

## TESIS DOCTORAL

### ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL ESTADIO DE FIBROSIS EN EL INJERTO HEPÁTICO DE PACIENTES CON HEPATITIS C RECURRENTE POST-TRASPLANTE

Trabajo presentado por JUDITH PÉREZ ROJAS, licenciada en Medicina y Cirugía para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia. Estudi General (UVEG)

#### DIRIGIDA POR:

- PROF. FRANCISCO JOSE VERA SEMPERE. Catedrático del Departamento de Patología. Facultad de Medicina y Odontología Universidad de Valencia.
- PROF<sup>a</sup>. TITULAR MARINA CARMEN BERENGUER HAYM. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.
- PROF. TITULAR JOSE FRANCISCO PERTUSA GRAU. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.

## **DEDICATORIA**

Esta memoria de trabajo doctoral está dedicado a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de su culminación. A mis padres, pilares fundamentales en mí vida, que me han apoyado y guiado siempre. A mi esposo e hijos. En fin, a todas las personas que me han enseñado a aprender.

## **AGRADECIMIENTO:**

Me gustaría agradecer en estas líneas la ayuda que muchas personas me han prestado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutor y Prof. Francisco Vera Sempere el haberme animado a realizar los estudios de doctorado, haberme orientado desde el primer momento el camino profesional a seguir y sobre todo por confiar en mí para iniciar mi trabajo como médico adjunto en el Servicio de Anatomía Patológica. Agradecimiento especial por su tutoría en la redacción de la tesis doctoral.

Asimismo, deseo expresar mi reconocimiento al Prof. Francisco José Pertusa Grau por su dedicación y enseñanza científica en las diferentes visitas realizada al departamento que dirige, dentro del proceso de investigación y elaboración del programa morfométrico. Gracias por su enseñanza y por su importante contribución y aportación científica.

En este ámbito académico, mi sincera gratitud y admiración a la Prof. y directora de la tesis doctoral Dra. Marina Berenguer Haym que con su aportación y perseverancia en el trabajo de investigación en la patología del trasplante hepático, ha contribuido en particular, a mi mayor motivación e interés científico en esta rama. También trasladar mi gratitud a todo el equipo de trabajo de la Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático del Hospital Universitario la Fe de Valencia, que dirige el Dr. Rafael López Andújar.

Mis especiales agradecimientos a todos mis compañeros del servicio de Anatomía Patológica del Hospital la Fe, médicos adjuntos y residentes por los conocimientos que me enseñaron, el cariño con el que siempre me han tratado y por todos los años compartidos desde que comencé mi especialidad en Anatomía Patológica. Un especial agradecimiento a la Prof. Josefina Artes por su ayuda incondicional, por su energía y por su gran calidad humana.

Procede que, en justicia, agradezca a la Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia la oportunidad que me ha dado para llevar a cabo esta investigación. Y concluyo: gracias a mi familia, por su paciencia y comprensión durante las muchas horas que les he robado.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## **1. INTRODUCCIÓN**

### 1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS C

1.1.1 Antecedentes y situación actual.....	6
1.1.2 Virus de la hepatitis C.....	8
1.1.3 Características virológicas del virus de la hepatitis C.....	8
1.1.4 Genotipos y cuasiespecies.....	13
1.1.5 Epidemiología.....	15
1.1.6 Modo de transmisión.....	15
1.1.7 Historia natural del virus de la hepatitis C. Factores asociados con la progresión de la fibrosis. Genotipo del gen IL28B y respuesta a tratamiento.....	17
1.1.8 Diagnóstico.....	22

### 1.2 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA Y LA FIBROSIS

1.2.1 Fibrosis. Patogenia y generalidades.....	30
1.2.2 Distintos métodos de valoración de la actividad inflamatoria y la fibrosis.....	32
1.2.3 Métodos para medir la fibrosis hepática.....	40

### 1.3 TRASPLANTE HEPÁTICO

1.3.1 Antecedentes y situación actual.....	45
1.3.2 Indicaciones para el trasplante hepático.....	50
1.3.3 Complicaciones post-trasplante.....	57

1.3.4 Retrasplante. Etiología e incidencia.....	58
1.3.5 Evaluación patológica en el trasplante.....	60
1.3.6 Recurrencia de la enfermedad en el periodo post-trasplante.....	62
1.3.7 Hepatitis C del injerto. Evaluación e historia natural.....	65
<b><u>1.4 MORFOMETRÍA</u></b>	
1.4.1 Generalidades.....	73
1.4.2 Morfometría en el trasplante hepático.....	77
<b><u>2. MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	
2.1 Tipo de estudio.....	81
2.2 Material.....	81
2.3 Métodos.....	85
2.4. Análisis estadísticos y variables del estudio	
2.4.1 Variables dependientes.....	95
2.4.2 Variables independientes.....	95
2.4.3 Análisis estadísticos.....	96
<b><u>3. RESULTADOS</u></b> .....	98
<b><u>4. DISCUSIÓN</u></b> .....	117
<b><u>5. CONCLUSIONES</u></b> .....	137
<b><u>6. SUGERENCIAS</u></b> .....	139
<b><u>7. ANEXO</u></b> .....	141
<b><u>8. BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	153
<b><u>9. ANEXO 2</u></b> .....	187

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Fig. 1: Organigrama genómico del virus hepatitis C.....	12
Fig. 2: Tasa de RVS según el genotipo del IL28B.....	20
Fig. 3: Esquemmatización del proceso de fibrinogénesis hepática.....	31
Fig. 4: Registro Europeo de trasplante hepático.....	45
Fig. 5: Evolución del trasplante hepático en Europa.....	46
Fig. 6: Actividad del trasplante hepático (número absoluto) en España.....	48
Fig. 7: Actividad del trasplante y retrasplante hepático. Principales centros hospitalarios de España.....	49
Fig. 8: Principales indicaciones de trasplante hepático en Europa.....	50
Fig. 9: Principales indicaciones de trasplante hepático en España.....	51
Fig. 10: Indicaciones de trasplante hepático en Europa. Distintas etiología de cirrosis hepática.....	52
Fig. 11: Supervivencia del trasplante hepático según la causa de cirrosis.....	53
Fig. 12: Comportamiento del trasplante hepático según edad y sexo en Europa.....	54
Fig. 13: Indicaciones del trasplante en la población adulta. Registro europeo (1988-2013).....	54
Fig. 14. Indicación del trasplante hepático en niños. Registro europeo.....	55
Fig. 15: Análisis europeo de supervivencia de los pacientes trasplantados hepáticos según grupo etario.....	56
Fig. 16: Registro europeo de retrasplante y mortalidad en el trasplante hepático.....	58
Fig. 17: Porcentaje de retrasplante con respecto a la totalidad de trasplante hepático España.....	59

Fig. 18: Microscopio analizador de imagen utilizado.....	87
Fig. 19: Programa morfométrico Imagen J. Caso 6B-2010 con F4.....	88
Fig. 20: Imágenes de los tres canales de procesamiento morfométrico.....	89
Fig. 21: Histograma de niveles de gris para la imagen original 19D-2007.....	90
Fig. 22: Histograma señalando los pixeles correspondiente al tejido y fondo de la imagen original 19D-2007.....	91
Fig. 23: Histograma señalando los pixeles correspondiente al tejido. Imagen binaria de la imagen original 19D-2007.....	91
Fig. 24: Imagen binaria con relleno del sistema vascular de la imagen original 19D-2007. ....	92
Fig. 25: Imagen del canal rojo representando fibrosis polarizante y no polarizante. Imagen original 19D-2007.....	93
Fig. 26: Valores de las cuatro variables morfométricas cuantificadas de la Imagen original 19D-2007.....	94
Fig. 27: Variabilidad por biopsia del tamaño de la muestra utilizada.....	89
Fig. 28: Promedio por biopsia, del número de fragmentos cilíndricos.....	99
Fig. 29: Variabilidad de la longitud de la muestra.....	101
Fig. 30: Longitud promedio de la biopsia.....	102
Fig. 31: Correlación de la longitud de la muestra y la fibrosis blanca.....	102
Fig. 32: Correlación de la longitud de la muestra y la cuantificación de fibrosis negra.....	102
Fig. 33: Progresión en tiempo de la fibrosis semicuantitativa.....	105
Fig. 34: Progresión en tiempo de la fibrosis total.....	106
Fig. 35: Progresión en tiempo de la fibrosis blanca.....	106
Fig. 36: Correlación entre ambos métodos de evaluación de la fibrosis.....	107



Fig. 37: Gráfica Curva ROC de sensibilidad/especificidad de la cuantificación de la fibrosis.....	108
Fig. 38: Imágenes de rojo sirius de espacios portas. Casos con fibrosis inicial. Estadio F0 y F1.....	109
Fig. 39: Imágenes morfométrica de espacios portas. Casos con fibrosis inicial. Estadio F0 y F1.....	110
Fig. 40: Imágenes de rojo sirius de espacios portas. Casos con fibrosis avanzada. Estadios F3 y F4.....	111
Fig. 41: Imágenes morfométrica de espacios portas. Casos con fibrosis avanzada. Estadio F3 y F4.....	112
Fig. 42: Imágenes de rojo sirius de espacios portas. Casos con fibrosis intermedia. Estadios F2.....	113
Fig. 43: Imágenes morfométrica de espacios portas. Casos con fibrosis intermedia. Estadios F2.....	114
Fig. 44: Discordancia entre pruebas bioquímicas (funcionales) y ARN viral con los métodos de evaluación de la fibrosis.....	115
Fig. 45: Discordancia entre pruebas bioquímicas colestásicas con los métodos de evaluación de la fibrosis.....	116

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Puntuación HAI (Histology Activity Index) o índice de Knodell.....	35
TABLA 2: Puntuación HAI (Histology Activity Index) modificada también llamada índice Ishak.....	36
TABLA 3: Escala semicuantitativa de evaluación histológica de daño hepático en hepatitis crónica. Sistema de METAVIR.....	38
TABLA 4: Escala semicuantitativa de evaluación histológica de daño hepático en hepatitis crónica. Sistema SCHEUER.....	39
TABLA 5: Resumen de las principales causas de recurrencia en el trasplante hepático. ....	63
TABLA 6: Factores de riesgo de enfermedad progresiva de la hepatitis C recurrente.....	67
TABLA 7: Datos generales de estudio. Pacientes incluidos/ biopsias analizadas.....	83
TABLA 8: Datos generales del estudio según sexo y año. Pacientes incluidos/biopsias analizadas.....	84
TABLA 9: Desviación estándar de la variabilidad de la muestra.....	98
TABLA 10: Número de imágenes utilizadas en los distintos estadios de fibrosis.....	98
TABLA 11: Promedio de la longitud de la muestra.....	100
TABLA 12: Porcentajes de fibrosis blanca y fibrosis total con y sin tejido vascular.....	103
TABLA 13: Correlación entre ambos métodos de evaluación de la fibrosis.....	104

## ABREVIATURAS:

VHC: Virus de hepatitis C.

VHB: Virus hepatitis B.

CEP: Colangitis esclerosante primaria.

CBP: Cirrosis biliar primaria.

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica.

OMS: Organización mundial de la salud.

ARN: Ácido ribonucleico.

CV: Carga viral.

ADNr: Amplificación ADN ramificada.

AST: Aspartato transaminasa

ALT: Alanina transaminasa.

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa.

AMT: Amplificación isotérmica mediada por transcripción.

TH: Trasplante hepático.

RVS: Respuesta Viroológica Sostenida.

FH: Fibrosis hepática.

ADPV: Adictos a droga por vía endovenosa.

## **1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **1.1.1 ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS C.**

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) está considerada como un problema de salud de gran relevancia que afecta en torno a unos 170 millones de personas en todo el mundo<sup>1</sup>. Aunque la importancia de la infección en cuanto a morbi-mortalidad aún presenta puntos oscuros debido a su particular historia natural, está plenamente demostrado que la progresión de la fibrosis hepática en pacientes afectados por la infección crónica puede desembocar en complicaciones graves, tales como la cirrosis hepática y el desarrollo de hepatocarcinoma.<sup>3-5</sup>

Según el informe de la OMS 2.014, en todo el mundo hay entre 130 y 150 millones de personas infectadas con el VHC. Se destaca además que entre 300.000 y 500.000 personas mueren anualmente por enfermedades hepáticas relacionadas con VHC.<sup>6</sup>

En la actualidad, el tratamiento habitual para la hepatitis C es una combinación de terapia antivírica con interferón y ribavirina, eficaz contra todos los genotipos de virus de la hepatitis (pangenotípica). Lamentablemente, el interferón no está fácilmente disponible en todo el mundo y algunos pacientes tienen intolerancia a ese fármaco. Esto significa que la gestión del tratamiento es compleja y que muchos pacientes no lo terminan. A pesar de esas limitaciones, el tratamiento con interferón y ribavirina siguen constituyendo pilares de la triple terapia antiviral utilizada en la actualidad.

Con los progresos científicos, en los últimos años, se han generado nuevos fármacos antivíricos contra la hepatitis C mucho más eficaces, seguros y mejor tolerados que las terapias precedentes. Esos fármacos, conocidos como agentes antivíricos orales de acción directa simplifican el tratamiento del VHC, dado que reducen considerablemente las necesidades de seguimiento y aumentan las tasas de curación. Aunque los costos de producción de estos agentes antivíricos son bajos, los precios inicialmente fijados por los fabricantes son muy elevados y probablemente, dificultarán el acceso incluso en países de ingresos altos. El tratamiento antivírico logra buenos resultados en el 50-90% de los casos, en función del tratamiento aplicado y ha mostrado eficacia para limitar el desarrollo de cirrosis y cáncer de hígado.<sup>7</sup> Sin embargo los casos y las muertes secundarias al VHC siguen aumentando en los países occidentales, debido a diagnósticos tardíos o fracaso de los tratamientos disponibles<sup>6</sup>. Por ello, en nuestro medio, la cirrosis por VHC en situación terminal con o sin hepatocarcinoma, sigue siendo la primera causa de trasplante hepático (50%), seguido de la cirrosis secundaria al consumo crónico de alcohol (30%).<sup>8-9</sup> Además, en un 30% de los pacientes con cirrosis por VHC candidatos a trasplante hepático existe un consumo de alcohol importante antes del mismo.<sup>10-11</sup>

El pronóstico post-trasplante en los pacientes con cirrosis por alcohol es bueno, alcanzando una supervivencia del 60% a los 10 años.<sup>12</sup> Por el contrario, en pacientes infectados por el VHC, la recidiva de la hepatitis C post-trasplante es universal y su evolución es agresiva en una proporción relativamente importante (progresión a cirrosis en el 30% de los pacientes a los 5 años) condicionando tasas de supervivencia inferiores al 65% a los 5 años en nuestro medio.<sup>13-15</sup> La evolución post-trasplante en los pacientes con cirrosis por etiología mixta es un hecho poco descrito en la literatura.<sup>16-22</sup>

### 1.1.2 VIRUS DE LA HEPATITIS C:

### 1.1.3 CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS:

El virus de la hepatitis C fue descubierto en 1.988 por un grupo de investigadores de Chiron Corporation (Emerylle, California).<sup>23</sup> El VHC pertenece a la familia Flaviviridae, que incluye patógenos que afectan a humanos y animales.<sup>24</sup> La familia Flaviviridae está compuesta, al menos, por 3 géneros diferentes; los pestivirus, entre los que se encuentra el virus de la diarrea bovina, los flavivirus, principales causantes de enfermedades virales transmitidas por artrópodos (como el dengue o la fiebre amarilla) y, finalmente, los heparivirus, cuyo único miembro es el virus de la hepatitis C.<sup>25</sup>

El VHC es un virus cuyo genoma está compuesto por una única cadena ARN de polaridad positiva que contiene 9.600 nucleótidos. Este genoma codifica una poliproteína de unos 3.000 aminoácidos sobre la que actúan las proteasas (virales y del huésped) para dar como resultado a 10 proteínas diferentes que se dividen en dos grupos: proteínas estructurales (proteínas de la nucleocápside y dos glicoproteínas de membrana) y proteínas no estructurales, con actividad enzimática entre las que se encuentra la polimerasa implicada en la replicación viral.<sup>26</sup>

El VHC es un virus de pequeño tamaño que a pesar de que su estructura no se conoce totalmente, algunos estudios han mostrado que la partícula viral tiene un tamaño de unos 30-60 nm de diámetro.<sup>27, 28</sup> El genoma está flanqueado por 2 regiones no codificantes, altamente conservadas. Estas regiones no codificantes del virus son denominadas 5'UTR y 3'UTR.

La **región 5'UTR** es una secuencia larga al principio del genoma<sup>5</sup>, que junto con la porción inicial del gen del core viral son las porciones más conservadas (*utilizadas, por tanto, para genotipado, como para marcador de PCR*). La región 5'UTR contienen unos 340 aminoácidos y su principal segmento está constituido por 300 aminoácidos, y confirman el dominio de entrada al ribosoma en el inicio de la replicación. Ésta puede ser la razón por la cual el VHC inicia la traducción de sus proteínas mediante un mecanismo único y parecido al de los procariotas.<sup>29</sup>

La **región 3'** consta de varios segmentos (región 3' final, una región Poliu y una región altamente conservada de 98 nucleótidos: cola 3'X). De ellos el más conservado es la región 3 final, que se corresponde con el sitio de reconocimiento de la replicasa durante la iniciación de la síntesis de la cadena negativa del ARN, *mostrando un papel importante en la replicación viral*.

El genoma se traduce en un único marco de lectura que codifica una gran poliproteína de 3.000 aminoácidos que es hidrolizada por proteasas del huésped inducidas en proteínas estructurales (E) y no estructurales (NS). Dichas proteínas incluyen la del nucleocápside viral (p21), las 2 proteínas de envoltura E1 (gp31) y E2 (gp70) y una proteína transmembranaria (p7). Entre los genes *E1* y *E2* se sitúan unas regiones denominadas hipervariables (HVR1 y HVR2) que permiten al VHC establecer un sistema de escape al sistema inmunitario y condiciona la aparición de infecciones persistentes. La región NS, codifica 6 proteínas implicadas en la replicación de ARN viral.

Las **proteínas E** son el core y las proteínas de la envoltura. La *proteína del core* que se localiza en el extremo amino terminal, es altamente básica y formaría la cápside. Las *glicoproteínas de envoltura* son E1 y E2. Las variaciones de ambas, causadas por mutación aleatoria y selección de variantes de escape al sistema inmune, han sido muy estudiadas para el posible desarrollo de vacunas<sup>30</sup>.

E1, podría dificultar la obstrucción de la respuesta inmune innata. E2, contiene una secuencia idéntica a los sitios de fosforilación de la proteína kinasa inducible por interferón (IFN) o PKR y al factor de iniciación de traducción eIF2 (diana de la PKR).<sup>31</sup> La proteína E2 contiene dos regiones hipervariables (HVR-1 y HVR-2), siendo la primera la región más variable del genoma.<sup>32</sup> Se cree que la selección de mutantes de esta región implica el escape viral a los anticuerpos neutralizantes. HVR-2 se compone de 7 aminoácidos, todos ellos variables. No se conoce su función, pero contiene un presunto sitio de glicosidación.<sup>33</sup>

El **polipéptido p7** es una proteína intrínseca de membrana de 63 aminoácidos, que expone sus extremos N-terminal y C-terminal en el lumen del retículo endoplasmático (RE) y que parece tener actividad de péptido señal interno.<sup>34</sup>

Las **proteínas no estructurales** se denominan *NS2*, *NS3*, *NS4* y *NS5b* e incluyen la helicasa, la proteasa y polimerasa virales (**Fig. 1**). La *proteína NS2* es una proteína transmembrana, con el extremo carboxi-terminal translocado en el lumen del RE y el amino-terminal en citosol.<sup>35</sup> Su función biológica concreta es desconocida.



La *proteína NS3* tiene un peso molecular de unos 70 Kd, y diversas funciones bioquímicas, las principales de las cuales son la serínproteasa y la helicasa.<sup>36</sup> La serínproteasa NS3 se encargan del procesamiento proteolítico de la poliproteína vírica.<sup>37</sup> Media la proteólisis de NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a y de NS5a/NS5b. La proteína NS3 posee motivos característicos de actividades de helicasa de ARN, fundamentales para la replicación del virus.<sup>38</sup> Esta es una buena diana para terapia antivírica.

La *región NS4* contiene dos proteínas: NS4a y NS4b.<sup>39</sup> La *NS4a* interviene en el anclaje del complejo de replicación y como cofactor de NS3. La *NS4b* parece que interviene en el complejo de replicación.

La *región NS5* contiene dos proteínas: NS5a y NS5b. La *NS5a* se libera por acción de NS3 y NS4a y su función aún es poco conocida. Tiene una zona conocida como región determinante de la sensibilidad al Interferón (ISDR-V3), donde el número de mutaciones podría determinar la sensibilidad al tratamiento.<sup>41</sup> El mecanismo celular implicado puede ser una interacción directa de NS5a con la proteína quinasa inducida por interferón (PKR). La *NS5b*, también se libera por acción de NS3 y NS4a. Posee una secuencia muy conservada en virus de ARN.<sup>41</sup>

La falta de un sistema de corrección de errores de replicación, provoca que la estructura genética de este virus se componga de cuasiespecies. Esta es una de las posibles causas de evasión del sistema inmune, mediante la emergencia de mutantes de escape.<sup>42</sup>

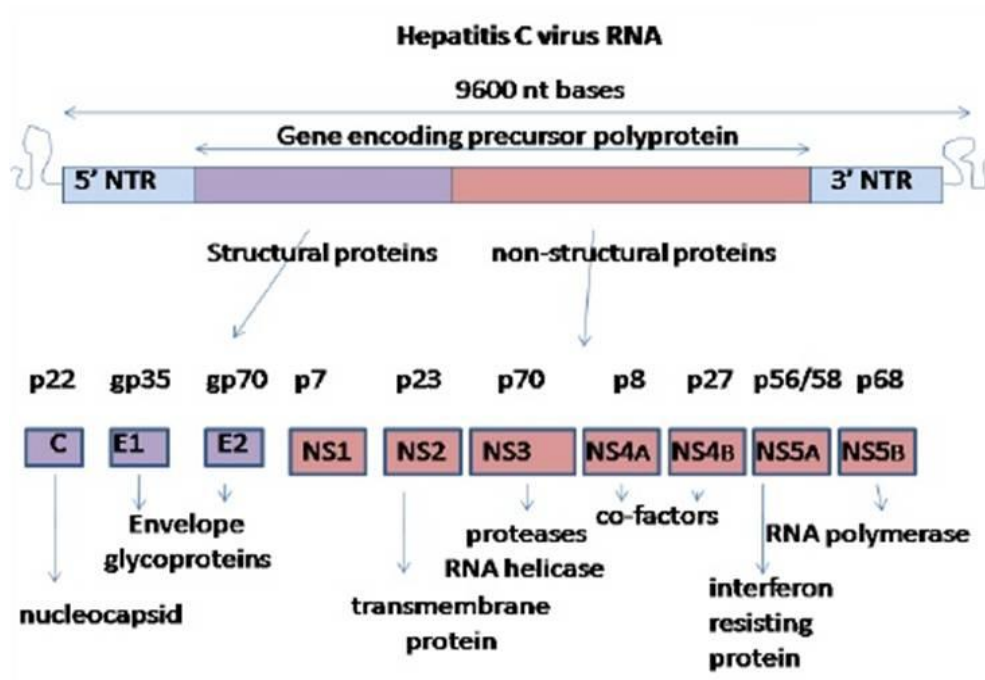


Fig1: Organigrama genómico del virus hepatitis C.

#### 1.1.4 GENOTIPOS Y CUASIESPECIES.

Una de las características más importantes y con mayores implicaciones en la patogenia de la hepatitis C es la gran heterogeneidad genética del VHC.<sup>43, 44</sup> Esta complejidad genómica es el resultado de la acumulación de mutaciones durante la replicación viral. Como otros virus ARN, el VHC no cuenta con enzimas responsables de corregir los posibles errores que se producen durante la replicación, lo que se traduce en una alta tasa de mutaciones. Algunos estudios han estimado que esta tasa se sitúa en 103-104 sustituciones de base por «lugar genómico» por año.<sup>45, 46</sup> Esta heterogeneidad genética del VHC se ha descrito bajo dos conceptos: los genotipos y las cuasiespecies.<sup>47</sup>

El genotipo hace referencia a la heterogeneidad genética existente entre los diferentes aislados de VHC en áreas geográficas diversas y refleja la acumulación de mutaciones durante un largo período de la evolución de estos virus. En cambio, las cuasiespecies son la traducción de la heterogeneidad genética en un determinado individuo.

Los análisis genéticos del VHC han demostrado la existencia de al menos 6 genotipos diferentes. Las diferencias entre estos pueden llegar al 35% de la secuencia nucleotídica. La mayoría de los aislados se puede incluir dentro de los principales genotipos, que se designan con números arábigos (1, 2, 3, 4, 5 y 6). A su vez, dentro de cada genotipo existen subgrupos con pequeñas diferencias entre sí, conocidos como subtipos, a los que se les asigna una letra (a, b, c, etc.).

Los diferentes genotipos pueden aparecer en cualquier parte del mundo, pero existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica.

Por ejemplo, los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a constituyen el 90% de todas las infecciones por el VHC en toda América, Europa, China, antigua Unión Soviética, Japón, Australia y Nueva Zelanda. Los genotipos 1a y 1b son los causantes del 40% de todas las infecciones por el VHC en los EE.UU.

El genotipo 1b es especialmente prevalente en el sur y este de Europa y también lo es en China y Japón. El genotipo 3 es altamente prevalente en zonas de Nepal, Bangladesh, India y Pakistán. En Egipto existe una alta prevalencia del genotipo 4a y tanto éste como otros subtipos del genotipo 4, se pueden encontrar más frecuentemente en África central. En Sudáfrica, el genotipo 5 es el causante de alrededor del 50% de las infecciones por el VHC. Por último, el genotipo 6 se encuentra especialmente en el sudeste asiático. A pesar de las variaciones geográficas, es importante remarcar que existen diferencias dentro de una misma área según los diferentes grupos de población. Así, en los países occidentales destaca la mayor prevalencia del genotipo 3a entre los jóvenes, especialmente entre aquellos que son usuarios de drogas por vía parenteral.<sup>11</sup>

Los diferentes genotipos se han asociado con la tasa de respuesta al tratamiento con interferón y también a la combinación de interferón y rivabirina. Así pues, los pacientes infectados con virus del genotipo 1, en particular el subtipo 1b, responden peor al tratamiento que los infectados con genotipos 2 ó 3. En nuestro medio, el 80-90% de las infecciones se deben al genotipo 1b. También las personas infectadas con virus de los genotipos 4 y 5 tienen un bajo índice de respuesta. Por el contrario, las mejores respuestas se producen en los infectados por los genotipos 2 y 3, que se han distribuido con mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes con antecedentes de adicción a drogas por vía endovenosa.

### 1.1.5 EPIDEMIOLOGÍA.

La prevalencia mundial de la infección por el VHC es aproximadamente del 1-2%. Sin embargo, tiene una amplia variabilidad geográfica. En España, la prevalencia en individuos sanos se estima aproximadamente en un 1%.<sup>48-50</sup>

### 1.1.6 MODO DE TRANSMISIÓN:

#### Parenteral:

La exposición percutánea directa a través de la sangre y hemoderivados, trasplante de órganos o uso de jeringuillas compartidas entre los ADPV, constituye la vía de transmisión más eficaz del VHC. Hasta disponer del primer test serológico para el VHC, la principal causa de hepatitis post-transfusional era el VHC.<sup>51</sup> Con la generalización del uso del test serológico para el VHC en 1.990, el riesgo de hepatitis transfusional disminuyó de forma llamativa.<sup>52</sup> El contagio por vía parenteral es el responsable de la alta prevalencia de infección por VHC en drogadictos, hemofílicos o pacientes en programas de hemodiálisis.<sup>53</sup>

En el trasplante de órganos, el riesgo de transmisión de infección VHC de un donante anti-VHC positivo y ARN-VHC sérico positivo a un receptor sin infección es del 100%. La tasa se reduce al 50% si el donante es ARN-VHC negativo.<sup>54</sup> Los profesionales sanitarios también tienen un riesgo superior de infección en relación con pinchazo, cortes o inoculaciones accidentales.<sup>55,56</sup> Las exploraciones médicas y dentales, antes del uso de materiales no desechables, también ha supuesto un mecanismo de transmisión relevante.<sup>57</sup>

### No parenteral:

Hasta en un 40% de los pacientes con VHC no existe evidencia de contagio parenteral. Aunque posiblemente, bastantes de estos casos se deban a inoculaciones parenterales inadvertidas, estos datos sugieren la posible existencia de mecanismos de contagio distintos de la inoculación parenteral. El contagio por vía sexual parece existir aunque con un riesgo mucho menor que con otros virus, como el VHB o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).<sup>58</sup> El riesgo varía según el tipo de relación sexual siendo más baja en parejas monógamas (0-0,06 por año) que en personas con múltiples parejas o conductas de riesgo para la adquisición de enfermedades de transmisión sexual (0,4-1,8% por año). Este riesgo de transmisión sexual aumenta en el caso de la infección por VIH.

