riesgo a lo doble de desarrollar morbilidad y mortalidad relacionada a enfermedad hepática en el seguimiento a seis años [113].

El **FibroTest** es otro marcador validado para la evaluación cuantitativa de la fibrosis en EGHNA, EHA y hepatitis crónica viral. La combinación de cinco marcadores bioquímicos como la haptoglobina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, apolipoproteína A1, la bilirrubina total y los niveles de GGT, corregidos para la edad y género, obtiene una media estandarizada de AUROC de 0.84 para fibrosis avanzada en EGHNA en un meta-análisis para FibroTest. El valor diagnóstico se encontró que es similar para el diagnóstico de los extremos de la fibrosis, sin una diferencia significativa entre las

AUROC de los estadios intermedios F2 vs F1 en comparación con los extremos F3 vs F4 o F1 vs F0 [114]. El FibroTest también se puede combinar con otros dos paneles: el SteatoTest y el NASH Test para conformar el panel FibroMax , que provee un estimación completa y simultánea del daño hepático en EGHNA [114]. FibroTest/FibroMax ahora se han adoptado ampliamente como una alternativa no invasiva a la biopsia hepática [115].

Otros biomarcadores potenciales incluyen el dominio 7S de la colágena tipo IV y el ácido hialurónico. En una cohorte de 112 pacientes con EGHNA, estos dos biomarcadores fueron capaces de excluir fibrosis avanzada con una AUROC de 0.83 y 0.80 y VPN de 84 y 78% respectivamente. Estos biomarcadores también mostraron VPP de 86% y 92% y AUROCs de 0.83 y 0.80 para discriminar EHNA de esteatosis simple [116]. EN una corte de 72 pacientes, la AUROC para el dominio 7S de la colágena IV y el AH fueron de 0.767 y 0.754 respectivamente para la detección de fibrosis avanzada en EHNA. Sin embargo, después del análisis de regresión múltiple, solamente el dominio 7S de la colágena IV fue independientemente asociado con fibrosis avanzada en este estudio [117]. Otros estudios de AH en EGHNA utilizando distintos valores de corte han demostrado AUROCs entre 0.89 y 0.97 para la detección de fibrosis avanzada [118-120]. Kaneda y cols. Demostraron que el AH tiene una AUROC, VPN, sensibilidad y especificidad de 0.97, 100%, 100% y 89% respectivamente para la detección de fibrosis severa, con una AUROC más baja de 0.87 demostrada para la colágena tipo IV. En este estudio, la cuenta de plaquetas aislada fue un predictor independiente de cirrosis, con una AUROC de 0.98, y una sensibilidad y especificidad, VPP y VPN de 100%, 95%, 76% y 100% respectivamente utilizando un valor de corte de  $16 \times 10^4/\mu\text{L}$  [119]. Lesmana y cols. también demostraron la utilidad de los niveles de AH y de colágena IV para

diferenciar entre fibrosis leve y avanzada [121], y en un estudio separado de 80 pacientes con EGHNA la combinación de AH con AST, AAR, edad, género e IMC demostró una AUROC de 0.763 para distinguir esteatosis simple de EHNA [122].

En otro pequeño estudio de los componentes de la matriz extracelular de 30 pacientes con EGHNA, la laminina sérica > 282 ng/ml mostró una exactitud del 87%, sensibilidad del 82%, especificidad del 89%, VPP del 82% y VPN del 89% para identificar la presencia de EHNA con fibrosis. Cuando se combina con la colágena tipo IV, ambas especificidades y VPP se incrementan hasta el 100%, pero con una sensibilidad más baja y un VPN del 64% y 83% respectivamente [123].

b) Evaluación radiológica:

A pesar de que muchas modalidades radiológicas se han evaluado en EGHNA, estos se concentran en cuantificar la cantidad de grasa hepática, con dificultades para tener una valoración confiable y distinguir entre simplemente esteatosis, de esteatohepatitis o fibrosis [124].

c) Elastografía transitoria (Fibroscan):

El fibroscan es un método no invasivo para evaluar la fibrosis hepática que se puede realizar en la cama del paciente o en pacientes de forma ambulatoria. Se utiliza tecnología basada en ultrasonido para medir la dureza hepática (LMS) y se ha validado para hepatopatías crónicas como virus C, VIH/VHC y enfermedad colestásica [125]. Puede existir falla para obtener lectura en el 5% de los pacientes, lo cual es más común en pacientes obesos, lo que lleva muchas limitaciones para la evaluación de pacientes con EGHNA ya que la mayoría son obesos. Sin embargo, para disminuir las

probabilidades de falla de la lectura, recientemente se ha introducido una sonda XL para este grupo de pacientes y mejorar los resultados de la lectura [126]. A pesar de que el uso de Fibroscan en pacientes con EGHNA se ha validado en menor proporción comparado con las otras hepatopatías crónicas, recientemente se demostró en un estudio japonés con 97 pacientes con EGHNA niveles elevados de dureza hepática por fibroscan que tenían fibrosis diagnosticada por histología, en donde las AUROCs para el diagnóstico de fibrosis significativa, fibrosis severa y cirrosis fueron de 0.88, 0.91 y 0.99 respectivamente [127]. Un estudio más grande que incluyó 246 pacientes con EGHNA demostró unas AUROCs para el diagnóstico de fibrosis moderada ( $\geq F2$ ), puentes de fibrosis ( $\geq F3$ ) o cirrosis (F4) de 0.84, 0.93 y 0.95 respectivamente [128]. En este estudio, los mejores valores de corte de LMS para predecir  $F \geq 2$ ,  $F \geq 3$  y F4 fueron de 7 kPa, 8.7 kPa y 10.3 kPa respectivamente. Los valores de corte de 5.8 kPa y 9 kPa, y 7.9 kPa y 9.6 kPa tienen  $>Z$  90% de sensibilidad y especificidad para descartar y diagnosticar F2 y F3 respectivamente. El valor de corte de 10.3 kPa para F4 tiene una sensibilidad del 92% y una especificidad del 88%. En este estudio, si la biopsia hepática solo hubiera estado indicada para aquellos pacientes con  $LMS \geq 8.7$  kPa, el 32% requeriría la biopsia, lo que solamente abarcaría el 4.8% de los pacientes con F3 y 0.6% de los pacientes con cirrosis. Sin embargo, si la biopsia fuera realizada solo en los pacientes con mediciones entre 7.9 y 9.6 kPa, solamente 16% de los pacientes requerirían biopsia [128]. Se realizó un meta análisis de los marcadores no invasivos de fibrosis en EGHNA y el fibroscan mostró AUROCs, sensibilidad y especificidad de 0.94 (0.90-0.99), 0.94 (0.88-0.99) y 0.95 (0.89-0.99) respectivamente [129]. A pesar de que se necesitan más estudios para la validación del fibroscan en EGHNA, éste



representa un herramienta útil y rápida para la evolución de la fibrosis hepática y determinar que pacientes necesitan la toma de biopsia.

Una elastografía magnética equivalente al Fibroscan ha demostrado recientemente exactitud diagnóstica con una sensibilidad y especificidad del 98% y 99% respectivamente para todos los grados de fibrosis [130]. La elastografía magnética también se ha asociado con mayor rendimiento diagnóstico que la elastografía por USG [131], y la dureza hepática no parece verse afectada por la esteatosis utilizando este medio diagnóstico [130]. Sin embargo, la elastografía por resonancia magnética continúa siendo una técnica experimental.

La combinación de la elastografía de transición con uno o más de los paneles séricos descritos previamente representan un abordaje potencial para la medición de fibrosis por métodos no invasivos en EGHNA [132].

d) Marcadores genéticos:

Los estudios de expresión de genes hepáticos proveen un punto de vista hacia los posibles mecanismos de la patogénesis así como biomarcadores potenciales de la enfermedad. EL uso de tejido hepático en los estudio de expresión de estos genes niega la naturaleza no invasiva. Sin embargo, los datos de la expresión de genes pueden identificar a los marcadores candidatos medibles en suero, convirtiéndolo así, en una herramienta poderosa en el desarrollo de marcadores no invasivos. Los experimentos se pueden enfocar en marcadores genéticos específicos. Younossi y cols. [133] utilizaron un set de cDNA personalizado que contenía 5220 genes, para investigar los genes hepáticos de expresión diferenciales en EHNA. Ellos encontraron un total de 34 genes expresados diferentes cuando comparaban EHNA con los

controles, 19 de los cuales se demostró que no están ocasionado por la obesidad. Cuatro de estos cambios en los genes se confirmaron por PCR. Sreekumar y cols. [134] compararon la expresión de genes de pacientes con cirrosis por EHNA con otras causas de cirrosis. Ellos encontraron 16 genes que mostraron diferencias en la expresión genética en los pacientes del grupo de cirrosis asociada a EHNA. Varios genes que están involucrados en la respuesta antioxidante se encontraron no expresados, junto con los genes que están involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa. En este estudio se investigaron alrededor de 6000 genes. Todos estos estudios de expresión genética resaltan muchos mecanismos potenciales de la enfermedad, cada uno añadiendo una pieza a la complejidad de la patogenia de la EGHNA. Además, estos estudios revelan algunos mecanismos de marcadores no invasivos. Todos ellos, sin embargo, comparten ciertas limitaciones, principalmente el tamaño de la muestra.

e) Factores demográficos y estudios séricos sencillos:

Algunos paneles diagnósticos se han desarrollado para facilitar la evaluación no invasiva de la EGHNA y la diferenciación entre los múltiples estadios de la enfermedad. Éstos están generalmente basados en un número de medidas de laboratorio, usualmente en combinación con parámetros clínicos como la edad, el sexo y el IMC. Dichos sistemas de evaluación, han demostrado tener una gran utilidad en la detección de fibrosis avanzada comparada con estadios de fibrosis intermedia y tempranos, lo que clínicamente tiene mayor relevancia ya que este es el grupo que se encuentra más susceptible de beneficio a medidas terapéuticas[132].