La transmisión vertical existe pero de forma infrecuente, y sobre todo, en mujeres con títulos muy altos de ARN del VHC en suero.<sup>59</sup> Algunos trabajos han demostrado una mayor prevalencia de infección en los contactos domiciliarios sin que otros lo hayan corroborado.

### 1.1.7 HISTORIA NATURAL Y FACTORES ASOCIADOS CON PROGRESIÓN DE LA FIBROSIS. GENOTIPO DEL GEN IL28B Y RESPUESTA A TRATAMIENTO.

El periodo de incubación de la infección por VHC oscila entre las 2 y las 26 semanas, siendo en la mayoría de los casos entre 6 y 12 semanas. Habitualmente, la infección aguda por el VHC es habitualmente asintomática y por tanto, difícil de reconocer. En general, se acepta que, sólo alrededor de un 15-20% de pacientes resuelven la infección durante la fase aguda, mientras que en el 80-85% restante, la infección se hace crónica y la viremia persiste.<sup>2, 60</sup>

Una vez se establece la infección, ocasiona en la mayoría de los pacientes una lesión hepática con diferentes grados de fibrosis y de actividad inflamatoria. Mientras que la actividad inflamatoria que causa en el hígado tiene un carácter fluctuante, el estadio de fibrosis parece ser progresivo y en ocasiones irreversible. Tanto la evolución como el espectro clínico son muy variables y mientras que algunos evolucionan a cirrosis y/o hepatocarcinoma otros no desarrollan complicaciones.<sup>61, 62</sup>

Hasta la fecha, los estudios sobre la historia natural son muy heterogéneos en cuanto a la población estudiada y el diseño, sin existir el diseño ideal (aquel que incluyese pacientes con momento de infección conocido y seguimiento a largo plazo sin tratamiento). En uno de los estudios con mayor número de pacientes realizado por Poynard y cols.<sup>62</sup> y utilizando el sistema semicuantitativo (METAVIR), incluyó un total de 2.235 pacientes con hepatitis C crónica, obteniendo una mediana de progresión calculada de 0,133 unidades de METAVIR/año, estimándose una progresión a la cirrosis en unos 30 años.<sup>4</sup>

Diversos estudios epidemiológicos transversales y longitudinales han permitido definir ciertos factores clínicos asociados con la velocidad de desarrollo de la fibrosis en la hepatitis C.<sup>63</sup> Entre estos factores existen algunos dependientes del virus, otros dependientes del huésped y otros dependientes del ambiente.

Entre los factores *dependientes del virus*, varios estudios sugirieron una asociación entre mayor progresión histológica y cargas virales elevadas o genotipo. Actualmente, estas dos asociaciones parecen estar descartadas. Así, existen pacientes con transaminasas normales y escasa lesión histológica pero con cargas virales muy altas<sup>63</sup> y por el contrario, pacientes con hepatopatía avanzada y viremia prácticamente indetectable.

Con respecto al genotipo, algunos trabajos sugirieron una mayor agresividad por parte del genotipo 1.<sup>20</sup> Estudios posteriores no han confirmado esta asociación. Probablemente los pacientes infectados por el genotipo 1 tengan una duración de la enfermedad más larga, que contribuya a esta mayor lesión hepática.<sup>64</sup>

Algunos estudios han sugerido que la alta capacidad mutagénica en forma de cuasiespecies y semiespecies, que permite escapar al sistema inmunitario se relacione con una mayor agresividad hepática, ya que pacientes que resuelven la infección tienen menor número de cuasiespecies que los que no la resuelven.<sup>65</sup> Pese a estos resultados se necesitan más estudios para llegar a explicar la variabilidad en la historia natural de la infección por VHC.



Los factores *relacionados con el huésped*, tales como la edad en el momento de la infección y el sexo varón son dos factores con alta capacidad determinante de la historia natural de la hepatitis C. Así, la infección en edades tardías se relaciona con una evolución más agresiva de la hepatopatía<sup>66-67</sup> mientras que la infección en edades tempranas se asocia con mejor evolución.<sup>68-69</sup>

Otros factores, como el índice de masa corporal (IMC),<sup>70</sup> el consumo de alcohol y el estado de inmunosupresión, también han sido relacionados con la progresión de la enfermedad hepática. Los pacientes inmunodeprimidos con infección VIH tienen una progresión acelerada de la enfermedad hepática.<sup>71</sup> De hecho, actualmente con la terapia TARGA (tratamiento anti-retroviral de gran actividad), la infección VIH está aceptablemente controlada y, sin embargo, los enfermos mueren por la enfermedad hepática asociada al VHC, dado que un porcentaje elevado (30%) de los enfermos presentan coinfección VHC-VIH.

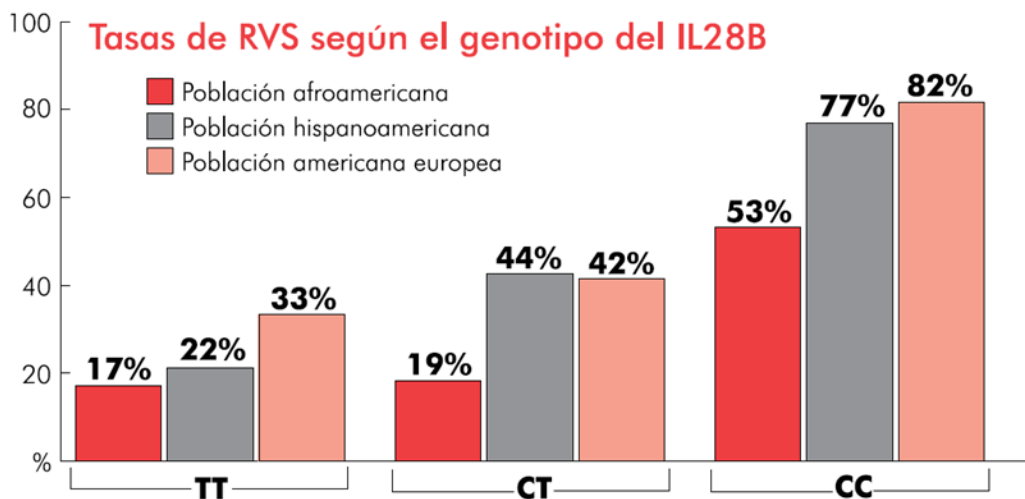
Los pacientes trasplantados requieren una terapia inmunosupresora habitualmente de por vida. Este hecho también se asocia con una progresión más acelerada de la hepatitis aunque otros factores, tales como la edad del donante, la esteatosis del donante, el sexo y la viremia tras el trasplante contribuyen igualmente con la progresión más acelerada.<sup>14</sup>

Por último, factores reconocidos tras la valoración de biopsia hepática, tales como la esteatosis, la sobrecarga férrica, la misma actividad necroinflamatoria y la fibrosis, se han relacionado con una mayor progresión de la enfermedad.<sup>70-72; 11-12</sup>

Existen diversos factores que ayudan a predecir la probabilidad de curarse (es decir, de obtener una *respuesta virológica sostenida* o *RVS*) con el tratamiento basado en interferón pegilado (IFN-PEG) y ribavirina (RBV).

Dos de los factores de predicción de la RVS más importantes están relacionados con el virus: la cantidad de VHC que existe en sangre (lo que se conoce como *carga viral*) y la cepa del virus de la hepatitis C (también conocida como *genotipo*).

El uso de IFN-PEG y RBV tiene menos eficacia en la población afroamericana o en personas de origen africano que en personas de otras razas o etnias (**Fig. 2**). De forma reciente, se ha descubierto que esto se debe sobre todo aunque no totalmente a un factor hereditario (*genético*), el gen de la interleuquina-28B (IL28B).



Adaptado de: Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature. 2009 Sep 17;461(7262):399-401. doi: 10.1038/nature08309.

**Fig. 2** Tasa de RVS según el genotipo del IL28B.

El gen IL28B está implicado en la respuesta inmunitaria a determinados virus, incluyendo el del VHC. Existen tres subtipos del IL28B (denominados *genotipos*): CC, CT y TT. Las personas con el genotipo CC presentan una respuesta inmunitaria más potente frente a la infección por VHC que las que tienen los genotipos CT o TT (también denominados *genotipos no-CC*). Esta respuesta inmunitaria hace que las personas que presentan un genotipo CC tengan más probabilidades de aclarar el VHC sin tratamiento (*aclaramiento viral espontáneo*) en los primeros meses de la infección. Las personas con un genotipo CC también son de dos a tres veces más propensas a curarse con IFN-PEG y RBV, con independencia de su origen étnico o su estado serológico al VIH.

La incorporación de uno de los nuevos fármacos orales (Sofosbuvir y Simeprevir) contra el VHC (denominados *antivirales de acción directa* o DAA) al régimen de IFN-PEG y RBV, o su empleo como parte de una combinación de DAA, aumenta las tasas de RVS en personas con genotipos no-CC, con independencia de su origen racial o étnico.

Todavía no está claro si el genotipo IL28B tiene una gran influencia sobre las tasas de curación usando DAA sin interferón pegilado, o si los DAA son mejores para las personas con dichos genotipos del gen IL28B. Independientemente del genotipo IL28B que se determine, es importante medir la carga viral 4 o 12 semanas después del inicio del tratamiento. Las personas con una carga viral del VHC indetectable a las semanas 4 o 12 tienen más posibilidades de curarse, en especial si presentan el genotipo IL28B CC. El genotipo IL28B no puede ser usado para denegar el tratamiento anti-VHC.

### 1.1.8 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico virológico de la infección activa por el VHC se basa en la combinación de la determinación por enzimo-inmunoanálisis (EIA) de anticuerpos específicos (anti-VHC) y técnicas para la determinación cualitativa o cuantitativa de marcadores de replicación viral.

Los anti-VHC indican exposición al virus, pero no confirman una infección activa, ya que suelen persistir indefinidamente tras su resolución espontánea o terapéutica. En cambio, la detección de marcadores de replicación viral confirma la infección activa, por lo que resultan esenciales para el diagnóstico de la infección aguda o crónica y para el control de la respuesta al tratamiento antiviral.

Por lo tanto, el diagnóstico de la infección crónica por VHC se realiza mediante pruebas serológicas utilizadas como screening y técnica de diagnóstico inicial así como por medio de la utilización de test serológicos los cuales son necesarios para confirmar la infección activa (replicación viral) y monitorizar los efectos del tratamiento.

Las recomendaciones de las Guías Clínicas<sup>73</sup> para diagnóstico de hepatitis aguda y crónica por VHC son la realización de Marcadores virológicos para la detección de anticuerpos y Ag del VHC y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

### PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DISPONIBLES<sup>73</sup>

Anti- VHC (anticuerpos totales)

Anti- VHC (RCP y AMT) pruebas confirmatorias

ARN- VHC (carga viral)

VHC genotipificación

Agc VHC (antígeno del core del VHC)

### Técnicas de detección del ARN del VHC circulante:

La detección del ARN o su señal requiere el uso de técnicas moleculares para su amplificación por el bajo nivel de virus circulante.<sup>74 -79</sup> Las técnicas de amplificación de diana consisten en la síntesis de numerosas copias (ampliaciones) del genoma viral mediante una reacción enzimática cíclica. Esta puede ser de dos tipos: la reacción en cadena de polimerasa (RCP), en la que, tras la retro transcripción del ARN en ADN, las ampliaciones generadas son ADN de doble cadena; y la amplificación isotérmica mediada por transcripción (AMT), en la que las copias del genoma son moléculas de ARN de cadena simple. En ambos casos, la identificación del producto amplificado se basa en su hibridación a oligonucleótidos sintéticos fijados a una fase sólida, seguida de la detección de los híbridos mediante una reacción enzimática sobre un sustrato colorimétrico o luminiscente.

### Tipos de técnicas de amplificación:

a) Técnicas de amplificación de diana por RCP: Pueden ser cualitativas o cuantitativas.

La mayoría de estas últimas se basan en la coamplificación por RCP "competitiva" del ARN viral con cantidades conocidas de un estándar sintético en el mismo tubo.

Las cantidades relativas de ampliaciones de ARN viral y estándar sintético son cuantificadas al final de la reacción y los resultados extrapolados a partir de una curva estándar generada en paralelo.

En la última década, se han desarrollado técnicas de RCP "en tiempo real" basadas en la detección de las ampliaciones durante la fase exponencial de la reacción de RCP en lugar de al final de ésta. Estas técnicas, que emplean sondas marcadas con fluorocromos, cuya emisión puede detectarse al inicio de la fase exponencial, son más sensibles, tienen menor riesgo de contaminación por arrastre y, sobre todo, un rango dinámico de cuantificación (rango de niveles de ARN de la muestra original en el que la cuantificación es lineal) mucho más amplio, lo que las hace especialmente útiles para el control del tratamiento antiviral.

b) Técnicas de amplificación de señal: se basan en la hibridación del ARN viral sobre oligonucleótidos de captura fijados a una fase sólida, seguida de la fijación de sondas de "ADN ramificado" (ADNr) que, a su vez, capturan múltiples oligonucleótidos marcados con una enzima que actúa sobre un sustrato luminiscente. Al igual que con las técnicas de PCR, la cuantificación se realiza por comparación con una curva estándar generada simultáneamente.

#### Métodos disponibles para detectar y cuantificar ARN de VHC:

a) Ensayos cualitativos: La detección cualitativa del ARN viral mediante técnicas de amplificación de diana (RCP o AMT) continúa siendo útil, ya que los métodos disponibles son más sensibles que la mayoría de técnicas cuantitativas.

Hay dos técnicas comerciales para la detección cualitativa del ARN viral basadas en RCP y AMT. La especificidad de ambas es cercana al 99%.

b) Ensayos cuantitativos: La OMS ha establecido un patrón de referencia para la estandarización de los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas.<sup>80</sup>

En la actualidad, los resultados de todos los métodos se calculan en unidades internacionales por mililitro (U/l). La cuantificación de ARN puede hacerse tanto en suero como en plasma, siempre que éste no contenga heparina.

Una vez obtenida, la muestra de sangre debe centrifugarse y el suero o plasma separado del coágulo o los hematíes en un plazo no superior a 3 h y guardarse congelado a -20 °C (-80 °C para almacenamiento prolongado). Las muestras para cuantificación no deben someterse a nuevos ciclos de congelación y descongelación. Es imprescindible la estricta observancia de estas normas para la correcta interpretación de los resultados.

Los límites inferiores de detección de las diversas técnicas oscilan entre 15 y 615 U/ml., mientras que el límite superior varía entre 200.000 y 7.700.000 U/ml. Se consideran sensibles las capaces de detectar menos de 15 U/ml. Cuando el valor de ARN en la muestra supera el límite superior del rango dinámico, ésta debe probarse de nuevo diluida al 1:100 para su precisa cuantificación.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para cuantificar el ARN de VHC tiene un rango dinámico cuyo límite superior no alcanza la mediana de carga viral de los pacientes con infección crónica. Con esta técnica, todas las muestras basales deben probarse directamente diluidas al 1:100.<sup>81</sup>

La especificidad de las técnicas es del 98-99% y es independiente del genotipo de VHC. Sin embargo, con cualquiera de ellas no deben tenerse en cuenta variaciones inferiores a 0,5 logaritmos, ya que pueden corresponder a la variabilidad intrínseca del método.

Variaciones en las condiciones de obtención y almacenamiento de las muestras y en la experiencia con el uso de las distintas técnicas explican los amplios coeficientes de variación obtenidos con los métodos cuantitativos en evaluaciones multicéntricas de paneles estandarizados.

#### Técnicas de detección de antígeno core del VHC circulante:

La determinación del antígeno core, producto de los primeros 191 aminoácidos de la poliproteína codificada por el genoma viral y que se polimeriza para formar junto al ARN la nucleocápside viral, requiere la disgregación de los inmunocomplejos circulantes y su captura y detección por enzimoimmunoanálisis (EIA) mediante anticuerpos monoclonales.<sup>79</sup>

#### Ensayos para detección y cuantificación de antígeno core de VHC:

El antígeno core puede detectarse y cuantificarse con un EIA comercial (Track-C, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ). El valor de antígeno (pg. /ml.) se correlaciona bien con el de ARN circulante, estimándose que 1 pg. de antígeno equivale a un promedio de 8.000 U de ARN, aunque esta relación es muy variable entre pacientes.<sup>82</sup>



La técnica es incapaz de detectar antígeno en muestras con valores de ARN inferiores a 20.000 U/ml., lo que limita su utilidad para el control de la respuesta al tratamiento o para el diagnóstico cuando el grado de replicación es bajo. Su principal ventaja es su simplicidad, por lo que es útil cuando no se dispone de infraestructura adecuada para determinar ARN.

#### Métodos serológicos:

Las pruebas serológicas que detectan anticuerpos frente al VHC como método diagnóstico de la infección por VHC utilizan antígenos, bien recombinantes o sintéticos, derivados de las diversas regiones del genoma viral. La elección de los antígenos ha ido mejorando con el tiempo, consiguiéndose mejorar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas.

En los tests de primera generación se utilizaba la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que incluía el antígeno c100-3<sup>83</sup>, codificado por la región NS4 del genoma viral, y una prueba confirmatoria (RIBA-1).<sup>84</sup> Estos test no se positivizaban hasta pasadas varias semanas o incluso meses desde el contagio, con escasa sensibilidad y especificidad.

Los test de segunda generación (ELISA II) detectan anticuerpos frente a un antígeno híbrido recombinante que incluye proteínas estructurales, sobre todo la c-22-3 (de la región del core) y no estructurales como la c-200, combinación de los productos de las regiones NS3 (c33) y NS4 (c100)<sup>85</sup> o la proteína correspondiente a la región NS5.<sup>86</sup>

En los pacientes de alto riesgo, una prueba ELISA II positiva es prácticamente sinónima de infección.

Por el contrario, en sujetos de bajo riesgo, los resultados positivos de ELISA II deben confirmarse con pruebas de confirmación que incluye la prueba confirmatoria RIBA-2 que incluye 4 antígenos virales (c22-3, c33c, c100-3 y 5-1-1) existiendo alta correlación entre la positividad de dos o más bandas y la viremia.

^

Por último, los métodos ELISA de tercera generación (ELISA 3) incorporan péptidos sintéticos de la nucleocápside (c22c) y de la región NS4 (c100-3) y un antígeno de la región NS5.<sup>86</sup> La introducción de estos test tan sensibles en los bancos de sangre ha llevado a la práctica eliminación del VHC post-transfusional. La prueba de confirmación RIBA-3 parece ser más específica que la RIBA-2, con menos resultados indeterminados.<sup>87</sup>

#### Determinación de los genotipos:

a) Métodos serológicos: consisten en una técnica de inmuno-ensayo que detecta anticuerpos frente a los serotipos del VHC.

b) Métodos de biología molecular: Puede detectarse por técnicas de RCP. La más usada en la práctica clínica consiste en el análisis de la hibridación en reverso mediante sondas específicas de cada genotipo. El patrón oro consiste en la secuenciación directa de las regiones NS5B o la E1 seguida de la alineación de la secuencia de referencia y análisis filogenético.<sup>88</sup>

### Cinética de los marcadores de replicación del VHC:

La presencia de ARN viral circulante puede detectarse dentro de las primeras 2 semanas tras la exposición y su nivel aumenta hasta alcanzar un máximo antes de la aparición de los signos biológicos de hepatitis aguda. Luego desaparece rápidamente en los casos que resuelven la infección espontáneamente (15-30% de casos) o desciende hasta estabilizarse en los que desarrollan infección persistente.

No es infrecuente que, durante la fase aguda de la hepatitis, el ARN sea indetectable durante semanas para reaparecer posteriormente y establecer infección persistente. *Durante la infección crónica, los valores de ARN son muy estables<sup>74</sup> y no guardan relación con la gravedad de la lesión hepática.<sup>75</sup>* La presencia de antígeno del core (cápside) del VHC en sangre, marcador fiable (aunque mucho menos sensible) de replicación viral, aparece 1-2 días después que el ARN tras la infección y sus variaciones suelen ser paralelas a las del ARN durante la infección aguda y crónica.<sup>76</sup>

## *1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA Y LA FIBROSIS.*

### **1.2.1 FIBROSIS. PATOGENIA Y GENERALIDADES.**

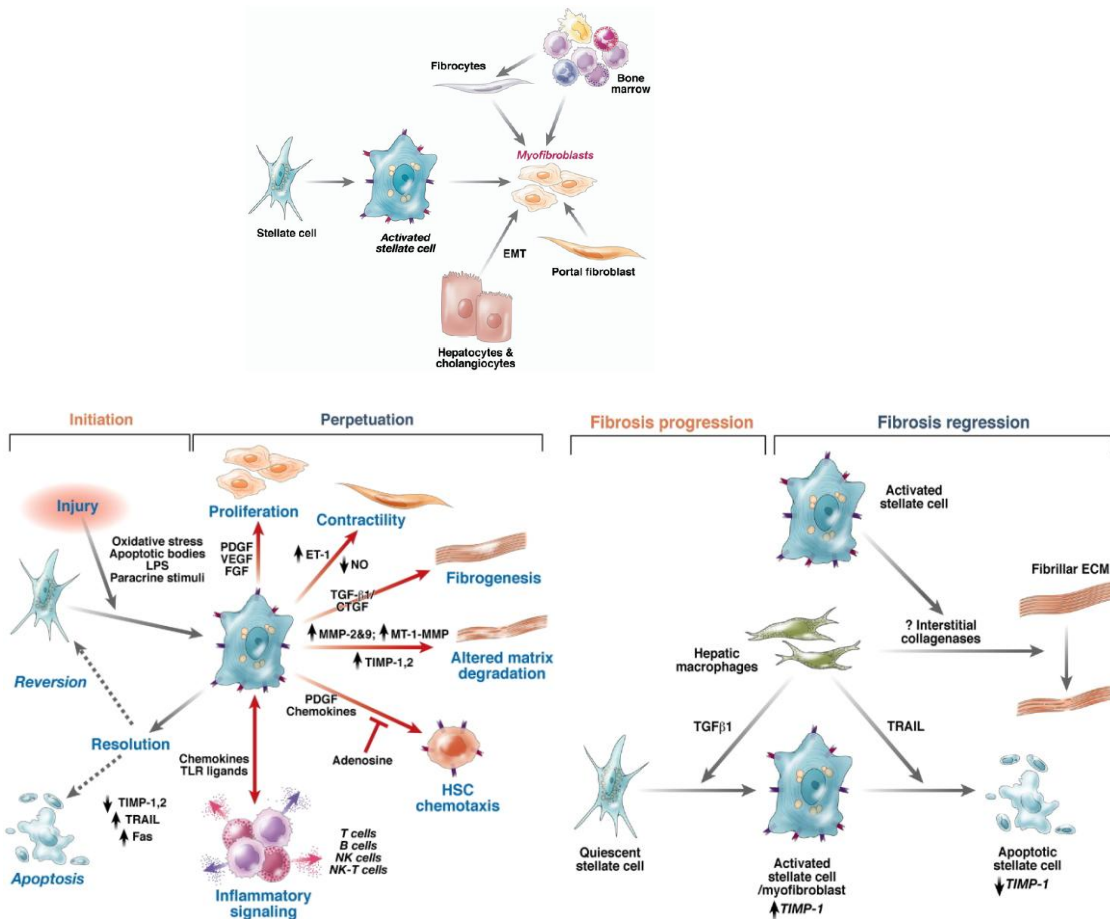
La fibrosis hepática es el resultado de la respuesta biológica del parénquima glandular a una agresión crónica con el consiguiente remodelado de la estructura del hígado. Así, en los pacientes con infección crónica por el (VHC) el hígado responde al daño producido por este agente externo, desarrollando una respuesta inflamatoria con aparición de fibrogénesis. Inicialmente, la fibrogénesis es un proceso dinámico que trata de reparar el daño originado por una agresión externa y que se caracteriza por la síntesis de moléculas de la matriz extracelular, proteínas (colágeno y elastina), glicoproteínas (fibronectina y laminina) y proteoglicanos organizados e interconectados. Esta síntesis está compensada y modulada en su desarrollo por los mecanismos de fibrinólisis que destruyen esta matriz.<sup>89-90</sup>

Estos mecanismos no órgano-específicos, tienen como objetivo detener el daño producido por las agresiones externas. Sin embargo, cuando se perpetúan en el tiempo, tienen como resultado un desbalance entre fibrogénesis y fibrinólisis a favor de la fibrogénesis y en consecuencia, una acumulación de matriz extracelular que origina una alteración y destrucción de la arquitectura hepática.<sup>90-91</sup>

En resumen, la fibrogénesis, inicialmente desarrollada por el organismo como un proceso defensivo y beneficioso, puede llegar a ser perjudicial para este si persiste la agresión externa. La fibrogénesis está directamente relacionada con la activación de las células estrelladas hepáticas.<sup>92</sup>

En presencia de daño hepático, estas células adquieren un fenotipo similar al de los fibroblastos y producen y remodelan la matriz extracelular.<sup>90</sup>

Varios factores se han implicado en la fibrogénesis hepática: citoquinas, quimioquinas, receptores de matriz extracelular, moléculas de adhesión, endotelina, norepinefrina, inhibidores de metaloproteinasas y factores de crecimiento.<sup>92</sup> El TGF- $\beta$  (platelet derived growth factor) y citoquinas como la Interleuquina (IL) 10, la IL-13 y la angiotensina II, juegan asimismo un papel relevante en la activación de las células estrelladas<sup>92</sup> (**Fig. 3**).



**Fig. 3:** Papel relevante de la activación de las células estrelladas, conjuntamente con otras células del tejido fibroblástico, en el proceso de fibrogénesis desde la fase inicial a la fase de regresión.<sup>92</sup>

## 1.2.2 DISTINTOS MÉTODOS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA Y LA FIBROSIS.

La biopsia hepática es la prueba fundamental en la evolución natural de la infección VHC, para evaluar la extensión de la actividad necroinflamatoria y de la fibrosis (FH).

Varias herramientas están disponibles para el patólogo para evaluar la fibrosis hepática en la biopsia. Distintos sistemas de puntuación semicuantitativa de complejidad creciente que evalúan la fibrosis han sido propuestos. Estos se basan en un limitado número de patrones morfológicos bien caracterizados. Sin embargo, la evaluación cualitativa de la FH y de la actividad se ve muy limitada por la variabilidad inter observador.

Sin duda la necesidad de realizar una evaluación objetiva de los hallazgos de fibrosis y actividad en los ensayos clínicos controlados de regímenes terapéuticos, ha sido el motor que ha desarrollado numerosos sistemas de estadiaje o gradación de las lesiones anatomopatológicas.

Entre los hallazgos anatomopatológicos deben diferenciarse dos aspectos importantes: el grado de actividad necroinflamatoria (“grado” de enfermedad) y la cantidad de fibrosis o desde otra perspectiva la valoración de los cambios arquitecturales y la presencia de cirrosis (“estadio” de enfermedad). El grado de inflamación puede fluctuar con el tiempo, mientras que el estadio de fibrosis es consecuencia del proceso de necrosis.