Es sistema **BARD** es una sistema de evaluación sencillo, diseñado para identificar pacientes con EGHNA que se encuentran en bajo riesgo de tener enfermedad

avanzada. Este sistema combina tres variables: IMC, relación AST/ALT (AAR) y la presencia de diabetes. A todas estas variables se les asigna un valor (IMC  $\geq 28 = 1$  punto; AAR  $\geq 0.8 = 2$  puntos; DM = 1 punto), para generar una escala que va del 0 al 4. En el estudio original, un puntaje de 2 – 4, se asoció a una razón de momios para fibrosis avanzada de 17 u un valor predictivo negativo del 96% [135]. Un estudio posterior del sistema BARD en 138 pacientes con EGHNA evaluado con biopsia, mostró un área bajo la curva de 0.67 (95% CI, 0.56-0.77), con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de 51%, 77%, 45% y 81% respectivamente [136]. En un estudio reciente realizado por McPherson y col, en donde se incluyeron un total de 145 pacientes con diagnóstico de EGHNA por biopsia, se comparó el rendimiento diagnóstico de cinco sistemas de evaluación de fibrosis no invasivos (BARD, NAFLD fibrosis, FIB-4, APRI, y la relación AST/ALT) para la identificación de fibrosis relacionada a EHNA[137]. En este estudio el sistema BARD demostró una AUROC de 0.77, con una sensibilidad del 89%, especificidad del 44%, VPN del 95% y VPP del 25%. Se ha intentado validar en distintas poblaciones, con VPN del 97% en un estudio en población polaca, pero ha mostrado menor VPN en otras poblaciones como la japonesa[138]. El sistema BARD es fácilmente calculado y representa una herramienta sencilla para excluir la presencia de fibrosis avanzada en pacientes con EGHNA.

El sistema **APRI** fue originalmente desarrollado para hepatitis C, pero su utilidad en EGHNA se ha estudiado por numerosos grupos. Utilizando este sistema, Cales y cols. demostraron una AUROC de 0.866 para fibrosis significativa, 0.861 para fibrosis severa y 0.842 para cirrosis en un estudio con 235 pacientes con EGHNA [139]. Sin embargo, valores más bajos fueron obtenidos en otros estudios, en donde se encontraron

AUROC de 0.564 para fibrosis significativa, 0.568 para fibrosis avanzada y 0.786 para predecir cirrosis [140, 141]. En el estudio de McPherson reportó una AUROC de 0.67 para el diagnóstico de fibrosis avanzada [137].

La **relación AST/ALT (AAR)** es calculada utilizando dos pruebas de laboratorio ampliamente utilizadas. Además de su utilidad como marcadores individuales de daño hepático, la AAR es también un componente de varios sistemas de evaluación de fibrosis incluyendo el sistema NAFLD Fibrosis y el BARD. A pesar de su simplicidad, utilizando un valor de corte de 0.8, McPherson y cols mostraron una AURON de 0.83, con una sensibilidad del 74%, una especificidad del 78% y un VPN del 93% para el diagnóstico de fibrosis avanzada en pacientes con EGHNA utilizando la AAR [137]. La red de investigación clínica de EHNA en los EU (NASH CRN) recientemente investigó la utilidad de las variables estudiadas tanto clínicas como bioquímicas para predecir la severidad de la EGHNA en más de 600 pacientes con biopsia hepática positiva para EGHNA. En este estudio, la combinación de AST, ALT séricos y la AAR mostraron solamente una AUROC de 0.59 para predecir esteatosis, pero ésta combinación fue capaz de predecir cirrosis con una AUROC de 0.81. Pero, al momento de agregar datos demográficos, comorbilidades y otros estudios de laboratorio, al AUROC fue de 0.79 para EHNA y de 0.96 para cirrosis [142].

El sistema **FIB-4** combina variables como edad con tres valores bioquímicos estándar: plaquetas, ALT y AST, para evaluar la fibrosis en pacientes con EGHNA. En pacientes con EGHNA, el sistema FIB-4 ha demostrado resultados similares a la AAR, utilizando un valor de corte de 1.3, con una AUROC de 0.86, sensibilidad del 85%, especificidad del 65% y un VPN del 95% para el diagnóstico de fibrosis avanzada [137]. En un estudio

en donde se compararon distintos sistemas de evaluación de fibrosis en 541 pacientes con EGHNA, el sistema FIB-4 obtuvo la mayor AUROC de 0.802, con un VPP y VPN de 80% y 90% respectivamente para el diagnóstico de fibrosis avanzada. En este mismo estudio, las AUROC para el sistema NAFLD Fibrosis, AAR, APRI y BARD fueron de 0.768, 0.742, 0.73 y 0.70 respectivamente [143].

El incremento de los niveles de gamma glutamiltranspeptidasa **GGT** sérica también ha mostrado tener una asociación con fibrosis avanzada en EGHNA. En un estudio de 50 pacientes con EGHNA se demostró una AUROC de 0.74 para la predicción de fibrosis avanzada. Utilizando un valor de corte de 96.5 U/L, los niveles de GGT predicen fibrosis avanzada con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 69%[144].

El **FibroMeter** es un panel de marcadores séricos que fue desarrollado originalmente para el estadiaje de fibrosis en pacientes con infección por virus C crónica[145]. Sin embargo, posteriormente se desarrolló el FibroMeter NAFLD y ha mostrado una exactitud diagnóstica adecuada para el estadiaje de la fibrosis en EGHNA. Este panel de marcadores combina siete variables: edad, peso, glucosa en ayuno, AST, ALT, niveles de ferritina y cuenta de plaquetas. En un estudio de 235 pacientes con EGHNA demostró AUROC de 0.943 para fibrosis significativa, 0.937 para fibrosis severa y 0.904 para cirrosis. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del FibroMeter para diagnóstico de fibrosis significativa son del 78.5%, 95.9%, 87.9% y 92.1% respectivamente [139].

El sistema **NAFLD fibrosis (NFS)** es un panel que contiene seis variables: edad, hiperglucemia, IMC, cuenta de plaquetas, albumina y el radio AST/ALT, el cual fue construido utilizando un panel de 733 biopsias con el diagnóstico de EGHNA de varios centros del mundo. Dos valores de corte fueron generados para predecir la

probabilidad de la presencia o ausencia de fibrosis avanzada respectivamente [102]. En el estudio original, aplicando el valor de corte más bajo (-1.455), el NFS obtuvo un VPN de 93% y de 88% en la estimación y validación de grupos para excluir la presencia de fibrosis avanzada. Aplicando el valor de corte más alto (0.676), se obtuvieron VPP de 90% y 82% en la estimación y validación de grupos respectivamente para predecir la presencia de fibrosis avanzada. La AUROC fue de 0.84, y la aplicación de éste modelo a la población en estudio puede evitar la realización de la biopsia hepática en el 75% de los pacientes, con una predicción correcta hasta del 90% [102]. En el reciente estudio realizado por McPherson y cols., el NFS demostró una AUROC de 0.81, con un VPN del 92% y un VPP del 72%, siendo éste VPP el más alto que se encontró de los cuatro sistemas evaluados en éste estudio [137]. Cales y cols., demostraron una AUROC del 0.884 para fibrosis significativa, 0.932 para fibrosis severa y 0.902 para cirrosis [139]. Estudios en Asia el este ha mostrado también una adecuada exactitud para el diagnóstico de fibrosis avanzada, con VPNs del 89% y 91% demostrado en poblaciones japonesas y chinas con EGHNA [138, 146]. El NFS también demostró exactitudes excelentes al excluir fibrosis en sujetos con obesidad mórbida con EGHNA que fueron sometidos a cirugía bariátrica, en donde VPNs del 98%, 87% y 88% para excluir fibrosis avanzada fueron demostrados [147]. En un reciente meta análisis, el NFS mostró AUROC agrupados, una sensibilidad y especificidad de 0.85 (0.80 -0.93), 0.90 (0.82-0.99) y 0.97 (0.94-0.99) para la identificación de EGHNA con fibrosis avanzada [129]. El NFS facilita la identificación de los pacientes con EGHNA con enfermedad más avanzada que por lo tanto, requiere un seguimiento más estrecho, y éste sistema de predicción de fibrosis, disminuye considerablemente la necesidad de la biopsia hepática en la mayoría de los pacientes [137].

De todos estos sistemas de evaluación de fibrosis en EGHNA, el sistema FIB-4 y el NAFLD fibrosis, son los dos sistemas que se han validado en más países y son los que han demostrado mayor superioridad en el diagnóstico de fibrosis avanzada comparado como los demás sistemas.

Podemos concluir, que a pesar de que la biopsia hepática continua siendo el estándar de oro para el diagnóstico y estadiaje de la fibrosis hepática en EGHNA, el desarrollo actual de sistemas de evaluación, paneles de biomarcadores, marcadores genéticos y modalidades de imagen diversas, han contribuido a identificar a los pacientes en riesgo de desarrollar complicaciones asociadas a la fibrosis sin la necesidad de realizar un procedimiento que es invasivo y tiene sus complicaciones como lo es la biopsia hepática.

## JUSTIFICACIÓN

Dado al incremento en la prevalencia de la EGHNA que ya se discutió previamente, es necesario estudiar las repercusiones y complicaciones de ésta enfermedad. Actualmente, el estándar de oro para evaluar y diagnosticar EGHNA y el grado de fibrosis e inflamación es la biopsia hepática. Como mencionamos previamente, la evolución natural de la enfermedad, puede llevar a los pacientes con EGHNA a desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma. Por lo tanto, la evaluación de estos pacientes mediante la biopsia hepática puede ser una herramienta útil, pero como todo método diagnóstico invasivo, se pueden desarrollar complicaciones, además de tener ciertas limitaciones que nos llevan a un error en la obtención de más muestras.

El realizar biopsia hepática en toda la población con EGHNA y EHNA no sería adecuado. Por tal motivo, los distintos estudios no invasivos se pueden utilizar como métodos confiables para diagnóstica o excluir fibrosis avanzada disminuyendo la necesidad de la realización de una biopsia hepática.

Algunos sistemas no invasivos basado en parámetros clínicos o de laboratorio se han propuesto para identificar aquellos pacientes que tienen fibrosis avanzada con EGHNA. Estos sistemas incluyen el sistema APRI, la relación AST/ALT, el sistema BARD, el sistema FIB-4 y el sistema NAFLD fibrosis.

Pero es necesario validar estos sistemas no invasivos de evaluación fibrosis en distintas poblaciones para ampliar su uso.

En nuestra población, no existen estudios comparativos entre los distintos sistemas y los resultados de fibrosis obtenidos en biopsias de pacientes con EGHNA.



## **OBJETIVO**

El objetivo de este estudio es comparar la eficacia diagnóstica de una serie de sistemas de evaluación no invasivos de fibrosis en pacientes con EGHNA en una cohorte de pacientes en quienes se realizó biopsia hepática por distintas indicaciones y se obtuvo el diagnóstico de EGHNA en la ciudad de México.

## **HIPÓTESIS**

Existe una adecuada concordancia entre los hallazgos de biopsias sin fibrosis y de biopsias con fibrosis avanzadas con los distintos sistemas no invasivos de fibrosis de biopsias con pacientes con enfermedad grasa hepática no alcohólica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Se obtuvo la información de las biopsias hepáticas realizadas en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Fundación Clínica Médica Sur, en la Ciudad de México, entre enero del 2005 a Diciembre del 2010. Se recabaron los resultados de pruebas de funcionamiento hepático y biometría hemática en un periodo de 3 meses de cercanía a la fecha del evento de la toma de biopsia, al igual que las medidas antropométricas (peso, talla, IMC) registradas en el expediente electrónico durante el internamiento hospitalario para la realización de la biopsia. También se recabó

información acerca de las comorbilidades registradas durante el interrogatorio de la historia clínica del día de la toma de la biopsia hepática.

### **Criterios de inclusión**

Se incluyeron aquellas biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de EGHNA, que contaran con biometría hemática completa y pruebas de funcionamiento hepático del día de la fecha de la toma de biopsia o de 3 meses cercanos al evento, además que contaran con registro en el expediente clínico de la talla, peso, IMC y comorbilidades.

### **Criterios de exclusión**

Se excluyeron aquellos pacientes en donde se documentó por histología o historia clínica otra hepatopatía asociada (cirrosis biliar primaria, infección crónica por virus de hepatitis B o C, hepatitis autoinmune, colangitis esclerosante, síndrome de sobreposición), evidencia de ingesta de alcohol de más de tres copas de cualquier tipo de bebida alcohólica a la semana, aquellos pacientes que no contaban con pruebas de funcionamiento hepáticas y/o biometría hemática de 3 meses cercanos a la toma de biopsia, pacientes sin registro de los datos antropométrico o las comorbilidades en el expediente clínico.

De los parámetros clínicos se obtuvieron la edad, el sexo, el peso, la talla, el índice de masa corporal (IMC), la existencia de intolerancia a carbohidratos y diabetes mellitus. El IMC se calculó con la siguientes fórmula:  $\text{peso (kg)} / \text{talla (m)}^2$ ; el diagnóstico de diabetes mellitus obtuvo si el pacientes se encontraba tomando hipoglucemiantes

orales, insulina o que el paciente se conociera con el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 reportado en el expediente clínico.

### **Tipo de estudio**

Es un estudio retrospectivo, transversal, analítico.

### **Técnicas analíticas**

Se obtuvieron los sistemas de marcadores no invasivos calculados con las siguientes formulas:

APRI:  $AST (IU/l) / (\text{el valor superior normal } 41(IU/l) / \text{número de plaquetas } (x10^9) \times 100$  [148]; el sistema FIB-4 se calculó:  $edad \times AST (IU/l) / \text{número de plaquetas } (x10^9) \times \sqrt{ALT (IU/l)}$  [149]; el sistema NAFLD fibrosis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $-1.675 + 0.037 \times edad \text{ (años)} + 0.094 \times IMC \text{ (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{glucosa anormal en ayuno o diabetes (si=1, no=0)} + 0.99 \times \text{radio AST/ALT} - 0.013 \times \text{número de plaquetas } (x10^9) - 0.66 \times \text{albumina (g/dl)}$  [102]; el sistema BARD se obtuvo de la sumatoria tres variables (IMC > 28 =1 pt, radio AST/ALT > 0.8= 2pt, diabetes = 1pt) [135].

### **Biopsias hepáticas**

Se obtuvieron biopsias hepáticas mediante distintos métodos, biopsia percutánea por aspiración con aguja fina, biopsia percutánea por tru-cut, biopsias quirúrgicas en cuña, biopsia quirúrgica por tru-cut y biopsia transyugular.

### **Tinciones**

Se realizaron las tinciones de hematoxilina & eosina y tricrómica de Masson de las biopsias como se describe a continuación:

Hematoxilina y Eosina de Mayer: se utilizaron las soluciones de hematoxilina de Mayer y la solución de eosina-floxina. Se realizó la desparafinación de las láminas y se hidrataron hasta llegar al agua. Las laminillas se tiñeron en la solución de hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Al terminar este periodo de tiempo, se lavaron con agua corriente por 15 minutos y se colocaron en agua destilada. Se colocó etanol al 80% por 2 minutos. Se realizó contraste en solución de eosina-floxina por 2 minutos. Se deshidrataron y se aclararon las laminillas por medio de dos cambios cada uno de 95% etanol, etanol absoluto y xileno por 2 minutos cada uno. Los núcleos de las células se tiñen de azul, el citoplasma y la mayoría de otros tejidos de rosado a rojo.

Tricrómica de Masson: se utilizó la solución fijadora de Bouin, la solución diaria de hematoxilina de hierro de Weigert, la solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich, la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico, la solución de azul de anilina. Se desparafinizaron las muestras y se hidrataron hasta llegar al agua destilada. Se fijaron con la solución de Bouin por una hora en el horno a 56°C. Posteriormente se lavaron con agua corriente hasta que las secciones se aclararan. Se enjuagaron con agua destilada. Se colorearon con la solución de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 minutos y se lavaron con agua corriente por 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada. Se diferenciaron con la solución de fucsina-ácida- esкарlata de Bierbrich durante 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Se contrastaron con la solución de azul de alanina durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se diferenciaron con ácido acético al 1% por 5 minutos. Se deshidrataron las muestras y se aclararon a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios cada uno por 2 minutos cada uno. Los núcleos se tiñen de negro, el citoplasma y la queratina de rojo y la colágena de azul.

Las biopsias fueron revisadas por dos patólogos expertos llegando a un consenso en los resultados.

El diagnóstico de enfermedad grasa hepática no alcohólica por histología se determinaron los criterios previamente descritos como la esteatosis, la balonización de los hepatocitos y a presencia de cuerpos de Mallory entre otros criterios. Para la determinación del grado de fibrosis, se utilizó la clasificación para fibrosis de Brunt la cual consiste en grado 1, fibrosis en la zona 3, peri sinusoidal y/o peri celular; grado 2, fibrosis en la zona 3 y peri portal; grado 3, puentes de fibrosis y grado 4, formación de nódulos, cirrosis.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables continuas se describen con medias y desviación estándar, la diferencia entre medias se analizaron con T de Student o U de Mann-Whitney.

Las variables categóricas se describen como número total y porcentajes, las diferencias de proporciones se analizaron por medio de chi cuadrada o prueba exacta de Fisher.

Los datos de precisión diagnóstica se obtuvieron por medio del análisis de tablas de 2 X 2, con lo que se calculó sensibilidad  $[a/(a+c)]$ , especificidad  $[d/(b+d)]$ , valor predictivo positivo  $[a/(a+b)]$ , valor predictivo negativo  $[d/(c+d)]$  con un intervalo de confianza del 95% para cada sistema de evaluación de fibrosis no invasivo (APRI, AST/ALT, FIB-4, BARD y NAFLD score)]. De mismo modo se calculó la exactitud diagnóstica  $[(a+d)/(a+b+c+d)]$  de cada una de las pruebas, para mejorar su capacidad de interpretación. Se consideró un valor significativo de  $P < 0.05$ .