Dentro de los sistemas de graduación habitualmente se asigna una puntuación numérica a cada una de las tres principales alteraciones encontradas en la hepatitis crónica viral, concretadas en:

- Inflamación de los tractos portales.
- Necrosis y apoptosis del parénquima.
- Fibrosis hepática.

De este modo, las diferentes biopsias se pueden comparar de forma más rápida y eficaz. Existen al menos cuatro problemas importantes asociados con la puntuación histológica:<sup>93</sup>

1º Aunque la puntuación puede representar una progresión lineal, las diferencias de gravedad de la lesión pueden no representarse por la puntuación.

2º Algunos sistemas de puntuación, mezclan la inflamación con la fibrosis y la puntuación total de dos biopsias puede ser la misma, sin reflejar realmente el grado de lesión histológica.

3º El resultado de la puntuación intenta extrapolar los hallazgos de un pequeño fragmento de tejido a un órgano que pesa más de 1,5 Kg. y aunque en el caso de la hepatitis crónica por virus C la lesión suele ser uniforme y difusa en todo el órgano, a diferencia de otras enfermedades como la cirrosis biliar primaria, una única biopsia y su puntuación pueden no ser representativas del órgano entero.

4° Por último cabe considerar que el pronóstico de la enfermedad no debe basarse exclusivamente en la gravedad del daño hepático en el momento de la biopsia, ya que otros factores pueden influir, en la gravedad y su evolución natural tales como son: la duración de la infección, el abuso de alcohol, etc...

Los sistemas de puntuación de los hallazgos anatomopatológicos en la biopsia hepática más importantes y más usados de la literatura son:

1. La puntuación HAI (Histology Activity Index) o Índice de Knodell<sup>94</sup> (**Tabla 1**), que muestra una puntuación combinada valorando la necrosis, inflamación y fibrosis.
2. La puntuación HAI (Histology Activity Index) modificada (también llamada Índice Ishak)<sup>95</sup> (**Tabla 2**), que evalúa la gradación de la puntuación necroinflamatoria y el estadiaje de la fibrosis por separado.
3. El sistema METAVIR<sup>96</sup> (**Tabla 3**), que también evalúa la fibrosis y actividad histológica de manera independiente.
4. El sistema de Scheuer<sup>97</sup> (**Tabla 4**), es menos completo que la puntuación HAI, dando la misma importancia a la actividad lobular y portal y agrupando las lesiones periportales y portales en una única categoría.



**TABLA 1: PUNTUACIÓN HAI (HISTOLOGY ACTIVITY INDEX) O ÍNDICE DE KNODELL.**<sup>94</sup>

<b>I. Necrosis periportal +/- en puentes</b>	
A. Ninguna	0
B. Necrosis “piecemeal” leve	1
C. Moderada necrosis “piecemeal” (<50% de la circunferencia de la mayoría de los tractos portales)	3
D. Marcada necrosis “piecemeal” (>50% de la circunferencia)	4
E. Moderada necrosis “piecemeal” más necrosis en puentes	5
F. Marcada necrosis “piecemeal” más necrosis en puentes	6
G. Necrosis multilobular	10
<b>II. Degeneración introbulillar y necrosis focal</b>	
A. Ninguna	0
B. Leve (cuerpos acidófilos, degeneración balonzante y/o focos de necrosis hepatocelular en <1/3 de lóbulos)	1
C. Moderada (afectación de 1/3 a 2/3)	3
D. Marcada (afectación de >2/3)	4
<b>III. Inflamación Portal</b>	
A. Sin inflamación	0
B. Leve (células inflamatorias en <1/3 de tractos portales)	1
C. Moderada (1/3-2/3)	3
D. Marcada (>2/3)	4
<b>IV. Fibrosis</b>	
A. Sin fibrosis	0
B. Expansión de fibrosis portal	1
C. Fibrosis en puentes (porto-portales o porto-centrales)	3
D. Cirrosis	4

**TABLA 2: PUNTUACIÓN HAI (HISTOLOGY ACTIVITY INDEX) MODIFICADA (TAMBIÉN LLAMADA ÍNDICE ISHAK).<sup>95</sup>**

<b>GRADACIÓN DE LA PUNTUACIÓN NECROINFLAMATORIA</b>	
<b>A.- Hepatitis de interfase periportal o periseptal ("piecemeal" necrosis)</b>	
Ausente	0
Leve (focales áreas portales)	1
Leve-moderada (focal, la mayoría de áreas portales)	2
Moderada (<50% de tractos o septos)	3
Grave (>50% de tractos o septos)	4
<b>B.- Necrosis confluyente</b>	
Ausente	0
Necrosis focal confluyente	1
Necrosis de la zona 3 en algunas áreas	2
Necrosis de la zona 3 en la mayoría de las áreas	3
Necrosis de la zona 3 y ocasionales puentes portal-central	4
Necrosis de la zona 3 y múltiples puentes portal-central	5
Necrosis panacinar o multiacinar	6
<b>C.- Necrosis lítica focal, apoptosis e inflamación local</b>	
Ausente	0
Un foco o menos por campo 10x	1
Dos a cuatro focos por campo 10x	2
Cinco a 10 focos por campo 10x	3
Más de 10 focos por campo 10x	4
<b>D.- Inflamación Portal</b>	
Ninguna	0
Leve, alguna o todas las áreas portales	1
Moderada, alguna o todas las áreas portales	2
Moderada/Marcada, todas las áreas portales	3

Marcada, todas las áreas portales	4
Puntuación máxima posible	<b>18</b>
<b>GRADACIÓN DE LOS CAMBIOS ARQUITECTURALES, FIBROSIS Y CIRROSIS</b>	
Sin fibrosis	0
Fibrosis algunas áreas portales, con/sin septos fibrosos cortos	1
Fibrosis áreas portales, con o sin septos fibrosos cortos	2
Fibrosis áreas portales, ocasionales puentes porto-portales	3
Fibrosis áreas portales, puentes porto-portales y/o porto-centrales	4
Puentes porto-portales y porto y/o centrales, nódulos ocasionales	5
Cirrosis, probable o definida	6
Máxima puntuación posible	<b>6</b>

**TABLA 3: SISTEMA DE METAVIR.**<sup>96</sup>

**Algoritmo para la evaluación de la actividad histológica:**

<b>“Piecemeal” necrosis</b>	<b>+ Necrosis lobular</b>	<b>= Puntuación de actividad histológica</b>
<b>0 (ninguna)</b>	<b>0 (ninguna)</b>	<b>0 (ninguna)</b>
<b>0</b>	<b>1 (moderada)</b>	<b>A1 (leve)</b>
<b>0</b>	<b>2 (grave)</b>	<b>A2 (moderada)</b>
<b>1 (leve)</b>	<b>0,1</b>	<b>A1</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>A2</b>
<b>2(moderada)</b>	<b>0,1</b>	<b>A2</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>A3 (grave)</b>
<b>3 (grave)</b>	<b>0,1,2</b>	<b>A3</b>

**Puntuación de fibrosis.**

<b>Puntuación</b>	<b>Descripción</b>
<b>F0</b>	<b>Sin expansión fibrótica</b>
<b>F1</b>	Expansión fibrosis portal
<b>F2</b>	Fibrosis con septos escasos
<b>F3</b>	Fibrosis con septos numerosos
<b>F4</b>	Cirrosis

**TABLA 4: SISTEMA SCHEUER.**<sup>97</sup>

<b>Gradación de la actividad portal/perportal</b>	
Ausente o mínima	0
Inflamación portal	1
Necrosis “piecemeal” leve	2
Necrosis “piecemeal” moderada	3
Necrosis “piecemeal” severa	4
<b>Gradación de la actividad lobular</b>	
Ausente	0
Inflamación pero no necrosis	1
Necrosis focal o cuerpos acidófilos	2
Daño celular severo	3
Daño que incluye puentes de necrosis	4
<b>Gradación de la fibrosis</b>	
Ausente	0
Tractos fibrosos portales	1
Septos periportales o porto-portales pero con arquitectura intacta	2
Fibrosis con distorsión arquitectural pero no clara cirrosis	3
Cirrosis probable o definida	4

### 1.2.3 MÉTODOS PARA VALORAR LA FIBROSIS HEPÁTICA.

#### Biopsia hepática.

La biopsia hepática es una importante herramienta de evaluación en los pacientes con hepatopatía crónica secundaria a infección por el VHC. El pronóstico y el seguimiento clínico de las enfermedades hepáticas crónicas dependen directamente de la extensión de la FH, ya que las complicaciones ocurren habitualmente en estadios avanzados de la enfermedad.<sup>98</sup>

La biopsia hepática es considerada como la prueba de referencia para el diagnóstico de FH en estos individuos<sup>99</sup>, aunque habitualmente se basa en una muestra que representa 1/50000 del total de la masa hepática. Su empleo evita el tratamiento en aquellos pacientes cuya enfermedad hepática es poco probable que progrese. Sin embargo, es un procedimiento invasivo y se asocia a complicaciones en ocasiones graves como dolor, sangrado, pneumotórax, hemotórax, peritonitis biliar, hemobilia, punción de riñón e intestino, infecciones, ansiedad.<sup>100-102</sup>

Entre el 0.6% y el 5% de los pacientes que se someten a una biopsia hepática desarrollan complicaciones, que llegan a incluir en casos excepcionales la muerte del paciente.<sup>103</sup> Debido a ser una técnica invasiva no puede ser utilizada como una herramienta de repetición.<sup>104</sup>

A pesar de que la biopsia hepática tiene varias indicaciones dentro de la patología hepática<sup>105</sup> y de que sigue siendo el estándar de oro para la evaluación de la fibrosis, varios estudios han señalado la variabilidad inter observador y de muestreo como una importante limitación potencial de biopsia.<sup>106</sup> Incluso, en los casos en los que un profesional experimentado realiza la biopsia hepática y un patólogo experto interpreta los resultados, este procedimiento puede llegar a tener una tasa de diferencia en estadiaje de hasta un 20 %.<sup>107</sup>

Con el uso de sistemas estandarizados para la evaluación de biopsias hepáticas, se ha reducido la variabilidad inter e intra observador, pero la variabilidad de las muestras continúa siendo un problema actual que motiva continuo debate en distintos foros y congresos.<sup>108</sup> Esta cuestión es pertinente porque la biopsia con aguja gruesa del espécimen del hígado representa sólo una parte muy limitada de la totalidad del parénquima y la fibrosis es heterogéneamente distribuida como ha sido señalado por varios estudios.<sup>109-110</sup>

De hecho, Regev y cols.<sup>111</sup> encontraron que las biopsias con aguja realizadas en lóbulos hepáticos derecho e izquierdo del mismo hígado, pueden diferir en el estadiaje en un tercio de los pacientes con infección crónica VHC, tras ser evaluadas por el mismo observador. Parece ser, que para evitar estas variabilidades y limitar el riesgo para la evaluación falsa, el uso de una biopsia de longitud suficiente y que incluya un suficiente número de espacio portales es fundamental.

### Marcadores serológicos.

Algunos marcadores séricos (tanto los implicado directamente en el remodelado que tiene lugar en la FH, como aquellos alterados como consecuencia de esta), parecen estar correlacionados con el grado de FH.<sup>112, 113</sup> Más recientemente, se han descrito algunos tests para evaluación de fibrosis diseñados mediante modelos estadísticos.<sup>114</sup> El Fibrotest combina concentraciones séricas de macroglobulina alfa 2, haptoglobina, GGT, bilirrubina y apolipoproteínas A1.<sup>115</sup>

Igualmente, Forns y cols.<sup>116</sup> publicaron un score que combinaba edad, GGT, colesterol y plaquetas. El Hepascore combina bilirrubina, GGT, ácido hialurónico, macroglobulina alfa 2, edad y sexo.<sup>117</sup> El APRI es el test más sencillo basado en los niveles séricos de AST y recuento plaquetario.<sup>118</sup>

Cales y cols.<sup>119</sup> propusieron otro test denominado Fibrometer, combinando ácido hialurónico, tiempo de protrombina, plaquetas, AST, macroglobulina alfa 2, urea y edad; la fórmula está ajustada según la causa de la enfermedad hepática. El test MP3 combina procolágeno tipo III (PIIINP), un marcador de fibrogénesis, y la matriz de metaloproteinasas 1 (MMP-1), que está implicada en la fibrinólisis.<sup>120-121</sup>

Todos estos test serológicos se diseñaron para discriminar entre pacientes con fibrosis significativa ( $\geq$  F2), estimando el diagnóstico de seguridad mediante curvas ROC que variaron entre 0.76 y 0.96. Todos ellos se han utilizado para evaluar el grado de FH en pacientes con hepatopatía crónica por VHC.<sup>122</sup>



## FIBROSCAN O ELASTOGRAFÍA DE TRANSICIÓN.

La cuantificación de la FH por métodos no invasivos ha estimulado la búsqueda de nuevas herramientas. La elastografía hepática transitoria (FibroScan® [FS], Echosens, París, Francia) es un método de nueva implantación que permite evaluar de forma rápida y no invasiva el grado de rigidez hepática.<sup>108</sup> El sistema FS está compuesto por un transductor de ultrasonidos acoplado sobre el eje de un vibrador. Este genera una vibración de baja frecuencia y amplitud que provoca una onda elástica de propagación a través de los tejidos. Las señales de ultrasonidos permiten determinar la propagación y velocidad de la onda elástica y la relacionan directamente con la elasticidad tisular y su inversa, la fibrosis.

El FS mide la FH de un cilindro de aproximadamente 1 cm. de diámetro por 2 cm. de longitud, el cual es 100 veces mayor que las muestras obtenidas habitualmente para las biopsias hepáticas y, por tanto, es mucho más representativo de la totalidad del parénquima hepático.

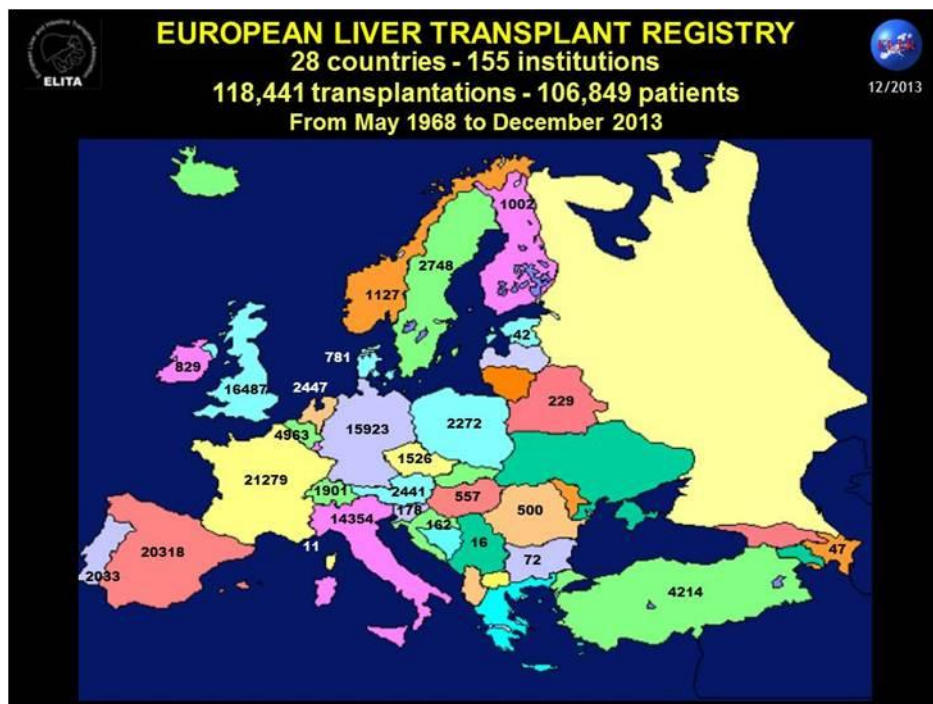
La utilidad del FS como método para cuantificar el grado de FH ha sido demostrada en pacientes con hepatopatía crónica de diversas etiologías tales como: infección por VHC, VHB, coinfección VIH-VHC, etilismo, esteatohepatitis no alcohólica, hemocromatosis y enfermedad hepática colestásica, entre otras.<sup>123</sup>

Foucher y cols.<sup>124</sup>, tras analizar 2.114 medidas de rigidez hepática realizadas mediante FS, concluyeron que la elastografía hepática es un buen método de evaluación de FH, que es posible llevar a cabo en más del 95% de los pacientes. El índice de masa corporal (IMC) fue el único factor asociado al fracaso para determinar el grado de FH mediante FS, ya que, en pacientes con sobrepeso, el acumulo de grasa a nivel torácico y abdominal atenúa las ondas elásticas y los ultrasonidos, dificultando la medición de la rigidez hepática.<sup>124</sup>

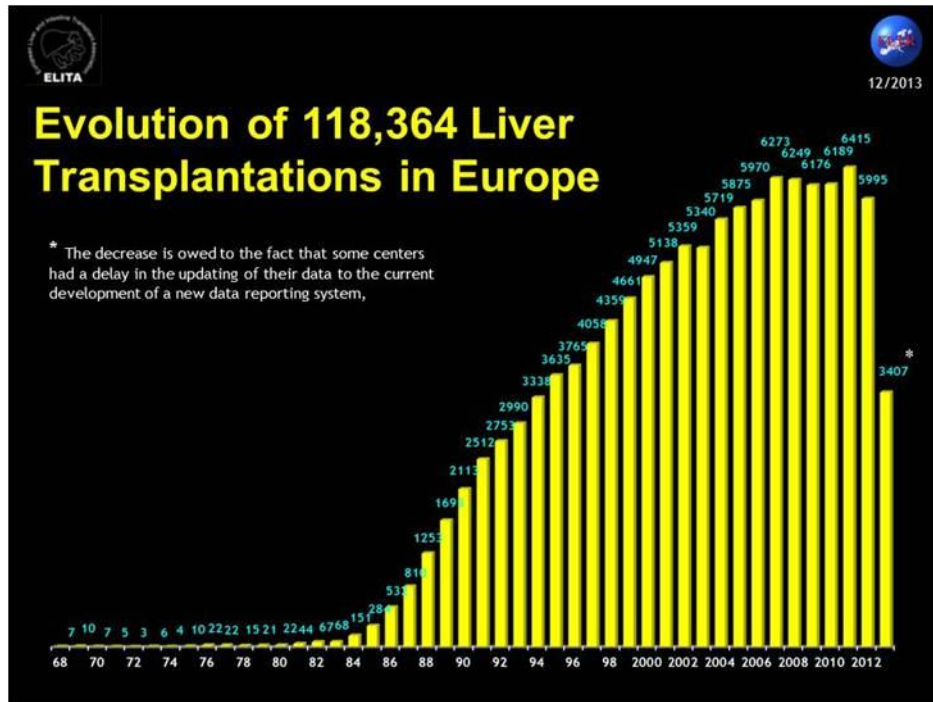
### 1.3 TRASPLANTE HEPÁTICO.

#### 1.3.1: ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL:

El primer trasplante realizado con éxito de hígado humano se llevó a cabo en 1.967.<sup>2-3</sup> Los resultados iniciales fueron pobres durante la primera década del trasplante hepático clínico, con una supervivencia de solo el 30% al año de evolución.<sup>125, 126</sup> La actividad de trasplante durante este periodo se limitó a un pequeño número de centros. Posteriores mejoras en la preservación de donantes de órganos, técnica quirúrgica y la terapia con fármacos inmunosupresores, han logrado que se obtengan mejores resultados del trasplante hepático. Después de un aumento exponencial en el número de trasplantes llevados a cabo durante los años 1.980 y principios de 1.990, el número de trasplantes se ha estabilizado, debido principalmente a la falta de donantes de órganos. Esto ha llevado al uso de donantes de calidad subóptima<sup>127-128</sup> (Fig. 4 y 5).



**Fig. 4: Registro europeo del trasplante hepático. Período (1.968 - 2.013).**



**Fig. 5: Evolución del trasplante hepático en Europa hasta el año 2.012.**

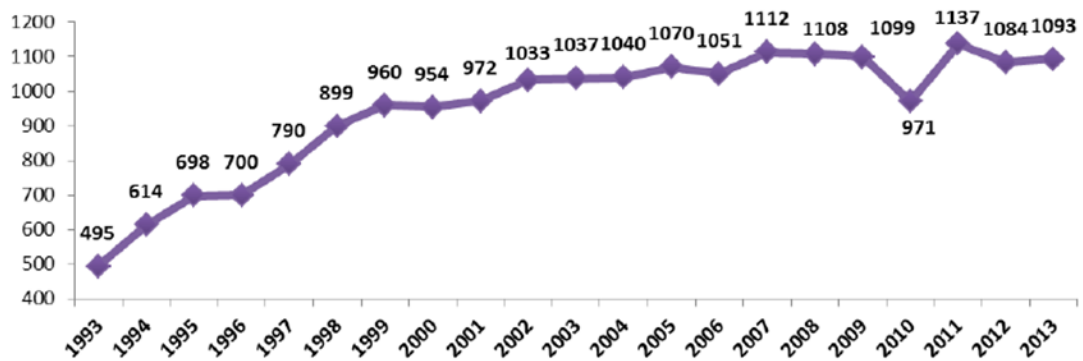
En octubre de 1.985, con motivo de una visita a Hannover, el profesor Henri Bismuth del centro hepatobiliar Paul Brousse (Hospital Villejuif en Francia), propuso al profesor Rudolf Pichlmayer del Instituto experimental de Cirugía de la Universidad de Munich, la idea de crear un Registro Europeo de Trasplantes de Hígado (RETH) como una extensión del registro francés que se había iniciado antes.<sup>129</sup> Igualmente, Sir Roy Calne de la Universidad de Cambridge se unió al grupo, que fue precursor del trasplante hepático e intestinal en Europa, en la reunión de la Sociedad Europea de Trasplante de Órganos (SETO) en Múnich, en 1.985, donde se decidió crear el RETH con los siguientes objetivos:

1. Registro de todos los trasplantes hepáticos (TH) y los procedimientos de Europa.
2. Listado de los centros europeos, existiendo en España 25 centros de referencia.
3. Uso de fórum científico y publicaciones.

En la actualidad, casi todos los centros europeos de trasplante hepático (145 centros en 25 países) están participando en el RETH. Entre 1.968 y junio de 2.009, el RETH ha recogido datos relativos a 87.964 TH realizados en Europa, incluyendo datos sobre indicación de trasplante, los donantes (incluyendo a los donantes vivos) y la compatibilidad del grupo receptor de la sangre, los aspectos técnicos, la causa de muerte o de fracaso del injerto y la inmunosupresión llevada a cabo.

Las cifras actuales de supervivencia son superiores al 80 %, 70 %, 65 % y 50 % al año, 5, 10 y 20 años, respectivamente.<sup>130</sup> El mejor resultado para los trasplantados de hígado en los últimos 20 años, está muy relacionado con una reducción de las complicaciones durante el primer mes post-trasplante.<sup>130</sup>

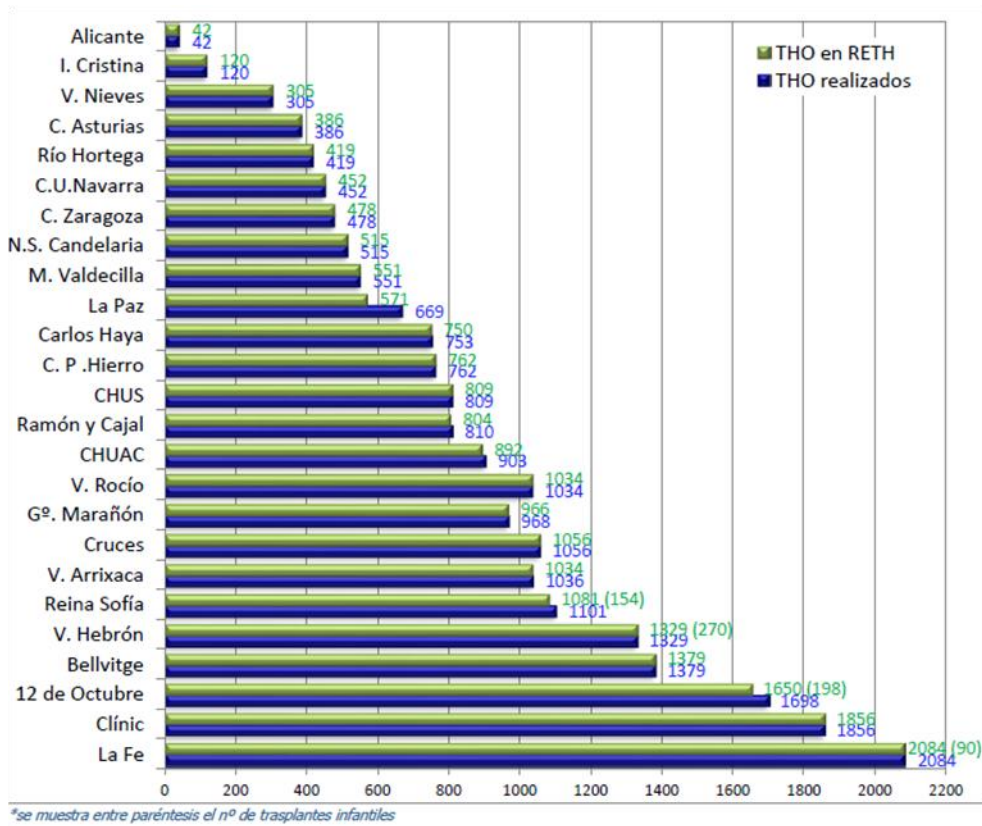
En España fueron los Drs. Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta del Hospital de Bellvitge de l'Hospitalet, Barcelona los que en 1.984 realizaron con éxito la primera operación.<sup>131</sup> Hoy se efectúa en 24 hospitales de todo el estado y son más de mil enfermos los que anualmente reciben un trasplante hepático en nuestro país (**Fig. 6**), con diferencia el que más realiza del mundo en relación a su población. Los españoles tan solo somos el 0,7% de la población del planeta, pero realizamos desde hace años cerca del 10 % de todos los trasplantes de hígado.<sup>131</sup>



**Fig. 6: Actividad del trasplante hepático (número absoluto) en España. Período (1.993 - 2.013).**

El 5 de enero de 1.991, el Hospital la Fe realizó el primer trasplante hepático de la Comunidad Valenciana y cinco años después fue el primer hospital español por número de trasplantes hepáticos situándose entre los cinco primeros de Europa, donde se ha mantenido durante 15 años (**Fig. 7**).

En 2.011, el Hospital Universitario La Fe fue el centro sanitario español que realizó más trasplantes de hígado, con un total de 101 y según los últimos datos del Registro Europeo, el hospital ha realizado cada año el 10 % de los trasplantes de hígado de España, el 5 % de Europa y el 1 % del mundo. Este número se ha estabilizado hace muchos años en torno a los 100 trasplantes anuales, la cifra media del número de donantes que se generan en la Comunidad Valenciana.