## RESULTADOS

Se revisaron un total de 201 biopsias hepáticas con el diagnóstico histológico de EGHNA así como sus expedientes clínicos. Se excluyeron del estudio 15 biopsias por falta de datos clínicos o de laboratorio completos u otro diagnóstico concomitante con EGHNA. Se incluyeron un total de 186 biopsias para el análisis. Se incluyeron 88 mujeres (47%) y 98 hombres (52.7%); la mediana de la edad fue de  $48.4 \pm 13.3$  años; de las variables antropométricas, el IMC normal se encontró en 43 biopsias (23.1%), sobrepeso en 70 (37.6%), obesidad grado I en 50 (26.8%), obesidad grado II 5(2.6%), obesidad grado III 1 (0.5%) y obesidad mórbida 1 (0.5%). Del total de los pacientes el 16.7% (31 pacientes) contaba con el diagnóstico de intolerancia a carbohidratos o DM2.

En cuanto a los hallazgos histopatológicos, se encontró EGHNA grado 1 y 2 (esteatosis) en el 73.1%, mientras de datos de esteatohepatitis o EGHNA grado 3 y 4 en el 26.9%. Por grados de fibrosis se obtuvieron los siguientes resultados: el 60.2% (112 biopsias) se encontraron sin fibrosis (F0), 25.8% (48) con F1, 3.8% (7) con F2, 5.9% (11) con F3 y 4.3% (8) con cirrosis (F4) (Tabla 7). Se calcularon las medias de los valores de laboratorio, obteniendo una media par los niveles de ALT de  $67.8 \pm 84.5$  U/L, AST  $54.8 \pm 60.06$  U/L, albumina  $3.5 \pm 0.64$  g/dL, plaquetas  $241 \pm 98.7$  y niveles de glucosa en  $109.2 \pm 26.8$  mg/dL (Tabla 7).

**Tabla 7. Características generales de la población**

<b>DEMOGRÁFICAS</b>	<b>No. (%)</b>
<b>GENERO</b>	
•Mujer	88 (47.3)
•Hombre	98 (52.7)
<b>EDAD (años)</b>	<b>48.4 (±13.3)</b>
<b>IMC</b>	
•Normal	43 (23.1)
•Sobrepeso	70 (37.6)
•Obesidad G I	50 (26.8)
•Obesidad GII	5 (2.6)
•Obesidad GIII	1 (0.5)
•Mórbida	1 (0.5)
<b>ICH/DM2</b>	<b>31 (16.7)</b>
<b>INDICACIONES DE BIOPSIA</b>	
	<b>145 (77.9)</b>
•Colecistectomía	33 (17.7)
•Hepatopatía en estudio	8 (4.3)
•Masa hepática en estudio	
<b>TOMA DE BIOPSIA</b>	
•PAAF	21 (11.2)
•PTC	1 (11.2)
•QCÑ	117 (62.9)
•QTC	36 (19.3)
•TRY	7 (3.7)
•TRG	4 (2.1)
<b>HISTOLOGIA</b>	
<b>EGHNA</b>	
•Grado 1 y 2	136 (73.1)
•Grado 3 y 4	50 (26.9)
<b>Fibrosis</b>	
•F0	112 (60.2)
•F1	48 (25.8)
•F2	7 (3.8)
•F3	11 (5.9)
•F4	8 (4.3)
<b>LABORATORIOS</b>	
•Plaquetas (x 10 <sup>5</sup> )	241 (±98.7)
•Albumina (gr/dL)	3.5 (±0.64)
•ALT (U/L)	67.8 (±84.5)
•AST (U/L)	54.8 (±60.06)
•Glucosa (mg/dL)	109.2 (±26.8)
<p>PAAF: percutánea con aguja fina; PTC: percutánea tru-cut; QCÑ: quirúrgica en cuña; QTC: quirúrgica tru-cut; TRY: transyugular; TRG: endoscópica transgástrica</p>	



En cuanto a las indicaciones de biopsia, la colecistectomía fue la principal indicación (77.9%), seguido de hepatopatía en estudio (17.7%) y masa hepática en estudio (4.3%).

La técnica para la toma de biopsia más usada fue la obtención de muestra por cirugía en cuña (62.9%), seguido por quirúrgica con tru-cut (19.3%), percutánea con aguja fina y tru-cut en la misma proporción (11.2%), transyugular (3.7%) y transgástrica por vía endoscópica (2.1%) (Tabla 8).

**Tabla 8. Tipo de biopsia por grado de fibrosis**

	<b>F0-F2</b>	<b>F3-F4</b>
<b>TIPO</b>	<b>No. (%)</b>	<b>No. (%)</b>
<b>PAAF</b>	<b>16 (9.6)</b>	<b>5 (26.3)</b>
<b>PTC</b>	<b>1 (0.6)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>QCÑ</b>	<b>109 (65.3)</b>	<b>8 (42.1)</b>
<b>QTC</b>	<b>33 (19.8)</b>	<b>6 (31.6)</b>
<b>TRY</b>	<b>7 (4.2)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>TRG</b>	<b>4 (2.4)</b>	<b>0 (0)</b>

PAAF: percutánea con aguja fina; PTC: percutánea tru-cut; QCÑ: quirúrgica en cuña; QTC: quirúrgica tru-cut; TRY: transyugular; TRG: endoscópica transgástrica

Para la comparación de la biopsia con los marcadores no invasivos de fibrosis, se dividieron los pacientes en dos grupos: fibrosis leve (F0-F2) y fibrosis severa (F3-F4). Entre los distintos grados de fibrosis, al comparar los distintos valores para las variables previamente descritas, solo se pudo observar diferencias significativa ( $p < 0.5$ ) en la cantidad de plaquetas, la edad y la presencia de intolerancia a carbohidratos o DM2. En el grupo de fibrosis leve (F0-F2), se encontraron cifras de plaquetas mayores que en el grupo de fibrosis severa (F3-F4). También se encontró una mayor tasa de intolerancia a la glucosa o DM2 en los pacientes con fibrosis severa comparados con los pacientes con fibrosis leve, al igual que los pacientes con mayor

grado de fibrosis son pacientes con edad más avanzada (Tabla 9). No se encontraron diferencias con respecto a los niveles de ALT, AST, albumina, glucosa, sexo o IMC.

<b>Tabla 9. Características por grado de fibrosis</b>			
	<b>F0-F2</b>	<b>F3-F4</b>	<b>Valor de p</b>
<b>GENERO</b>			
•Mujer	80 (47.9%)	8 (42.1%)	0.63
•Hombre	87 (52.1%)	11 (57.9%)	
<b>EDAD (años)</b>	47.6 (±13.2)	55.3 (±10.4)	0.010
<b>LABORATORIOS</b>			
•Plaquetas (x 10 <sup>5</sup> )	248.4 (±98.68)	175.2 (±72.4)	0.001
•Albumina (gr/dL)	3.5 (± 0.6)	3.3 (±0.67)	0.13
•ALT (U/L)	69.5 (±87.8)	52.8 (±44.4)	0.35
•AST (U/L)	54.5 (± 61)	57.3 (±51.8)	0.39
•Glucosa (mg/dL)	109.3 (±26.4)	107.9 (±31.2)	0.65
<b>IMC</b>			
•Normal	37 (22.1%)	6 (31.5%)	0.35
•Sobrepeso	60 (35.9%)	10 (52.6%)	
•Obesidad grado I	48 (28.7%)	2 (10.5%)	
•Obesidad grado II	4 (2.3%)	1 (5.2%)	
•Obesidad grado III	1 ( 0.5%)	0 (0%)	
•Mórbida	1 (0.5%)	0 (0%)	
<b>ICH/DM2</b>	23 (13.7%)	8 (42.1%)	0.001
<b>MARCADORES</b>			
•APRI	0.74 (± 1.67)	1.09 (± 1.3)	0.35
•FIB 4	1.91 (±3.86)	3.19 (± 2.4)	0.05
•NAFLD SCORE	-2.15 (±2.17)	-0.45 (± 2.33)	0.006
•AST/ALT	0.96 (±0.45)	1.24 (± 0.61)	0.07
•BARD	1.66 (±1.16)	2.23 (± 1.34)	0.113

En la tabla 10, se pueden comparar las sensibilidades, especificidades, valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) de todos los marcadores no invasivos estudiados, así como su exactitud diagnóstica.

<b>MARCADOR</b>	<b>S (% ,IC 95%)</b>	<b>E (% ,IC95%)</b>	<b>VPP (% , IC95%)</b>	<b>VPN (% ,IC95%)</b>	<b>EXACTITUD</b>
<b>AST/ALT</b>	57,33-78	60,52-67	14,7-24	92,85-96	<b>0.60</b>
<b>APRI</b>	31,13-56	89,83-93	25,10-47	91,86-95	<b>0.83</b>
<b>BARD</b>	76,49-92	43,35-52	13,7-22	94,85-98	<b>0.47</b>
<b>FIB-4</b>	58,28-83	88,81-93	35,16-59	95,88-98	<b>0.85</b>
<b>NAFLD SCORE</b>	63,31-87	86,79-91	29,13-51	96,90-98	<b>0.84</b>

La relación AST/ALT tuvo una sensibilidad del 57.89%, una especificidad del 60.48%, un VPP de 14.29%, y un VPN del 92.66% con una exactitud diagnóstica de 0.60. En cuanto al APRI, se obtuvo una sensibilidad del 31.58%, una especificidad del 89.22%, un VPP del 25% y un VPN del 91.8% con una exactitud diagnóstica de 0.83. El sistema BARD mostró una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del 76.47%, 43.92%, 13.54% y 94.2% respectivamente con una exactitud de 0.47. Al calcular el marcador FIB-4, se obtuvo una sensibilidad del 58.33%, una especificidad del 88.7%, un VPP del 35% y un VPN del 95.33% con una exactitud de 0.85; por último, el sistema NAFLD score obtuvo una sensibilidad del 63.54%, una especificidad del 86.72%, un VPP de 29.17% y un VPN de 96.52% con una exactitud de la prueba de 0.84.

Al realizar una comparación entre los distintos sistemas de fibrosis, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los valores del sistema entre los distintos grados de fibrosis en los sistemas FIB-4 y NAFLD Score ( $p = 0.05$  y  $p = 0.006$  respectivamente) (Tabla 10).

## DISCUSIÓN

El uso de los métodos no invasivos para la detección de la fibrosis se han utilizado como una estrategia para disminuir la realización de las biopsias en pacientes con EGHNA, debido al problema ético que presenta realizar diagnóstico etiológico en un escenario clínico sin opciones reales de manejo. Esto aún más relevante en aquellos pacientes que tienen factores de riesgo para el desarrollo de EHNA, como los pacientes con obesidad y diabetes mellitus. En nuestro estudio, se mostró una diferencia significativa en la prevalencia de diabetes mellitus entre el grado de fibrosis en los pacientes con fibrosis leve y con fibrosis severa, siendo más alta en la población con fibrosis severa, dato que también se ha reportado en otras poblaciones [136]. Por el contrario, no encontramos que la obesidad fuera un factor que influyera en el grado de fibrosis de nuestra cohorte, factor ya conocido previamente para el desarrollo de fibrosis. Cabe resaltar en este punto, que a pesar de que solamente el 23% tiene un IMC, solamente el 1% de la población contaba con un IMC por arriba de  $40 \text{ Kg/m}^2$  y esto pudo condicionar que la obesidad no mostrara diferencia entre los dos grupos. Es importante resaltar que hasta en el 30% de los pacientes con fibrosis severa tenían un IMC por debajo de  $25 \text{ Kg/m}^2$ . Sin embargo, por la naturaleza retrospectiva del estudio, se dificulta conocer si el paciente en algún momento tuvo un IMC superior al actual.

La edad como factor de fibrosis no se ha descrito, sin embargo en nuestro estudio, se observó una diferencia significativa en cuando a la edad entre los dos grupos, siendo pacientes de mayor edad aquellos con fibrosis severa. Esto también fue reportado en el estudio de McPherson [137] y en el estudio de Ruffillo [136] en donde también la

edad es mayor en los grupos con fibrosis avanzada. Esto puede ser explicado por el tiempo de evolución de la enfermedad, a mayor edad, mayor tiempo de progresión de la enfermedad grasa no alcohólica y una mayor probabilidad de tener cierto grado de fibrosis.

De los parámetros de laboratorio, un marcador indirecto de fibrosis avanzada como lo es la cuenta de plaquetas mostró diferencias entre los dos grupos. La cantidad de plaquetas en los pacientes con fibrosis severa era menor a los pacientes con fibrosis leve, marcador ya conocido como predictor de fibrosis avanzada. Sin embargo ningún otro parámetro de laboratorio en nuestra cohorte mostró alguna diferencia entre los dos grupos. Encontramos aquí también la relevancia de la realización de escrutinio de fibrosis en pacientes con hígado graso por imagen con parámetros de laboratorio normales. Y nos encontramos de nuevo ante la interrogante, ¿método no invasivo o la biopsia hepática? Si bien la biopsia hepática es el estándar de oro, y las complicaciones se presentan en un bajo porcentaje, someter al paciente a este riesgo es cuestionable. Es allí en donde el papel de los métodos no invasivos adquiere importancia. Al evaluar al paciente y someterlo a todos estos sistemas de evaluación de fibrosis y aun así no poder determinar el grado de fibrosis, podemos contar con mejores bases para la justificación de la realización de la biopsia como una última alternativa de evaluación de la fibrosis.

La utilidad de los sistemas de evaluación se ha intentado reproducir en distintas poblaciones con EGHNA alrededor del mundo. La relación AST/ALT se ha agregado a varios sistemas de evaluación como lo es el NAFLD score y el BARD. Este marcador es el más sencillo de calcular de los cinco marcadores evaluados, se ha utilizado desde su

creación en distintas hepatopatías para valorar fibrosis con una exactitud adecuada. De los estudios en EGHNA, éste marcador ha obtenido una sensibilidad del 52%, una especificidad del 90%, un VPP del 55% y un VPN del 89% [137]. Al aplicarlo a nuestra población, las cifras fueron muy similares, a diferencia de que el VPN fue mayor (92%). Pero al analizar la exactitud de la prueba diagnóstica, se obtiene un valor de 0.60, lo que pone en duda su efectividad para hígado graso en nuestra población.

El sistema APRI fue desarrollado originalmente para evaluar la fibrosis en pacientes con infección de virus de hepatitis C. Sin embargo, con el incremento de la EGHNA, se han realizado estudios de validación de este método para la población con enfermedad hepática grasa. En uno de los estudios donde se evaluó la utilidad de este sistema [137], en el que se incluyeron 145 pacientes, se encontró una sensibilidad del 27%, especificidad del 89%, VPP del 37% y un VPN del 95%. Otra larga cohorte que compara este marcador en población francesa con EGHNA mostró una sensibilidad del 66%, una especificidad del 90%, un VPP del 72% y un VPN del 87%, siendo éste el estudio con la sensibilidad y VPP más alto [139]. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en éste estudio, son muy similares los valores de sensibilidad y VPN a los de la cohorte de McPherson. Extrapolando estos resultados a población mexicana y comparando la exactitudes diagnósticas, se puede determinar que éste sistema puede de forma confiable, descartar la presencia de fibrosis severa en EGHNA. La practicidad del uso del APRI es el uso de dos variables disponibles en la práctica habitual y una fórmula sencilla para realizar el cálculo, además de no obtener valores de fibrosis indeterminados.

El sistema NAFLD score fue creado para evaluar fibrosis en hígado graso. en una población de 138 pacientes estudiados este sistema, mostró valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 22.7%, 100%, 81.3 y 100%, respectivamente [136]. Otros estudios [136, 137] han mostrado sensibilidad, especificidad, VPP y VPN que van del 22-78%, 58-100, 30-81 y 92-100%, respectivamente. En nuestro estudio se encontró una sensibilidad del 63%, una especificidad del 86%, un VPP bajo del 29% y un VPN del 96%. Los valores obtenidos en esta cohorte, comparada con las que se han realizado en otros sitios geográficos, muestra datos muy similares al estudio más reciente realizado en población inglesa y además obtuvimos una exactitud diagnóstica de 0.84, dando aún mayor fuerza estadística para el uso de este marcador en nuestra población para detectar fibrosis avanzada. Una de las desventajas para el uso de éste marcador, es que se necesita un calculador para obtener el valor, ya que la fórmula que emplea es compleja aun cuando se requieren variables habituales de la consulta ambulatoria. Sin embargo, es un método aplicable a población mexicana con una alta exactitud diagnóstica para fibrosis severa.

El sistema BARD toma dentro de sus variables la presencia de diabetes, que como se muestra en los resultados de este estudio, es un predictor de fibrosis. Al calcular este marcador, nos indica qué pacientes se encuentran en mayor riesgo de tener fibrosis avanzada. En algunos de los estudios han mostrados parámetros de baja sensibilidad y VPP [137, 138], así como en el estudio de Ruffillo y cols. [136] muestra un VPN por debajo de 90%. Por el contrario, el estudio original de validación es reproducible en el estudio realizado por McPherson y cols., en donde se encuentran VPP y VPN para fibrosis avanzada del 44% y 95% respectivamente. En nuestra muestra se encontró que éste sistema de evaluación cuenta con valores de sensibilidad, especificidad y VPP por

debajo del 80%, no así el VPN que se encontró del 94%; si embargo, al momento de evaluar la exactitud de la prueba, obtenemos un valor de 0.47, lo que nos muestra que es deficiente para el diagnóstico de fibrosis avanzada.

El sistema FIB-4 ha mostrado resultados interesantes en los distintos estudios que se han publicado alrededor del mundo. Los valores de sensibilidad se encuentran en 85%, especificidad del 65%, VPP del 75-80% al y VPN del 95% [137, 143]. En nuestro estudio se encontraron valores distintos, una menor sensibilidad y VPP, pero con un VPN del 95% con una exactitud de la prueba diagnóstica de 0.85. El sistema FIB-4 utiliza variables sencillas y la correlación con las muestras por biopsia fue adecuada.