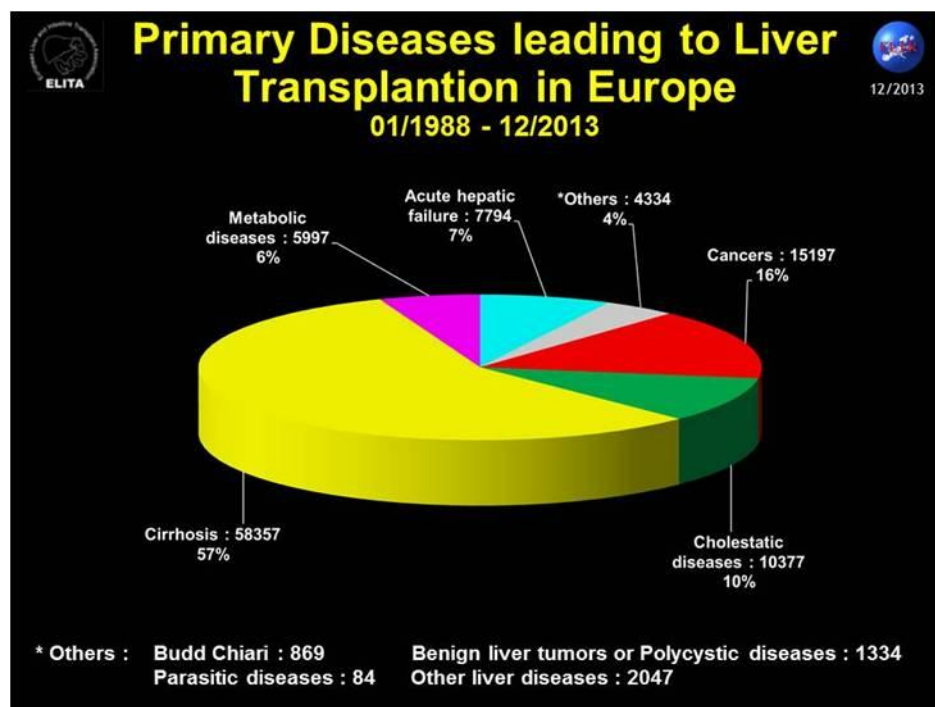


**Fig. 7: Actividad del trasplante y retrasplante hepático en principales centros hospitalarios españoles.**

### 1.3.2 INDICACIONES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO.

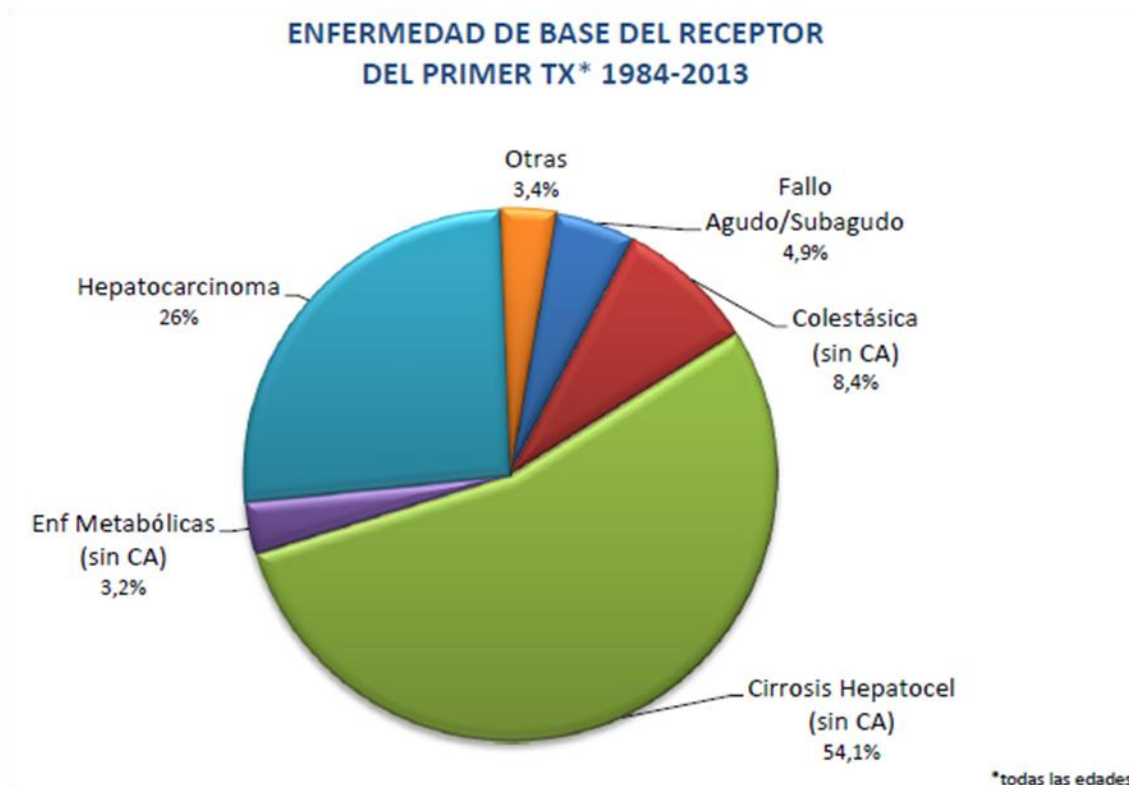
El trasplante hepático se ha consolidado en el momento actual, como un tratamiento para muchas enfermedades hepáticas de otro modo incurables. Las indicaciones de trasplante de hígado se pueden dividir en tres grandes grupos de procesos<sup>132</sup> (Fig. 8 y 9).

1. Etapa final de enfermedad hepática crónica.
2. Insuficiencia hepática aguda.
3. Los tumores hepáticos.



**Fig. 8: Principales indicaciones del trasplante hepático en Europa. Período (1.968 - 2.013).**



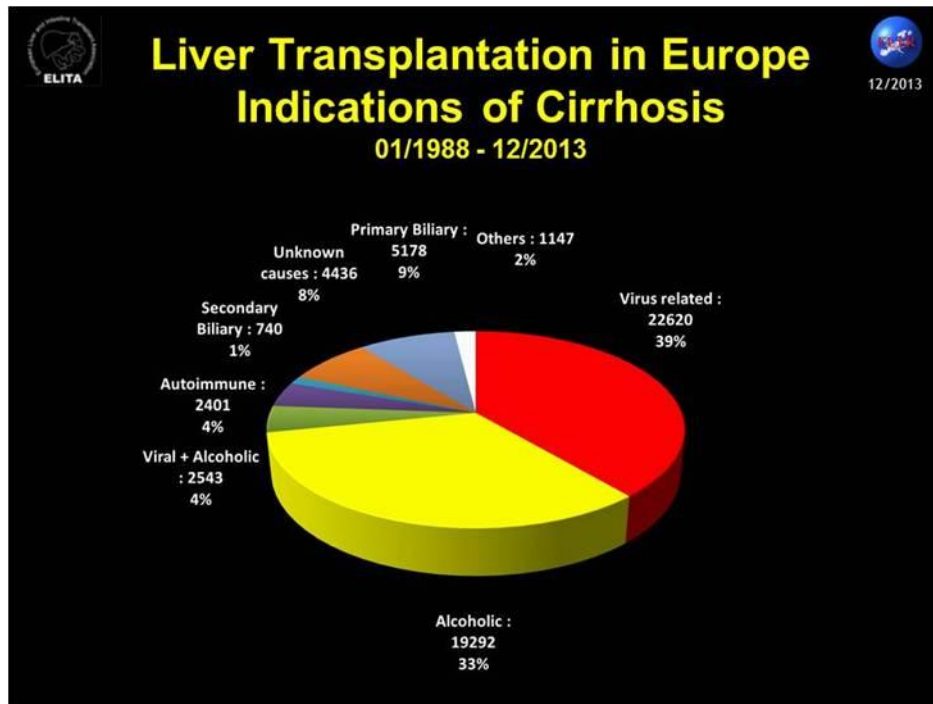


**Fig. 9: Principales indicaciones del trasplante hepático en España. Período (1.984 - 2.013).**

La indicación más frecuente para el trasplante de hígado es la etapa final de la enfermedad hepática crónica, que representa aproximadamente el 70 % de todas las operaciones de trasplante tanto en Europa como en España. Dentro de este grupo, las proporciones relativas de los tipos específicos de la enfermedad varían de centro a centro.<sup>132</sup>

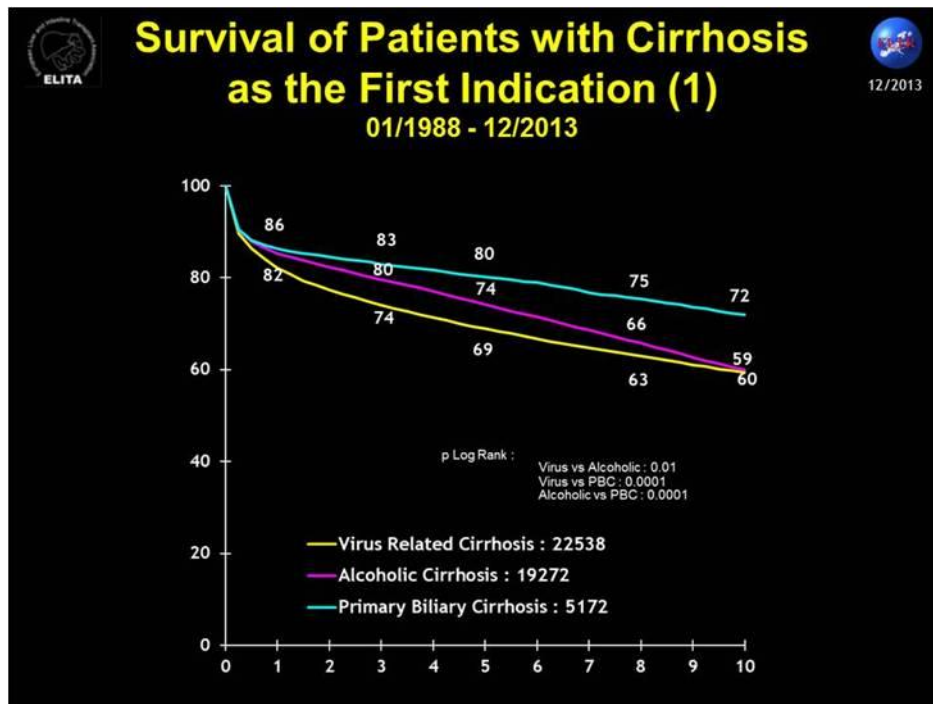
En países como el Reino Unido, donde la cirrosis biliar primaria tiene una alta prevalencia, esta ha sido una de las enfermedades más comunes en los registros de trasplante de hígado.<sup>132</sup>

En muchos otros centros de Europa y en EE.UU, la hepatitis C crónica es ahora la indicación más frecuente para el trasplante hepático, seguida de la cirrosis por alcohol (fig. 10), mostrando la cirrosis por VHC una menor supervivencia.



**Fig. 10: Indicaciones del trasplante hepático en Europa según distintas causas de cirrosis. Período (1.988 - 2.013).**

El trasplante de hígado se ha utilizado también en el tratamiento de tumores hepáticos primarios, particularmente el carcinoma hepatocelular (HCC).<sup>132</sup> Los primeros resultados para el HCC eran pobres, debido a problemas con la recurrencia de la enfermedad. Sin embargo, una cuidadosa selección preoperatoria cuyo objetivo es excluir a los pacientes con alto riesgo de recurrencia (basadas principalmente en el tamaño del tumor y el número) se ha traducido en altas posibilidades de supervivencia, similares a los trasplantados por cirrosis sin hepatocarcinoma<sup>132</sup> (Fig. 11).



**Fig. 11: Supervivencia del trasplante hepático según la causa de cirrosis. Período (1.988 - 2.013).**

El trasplante hepático se comporta de modo distinto según la edad. Las indicaciones, complicaciones y pronóstico difieren en la población adulta y pediátrica (**Fig. 12**). Así mientras que en la población adulta la causa más frecuente de trasplante hepático es la hepatopatía crónica (**Fig. 13**), en la población pediátrica, la indicación más frecuente para el trasplante hepático sigue siendo la atresia biliar extra hepática (**Fig. 14**). El trasplante de la cirrosis relacionada con las enfermedades metabólicas también se lleva a cabo con frecuencia en este grupo de edad pediátrica.

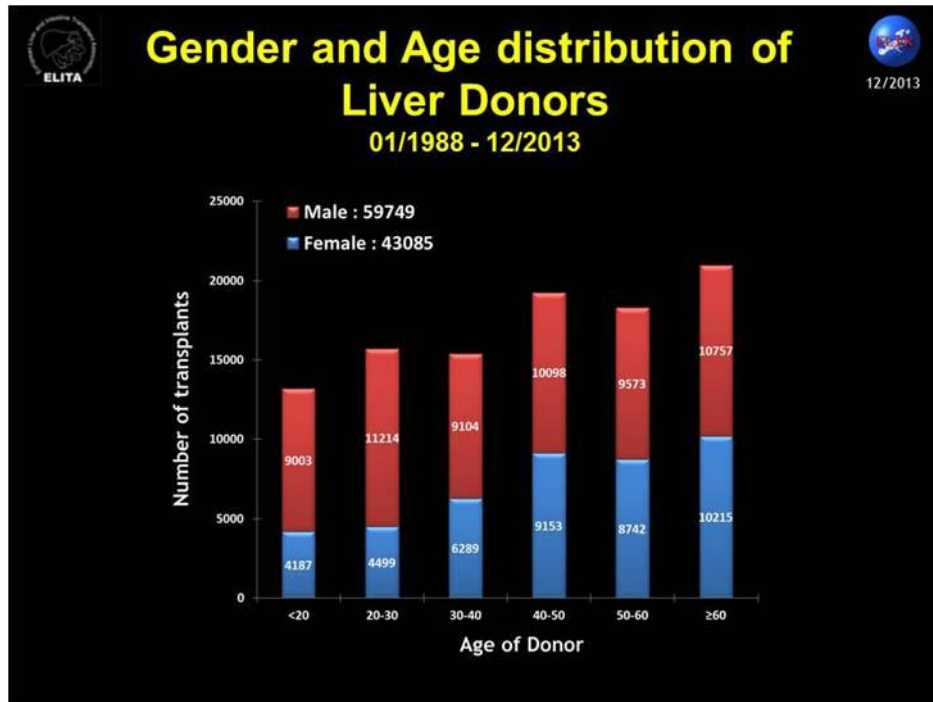


Fig. 12: Comportamiento del trasplante hepático según edad y sexo. Europa Período (1.988 - 2.013).

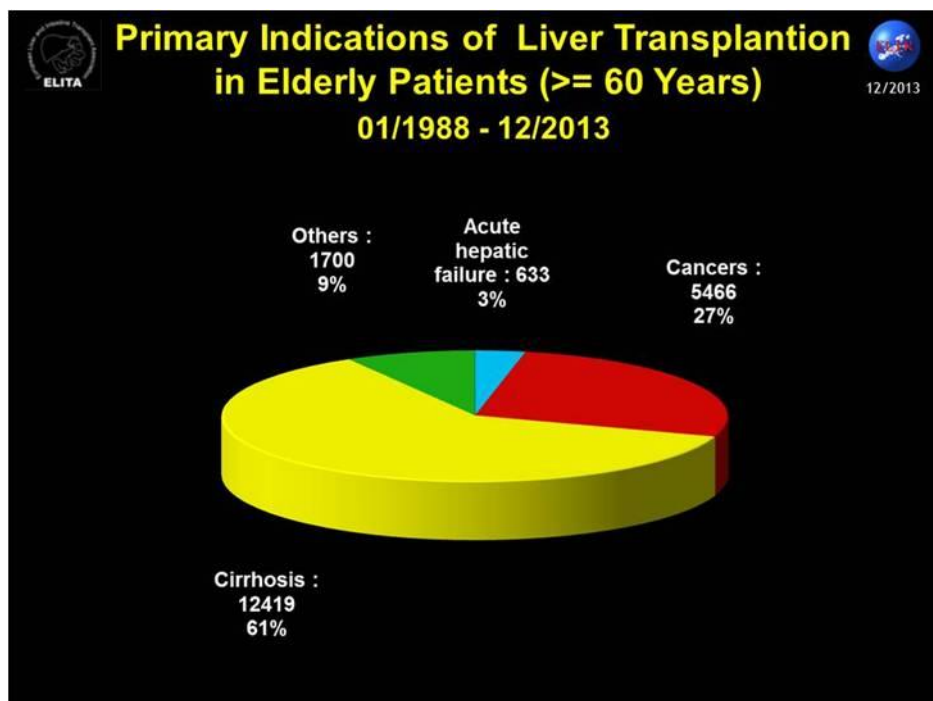
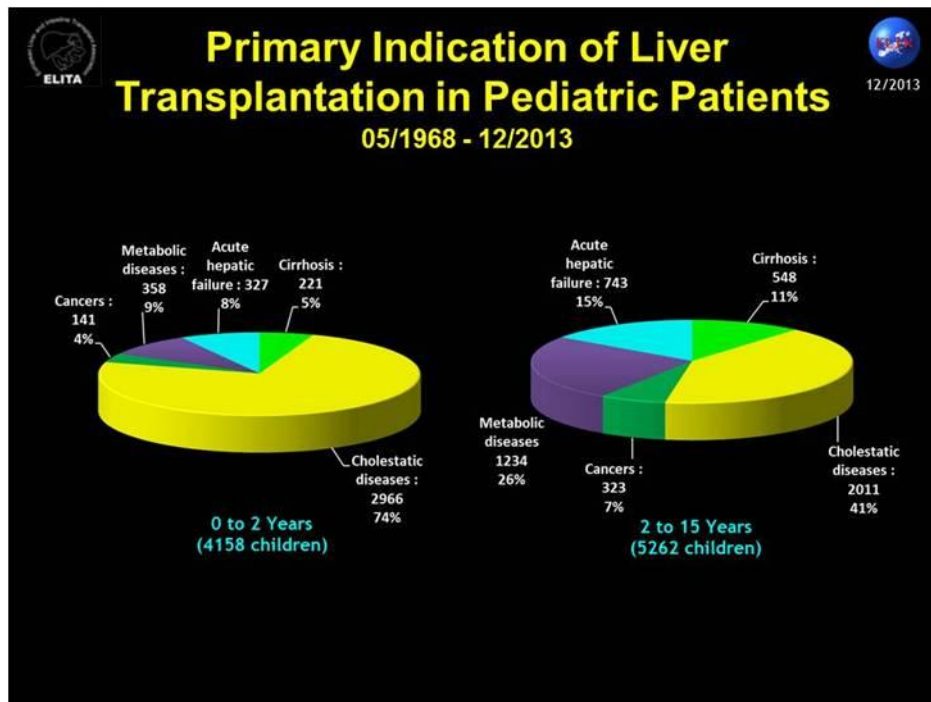
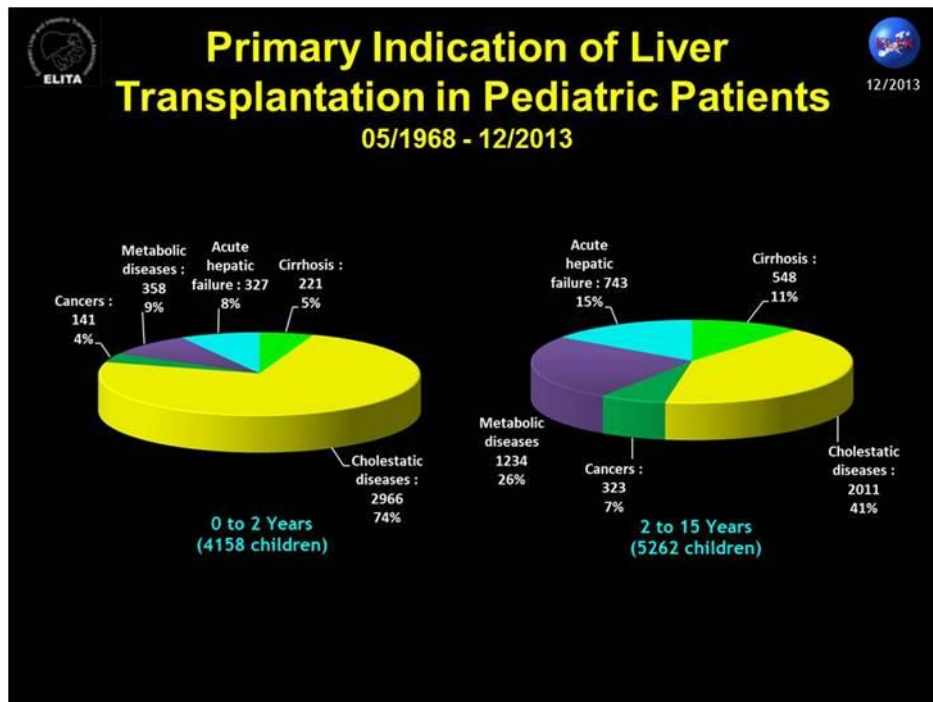


Fig. 13: Indicaciones del trasplante en la población adulta. Registro europeo. Período (1.988 - 2.013).



**Fig. 14: Indicación del trasplante hepático en niños. Registro europeo. Período (1.968 - 2.013).**

La supervivencia post-trasplante se relaciona inversamente con la edad (**Fig. 15**) y también con la etiología de la enfermedad que motiva el trasplante. En este sentido, debido a la recurrencia de la enfermedad primaria en el injerto, la infección por VHC se asocia con tasas de supervivencia menores.<sup>134</sup>



**Fig. 15: Análisis europeo de supervivencia de los pacientes trasplantados hepáticos según grupo etario. Período (1.988 - 2.013).**

### 1.3.3 COMPLICACIONES DEL POST-TRASPLANTE HEPÁTICO.

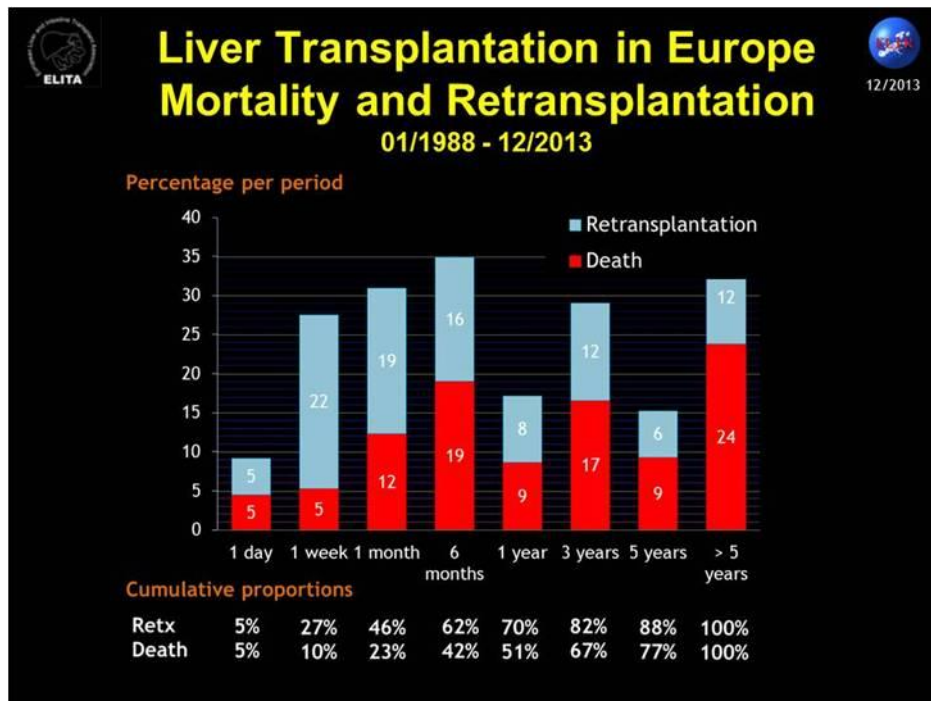
Las principales complicaciones del trasplante de hígado incluyen<sup>132</sup>:

1. Problemas ligados a la preservación y la reperfusión del órgano de un donante (preservación / reperfusión).
2. Problemas ligados a las técnicas / quirúrgica: complicaciones que afectan a las estructuras vasculares y / o biliar.
3. Rechazo celular o humoral.
4. Complicaciones de la terapia inmunosupresora (por ej. las infecciones oportunistas, post-trasplante, las neoplasias *de novo* o enfermedades linfoproliferativas y toxicidad medicamentosa).
5. La recurrencia de la enfermedad original por la cual se llevó a cabo el trasplante.
6. Enfermedad adquirida del hígado (por ejemplo, hepatitis autoinmune *de novo* o enfermedad de hígado graso debido al aumento de los factores de riesgo de hígado graso).

### 1.3.4: RETRASPLANTE.

#### **Etiología e incidencia:**

Aproximadamente del 10 al 20% de los pacientes que se someten a un trasplante de hígado requiere trasplante por fallo del injerto en relación con las complicaciones del trasplante hepático.<sup>132</sup> De ellos, el 1,2% se somete a dos o más operaciones de trasplante.<sup>134</sup> (Fig. 16).



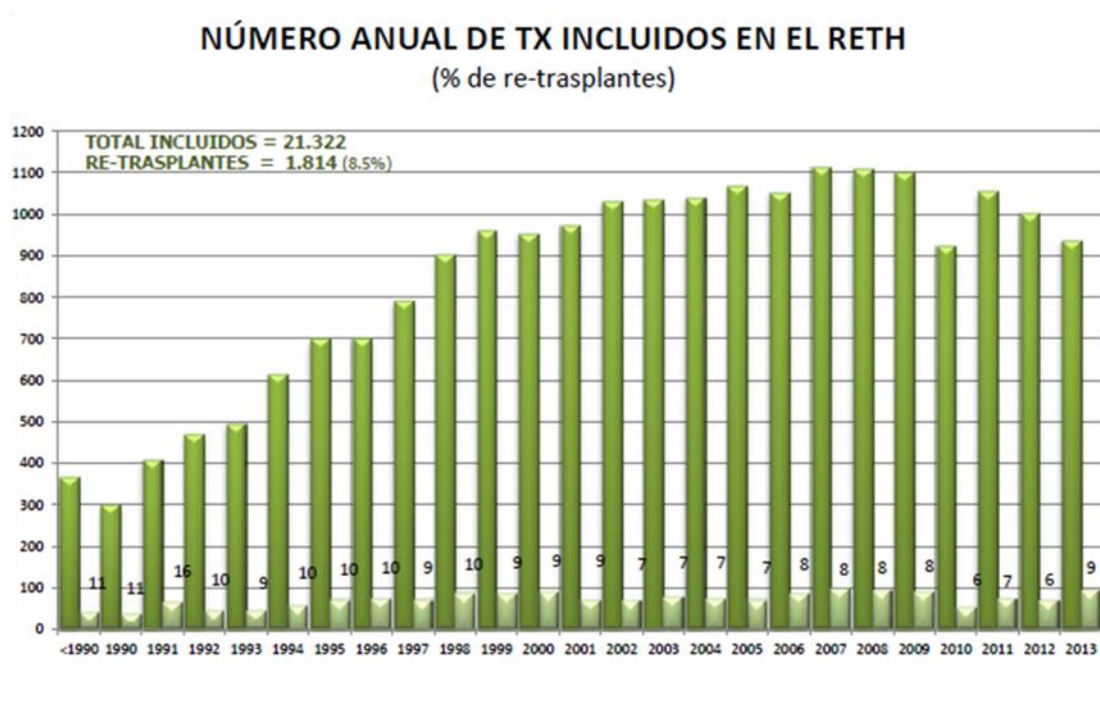
**Fig.16: Registro Europeo de trasplante y mortalidad en el trasplante hepático. Período (1.988 - 2.013).**

En comparación con el evento primario, la supervivencia global del paciente tiende a disminuir con operaciones sucesivas de trasplante.



Las principales indicaciones de retrasplante durante el primer mes se refieren a problemas con la preservación del injerto ("fallo primario") o isquemia del injerto. Raros casos de rechazo humoral (hiperagudo) se producen durante este período. Más allá del primer mes, las indicaciones comunes para retrasplante son el rechazo crónico y complicaciones biliares isquémicas.<sup>134</sup>

A partir del año del trasplante, las complicaciones relacionadas con la recurrencia de la enfermedad, la hepatitis viral, en particular, se convierten en la indicación más común de retrasplante. La tasa global de retrasplante se ha reducido, debido principalmente a una reducción en la frecuencia de rechazo o de complicaciones isquémicas<sup>134</sup> (**Fig. 17**).



**Fig. 17: Porcentaje de retrasplante con respecto a la totalidad del trasplante hepático anual en España. Período (1.990 - 2.013).**

### 1.3.5 EVALUACIONES PATOLÓGICAS EN EL TRASPLANTE DE HÍGADO.

Las evaluaciones histopatológicas tienen un papel importante en todas las etapas del seguimiento de los pacientes sometidos a trasplante hepático. El punto de partida es un análisis de los hígados nativos en el explante. El protocolo utilizado para la obtención de biopsias de post-trasplante varía de centro a centro. En muchos centros, una biopsia del hígado del donante se realiza inmediatamente después de la reperfusión. Esta biopsia "tiempo cero" se utiliza como una evaluación de referencia para detectar enfermedades pre-existentes en el hígado del donante y para identificar los cambios relacionados con la conservación del órgano y la reperfusión.

Hasta mediados de la década de los 90, se tomaron biopsias de protocolo con frecuencia alrededor del 7º día post-trasplante. Esto se hizo porque el final de la primera semana fue reconocido como el momento en que los cambios morfológicos de rechazo celular agudo se manifiestan generalmente. Sin embargo, el descubrimiento de que las características histológicas de rechazo suelen estar presentes en pacientes con la función del injerto estable y que estos casos no requieren de inmunosupresión adicional<sup>135</sup> ha llevado a interrumpir la biopsia del 7º día en la mayoría de los centros.

En algunos centros, las biopsias de protocolo se obtienen también en los pacientes que sobreviven a largo plazo como parte de una revisión anual. En estos casos, se suelen observar alteraciones histológicas, incluso en pacientes clínicamente estables y sin alteraciones bioquímicas relevantes.<sup>136-137</sup>

Sin embargo, la incertidumbre sobre el significado clínico y las implicaciones terapéuticas de estos hallazgos ha llevado a muchos centros a cuestionar estas biopsias de protocolo, con excepción del grupo de pacientes con hepatitis C del injerto.<sup>138</sup>

En algunas condiciones en las que la biopsia hepática se utiliza para investigar la disfunción del injerto, la histología puede ser considerada como el "gold standard" para el diagnóstico. El mejor ejemplo es el rechazo del injerto hepático, ya que no existe ningún otro marcador fiable para el diagnóstico del rechazo, al menos hasta el momento actual.<sup>136</sup>

Para otras condiciones (p.e., la infección por hepatitis C), una causa probable de la disfunción del injerto pudo haber sido identificado por otros métodos, pero la biopsia hepática proporciona además una información adicional importante acerca de los cambios morfológicos en el hígado (por ejemplo, la gravedad de la actividad necroinflamatoria y fibrosis) y puede orientar hacia la presencia de otras causas de disfunción del injerto que coexistan. En algunos casos, la biopsia hepática puede proporcionar el primer indicio de un problema biliar o vascular, que posteriormente se confirme radiológicamente.

### 1.3.6 ASPECTOS GENERALES DE LA RECURRENCIA DE LA ENFERMEDAD.

Con la mejora a largo plazo de la supervivencia después del trasplante, los problemas relacionados con la recurrencia de la enfermedad son cada vez más importante. La mayoría de las enfermedades comunes que motivan la realización del trasplante de hígado en los adultos pueden volver a recurrir en el injerto.

La incidencia y las consecuencias clínicas de la recidiva de la enfermedad varían considerablemente.<sup>139</sup> Para algunas condiciones (por ejemplo, la hepatitis C), la recurrencia es común y temprana y tiene un impacto importante en la función del injerto, en algunos casos con resultado de fracaso del injerto o incluso de muerte del paciente.

La enfermedad recurrente es menos problemática en los niños, la gran mayoría de los cuales se trasplantan por enfermedades que no se repiten, tales como la atresia biliar o enfermedades metabólicas como hemos comentado anteriormente, en el capítulo sobre las indicaciones del trasplante hepático.

El diagnóstico histológico de la enfermedad recurrente es más problemático, cuando coinciden dos condiciones: hepatitis C y rechazo celular agudo. Además pueden existir interacciones con otras complicaciones de un trasplante de hígado.

**TABLA 5. RESUMEN DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE RECURRENCIA EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO. MODIFICADA DE HUBSCHER DE 2006.<sup>140</sup>**

ENFERMEDAD RECURRENTE	FRECUENCIA	COMENTARIOS
<b>Hepatitis B (VHB)</b>	<10%	Mayor frecuencia en los años 1980 - 1990 (15-85%). La incidencia y el impacto clínico se ha reducido en gran medida por el uso de la terapia antiviral pre y post-trasplante.
<b>Hepatitis C (VHC)</b>	<b>&gt; 90%</b>	<b>Recorrente universal de la infección. La mayoría de los casos asociados con daño del injerto. Progresión de la enfermedad en el 20-50% a cirrosis hepática en 5-10 años.</b>
<b>Cirrosis biliar primaria (CBP)</b>	20-50%	La mayoría de los casos tienen una enfermedad leve o asintomática. Se diagnostica con frecuencia en las biopsias de protocolo. Menos de 1% de los casos progresa a la cirrosis o al fracaso del injerto.
<b>Colangitis esclerosante primaria (CEP)</b>	20-30%	Con más frecuencia síntomas clínicos de CBP recurrente. Aproximadamente el 10% progresa a un fracaso del injerto. Las características histológicas y radiológicas pueden ser difíciles de distinguir de la colangiopatía isquémica.
<b>Hepatitis autoinmune</b>	20-30%	La mayoría de los casos se producen como consecuencia de una inmunosupresión subóptima y responde, a la terapia inmunosupresora. El diagnóstico está basado en una combinación de los hallazgos bioquímicos, inmunológicos e histológicos.
<b>Enfermedad hepática alcohólica (EHA)</b>	10-30%	Reanudar el hábito alcohólico es común, pero las complicaciones graves son raras en el injerto. Cambio graso es el hallazgo más frecuente. Algunos casos progresan ocasionalmente a la esteatohepatitis o fibrosis.

ENFERMEDAD RECURRENTE	FRECUENCIA	COMENTARIOS
Enfermedad de hígado graso, sin consumo alcohol (EHNA)	20-40%	Los factores de riesgo para el hígado graso no alcohólico suelen persistir después del trasplante y puede ser exacerbada por el uso de los fármacos inmunosupresores y otros factores relacionados con el trasplante. Un 10-40% desarrolla esteatohepatitis y hasta un 12% evoluciona a la cirrosis.
Tumores hepáticos	Variable	Los primeros estudios informaron de tasas de recidiva del 30-50% para el carcinoma hepatocelular. Incidencia que actualmente se ha reducido a entre 10-20%, debido a los mejores criterios de selección de pre-trasplante.
		Altas tasas de recurrencia (hasta un 90%) han sido señalada en los primeros estudios de colangiocarcinoma, debido a la localización hiliar y la resección incompleta. Mejora de la supervivencia se han indicado en algunos centros al mejorar los criterios de selección.

### 1.3.7 HEPATITIS C DEL INJERTO.

#### Incidencia y factores de riesgo:

Más del 90% de los pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C que se someten a un trasplante de hígado tienen marcadores virológicos de la infección recurrente en el post-trasplante.<sup>141</sup> La reinfección del injerto se inicia probablemente durante la reperfusión y la replicación viral comienza a las pocas horas después.<sup>142</sup> Los niveles de ARN por lo general disminuyen en el período postoperatorio inmediato, pero vuelven rápidamente a los niveles pre-trasplante, a menudo en el plazo de unos días y posteriormente, aumentan aún más, por lo general alcanzando hasta 100 veces los niveles pre-trasplante en los 2-3 meses post-trasplante.<sup>143-145</sup>

Aproximadamente el 50% de los pacientes permanecen asintomáticos durante los primeros 12 meses post-trasplante<sup>146</sup>, pero la mayoría (70-95%) eventualmente desarrollará las características histológicas de la hepatitis C del injerto.<sup>147-148</sup>

La progresión de la fibrosis hepática tras el trasplante es más rápida que antes del trasplante.<sup>148 -154</sup> Los factores de riesgo más importantes de recidiva agresiva se relacionan con el uso de la inmunosupresión, ya sea como terapia de base o para tratar los episodios de rechazo agudo. El aumento de la replicación viral que se produce en el contexto de inmunosupresión predispone a mayor daño, situación que puede agravarse cuando el sistema inmunitario se reconstituye al reducir la inmunosupresión, sobre todo si se hace de forma brusca.<sup>155-157</sup>

La edad del donante se ha convertido en el principal factor de riesgo, y la utilización cada vez más frecuente de órganos provenientes de donantes añosos permite explicar la mayor agresividad de la hepatitis C recurrente en pacientes trasplantados en años recientes.

El desarrollo de síndrome metabólico es más frecuente en los pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis por el VHC en comparación con los trasplantados por otras enfermedades crónicas del hígado<sup>158-159</sup>, y es cada vez más reconocido como un factor de riesgo de hepatitis agresiva.<sup>159-161</sup>

Los pacientes coinfectados con el VHC y el VIH tienen un mayor riesgo de progresión de la fibrosis tras el trasplante en comparación con los pacientes mono infectados.<sup>161</sup>



**TABLA 6: FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD GRAVE O PROGRESIVO DE LA HEPATITIS C RECURRENTE.**<sup>141; 148; 150.</sup>

<b>Factores virales</b>	VHC genotipo (1b ó 4)
	Niveles de ARN-VHC pre-y post-trasplante elevados
	Diversidad cuasiespecies
<b>Factores del receptor</b>	Edad (avanzada)
	Raza (no blanca)
	Género (mujer)
	Coinfección VIH
<b>Factores del donante</b>	Edad (avanzada)
	Esteatosis
	Tipaje HLA
	Concentración de hierro hepático
<b>Factores relacionados con el trasplante</b>	Factores perioperatorios

	Tiempos de isquemia caliente y fría
	Preservación / reperfusión del injerto
	Rechazo agudo
	Gravedad y número de episodios de rechazo
	Inmunosupresión
	Cantidad / tipo de inmunosupresión
	Retirada rápida corticoides
	Coinfección virus familia herpes ,CMV, HHV-6
	Síndrome metabólico / hígado graso no alcohólico
Complicaciones biliares	
<b>Hallazgos histológicos en las primeras biopsias post-trasplante</b>	Cambio graso
	Actividad necroinflamatoria
	Balonización hepatocitos / colestasis
	Apoptosis hepatocelular

	Detención del ciclo celular de los hepatocitos o de senescencia explicativa
	Activación de las células estrelladas hepáticas

Las características histológicas observadas en las biopsias tomadas durante los primeros 12 meses tras el trasplante de hígado también son útiles a la hora de predecir la historia natural de la hepatitis C recurrente.<sup>156</sup> Los ejemplos incluyen: la presencia y/o gravedad de la esteatosis macrovesicular en la biopsia obtenida durante el primer mes, la gravedad de la actividad necroinflamatoria en el momento de la presentación de la hepatitis por VHC durante los primeros 6 meses post-trasplante<sup>156-157</sup>, la cantidad de apoptosis de los hepatocitos, la presencia de hepatocitos balonzados y/o colestasis<sup>158</sup>, así como, la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC). Esta última puede ser demostrada mediante tinción inmunohistoquímica para la actina de músculo liso- $\alpha$  ( $\alpha$ SMA) en biopsias obtenidas 3-6 meses post-TH<sup>159-162</sup> o por la inmunoreactividad frente a para la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) o la actina, marcadores todos ellos orientativos de la activación temprana de las células estrelladas.<sup>162</sup>

Las características típicas de la infección por HCV se asemejan a las observadas en el hígado no trasplantado en la mayoría de los casos. Más raramente, hay patrones atípicos de daño hepático, probablemente relacionados con otros factores presentes en los trasplantados hepáticos.

La biopsia de hígado desempeña por lo tanto una herramienta importante en el diagnóstico y tratamiento de la infección por el VHC recurrente. La distinción entre hepatitis C del injerto y otras complicaciones, tales como el rechazo, no se suele lograr mediante el análisis exclusivo de los parámetros clínicos o bioquímicos. Los hallazgos histológicos son, por tanto, elementos esenciales para establecer un diagnóstico de hepatitis C del injerto o de rechazo.<sup>163</sup>

Las biopsias de hígado también se utilizan rutinariamente para evaluar la gravedad y la progresión de la enfermedad, particularmente la fibrosis. Las alteraciones histológicas son frecuentes en las biopsias de protocolo hechas en pacientes VHC-positivos, incluso en aquellos que están clínicamente bien, con una buena función del injerto.<sup>164</sup>

Estos hallazgos tienen implicaciones para el pronóstico y tratamiento de los pacientes trasplantados. Por ejemplo, la presencia y gravedad de la fibrosis en la biopsia del primer año son predictivos de la progresión a cirrosis y posterior fracaso del injerto.<sup>165-</sup>

<sup>168</sup> Los pacientes que desarrollan fibrosis de forma precoz tienen indicación de tratamiento con terapia antiviral<sup>169</sup> y mediante el estudio biopsico también se permite evaluar la respuesta terapéutica<sup>170</sup> descartando complicaciones durante el mismo, tal como puede ser el rechazo inducido por interferón o la hepatitis autoinmune *de novo*.

En la reinfección por virus C del injerto, se pueden identificar tres fases principales.<sup>171</sup>

Durante la etapa inicial (0-2 meses post-trasplante), cuando los niveles de ARN viral ya son altos, la evaluación de los cambios relacionados con el VHC son difíciles de establecer, debido a la presencia frecuente de otras causas de daño del injerto, tales como el daño por preservación-reperfusión o el rechazo agudo.

La inflamación provocada por la infección por el VHC y la respuesta inmune frente a este es rara vez visible en este periodo. En esta fase inicial, se suele apreciar un desorden lobular asociado con los hepatocitos, cuerpos acidófilos y mayor actividad mitótica. Los cambios grasos también pueden observarse en esta etapa. La esteatosis grave puede ser la manifestación inicial histológica de la hepatitis recurrente, sobre todo en pacientes infectados por el VHC genotipo 3.<sup>172</sup>

La segunda etapa (2-4 meses post-trasplante) se caracteriza por la existencia de un mayor número de rasgos típicos de hepatitis aguda. La inflamación es generalmente leve, predominantemente lobular y se asocia con menores grados de desorden, balonización hepatocelular, cuerpos acidófilos y agrandamiento de las células de Kupffer. La linfocitosis sinusoidal es a veces prominente. También es frecuente observar diversos grados de inflamación portal. Estos cambios se han descrito a pesar de la cronología antes señalada precozmente e incluso a los 9 días después del trasplante.<sup>173</sup>

La tercera etapa del daño hepático progresivo (más de 6 meses post-trasplante) se caracteriza por características histológicas de hepatitis crónica, semejantes a las observadas en la infección por hepatitis C crónica del hígado no trasplantado. Hay un infiltrado portal inflamatorio de predominio mononuclear, por lo general asociado con agregados linfoides e infiltración linfocítica focal de los conductos biliares. La hepatitis de interfase está presente. También hay inflamación lobular comúnmente irregular, con cambios grasos (por lo general macrovesicular) y formación del cuerpo central acidófilo.

Aproximadamente, el 50 % de los pacientes tienen evidencia histológica de hepatitis crónica al año post-trasplante. Esta cifra aumenta con períodos más largos de seguimiento.

Hay una forma atípica de hepatitis C del injerto que es la hepatitis C colestásica ("hepatitis colestásica fibrosante "). Una pequeña proporción de casos desarrolla este síndrome colestásico grave, que asemeja a la hepatitis colestásica fibrosante (FCH) de la infección recurrente por VHB.<sup>172</sup> Ocurre típicamente en los primeros 1-3 meses post-trasplante y se asocia con niveles séricos altos de viremia al igual que niveles de ARN del VHC intrahepático. Se ha sugerido que este tipo de presentación se debe al efecto citopático directo del VHC por asociarse con un deterioro llamativo de la respuesta inmune contra el VHC. Además de datos bioquímicos de hiperbilirrubinemia<sup>173</sup>, el parénquima hepático a menudo muestra balonización importante de hepatocitos centrolobulillares, que puede ser la primera manifestación histológica de esta enfermedad. Los focos de fibrosis perisinusoidal delicada también se pueden detectar en esta etapa.<sup>174</sup> Posteriormente la expansión portal y la reacción de los ductos imitan la obstrucción biliar. La fibrosis más extensa, a veces con un patrón de transición, también es evidente en esta etapa.<sup>174</sup>

Se han descrito casos ocasionales de carcinoma hepatocelular implantados *de novo* en pacientes con cirrosis VHC. Estos casos ocurren dentro de los 7 años desde post-trasplante, hecho que apoya una progresión acelerada de la enfermedad en el injerto hepático.<sup>175-177</sup> La infección recurrente VHC es ahora reconocida como una de las principales causas de fracaso del injerto e indicación de retrasplante después del año.<sup>177</sup>

## *1.4 MORFOMETRÍA.*

### 1.4.1 GENERALIDADES:

Al evolucionar la microscopia, cada detalle o cambio celular y arquitectural observado, normal o patológico, necesitaba ser cuantificado objetivamente para su comparación y análisis. La medición reproducible suministra un dato de objetividad mediante la evaluación cuantitativa del estudio morfológico.

En Biomedicina se denomina morfometría a todo proceso de medición o cuantificación de estructuras o áreas de órganos, tejidos, células e inclusive núcleos; utilizando generalmente técnicas de análisis de imagen. Dicha técnica es el resultado de una teoría matemática o geométrica específicamente. Con ella se definen mediciones de longitudes, áreas o volúmenes y la cuantificación de una estructura definida ya sea macro o microscópica.<sup>178</sup>

En 1.924, Feulgen descubrió un reactivo cromogénico que reaccionaba específicamente con el ADN nuclear, contribuyendo decisivamente al desarrollo de las técnicas cuantitativas y permitiendo así el estudio morfométrico nuclear mediante el análisis del contenido de ADN (ploidía). A este avance inicial se sumó posteriormente el de las técnicas de análisis de imagen asociadas a programas informáticos, permitiendo el control directo de los objetos que se están valorando, con lo que se consiguió mejorar ostensiblemente las mediciones.<sup>178</sup>

Posteriormente la citometría dinámica o de flujo (CMF) ha sido un avance decisivo y basado en el estudio de las características estructurales y funcionales de células o partículas mantenidas en suspensión.<sup>179</sup>

Los métodos de valoración cuantitativos (morfometría) traen de esta forma una gran relevancia tanto en investigación como la rutina asistencial diagnóstica al conseguir las siguientes ventajas:<sup>178-180.</sup>

- Disminuir la variabilidad inter e intra observador.
- Observación objetiva del patólogo (clasificaciones).
- Valoración pronóstica.
- Incremento de la sensibilidad en la identificación de cambios mínimos en los rasgos celulares.
- Establecimiento de una serie de valores estándar para el diagnóstico y la docencia.

Las aplicaciones biomédicas actuales de la morfometría pueden resumirse en los siguientes puntos:<sup>181-182</sup>

- Caracterización de la forma celular
- Caracterización de la forma nuclear
- Cuantificación de estructuras tisulares (vasos, núcleos, complejos marcados)
- Cuantificación de características específicas expresadas por un elemento celular marcado con tinciones y/o inmunohistoquímica
- Cuantificación de células, y áreas de tejido definido



Con un criterio general la técnica morfométrica por citometría estática (CME) sigue los siguientes cinco pasos o procedimiento:<sup>181</sup>

1.- **Preparación y requisitos:** va desde la obtención de la imagen por una videocámara adaptada al microscopio, pasando luego por un procesamiento digital de la imagen, hasta que dicha imagen sea tratada con el software en el ordenador.

2.- **Ubicación de zonas adecuadas y preparación de la imagen:** se buscan áreas de la preparación en que la zona está en la disposición técnica esperada. Luego se prepara la imagen para que el programa la pueda captar mejor, mediante la utilización de filtros digitales de pasa bajo y de pasa alto. Con los filtros de paso bajo se elimina el “ruido” de la imagen. Con los filtros de paso alto se incrementa la diferencia entre la imagen y las zonas adyacentes, resaltando la superficie inmune marcada.

3.- **Segmentación:** al proceso de separar digitalmente una parte de la imagen para poder analizarla por separado. Se decide un umbral en los valores de píxeles o se colocan intervalos dentro de los cuales se va a realizar el análisis. Esta fase puede ser interactiva, eligiendo los objetos el observador; automática, decidiéndolo la máquina; o bien semiautomáticas en la que podemos incluir o quitar algunos objetos, después del procesado automático.

4.- **Erosión/Dilatación:** consiste en quitar/poner una capa de píxeles de la superficie del objeto a medir y así se alisa la superficie. De esta manera es posible aislar células o estructuras en contacto, lo que permitirá su medida individual.

5.- **Esqueletización:** se realiza limitando las estructuras o estrechándolas hasta ubicarlas en una línea. Esqueletos lineales nos indican formas simples, mientras que esqueletos ovoideos o elipses y esqueletos ramificados corresponden a estructuras complejas.

Realizados estos pasos, se procede a la activación del software con la consecuente ubicación y relación de las imágenes con su correspondiente plantilla en una hoja de cálculo. Este documento debe ser preparado y marcado previamente por el especialista que manipula el proceso. Es importante resaltar que gran parte de la relevancia de los resultados tiene que ver con la objetividad del especialista ante cada imagen. Esa cualidad del proceso obliga a que las imágenes lleguen al especialista previamente numeradas con secuencias que oculten la proveniencia específica de la muestra, tanto en los casos como en los controles.

En los últimos 10 años, se han desarrollado equipos informáticos y software de mejor calidad, así como algoritmos morfométricos. Esto ha condicionado que la morfometría sea más accesible y útil para el patólogo. Hay que destacar, no obstante, que incluso cuando se utilizan técnicas totalmente automatizadas, la morfometría sigue siendo un proceso lento no recomendable en rutina diaria. Sin embargo, ofrece la posibilidad de estratificar la enfermedad en un número infinito de categorías, algo que no se puede hacer por estimación visual.

#### 1.4.2 EL MÉTODO MORFOMÉTRICO APLICADO A LA INFECCIÓN VHC.

En los últimos años la morfometría se ha utilizado en la patología hepática, para cuantificar características histológicas diferentes. Asistidas por ordenador y por los métodos de recuento de puntos estereológicos, se ha utilizado para cuantificar el grado de esteatosis,<sup>183</sup> pero evaluar la fibrosis en la enfermedad hepática crónica sigue siendo su principal interés.<sup>184</sup>

El análisis de imágenes digitales con rapidez deja atrás el componente subjetivo, el juicio del patólogo y proporciona resultados cuantitativos muchos más precisos que los determinados por métodos de clasificación semicuantitativa de fibrosis.<sup>184</sup> Además de la fibrosis portal o en puente, recientemente se ha publicado que la morfometría ofrece una cuantificación rápida, reproducible y sensible de la fibrosis perisinusoidal.<sup>185-186</sup> Sin embargo, se piensa que solo la aparición temprana de la fibrosis a nivel periportal, pueda ser un indicador predictor de aceleración de la recurrencia de hepatitis C en el periodo post-trasplante y no así la fibrosis sinusoidal presente en estadios iniciales.<sup>185</sup>

Servais y cols.<sup>187</sup> realizaron uno de los primeros estudios en el que utilizó la cuantificación semiautomática de la fibrosis intersticial utilizando en la técnica de Tricromo de Masson en biopsias renales. Sin embargo el método no fue reproducible<sup>187</sup>.

Vasilievic y cols.<sup>188</sup> compararon diferentes metodologías histológicas usando la cuantificación de la fibrosis. Otros estudios han validado ambos métodos estudiando la fibrosis en biopsias miocárdicas.<sup>189</sup>

El Sirius-red es uno de los métodos histoquímicos de tinción utilizado clasicamente en la evaluación del colágeno.<sup>190</sup> Junqueira<sup>190-191</sup> y Montes<sup>192</sup> señalan en sus trabajos de referencia, que el estudio de la histopatología del colágeno tuvo un significativo avance con el uso de las técnicas de inmunohistoquímica y el empleo del Sirius Red-Polarización.

Las fibras de colágeno vistas al microscopio óptico presentan acidófilia con la H/E. Se colorean de azul con la técnica tricrómica de Masson y de verde con la técnica tricrómica de Mallory. Pero estos métodos tintoriales no diferencian los distintos tipos de colágeno.

Por el contrario, los trabajos al respecto, siempre han manifestado que la tinción con Sirius Red y su posterior análisis con microscopía de polarización nos posibilitan demostrar selectivamente diferentes tipo de colágeno.<sup>193</sup> Con Picosirius Red/Polarización, las fibras de colágeno muestran birrefringencia debido a que sus unidades submicroscópicas se orientan en dirección al eje de la fibra. Estas subunidades están constituidas por colágeno de tipos I principalmente. El de tipo I es fuertemente birrefringente, con colores que varían del amarillo al rojo; en cambio, el colágeno de tipo III es menos refringente y aparece de color verde.<sup>194</sup>

Recientemente Lattouf y cols.<sup>195</sup> cuestionan el argumento de que el Rojo Sirius sirva para diferenciar los distintos tipos de colágeno y concluyen que la cantidad de luz polarizada por este colorante depende de la orientación y grosor de las fibras de colágeno.

No obstante, este método histoquímico es el preferido en el estudio de la matriz extracelular, útil para el estudio de la remodelación de los tejidos y por consiguiente para la evaluación de la fibrosis hepática usando métodos cuantitativos.<sup>196</sup> La cuantificación de la fibrosis se realiza por un software de análisis de imagen que proporciona un nivel muy alto de precisión permitiendo la evaluación numérica de la fracción de interés.

Otra ventaja de la utilización del método morfométrico en el estudio y evaluación de la fibrosis hepática se encuentra en la valoración del efecto de tratamientos antifibrinolíticos en biopsias repetidas.<sup>197</sup> Su alta precisión en la medición de la fibrosis, la convierte en una referencia perfecta para determinar la validez de los métodos no invasivos.

Sin embargo, sus limitaciones de costo y error de muestreo, hacen que sea un método no empleado en la rutina sistemática para el estudio de estos pacientes.<sup>198-199</sup> Estos datos se detallan muy bien en los estudios de Lagging y cols.<sup>200</sup> sobre la valoración de la fibrosis en pacientes portadores del VHC.

Goodman y cols.<sup>201</sup> en el instituto de patología en Washington señalan que una de las mayores limitaciones de la morfometría en su estudio en pacientes con hepatitis crónica C es que la técnica de imagen requiere de alta calidad y muestras cilíndricas no fragmentadas. Los autores destacan que en pacientes cirróticos, donde en ocasiones obtenemos biopsias fragmentadas, la cuantificación de la fibrosis hepática puede ser infravalorada. al utilizar espécimen biopsicos fragmentados.

Otro aspecto que destacaron en su estudio es la heterogeneidad de la fibrosis en el hígado. Así es posible que muestras cilíndricas de longitud adecuada, bien sin embargo no son representativa en cuanto a la cuantificación de la fibrosis.

Recientemente Manousou y cols.<sup>202-203</sup> estudian la predicción de la fibrosis utilizando técnicas de imagen digital en pacientes trasplantados por hepatitis C en el periodo del 1º año post-trasplante. Ellos utilizan muestras de más de 12 mm., con espacios portas que incluyan las tres estructuras portales bien constituidas según lo define Crawford y cols.<sup>204</sup> Estos estudios concluyen que la hepatitis de novo, la edad del donante y el uso discontinuo de inmunosupresores están asociados con una rápida progresión de la fibrosis después del trasplante y que la cuantificación proporcional de la fibrosis con respecto al área un mejor predictor clínico que los sistemas semicuantitativos utilizados en la actualidad.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### 2.1 TIPO DE ESTUDIO:

Se ha desarrollado un estudio retrospectivo y analítico de las biopsias post-trasplante de 103 pacientes trasplantados por VHC. El estudio se ha realizado en el Hospital Universitario la Fe de Valencia, hospital de referencia para la patología hepática del trasplante. A su vez, el Hospital la Fe realiza en torno a 100 trasplantes anuales, representando el 10 % de los trasplantes de hígado de España, el 5 % de Europa y el 1 % del mundo. Estas cifras de actividad trasplantadora se han mantenido y estabilizado en las dos últimas décadas.

### 2.2 MATERIAL:

#### Selección de pacientes:

Se seleccionaron las biopsias de 85 pacientes, correspondientes a los 105 pacientes iniciales trasplantados por VHC, en la unidad hepática del Hospital Universitario la Fe en el periodo de 2.007 al 2.011. Se analizaron 115 biopsias realizadas por protocolo post-trasplante a los 6 meses, al año y hasta 3 años post-trasplante en los casos trasplantados del año 2.007 y el año 2.008. Se incluyó, además, un análisis semicuantitativo de las biopsias cero (post- reperusión) de los pacientes incluidos en el estudio.