Hablando de la exactitud de éstos métodos no invasivos, se han realizados estudios en otras poblaciones con una adecuada correlación entre ellas. Estudios en Asia [138, 146] con poblaciones japonesas y chinas que han evaluado la utilidad de estos sistemas en EGHNA, han obtenido resultados reproducibles utilizando el sistema NAFLD score. El estudio realizado por McPherson [137] en una cohorte de pacientes ingleses con el diagnóstico de hígado graso, mostró que el sistemas NAFLD score, la relación AST/ALT, el sistema FIB-4 y el sistema BARD, contaban con VPN  $\geq$  a 92% para descartar la presencia de fibrosis avanzada. Los resultados que obtuvimos en nuestro estudio, todos los sistemas obtuvieron VPN por arriba del 90% para descartar la presencia de fibrosis avanzada. Sin embargo, al momento de analizar los demás parámetros como la sensibilidad, la especificidad, el VPP y la exactitud diagnóstica de cada sistema de evaluación, los sistemas NAFLD score, FIB-4 y APRI obtuvieron el mejor rendimiento diagnóstico. Estos tres sistemas cuentan con variables de uso común en la práctica médica como lo son la edad, el índice de masa corporal, la

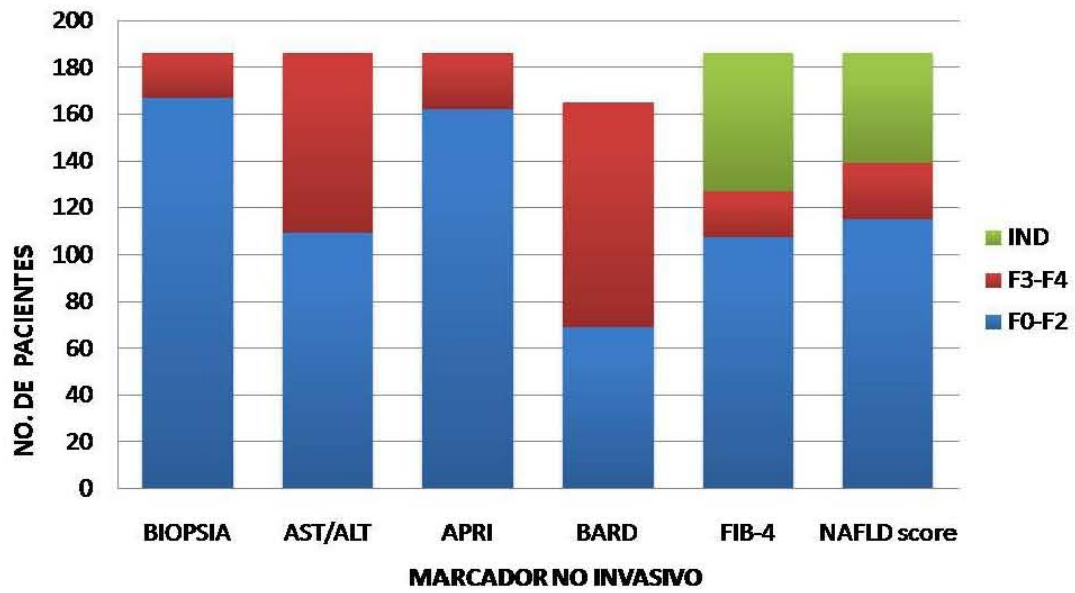


presencia de intolerancia a carbohidratos o DM2, niveles de ALT y AST, cuenta de plaquetas y albúmina para el sistema NAFLD score; valores como la edad, los niveles de AST, ALT y cuenta de plaquetas para el sistema FIB-4 y el APRI requiere solamente el valor de AST y la cuenta plaquetaria. Con los avances tecnológicos, la mayoría de los profesionales de la salud contamos con algún dispositivo electrónico con calculadores que podemos tener disponibles y obtener una medición de la fibrosis con estos sistemas de forma rápida durante la evaluación clínica de los pacientes a un bajo costo, y tomar de una forma oportuna, la decisión de realizar o no realizar un procedimiento invasivo como lo es la biopsia.

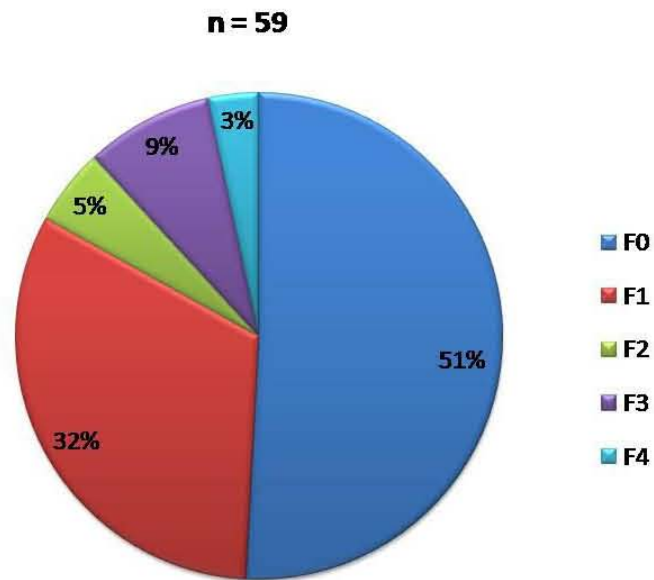
En este estudio describimos las técnicas por las que se realizó la toma de biopsia, y es importante observar, que a pesar de que se ha descrito que la toma de biopsia hepática por cuña puede sobreestimar el grado de fibrosis de la muestra, vemos que en el grupo de fibrosis leve (F0-F2) las muestras fueron obtenidas en el 65% por medio de ésta técnica. Si separamos a los pacientes sin fibrosis (F0), en el 66% se realizó cuña, en el 9.8 % percutánea por aspiración con aguja fina, el 0.8% percutánea por Tru-cut, 17% por tru-cut transquirúrgico, 5.6% transyugular y en el 1.7% transgástrica. Por el otro lado, en el grupo de fibrosis severa (F3-F4) las técnicas de toma de biopsia fueron más homogéneas, siendo por cuña en el 42%, por tru-cut transquirúrgico en el 31% y percutánea por aspiración con aguja fina en el 26%.

En la figura 8 se esquematiza la población estudiada y la estadificación en fibrosis leve y fibrosis severa por cada sistema de evaluación. Como podemos observar, todos los sistemas incluyen a los pacientes en los dos rangos, fibrosis leve y fibrosis severa. Sin embargo, dos de los cinco sistemas evaluados contienen pacientes a los que no se les

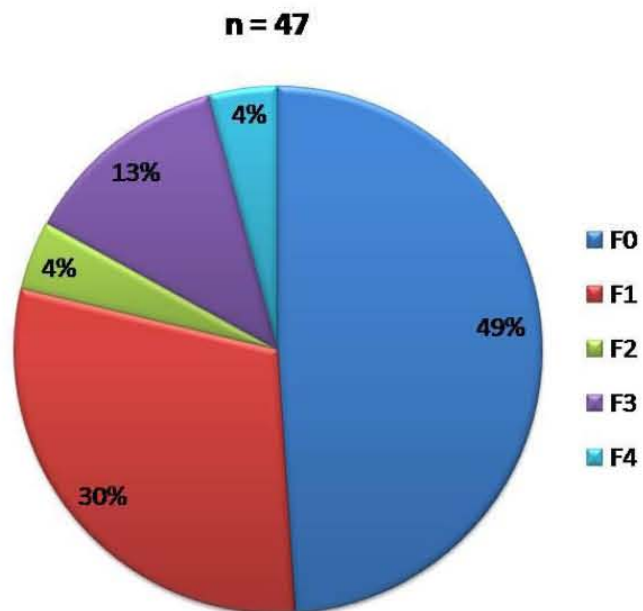
pudo determinar el grado de fibrosis, el sistema FIB-4 y el sistema NAFLD score (Figuras 9 y 10).



**Figura 8. Grados de fibrosis por marcador no invasivo vs biopsia**



**Figura 9. Muestras indeterminadas en FIB-4**



**Figura 10. Muestras indeterminadas en NAFLD score**

Es importante destacar, que el valor de fibrosis se dicotomiza en fibrosis leve y fibrosis severa, incluyendo en el grupo de fibrosis leve a aquellos pacientes sin fibrosis, dato que clínicamente sí muestra relevancia contra aquellos pacientes que ya presentan fibrosis. Al momento de analizar las biopsias que mostraron resultado indeterminado, para el sistema FIB-4 el 51% de las muestras corresponden a un F0, el 32% a un F1, el 5% a F2, el 9% a F3 y el 3% a F4. En el sistema NAFLD score, el 49% corresponde a F0, el 30% a F1, el 4% a F2, el 13% a F3 y el 4% a F4. Se puede observar en las biopsias con datos indeterminados, que el cincuenta por ciento aproximadamente de las muestras corresponden a muestras sin fibrosis en ambos sistemas de evaluación. Por otro lado, es muy pequeña la proporción de pacientes con cirrosis a la que no se pudo evaluar. Esto corrobora lo descrito para la utilidad de este tipo de marcadores en estadio de fibrosis avanzada, sin embargo en el extremo contrario (F0), nos deja una proporción de pacientes en los que no podemos determinar si existe o no fibrosis. En estos pacientes que quedan como indeterminados, que aunque no exista un consenso para la realización de la biopsias en hígado graso, serían los candidatos más apropiados para la realización de la biopsia para un adecuado estadiaje del grado de fibrosis y poder orientar de una manera más adecuada, la vigilancia y el seguimiento apropiado en este grupo de pacientes. Conociendo los resultados que obtuvimos, sabemos que la probabilidad de que el pacientes que sea sometido a biopsia por haber sido clasificado como indeterminado y que no tendrá fibrosis será aproximadamente del 50%, y que la otra mitad de pacientes, obtendremos un paciente con fibrosis.

## CONCLUSIONES

Para el diagnóstico de fibrosis avanzada en enfermedad grasa hepática no alcohólica se pueden utilizar con buena precisión los sistemas NAFLD score, FIB-4 y APRI en nuestra población y que además son de fácil disponibilidad en la práctica diaria.