#### Criterio de inclusión de pacientes:

- Pacientes trasplantados por VHC que desarrollaron una hepatitis C recurrente en el 1º año post-trasplante.

#### Criterio de exclusión de pacientes:

- Pacientes pediátricos trasplantados por VHC.
- Pacientes que presentaron episodio de rechazo celular diagnosticado en el 1º año post-trasplante.
- Pacientes con hepatitis C colestásica fibrosante en el 1º año post trasplante.
- Pacientes con coinfección de varios virus de hepatitis (B, D, E).
- Otras causas hepáticas de disfunción del injerto (toxicidad, autoinmunidad, infección CMV).

#### Criterio de inclusión de biopsias:

- Biopsias de 20 mm. de longitud o más.
  - Biopsias que presentaron más de 6 espacios porta, por sección independiente de su longitud siguiendo los criterios de Crawford y cols.<sup>204</sup> quienes señalan como tal la presencia de tejido conectivo que contiene al menos dos estructuras lumbinales (ya sea la vena porta o la arteria hepática o de las vías biliares). Un espacio portal, se consideró completo cuando su circunferencia era visible o cuando al menos tres cuartas partes de la circunferencia y tres estructuras lumbinales eran visibles. Un espacio portal fue considerado incompleto cuando su circunferencia era incompleta, pero contenía al menos 2 estructuras lumbinales. Ambos espacios (completos e incompletos) eran cuantificados como imágenes para analizar. Los tractos portales no fueron contados en biopsias con una distorsión severa de la arquitectura hepática, como en la cirrosis, porque es imposible reconocer y contar espacios portas individuales en tales casos.
- Caso control: Se tomó una biopsia en cuña de un paciente sin hepatopatía crónica de base como caso control.



Criterio de exclusión de biopsias:

Se excluyeron del estudio aquellas biopsias que mostraron:

1. Predominio de espacios portas hiliares de gran tamaño predominantemente.
2. Áreas de fibrosis subcapsular.
3. Signos histológicos de rechazo celular.
4. Fibrosis perisinusoidal secundario correspondiente a casos con hepatitis C fibrosante colestásica.

Datos generales del estudio:

En la tabla 7 se recogen el nº de pacientes incluidos inicialmente en el estudio y el nº de biopsias analizadas por cada uno de los años estudiados.

<b>AÑO</b>	<b># DE PACIENTES INICIALES</b>	<b># DE PACIENTES INCLUIDOS</b>	<b># DE BIOPSIAS ANALIZADAS</b>
<b>2.007</b>	16	15	21
<b>2.008</b>	12	11	11
<b>2.009</b>	22	21	33
<b>2.010</b>	27	23	28
<b>2.011</b>	26	15	22
<b>TOTAL</b>	<b>103</b>	<b>85</b>	<b>115</b>

**Tabla 7:** Datos generales de estudio. Pacientes incluidos/ biopsias analizadas. Período (2.007 - 2.011).

Igualmente en la tabla 8 se muestra el desglose de las biopsias/pacientes estudiados y su distribución por sexo.

<b>AÑO</b>	<b>SEXO</b>	<b># DE PACIENTES INICIALES</b>	<b># DE PACIENTES INCLUIDOS</b>	<b># DE BIOPSIAS ANALIZADAS</b>
<b>2.007</b>	hombres	9	9	12
	mujeres	7	6	9
<b>2.008</b>	hombres	8	8	8
	mujeres	4	3	3
<b>2.009</b>	hombres	19	18	28
	mujeres	3	3	5
<b>2.010</b>	hombres	22	19	22
	mujeres	5	4	6
<b>2.011</b>	hombres	21	10	15
	mujeres	5	5	7
<b>Total</b>		<b>103</b>	<b>85</b>	<b>115</b>

**Tabla 8:** Datos generales del estudio según sexo y año. Pacientes incluidos/biopsias analizadas. Período (2.007 - 2.011).

## 2. 3 MÉTODO.

### Metodología para la biopsia hepática:

De un total de 103 pacientes trasplantados por VHC en el período 2.007 - 2.011, se incluyeron en el estudio 85 pacientes con 115 biopsias analizadas que cumplían los requisitos de inclusión en el estudio. La muestra para estudio fue una biopsia hepática guiada por ecografía mediante aguja de Trucut y fijada en formaldehído e incluido en parafina. Se realizaron tres cortes seriados a 4 micras, realizando tinción de hematoxilina/eosina y técnicas histoquímicas de Tricromo de Masson y Rojo Sirius Red.

Todas las muestras fueron revisadas y evaluadas por el patólogo responsable del diagnóstico de patología hepatobiliar y de trasplante hepático del Hospital Universitario la Fe de Valencia. El grado de fibrosis fue evaluado según el método semicuantitativo de valoración (METAVIR) que clasifica la fibrosis en cuatro estadios:

F0= Ausencia de Fibrosis.

F1= Leve expansión fibrótica (visible solamente a través de técnica de Tricromo de Masson).

F2= Expansión fibrótica con finos septos (visible con hematoxilina/eosina y técnica de Tricromo de Masson).

F3= Expansión fibrótica con septos gruesos incompletos

F4= Cirrosis.

Se consideró fibrosis avanzada los estadios igual y mayor que F3.

### Calidad y variabilidad de la muestra de estudio:

Para valorar la calidad y variabilidad de la muestra de estudio se analizó el diametro longitudinal de las biopsias cilindricas, no así el diametro transversal. Además se constabilizaron el número de imágenes obtenidas por cada muestra biopsica por medio de la visualización de cada espacio porta a 10X de aumento.

### Metodología de laboratorio:

Se analizaron las siguientes determinaciones de laboratorio de los pacientes incluidos.

AST/GOT: transaminasa glutámico oxalacético (VR= 0 – 37 U/L.).

ALT/GPT: transaminasa glutámico pirúvico (VR= 0 – 40 U/L.).

FA: fosfatasa alcalina (VR= 40 –129 U/L).

GGT: gamma glutamil transpeptidasa (VR= 11 – 50 U/L.).

Carga viral ARN del virus hepatitis C en sangre (VR= < 15 UI/ml. no detectado).

Posteriormente estas determinaciones se correlacionaron con el estadio de fibrosis (según esquema de METAVIR) y método cuantitativo morfométrico.

### Metodología del cálculo de la fibrosis cuantitativa.

El estudio morfométrico se realizó mediante un software de procesamiento de imagen digital (Imagen J). Las imágenes fueron captadas y procesadas por medio de:

- Cámara digital CCD de refrigeración líquida, D5-5Mc Cooled DS Camera 5.24 megapixels (Nikon Corp.) conectada a la Unidad de Control DS-U2 (Nikon Corp.).
- Microscopio Eclipse 80i (Nikon Corp.) que incluye una Unidad Digital de Imagen *Digital Imaging Head* (Nikon Corp.).
- Ordenador Intel Core™ Duo XP Professional 6600; 2.40 GHz.

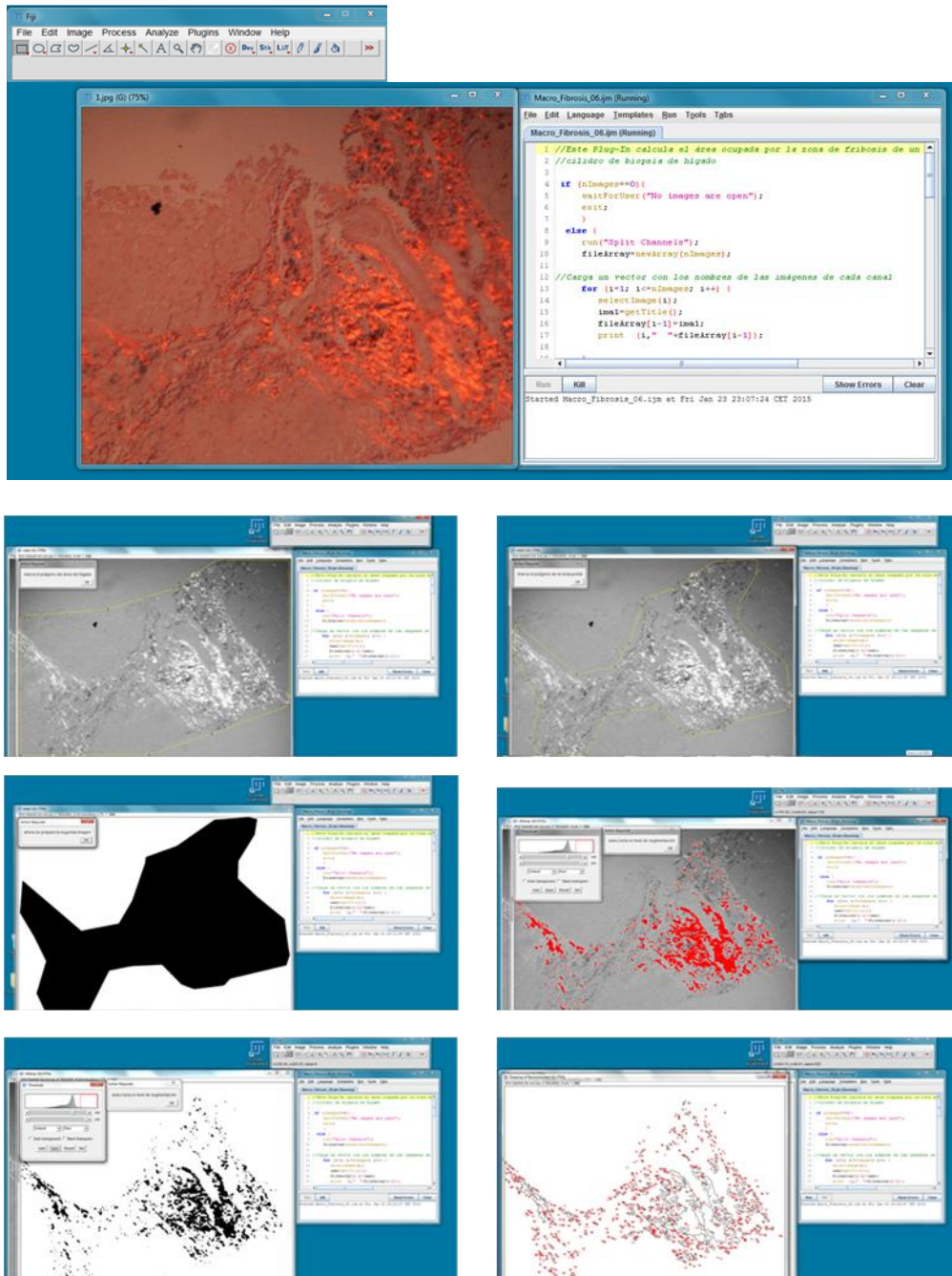


**Fig.18: Analizador de imagen.**

Para seleccionar la imagen correspondiente que queremos estudiar, se recorre la preparación con un pequeño aumento de 4X hasta identificarla. Localizado el *hot spot*, posteriormente se incrementa el número de aumentos hasta un aumento total de 10X, con un campo real en el monitor de 0,5028mm.<sup>2</sup>, usando el polarizador para visualizar la preparación del Sirius Red.

La cámara capta la imagen del microscopio, la traslada al ordenador y el monitor ofrece la imagen digitalizada.

Se elaboró un programa informático morfométrico de macroinstrucciones (Macrofibrosis), con secuenciación de los pasos para cuantificación de la FH. Programa Digital Imagen J. Anexo (Fig.1-12 y Tabla 1).



**Fig. 19:** Cuantificación de fibrosis hepática en el caso 6B-2010 (fibrosis estadio 4). Programa morfométrico Imagen J.

Las imágenes de las biopsias, captadas por el microscopio, al ser policromáticas, se descomponen en los tres canales de color (rojo, verde y azul). Obteniendo tres imágenes en gris, una por cada canal.

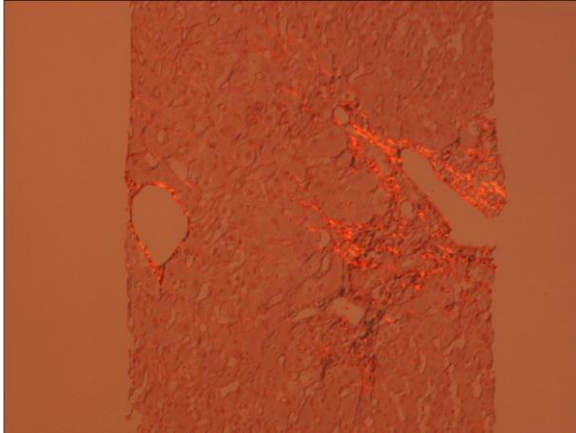
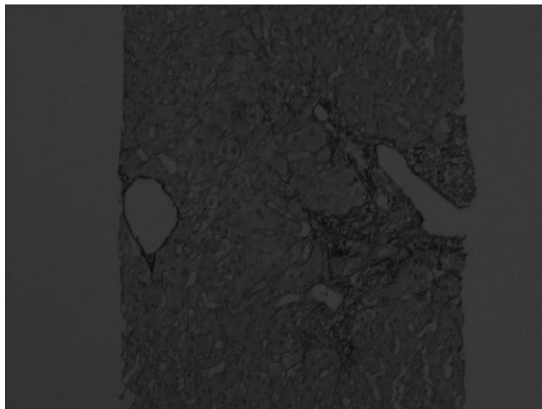
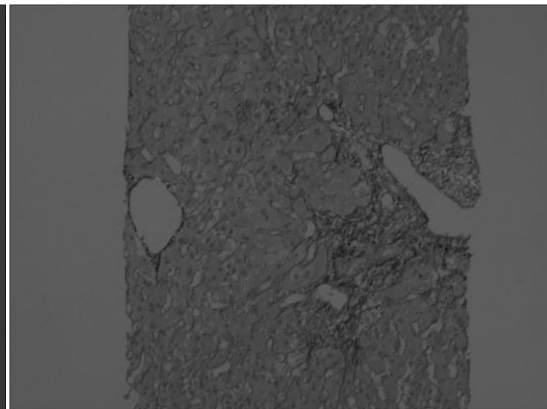


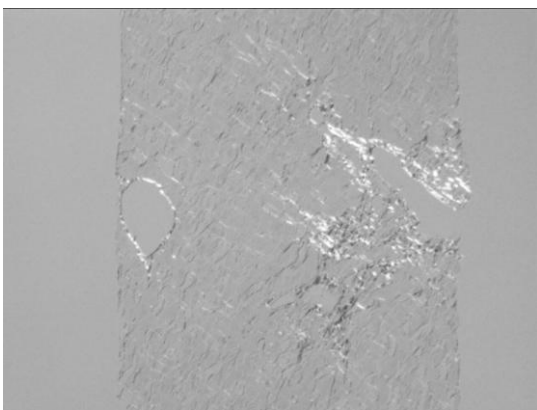
Imagen original 19D-2007.



Canal azul



Canal verde

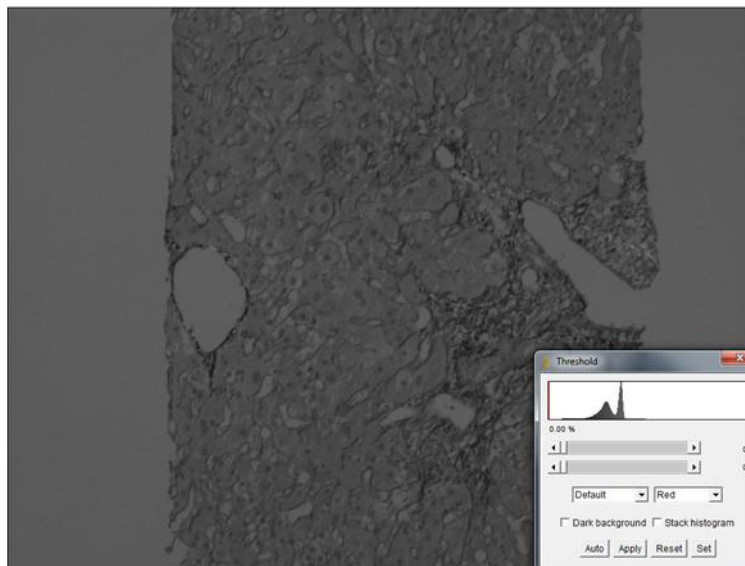


Canal rojo

**Fig. 20:** Imágenes de los tres canales de procesamiento morfométrico.

Cada canal proporciona un tipo de información diferente. Con el canal verde, podemos cuantificar el porcentaje de área del tejido biopsiado respecto a toda la imagen y con el rojo la fibrosis, tanto la que polariza como la que no.

Por cada imagen gris, de 8 bits, hay 256 ( $2^8$ ) niveles diferentes de gris, donde el negro es el valor 0, y el blanco 255. La imagen está representada por un histograma de niveles de gris, donde se representa en el eje X el rango de grises (0-255) y en el eje Y el número de píxeles con dicho valor de gris.



**Fig. 21:** Histograma de niveles de gris para la imagen original 19D-2007.

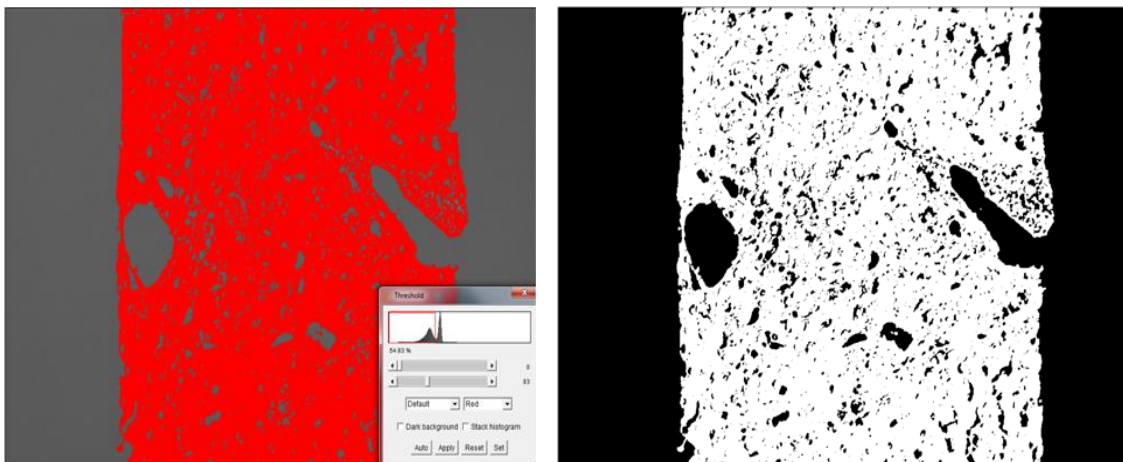
En las imágenes fue posible separar el tejido del fondo ya que, en el histograma, los píxeles correspondientes a tejido aparecían separados de los del fondo (Fig. 21-23).





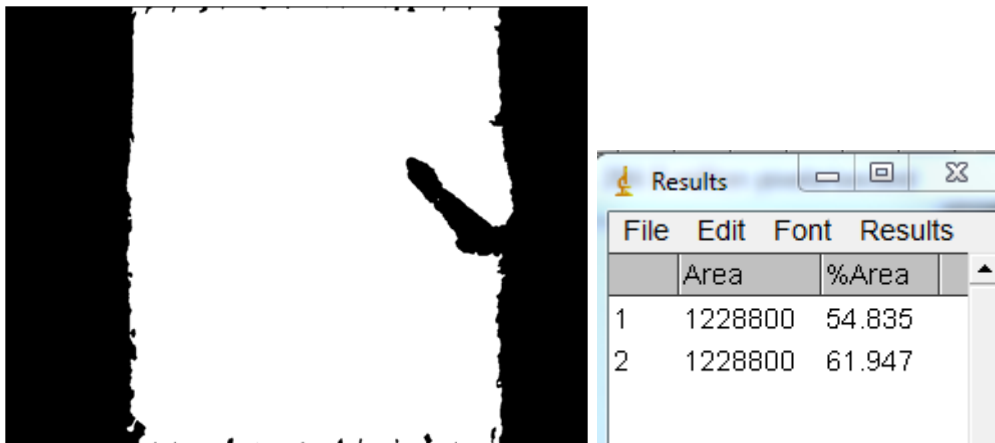
**Fig. 22:** Histograma señalando los píxeles correspondientes al tejido y fondo de la imagen original 19D-2007.

Mediante el programa de procesamiento de imagen digital (Image J) es factible seleccionar automáticamente los píxeles correspondientes a tejido, seleccionando el rango de niveles de gris que deseamos seleccionar (Fig. 22).



**Fig. 23:** Histograma señalando los píxeles correspondientes al tejido. Imagen binaria de la imagen original 19D-2007.

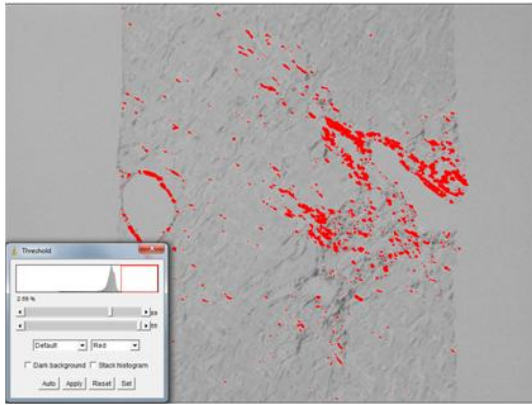
En este caso se han seleccionado todos los píxeles en el rango (0 - 83) que corresponden a tejido. De esta manera, se obtiene una imagen binaria, de valor 0 o 1, que correspondería al área seleccionada y a la no seleccionada. Los espacios dentro del tejido corresponden al sistema vascular /capilar y venoso, los cuales se pueden rellenar.



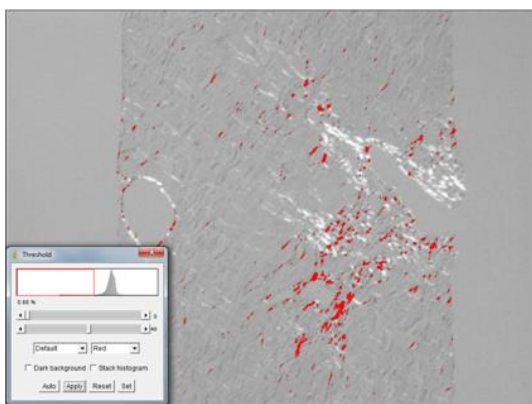
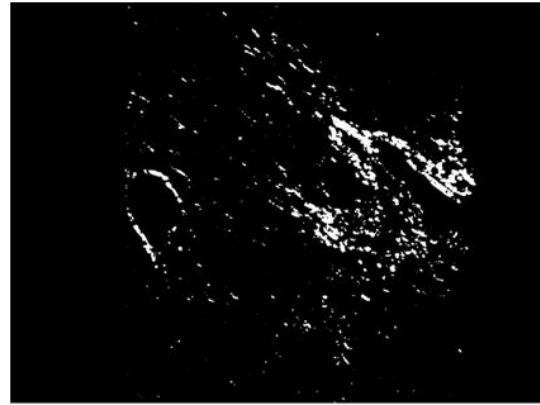
**Fig. 24:** Imagen binaria con relleno del sistema vascular de la imagen original 19D-2007. Valor del área total del tejido sin sistema vascular y con el mismo.

En ambos casos, se puede calcular el número de píxeles totales de toda la imagen y los correspondientes a las regiones blancas, que corresponden a las regiones seleccionadas, y calcular el porcentaje de área seleccionada sobre el total de la imagen. El área calculada en primer lugar ( File1) es la referente al tejido sin incluir el sistema vascular y el segundo (File 2) rellenándolo. (Fig. 24).

Con la imagen del canal rojo podemos de otra parte calcular las áreas de fibrosis que polarizan y las que no, de la misma forma que se calcula el área de tejido.



Fibrosis polarizante.



Fibrosis no polarizante.

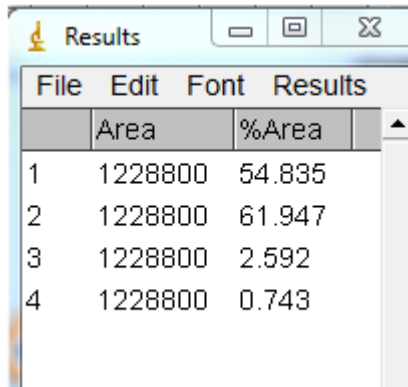


**Fig. 25:** Imagen del canal rojo representando fibrosis polarizante y no polarizante.

Imagen original 19D-2007.

En el canal rojo solo se observa en el histograma una curva y no dos, como se veía en el canal verde. Es por eso que no se puede usar para cuantificación de tejido. Sin embargo es el idóneo para la fibrosis, porque en la imagen original, que es mayoritariamente roja, la fibrosis aparece muy brillante o muy oscura, y en el canal rojo, la fibrosis que polariza se transforma en una región muy blanca, y la que no polariza, negra.

Además, las regiones de interés están en los extremos del histograma, ya que la fibrosis es blanca o negra (valores cercanos a 0 y a 255). De la misma forma que para el tejido, se puede cuantificar el área que ocupa la fibrosis sobre toda la imagen.



	Area	%Area
1	1228800	54.835
2	1228800	61.947
3	1228800	2.592
4	1228800	0.743

**Fig.26:** Valores de las cuatro variables morfométricas cuantificadas de la Imagen original 19D-2007.

File 1: área total de tejido total.

File 2: área del tejido con relleno del sistema vascular.

File 3: área de fibrosis polarizante o fibrosis blanca.

File 4: área de fibrosis no polarizante o fibrosis negra.

La fibrosis de mayor interés es la que polariza, que aparece en un tono blanco y la cual hemos denominado fibrosis blanca, pero también se puede estudiar la fibrosis total, haciendo la suma de la región blanca y la negra.

Por último, para saber el porcentaje de tejido ocupado por fibrosis se realiza lo siguiente:

$$\text{Área tejido fibrotico} = \text{Área de la fibrosis} / \text{Área del tejido} \times 100$$

## 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y VARIABLES DEL ESTUDIO.

### Variables dependientes:

- Área de fibrosis blanca: Fibrosis colágena tipo I que polariza fuertemente frente a la luz polarizada con el uso del rojo Sirius y fibrosis reticulínica que polariza débilmente.
- Área de fibrosis negra : Fibrosis reticulínica III que no polariza a la luz óptica con el uso del Rojo Sirius.
- Área de fibrosis total (blanca más negra).
- Área de fibrosis blanca sobre tejido con sistema vascular (incluye arteria porta, vena porta y capilares fenestrados).
- Área de fibrosis blanca sobre tejido sin sistema vascular.
- Área de fibrosis total sobre tejido con sistema vascular.
- Área de fibrosis total sobre tejido sin sistema vascular.

### Variables independientes:

- Tamaño muestral y número de espacios portas.
- Parámetros bioquímicos referidos a los valores de (TGO, TGP, FA, GGT).

### Variable a correlacionar:

- Estadios semicuantitativos de la fibrosis hepática según esquema de METAVIR.

### 2. 4. 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los resultados fueron introducidos para su posterior estudio en el programa estadístico SPSS 6.01 para Windows.

Dados, los números  $\{a_1, a_2, \dots, a_n\}$ , la **media aritmética** se define como:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n}$$

La desviación estándar, también llamada desviación típica, es una medida de dispersión usada en estadística que nos indica cuánto tienden a alejarse los valores concretos del promedio en una distribución. Se calcula como:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

De manera, que, si la desviación estandar es pequeña, los valores estadísticos estarán mas cercanos a la media, y si es grande, estarán más alejados de la media. Se señalan por último que se eliminaron las biopsias cuyo número de imágenes es inferior a 6, tomando como un mínimo de espacios portas por cilindro ese valor.

Para cada biopsia y cada imagen se calcula el área de tejido con y sin sistema vascular, la fibrosis que polariza ( fibrosis blanca) y la que no ( fibrosis negra).

De esta forma obtuvimos las siguientes variables de cada imagen cuantificando el promedio para cada cilindro biopsico, calculando la media y la desviación estandar:

- Área de fibrosis blanca: Fibrosis polarizante.
- Área de fibrosis total (suma de fibrosis blanca y fibrosis negra): Fibrosis polarizante y no polarizante respectivamente.
- Área de fibrosis blanca sobre tejido con sistema vascular: la fibrosis blanca de cada imagen se divide entre el área de tejido con sistema vascular y se multiplica por 100.
- Área de fibrosis blanca sobre tejido sin sistema vascular: la fibrosis blanca de cada imagen, se divide entre el área de tejido sin sistema vascular y se multiplica por 100.
- Área de fibrosis total sobre tejido con sistema vascular: se suma el área de fibrosis blanca y la negra, se divide entre el área de tejido con sistema vascular y se multiplica por 100.
- Área de fibrosis total sobre tejido sin sistema vascular: se suma el área de fibrosis blanca y la negra, se divide entre el área de tejido sin sistema vascular y se multiplica por 100.

Para cada estadio de fibrosis cualitativa clasificado según esquema de METAVIR (0 – 4) se realizó la media de los porcentajes de fibrosis cuantitativa, se calculo la desviación estandar de cada estadio, la mediana y el coeficiente de correlación (coeficiente de PEARSON), representando todos los resultados graficamente.

## RESULTADOS

### *1- Calidad y Variabilidad de la muestra:*

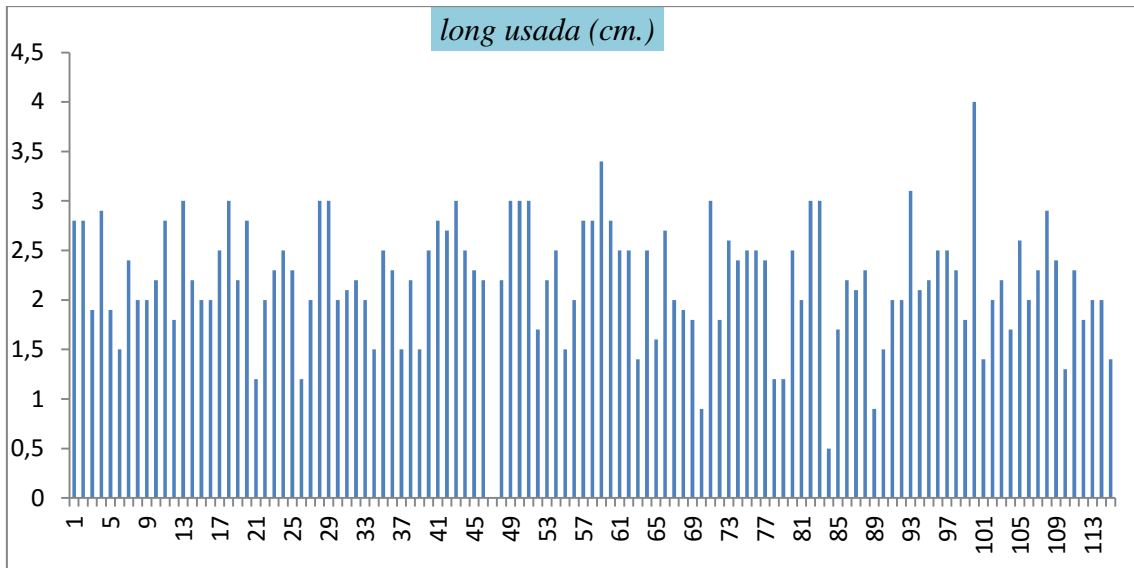
	# DE IMÁGENES POR CADA BIOPSIA	LONG CILINDROS (cm.)	# DE FRAGMENTOS BIOPSICOS	LONGITUD UTILIZADA (cm.)
<b>PROMEDIO</b>	9,67	2,38	1,25	2,21
<b>Desv Stand</b>	3,44	0,52	0,62	0,57

**Tabla 9:** Desviación Estándar de la variabilidad muestral (longitud, número (#) de fragmentos e imágenes analizadas).

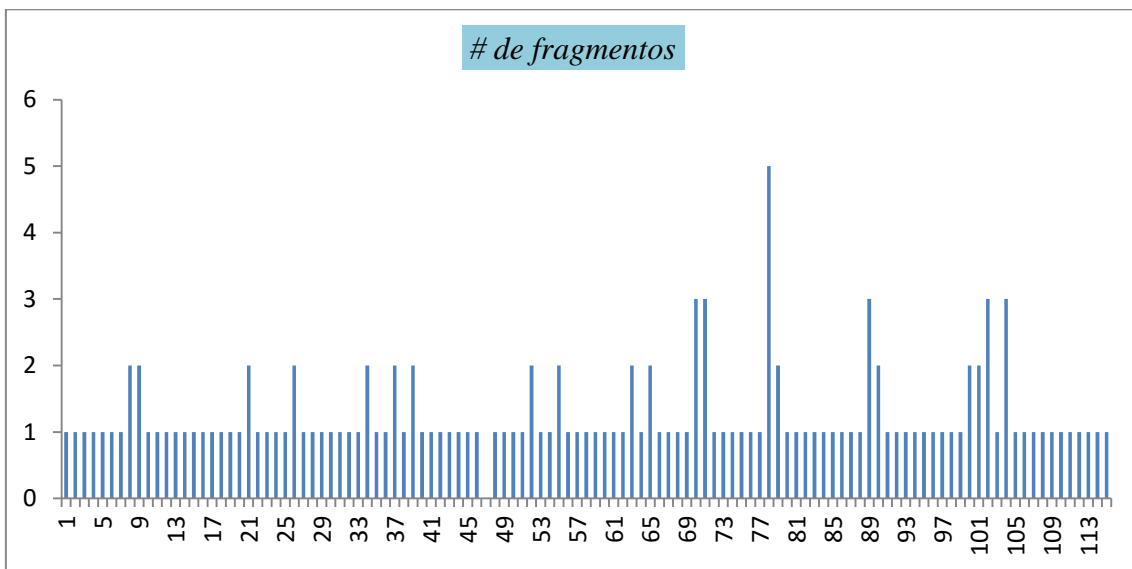
	# DE IMÁGENES POR CADA BIOPSIA	
<b>Estadios</b>	PROMEDIO	DESV EST
<b>0</b>	8,67	3,88
<b>1</b>	9,59	4,22
<b>2</b>	8,88	2,45
<b>3</b>	11,38	3,53
<b>4</b>	14,25	3,59

**Tabla 10:** Número de imágenes utilizadas en los distintos estadios de fibrosis del sistema de METAVIR.





**Fig. 27:** Variabilidad por biopsia del tamaño de la muestra utilizada. La media de la longitud biopsica utilizada fue de 2,25 cm..

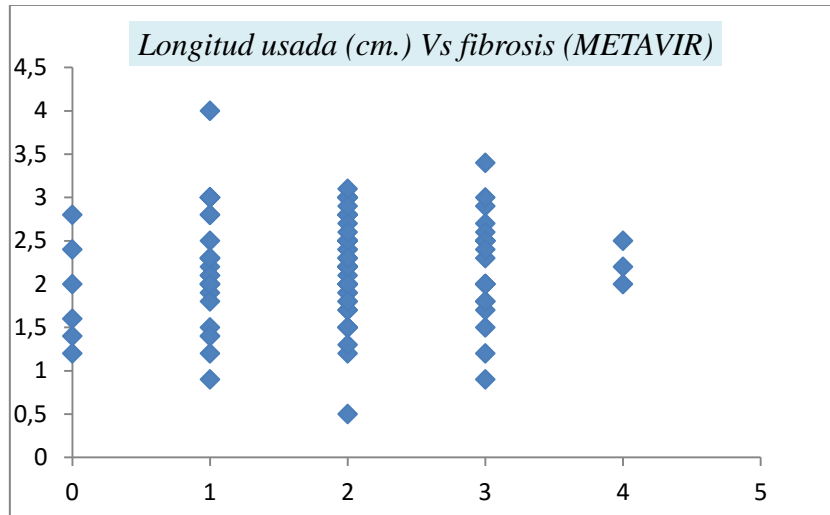


**Fig. 28:** Promedio por biopsia, del número de fragmentos cilíndricos utilizados en el análisis de cada muestras. Más del 50 %, consistía en un solo fragmento cilíndrico de 2,5 cm. de longitud.

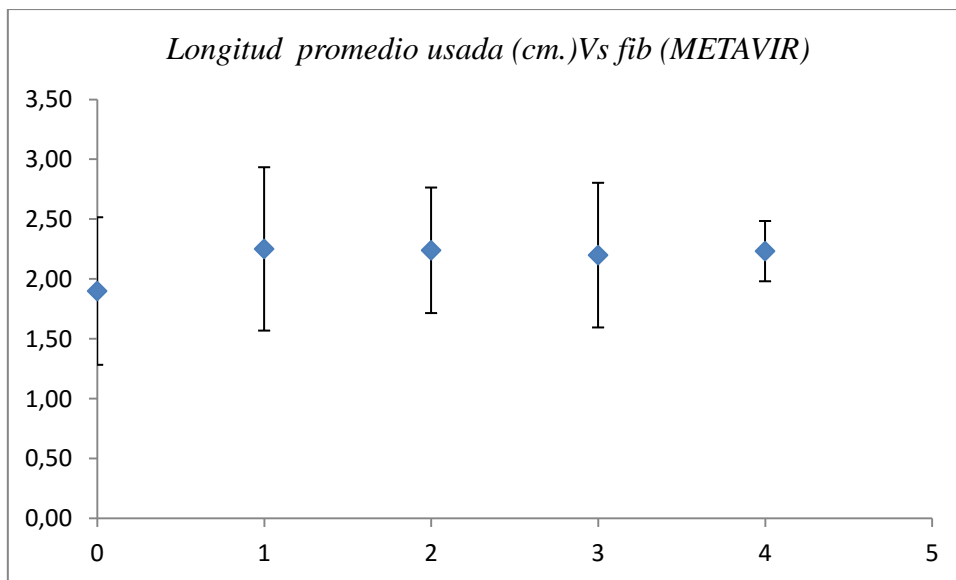
2. Correlación calidad de la muestra (longitud) y estadios de METAVIR.

			LONGITUD USADA (CM.)		
	FIBROSIS (F0)	FIBROSIS (F1)	FIBROSIS(F2)	FIBROSIS (F3)	FIBROSIS (F4)
PROMEDIO	1,9	2,25	2,24	2,2	2,23
Desv Stand	0,61	0,68	0,52	0,60	0,25

**Tabla 11:** Promedio de la longitud de la muestra con respecto a los cuatros estadios de fibrosis semicuantitativo clasificada según esquema de METAVIR.

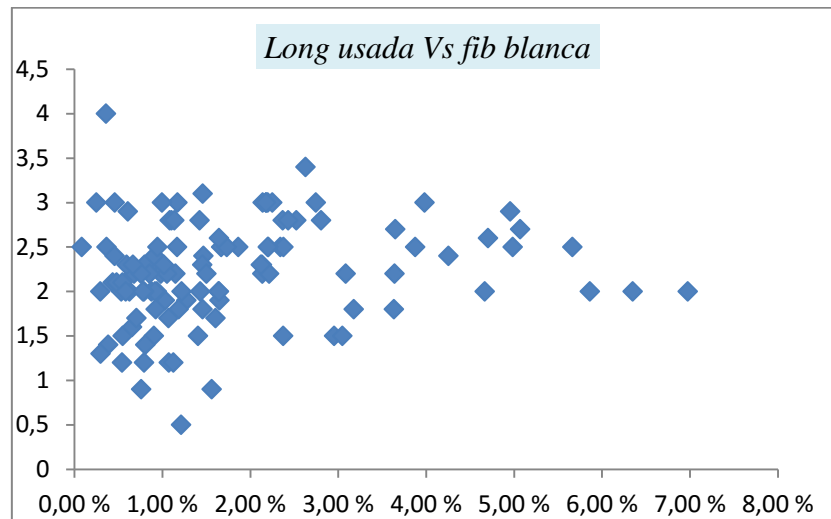


**Fig.29:** Variabilidad de la longitud de la muestra y valoración semicuantitativa de la fibrosis según esquema de METAVIR.

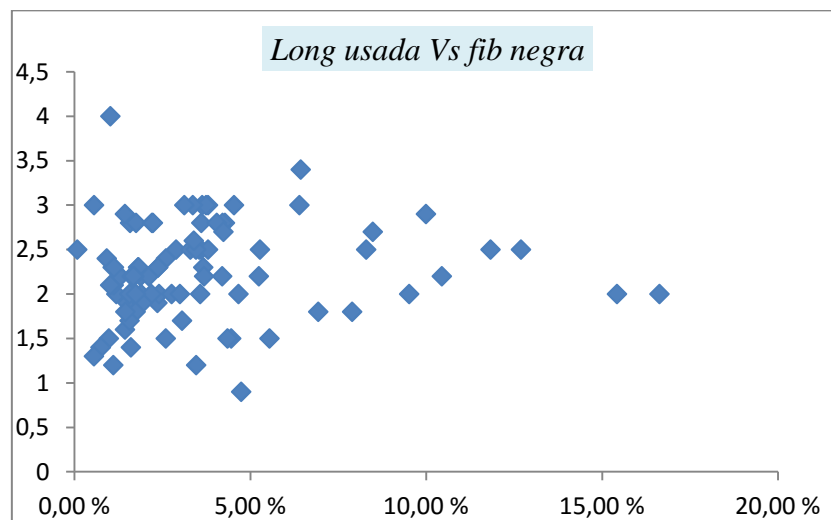


**Fig. 30:** Longitud promedio de la biopsia con respecto a los estadios semicuantitativos (METAVIR).

3. Correlación de calidad de la muestra con variables dependientes morfológicas (fibrosis blanca y negra).



**Fig. 31:** Correlación de la longitud de la muestra y la fibrosis colágena (fibrosis blanca).



**Fig. 32:** Correlación de la longitud de la muestra y la cuantificación de fibrosis reticulínica (fibrosis negra).

4. Cálculo de variables dependientes morfométricas (fibrosis) y correlación con los 4 estadios del Sistema de METAVIR.

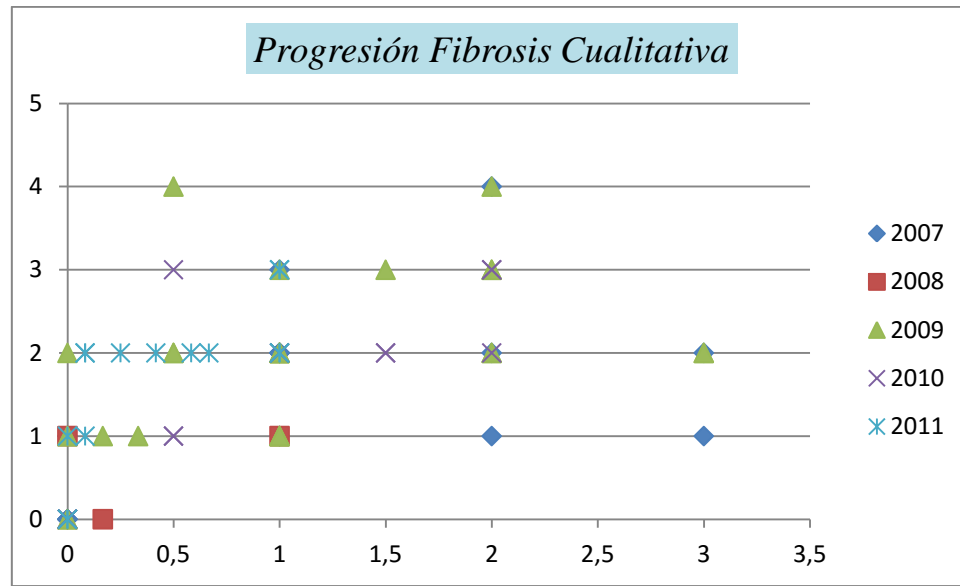
ESTADIO FIBROSIS	AREA DE FIBROSIS BLANCA			AREA DE FIBROSIS TOTAL			% FIBROSIS BLANCA SOBRE TEJIDO CON ARTERIA			% DE FIBROSIS BLANCA SOBRE TEJIDO SIN ARTERIA			% DE FIBROSIS TOTAL SOBRE TEJIDO CON ARTERIA			% DE FIBROSIS TOTAL SOBRE TEJIDO SIN ARTERIA		
	%	D Std	Med	%	D Std	Med	%	D Std	Med	%	D Std	Med	%	D Std	Med	%	D Std	Med
Caso control	0,50%	0,10%		1,07%	0,22%		0,50%	0,10%		0,53%	0,14%		1,08%	0,22%		1,29%	0,30%	
0	0,93 %	0,46%	1,0%	1,52 %	0,69 %	1,4%	0,96%	0,73%	0,8%	1,27%	0,99%	0,9%	1,89%	0,61%	1,7%	2,49%	0,84%	2,1%
1	1,46 %	1,14%	1,0%	2,60 %	1,67 %	2,2%	2,49%	1,66%	2,5%	2,82%	2,01%	2,7%	3,67%	2,38%	3,4%	4,22%	3,19%	3,7%
2	1,47 %	0,95%	1,1%	2,72 %	1,49 %	2,3%	2,33%	0,98%	2,3%	2,65%	1,06%	2,5%	3,90%	1,39%	3,7%	4,48%	1,65%	4,54%
3	2,87 %	1,89%	2,3%	5,85 %	3,87 %	5,28%	4,42%	2,17%	3,6%	4,70%	2,33%	3,9%	8,67%	4,88%	7,4%	9,25%	5,31%	7,8%
4	4,02 %	2,22%	3,7%	10,6%	5,74%	11,5%	6,30%	2,79%	4,9%	7,0%	2,6%	6,68%	17,0%	4,91%	14,2%	19,1%	4,35%	19,1%
COEFICIENTE CORRELACIÓN PEARSON (R)	0,894			0,838			0,917			0,902			0,829			0,805		

**Tabla 12:** Porcentaje de fibrosis blanca y fibrosis total con tejido con y sin arteria en los cuatros estadios cuantitativos. Desviación estándar (D Std.). Mediana (Med.). Coeficiente de Correlación PEARSON (R) entre las distintas variables morfométricas dependientes.

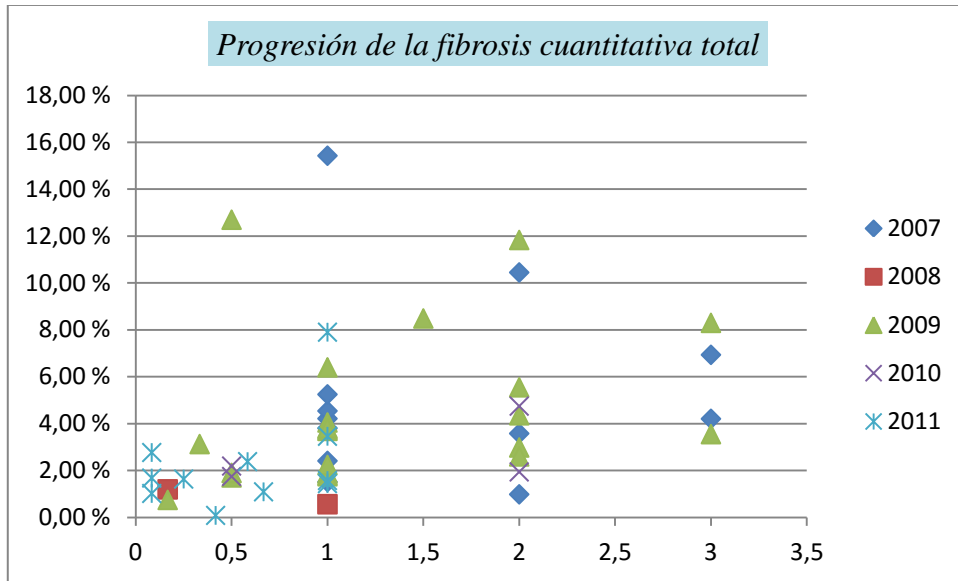
			% ÁREA FIBROSIS BLANCA		% ÁREA FIBROSIS TOTAL	
	% Área fibrosis blanca	% Área fibrosis total	Sobre tejido con sistema Vascular	Sobre tejido sin sistema vascular	Sobre tejido con sistema vascular	Sobre tejido sin sistema vascular
<b>Coefficiente PEARSON</b>	0,18	0,29	0,29	0,27	0,43	0,40

**Tabla 13:** Correlación de variables dependientes (fibrosis) con respecto a la valoración de la fibrosis por medio sistema METAVIR (Fibrosis cuantitativa /estadio).

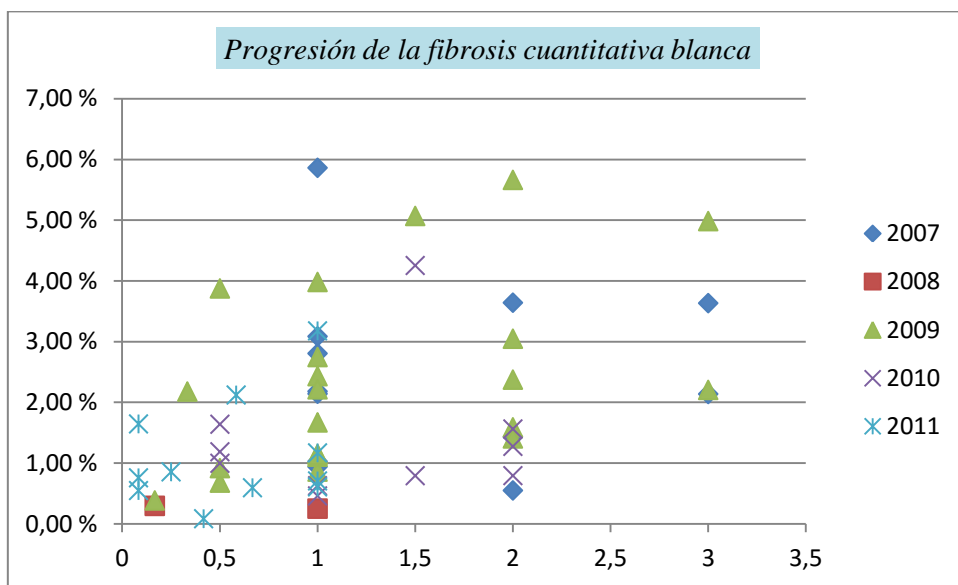
5. Evolución de la fibrosis en el tiempo.



**Fig. 33:** Progresión en tiempo (valoración en años) de la Fibrosis semicuantitativa (SISTEMA METAVIR), incluyendo la Biopsia 0 (Post - Reperfusión). Período (2.007 - 2.011).



**Fig. 34:** Progresión en tiempo (valoración en años) de la cuantificación de fibrosis total. Período (2.007 -2.011).

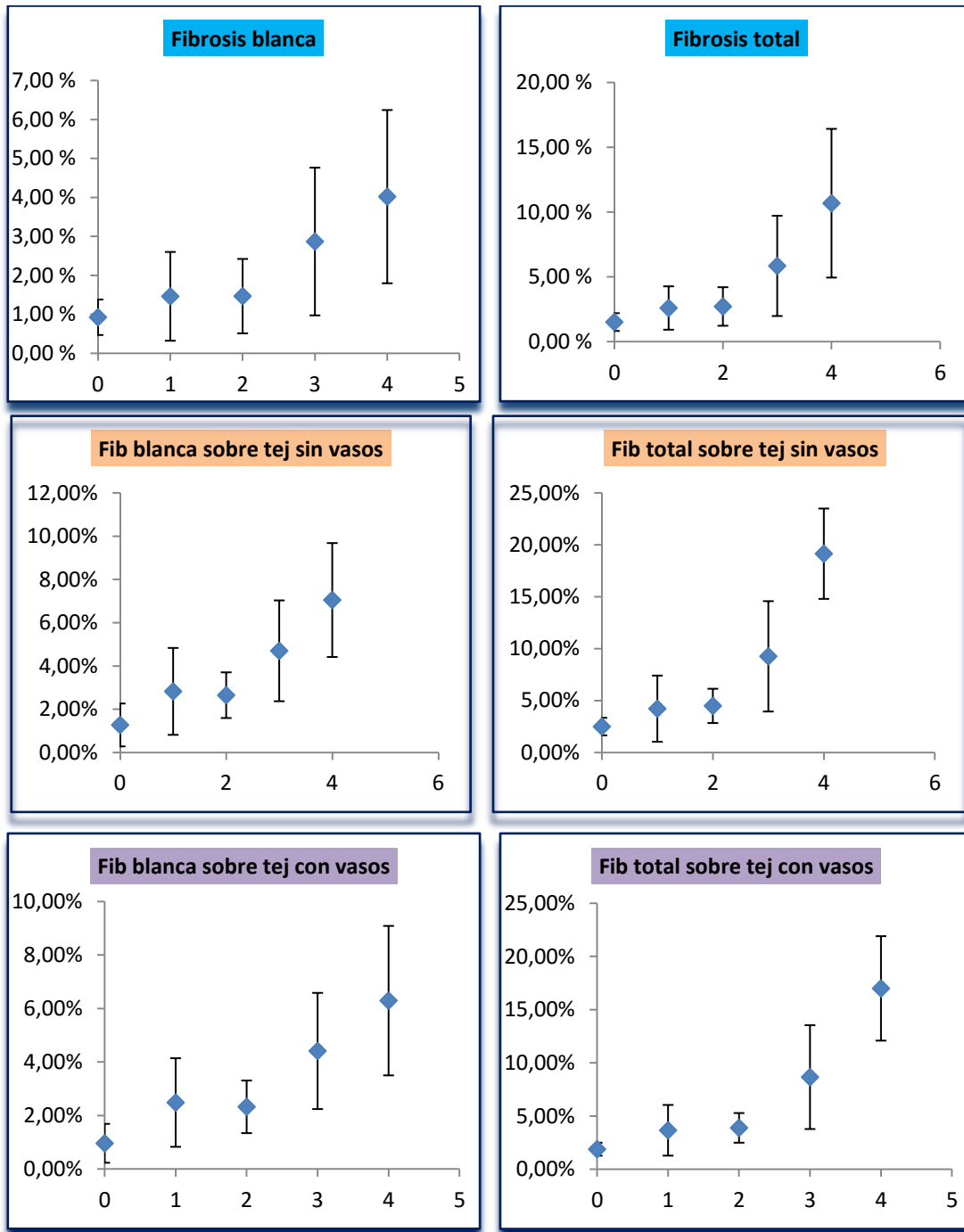


**Fig. 35:** Progresión en tiempo (valoración en años) de la cuantificación de fibrosis blanca. Período (2.007-2.011).

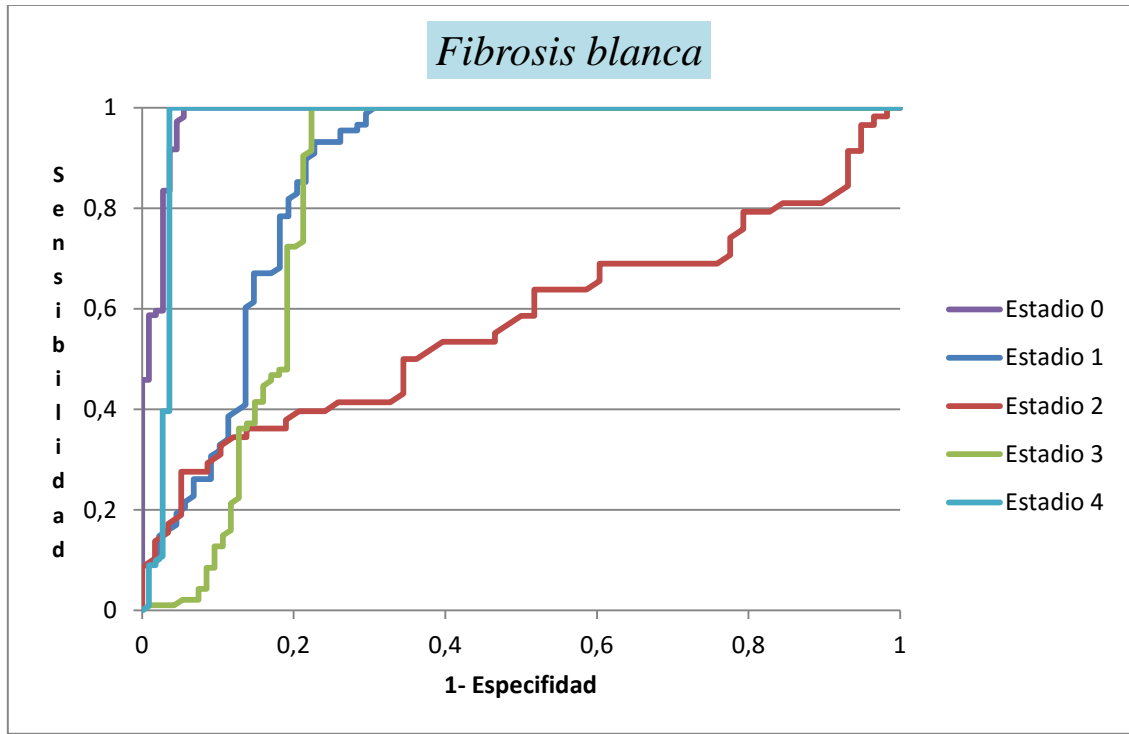


## 6. Validez del sistema de METAVIR.

Gráficas de variables dependientes y correlación con el Sistema de METAVIR.