Sin embargo, aún queda un gran pendiente para el desarrollo de los marcadores no invasivos, si bien son confiables para excluir enfermedad avanzada, el diagnóstico de fibrosis leve por éstos sistemas de evaluación queda lejos de ser una realidad y es en éste grupo de pacientes en los que una maniobra terapéutica temprana beneficiaría su progresión clínica a una enfermedad de mayor gravedad. Más aún, sabemos que el 25% de los pacientes que evaluemos por éstos métodos, tendrán un grado de fibrosis indeterminado y podrían ser sometidos a un procedimiento invasivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Preiss, D. and N. Sattar, *Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations*. Clinical science, 2008. **115**(5): p. 141-50.
2. *Executive Summary of The 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)*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
3. Younossi, Z.M., et al., *Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States from 1988 to 2008*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2011.
4. Williamson, R.M., et al., *Prevalence of and Risk Factors for Hepatic Steatosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in People With Type 2 Diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study*. Diabetes care, 2011. **34**(5): p. 1139-1144.
5. Leite, N.C., et al., *Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors*. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver, 2011. **31**(5): p. 700-6.
6. Richard, J. and I. Lingvay, *Hepatic steatosis and Type 2 diabetes: current and future treatment considerations*. Expert review of cardiovascular therapy, 2011. **9**(3): p. 321-8.
7. Targher, G., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients*. Diabetes care, 2007. **30**(5): p. 1212-8.
8. Loria, P., A. Lonardo, and G. Targher, *Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis*. Clin Sci (Lond), 2008. **115**(1): p. 1-12.
9. Gastaldelli, A., et al., *Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population*. Hepatology, 2009. **49**(5): p. 1537-44.
10. Rafiq, N., et al., *Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2009. **7**(2): p. 234-8.
11. Lizardi-Cervera, J., et al., *[Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects]*. Revista de gastroenterología de Mexico, 2006. **71**(4): p. 453-9.
12. Roesch-Dietlen, F., et al., *[Frequency of NAFLD in a group of patients with metabolic syndrome in Veracruz, Mexico]*. Rev Gastroenterol Mex, 2006. **71**(4): p. 446-52.
13. Chavarria-Arciniega, S., et al., *[Relationship between morphological diagnosis of NASH (non-alcoholic steatohepatitis) and liver function tests in a group of patients with morbid obesity]*. Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion, 2005. **57**(4): p. 505-12.
14. Byrne, C.D., et al., *Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease*. Clinical science, 2009. **116**(7): p. 539-64.
15. Lazo, M. and J.M. Clark, *The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective*. Seminars in liver disease, 2008. **28**(4): p. 339-50.
16. Hanouneh, I.A. and N.N. Zein, *Metabolic syndrome and liver transplantation*. Minerva gastroenterologica e dietologica, 2010. **56**(3): p. 297-304.
17. Spitzer, A.L., et al., *The biopsied donor liver: incorporating macrosteatosis into high-risk donor assessment*. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2010. **16**(7): p. 874-84.
18. Guzder, R.N., et al., *Impact of metabolic syndrome criteria on cardiovascular disease risk in people with newly diagnosed type 2 diabetes*. Diabetologia, 2006. **49**(1): p. 49-55.
19. Wannamethee, S.G., L. Lennon, and A.G. Shaper, *The value of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular risk prediction in men without diagnosed cardiovascular disease or diabetes*. Atherosclerosis, 2008. **201**(1): p. 168-75.
20. Schindhelm, R.K., et al., *Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study*. Atherosclerosis, 2007. **191**(2): p. 391-6.
21. Fracanzani, A.L., et al., *Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease*. The American journal of medicine, 2008. **121**(1): p. 72-8.
22. Zelman, S., *The liver in obesity*. A.M.A. archives of internal medicine, 1952. **90**(2): p. 141-56.
23. Peters, R.L., T. Gay, and T.B. Reynolds, *Post-jejunoileal-bypass hepatic disease. Its similarity to alcoholic hepatic disease*. American journal of clinical pathology, 1975. **63**(3): p. 318-31.
24. Adler, M. and F. Schaffner, *Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients*. The American journal of medicine, 1979. **67**(5): p. 811-6.
25. Nasrallah, S.M., C.E. Wills, Jr., and J.T. Galambos, *Hepatic morphology in obesity*. Digestive diseases and sciences, 1981. **26**(4): p. 325-7.
26. Falchuk, K.R., et al., *Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus*. Gastroenterology, 1980. **78**(3): p. 535-41.
27. Itoh, S., et al., *Five patients with nonalcoholic diabetic cirrhosis*. Acta hepato-gastroenterologica, 1979. **26**(2): p. 90-7.
28. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 1980. **55**(7): p. 434-8.
29. Tran, T.T., et al., *Living donor liver transplantation: histological abnormalities found on liver biopsies of apparently healthy potential donors*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2006. **21**(2): p. 381-3.
30. Guha, I.N., et al., *Non-invasive markers associated with liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. Gut, 2006. **55**(11): p. 1650-60.
31. Schwimmer, J.B., et al., *SAFETY study: alanine aminotransferase cutoff values are set too high for reliable detection of pediatric chronic liver disease*. Gastroenterology, 2010. **138**(4): p. 1357-64, 1364 e1-2.
32. Manco, M., et al., *Metabolic syndrome and liver histology in paediatric non-alcoholic steatohepatitis*. International journal of obesity, 2008. **32**(2): p. 381-7.
33. Fraser, A., M.P. Longnecker, and D.A. Lawlor, *Prevalence of elevated alanine aminotransferase among US adolescents and associated factors: NHANES 1999-2004*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1814-20.

34. Wiegand, S., et al., *Obese boys at increased risk for nonalcoholic liver disease: evaluation of 16,390 overweight or obese children and adolescents*. International journal of obesity, 2010. **34**(10): p. 1468-74.
35. Schwimmer, J.B., et al., *Influence of gender, race, and ethnicity on suspected fatty liver in obese adolescents*. Pediatrics, 2005. **115**(5): p. e561-5.
36. Barshop, N.J., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease as a comorbidity of childhood obesity*. Pediatric health, 2009. **3**(3): p. 271-281.
37. Petersen, K.F., et al., *Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(48): p. 18273-7.
38. Schwimmer, J.B., et al., *Prevalence of fatty liver in children and adolescents*. Pediatrics, 2006. **118**(4): p. 1388-93.
39. Blair, S.N. and M.Z. Nichaman, *The public health problem of increasing prevalence rates of obesity and what should be done about it*. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 2002. **77**(2): p. 109-13.
40. van Dam, R.M., et al., *Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men*. Annals of internal medicine, 2002. **136**(3): p. 201-9.
41. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-73.
42. Chalasani, N., et al., *Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis?* The American journal of gastroenterology, 2003. **98**(12): p. 2771-6.
43. Yamakawa, T., et al., *Augmented production of tumor necrosis factor-alpha in obese mice*. Clinical immunology and immunopathology, 1995. **75**(1): p. 51-6.
44. Yokohama, S., et al., *Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1222-5.
45. Leclercq, I.A., et al., *Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury*. Journal of hepatology, 2002. **37**(2): p. 206-13.
46. Wei, Y.H., L. Jun, and C.J. Qiang, *Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on hepatic fibrosis induced by CCl4 in rats*. Digestive diseases and sciences, 2004. **49**(10): p. 1589-94.
47. Katsuki, A., et al., *Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1998. **83**(3): p. 859-62.
48. Feldstein, A.E., et al., *Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 437-43.
49. Combs, T.P., et al., *Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(12): p. 1875-81.
50. Spranger, J., et al., *Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus*. Lancet, 2003. **361**(9353): p. 226-8.
51. Xu, A., et al., *The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice*. The Journal of clinical investigation, 2003. **112**(1): p. 91-100.
52. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1844-50.
53. Saltiel, A.R. and J.E. Pessin, *Insulin signaling pathways in time and space*. Trends in cell biology, 2002. **12**(2): p. 65-71.
54. Riordan, S.M., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, and non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2002. **50**(1): p. 136-8.
55. Neyrinck, A.M., et al., *Inhibition of Kupffer cell activity induces hepatic triglyceride synthesis in fasted rats, independent of lipopolysaccharide challenge*. Journal of hepatology, 2002. **36**(4): p. 466-73.
56. Miele, L., et al., *Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by 13C-octanoate breath test*. The American journal of gastroenterology, 2003. **98**(10): p. 2335-6.
57. Washington, K., et al., *Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver*. Human pathology, 2000. **31**(7): p. 822-8.
58. Cortez-Pinto, H., et al., *Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1999. **282**(17): p. 1659-64.
59. Yang, H., et al., *Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance*. Journal of immunology, 2010. **185**(3): p. 1836-45.
60. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
61. Brunt, E.M., *Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis*. Clinics in liver disease, 2002. **6**(2): p. 399-420, vii.
62. Ku, N.O., et al., *Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1639-49.
63. Matteoni, C.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1413-9.
64. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens*. Human pathology, 2004. **35**(9): p. 1070-82.
65. Brunt, E.M., et al., *Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 809-20.
66. Feldstein, A.E. and G.J. Gores, *Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 2005. **10**: p. 3093-9.
67. Nakayama, H., et al., *Presence of perivenular elastic fibers in nonalcoholic steatohepatitis Fibrosis Stage III*. Histology and histopathology, 2008. **23**(4): p. 407-9.
68. Cortez-Pinto, H., et al., *Hepatic stellate cell activation occurs in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepato-gastroenterology, 2001. **48**(37): p. 87-90.
69. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. The American journal of gastroenterology, 1999. **94**(9): p. 2467-74.

70. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-S112.
71. Torres, D.M. and S.A. Harrison, *Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1682-98.
72. Cheung, O. and A.J. Sanyal, *Hepatitis C infection and nonalcoholic fatty liver disease*. Clinics in liver disease, 2008. **12**(3): p. 573-85, viii-ix.
73. Vuppalanchi, R. and N. Chalasani, *Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management*. Hepatology, 2009. **49**(1): p. 306-17.
74. Bugianesi, E., *Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiac lipotoxicity: Another piece of the puzzle*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 2-4.
75. Teli, M.R., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study*. Hepatology, 1995. **22**(6): p. 1714-9.
76. Dam-Larsen, S., et al., *Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death*. Gut, 2004. **53**(5): p. 750-5.
77. Lee, R.G., *Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients*. Human pathology, 1989. **20**(6): p. 594-8.
78. Adams, L.A., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 113-21.
79. Ratziu, V., et al., *Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(6): p. 1485-93.
80. Hui, J.M., et al., *Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 420-7.
81. Cotrim, H.P., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: natural history?* The American journal of gastroenterology, 2000. **95**(10): p. 3018-9.
82. Adams, L.A., et al., *The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies*. Journal of hepatology, 2005. **42**(1): p. 132-8.
83. Ong, J., et al., *Cryptogenic cirrhosis and posttransplantation nonalcoholic fatty liver disease*. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2001. **7**(9): p. 797-801.
84. Bugianesi, E., et al., *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2002. **123**(1): p. 134-40.
85. Ong, J.P. and Z.M. Younossi, *Is hepatocellular carcinoma part of the natural history of nonalcoholic steatohepatitis?* Gastroenterology, 2002. **123**(1): p. 375-8.
86. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. The New England journal of medicine, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
87. Contos, M.J., et al., *Development of nonalcoholic fatty liver disease after orthotopic liver transplantation for cryptogenic cirrhosis*. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2001. **7**(4): p. 363-73.
88. Charlton, M., et al., *Frequency of nonalcoholic steatohepatitis as a cause of advanced liver disease*. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2001. **7**(7): p. 608-14.
89. Piccinino, F., et al., *Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies*. Journal of hepatology, 1986. **2**(2): p. 165-73.
90. Bedossa, P., D. Dargere, and V. Paradis, *Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1449-57.
91. Colombo, M., et al., *Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy: superiority of the Tru-Cut over the Menghini needle for diagnosis of cirrhosis*. Gastroenterology, 1988. **95**(2): p. 487-9.
92. Ratziu, V., et al., *Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1898-906.
93. Janiec, D.J., et al., *Histologic variation of grade and stage of non-alcoholic fatty liver disease in liver biopsies*. Obesity surgery, 2005. **15**(4): p. 497-501.
94. Mehta, S.H., et al., *Exceeding the limits of liver histology markers*. Journal of hepatology, 2009. **50**(1): p. 36-41.
95. Skelly, M.M., P.D. James, and S.D. Ryder, *Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology*. Journal of hepatology, 2001. **35**(2): p. 195-9.
96. Brunt, E.M., et al., *Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease*. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 2003. **16**(1): p. 49-56.
97. Pillai, A.A. and M.E. Rinella, *Non-alcoholic fatty liver disease: is bariatric surgery the answer?* Clinics in liver disease, 2009. **13**(4): p. 689-710.
98. Teixeira, A.R., et al., *The incapacity of the surgeon to identify NASH in bariatric surgery makes biopsy mandatory*. Obesity surgery, 2009. **19**(12): p. 1678-84.
99. Brunt, E.M., *Pathology of nonalcoholic fatty liver disease*. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, 2010. **7**(4): p. 195-203.
100. Rodriguez-Hernandez, H., et al., *Risk factors associated with nonalcoholic fatty liver disease and its relationship with the hepatic histological changes*. European journal of gastroenterology & hepatology, 2008. **20**(5): p. 399-403.
101. Chavez-Tapia, N.C. and C. Tiribelli, *Are non-invasive tests accurate enough to predict hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)?* Gut, 2008. **57**(10): p. 1351-3.
102. Angulo, P., et al., *The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD*. Hepatology, 2007. **45**(4): p. 846-54.
103. Rosenberg, W.M., et al., *Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study*. Gastroenterology, 2004. **127**(6): p. 1704-13.
104. Poynard, T., et al., *A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers*. Gastroenterology, 1991. **100**(5 Pt 1): p. 1397-402.



105. Imbert-Bismut, F., et al., *Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study*. *Lancet*, 2001. **357**(9262): p. 1069-75.
106. Naveau, S., et al., *Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest*. *Digestive diseases and sciences*, 1994. **39**(11): p. 2426-32.
107. McHutchison, J.G., et al., *Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group*. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2000. **15**(8): p. 945-51.
108. Gabrielli, G.B., et al., *Serum laminin and type III procollagen in chronic hepatitis C. Diagnostic value in the assessment of disease activity and fibrosis*. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 1997. **265**(1): p. 21-31.
109. Tsutsumi, M., et al., *Changes in laminin content in livers of patients with alcoholic liver disease*. *Liver*, 1995. **15**(6): p. 324-31.
110. Giannini, E., et al., *Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease*. *Archives of internal medicine*, 2003. **163**(2): p. 218-24.
111. Sorbi, D., J. Boynton, and K.D. Lindor, *The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease*. *The American journal of gastroenterology*, 1999. **94**(4): p. 1018-22.
112. Guha, I.N., et al., *Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers*. *Hepatology*, 2008. **47**(2): p. 455-60.
113. Parkes, J., et al., *Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease*. *Gut*, 2010. **59**(9): p. 1245-51.
114. Poynard, T., et al., *Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease*. *BMC gastroenterology*, 2007. **7**: p. 40.
115. Munteanu, M., et al., *Noninvasive biomarkers for the screening of fibrosis, steatosis and steatohepatitis in patients with metabolic risk factors: FibroTest-FibroMax experience*. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*, 2008. **17**(2): p. 187-91.
116. Sakugawa, H., et al., *Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2005. **11**(2): p. 255-9.
117. Yoneda, M., et al., *Type IV collagen 7s domain is an independent clinical marker of the severity of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage*. *Journal of gastroenterology*, 2007. **42**(5): p. 375-81.
118. Hashimoto, E., et al., *The characteristics and natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 2005. **33**(2): p. 72-6.
119. Kaneda, H., et al., *Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2006. **21**(9): p. 1459-65.
120. Suzuki, A., et al., *Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2005. **25**(4): p. 779-86.
121. Lesmana, C.R., et al., *Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. *Journal of digestive diseases*, 2009. **10**(3): p. 201-6.
122. Palekar, N.A., et al., *Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *Liver Int*, 2006. **26**(2): p. 151-6.
123. Santos, V.N., et al., *Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*, 2005. **38**(5): p. 747-53.
124. Joy, D., V.R. Thava, and B.B. Scott, *Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary?* *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2003. **15**(5): p. 539-43.
125. de Ledinghen, V. and J. Vergniol, *Transient elastography (FibroScan)*. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 2008. **32**(6 Suppl 1): p. 58-67.
126. de Ledinghen, V., et al., *Feasibility of liver transient elastography with FibroScan using a new probe for obese patients*. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2010. **30**(7): p. 1043-8.
127. Yoneda, M., et al., *Transient elastography in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. *Gut*, 2007. **56**(9): p. 1330-1.
128. Wong, V.W., et al., *Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2010. **51**(2): p. 454-62.
129. Musso, G., et al., *Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity*. *Annals of medicine*, 2010.
130. Yin, M., et al., *Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography*. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2007. **5**(10): p. 1207-1213 e2.
131. Huwart, L., et al., *Magnetic resonance elastography for the noninvasive staging of liver fibrosis*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 32-40.
132. Wieckowska, A. and A.E. Feldstein, *Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive*. *Seminars in liver disease*, 2008. **28**(4): p. 386-95.
133. Younossi, Z.M., et al., *Hepatic gene expression in patients with obesity-related non-alcoholic steatohepatitis*. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2005. **25**(4): p. 760-71.
134. Sreekumar, R., et al., *Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2003. **38**(1): p. 244-51.
135. Harrison, S.A., et al., *Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease*. *Gut*, 2008. **57**(10): p. 1441-7.
136. Ruffillo, G., et al., *Comparison of NAFLD fibrosis score and BARD score in predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease*. *Journal of hepatology*, 2011. **54**(1): p. 160-3.

137. McPherson, S., et al., *Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Gut, 2010. **59**(9): p. 1265-9.
138. Fujii, H., et al., *Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD*. Gut, 2009. **58**(11): p. 1566-7; author reply 1567.
139. Cales, P., et al., *Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD*. J Hepatol, 2009. **50**(1): p. 165-73.
140. Loaeza-del-Castillo, A., et al., *AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis*. Annals of hepatology : official journal of the Mexican Association of Hepatology, 2008. **7**(4): p. 350-7.
141. Fujii, H., et al., *Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. Journal of gastroenterology, 2009. **44**(6): p. 608-14.
142. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2010. **52**(3): p. 913-24.
143. Shah, A.G., et al., *Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2009. **7**(10): p. 1104-12.
144. Tahan, V., et al., *Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk*. Hepato-gastroenterology, 2008. **55**(85): p. 1433-8.
145. Cales, P., et al., *A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis*. Hepatology, 2005. **42**(6): p. 1373-81.
146. Wong, V.W., et al., *Validation of the NAFLD fibrosis score in a Chinese population with low prevalence of advanced fibrosis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(7): p. 1682-8.
147. Qureshi, K., R.H. Clements, and G.A. Abrams, *The utility of the "NAFLD fibrosis score" in morbidly obese subjects with NAFLD*. Obes Surg, 2008. **18**(3): p. 264-70.
148. Wai, C.T., et al., *A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 518-26.
149. Vallet-Pichard, A., et al., *FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest*. Hepatology, 2007. **46**(1): p. 32-6.