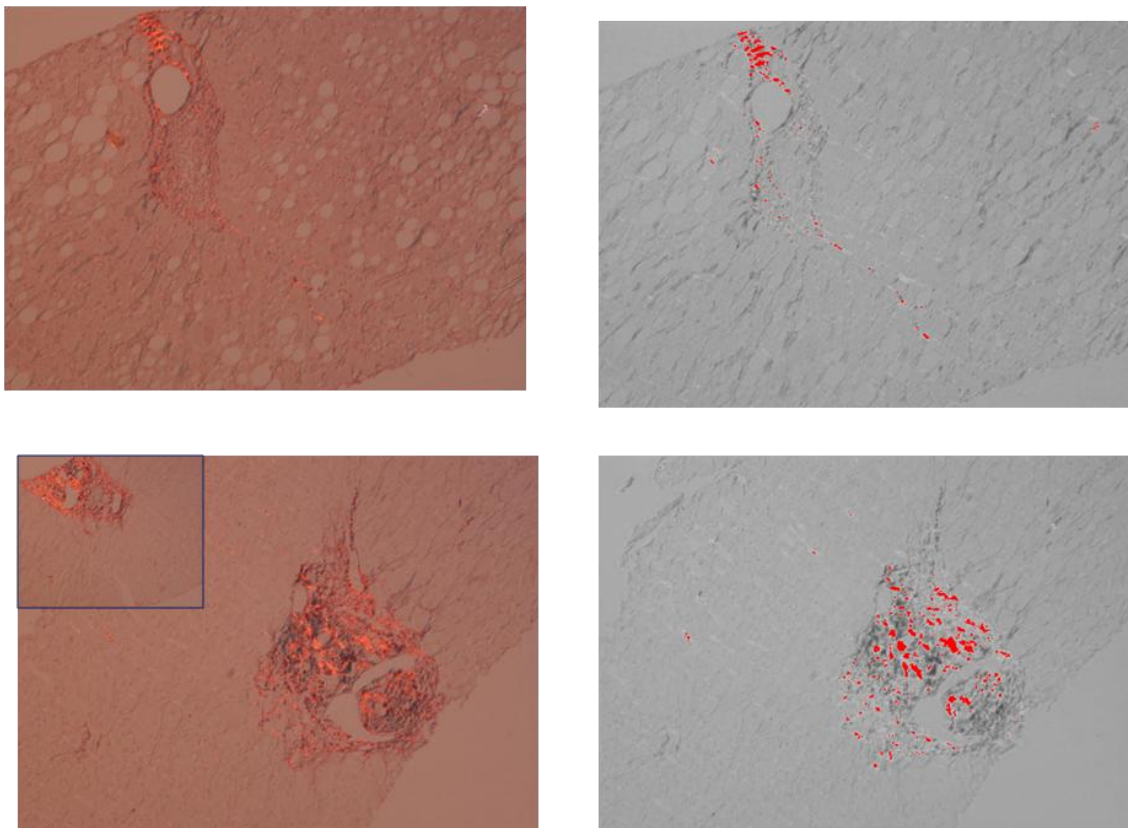


**Fig. 36:** Correlación entre las variables analizadas y los cuatro estadios de fibrosis (según esquema de METAVIR). Nótese el solapamiento en los estadios 1 y 2 y la presencia de fibrosis en algunos casos de estadio F0.

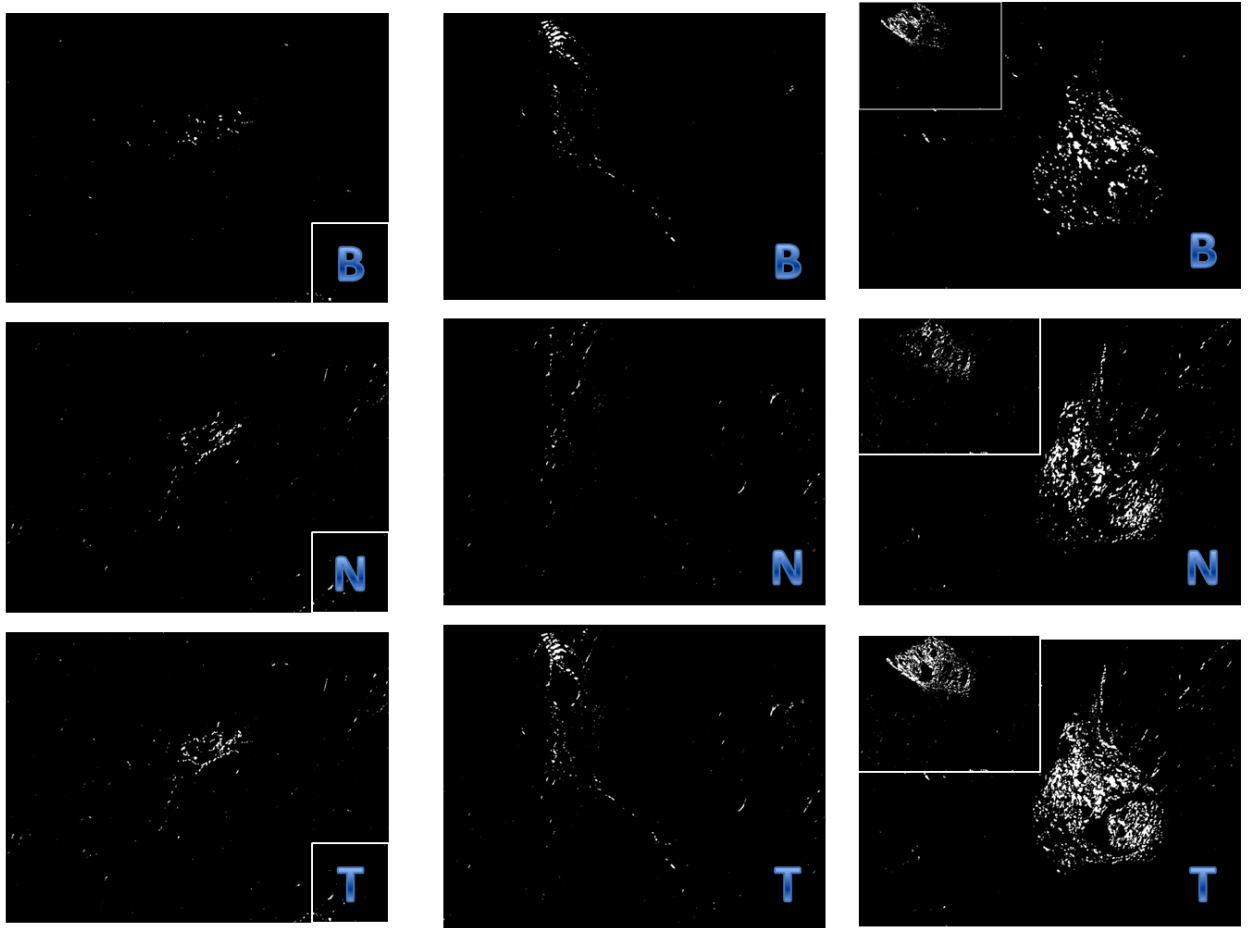


**Fig. 37:** Sensibilidad/ Especificidad de la cuantificación de la fibrosis blanca en los distintos estadios semicuantitativos del sistema METAVIR. Gráfica Curva ROC.

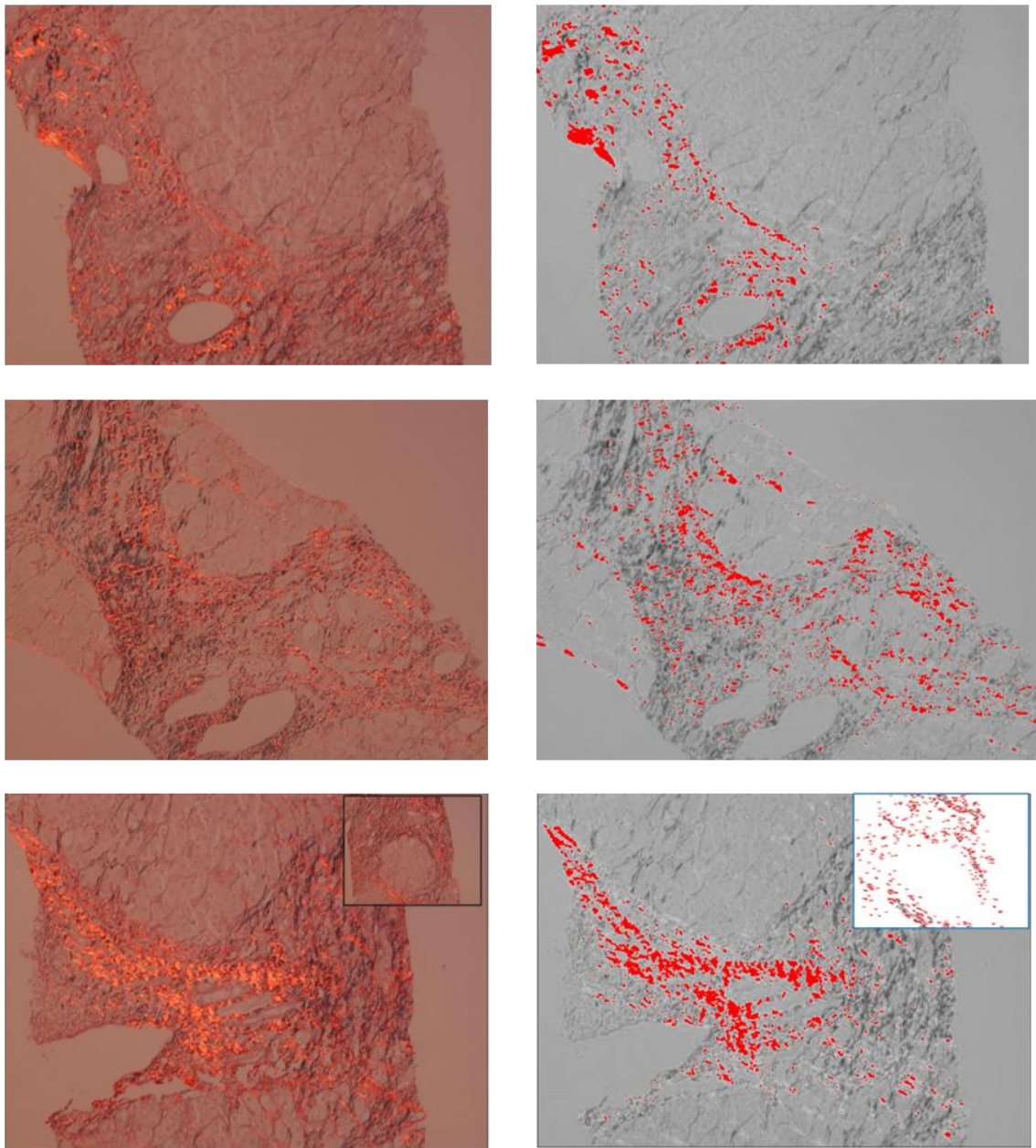
7. Imágenes Sirius red y Morfométricas (canal rojo) de casos en distintos estadios de Fibrosis.



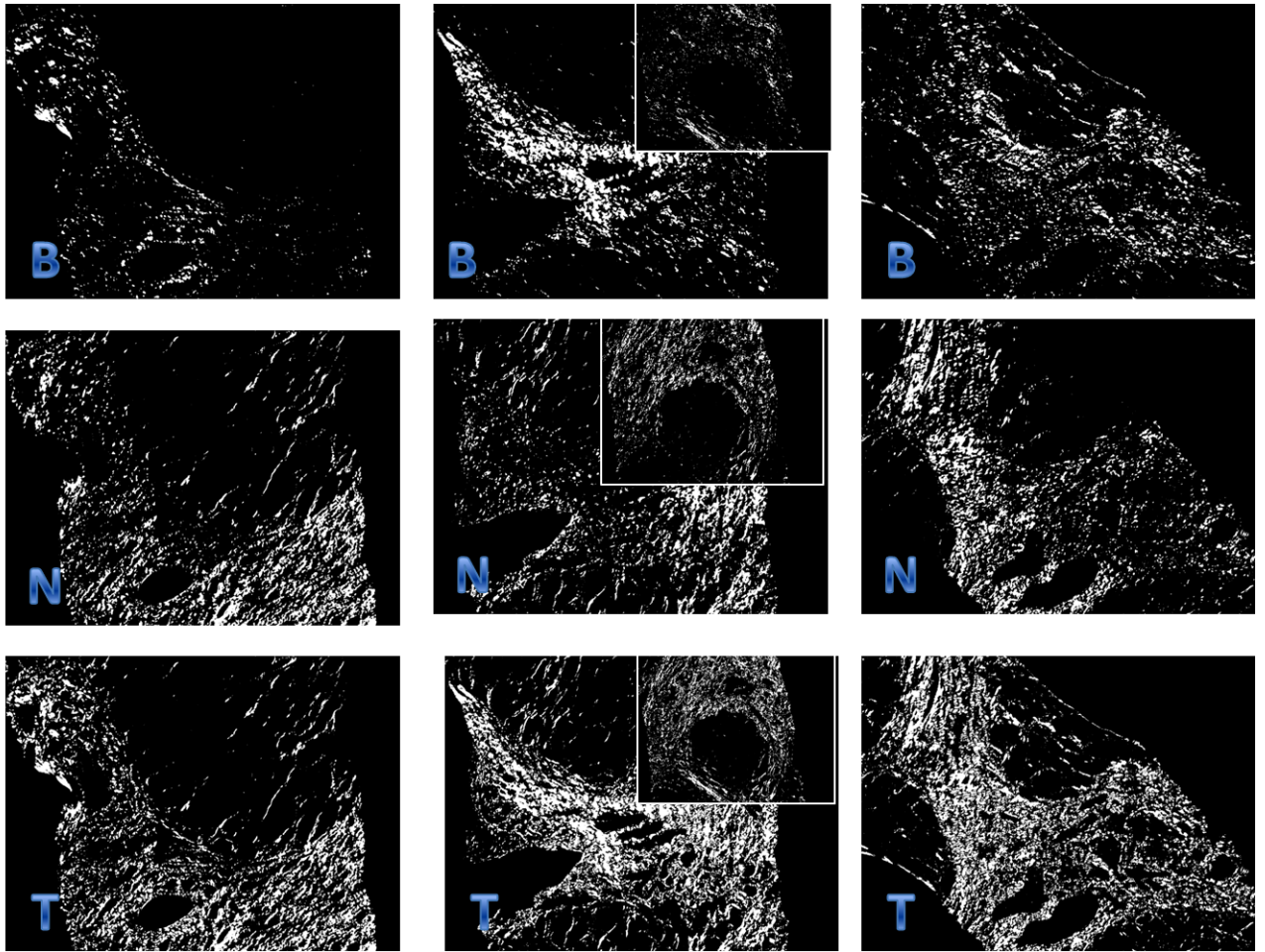
**Fig. 38.** Imágenes de tinción histoquímica frente al Rojo Sirius y canal rojo en el estudio morfométrico de la cuantificación de la fibrosis de un caso de fibrosis F0 y F1.



**Fig. 39:** Imágenes morfométricas de la cuantificación de la fibrosis de espacios portas de casos con fibrosis F0 y fibrosis inicial F1. **B** (fibrosis blanca), **N** (fibrosis negra), **T** (fibrosis total).



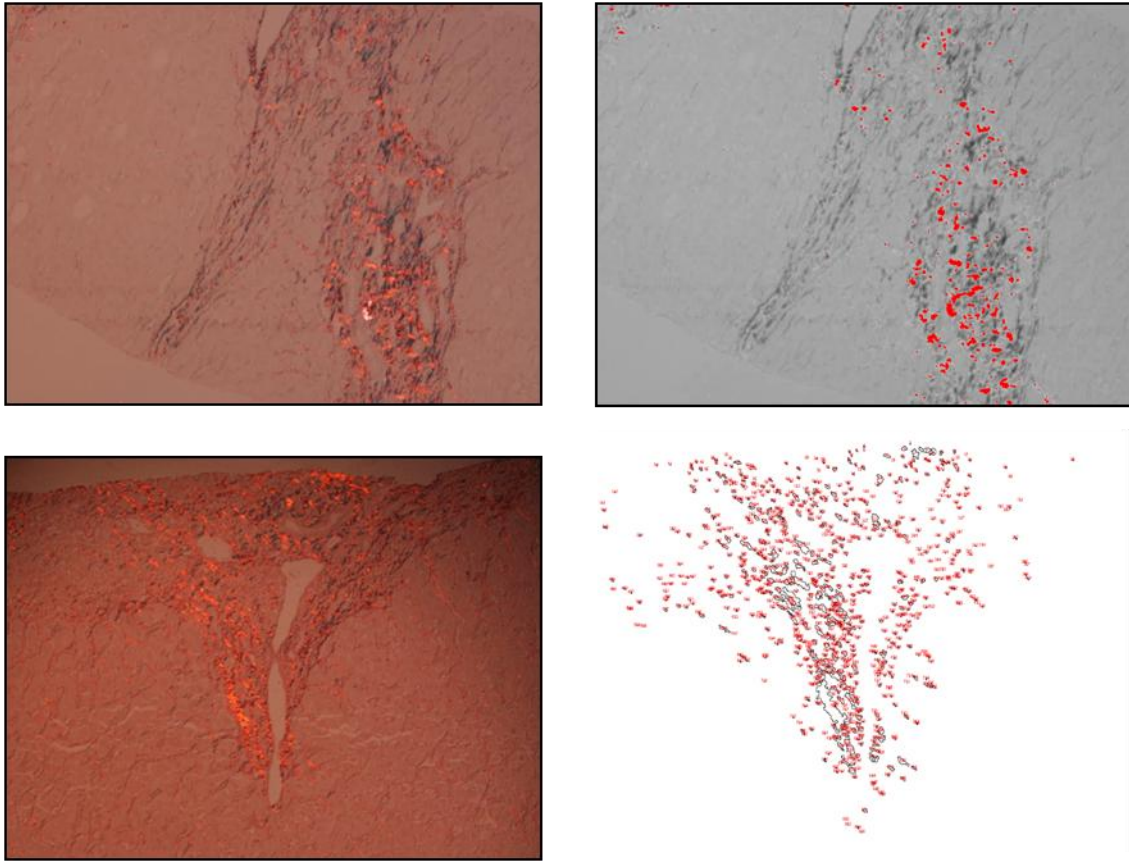
**Fig. 40.** Imágenes de tinción histoquímica frente al Rojo Sirius y canal rojo en el estudio morfométrico de la cuantificación de la fibrosis de un caso de fibrosis avanzada F3 y F4. Expansión fibrótica con formación de puentes y nodulaciones de carácter regenerativos (valorada F4 sistema de METAVIR).



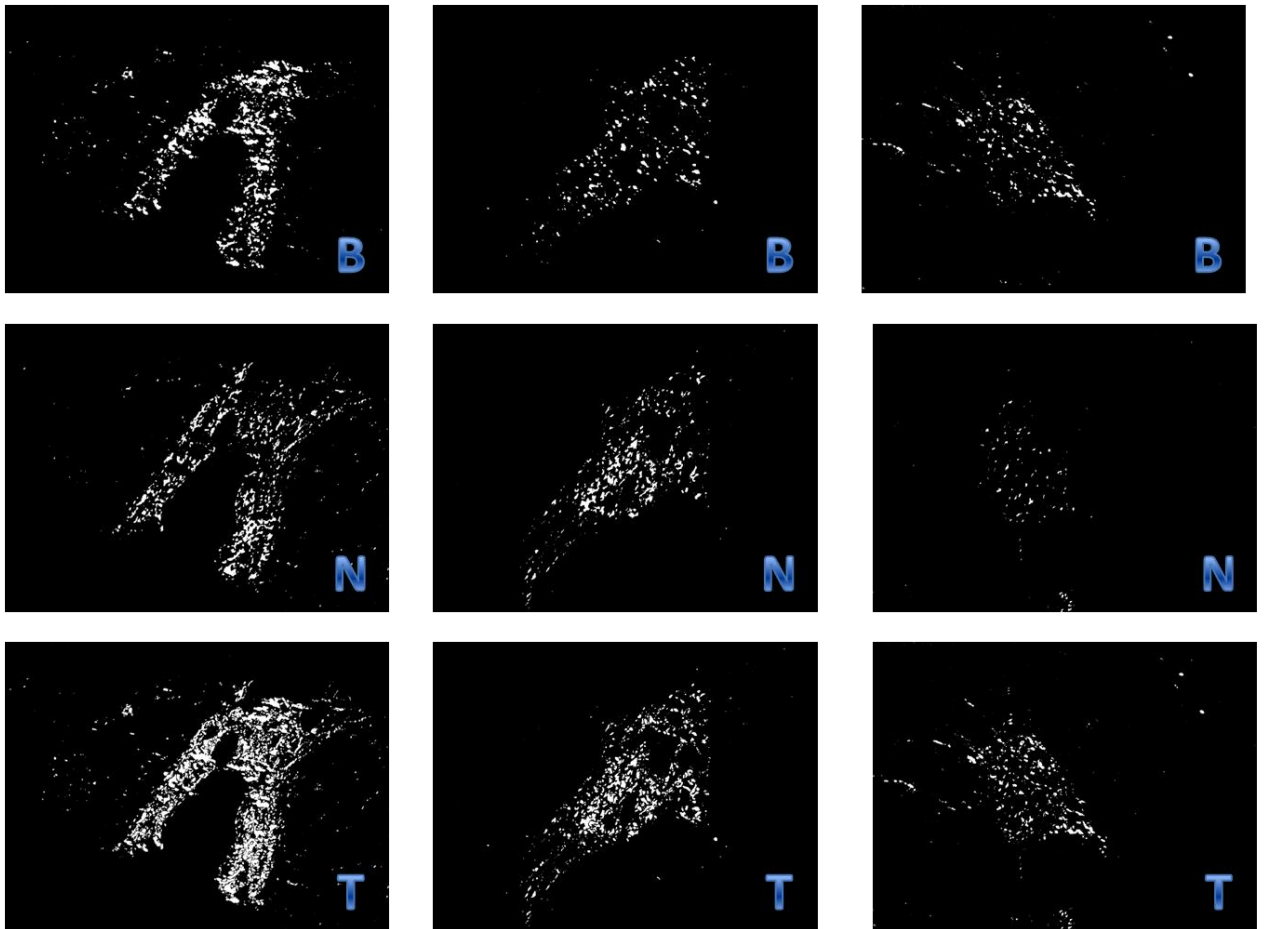
**Fig. 41:** Imágenes morfométricas de espacios portas de casos con fibrosis avanzada.

Estadios F3 y F4. **B** (fibrosis blanca), **N** (fibrosis negra), **T** (fibrosis total).

Imagen de un caso biopsico del año 2.008 con fibrosis cuantitativa a los 2 años post - trasplante (11 imágenes). Porcentaje de fibrosis blanca sin arteria (6,98 %). Porcentaje de fibrosis total (16,63 %). Caso con fibrosis avanzada.



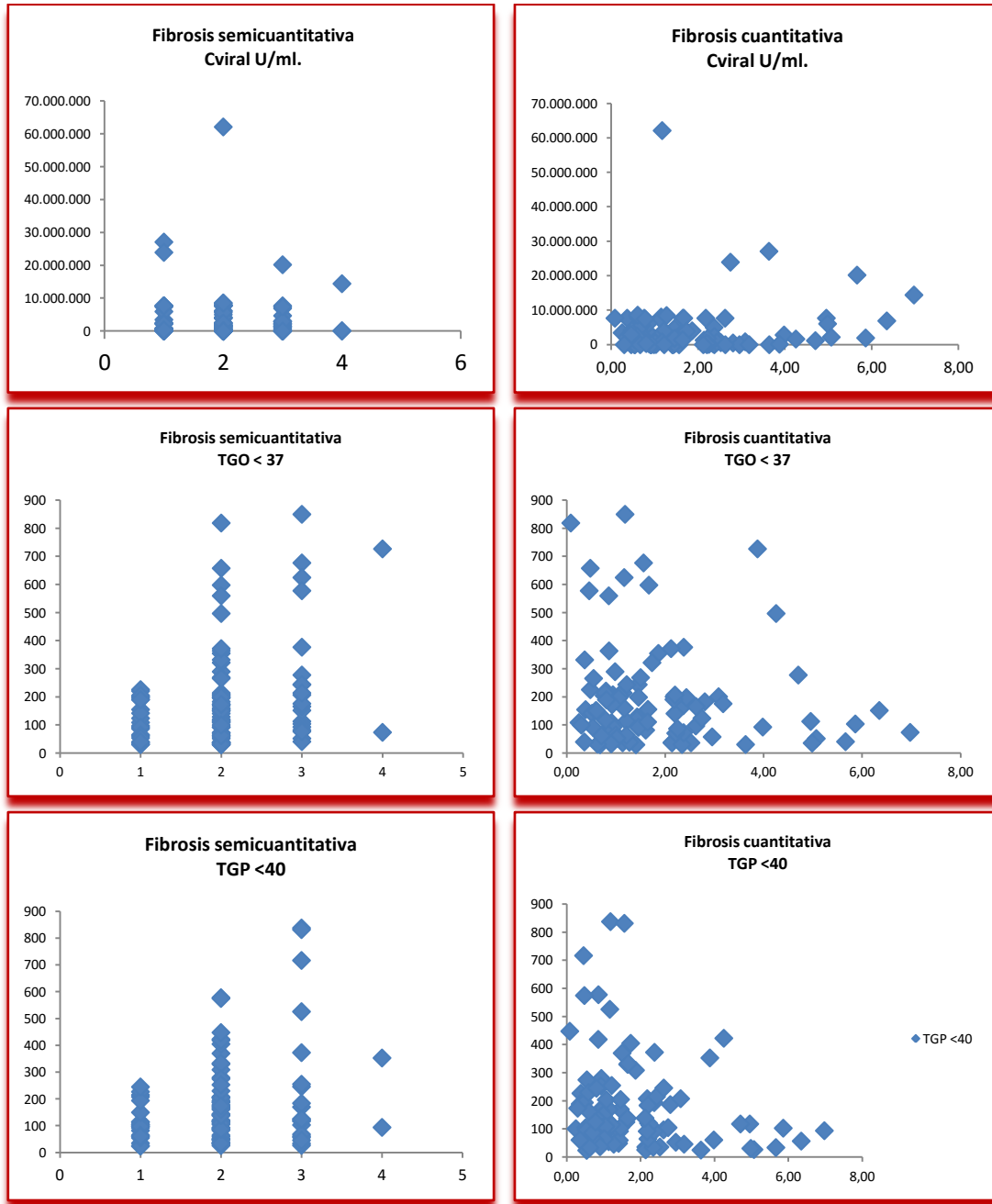
**Fig. 42.** Imágenes de tinción histoquímica frente al Rojo Sirius y canal rojo en el estudio morfométrico de la cuantificación de la fibrosis en un caso de fibrosis intermedia F2. Nótese la mayor expansión de fibrosis reticulínica (trazos de color oscuro).



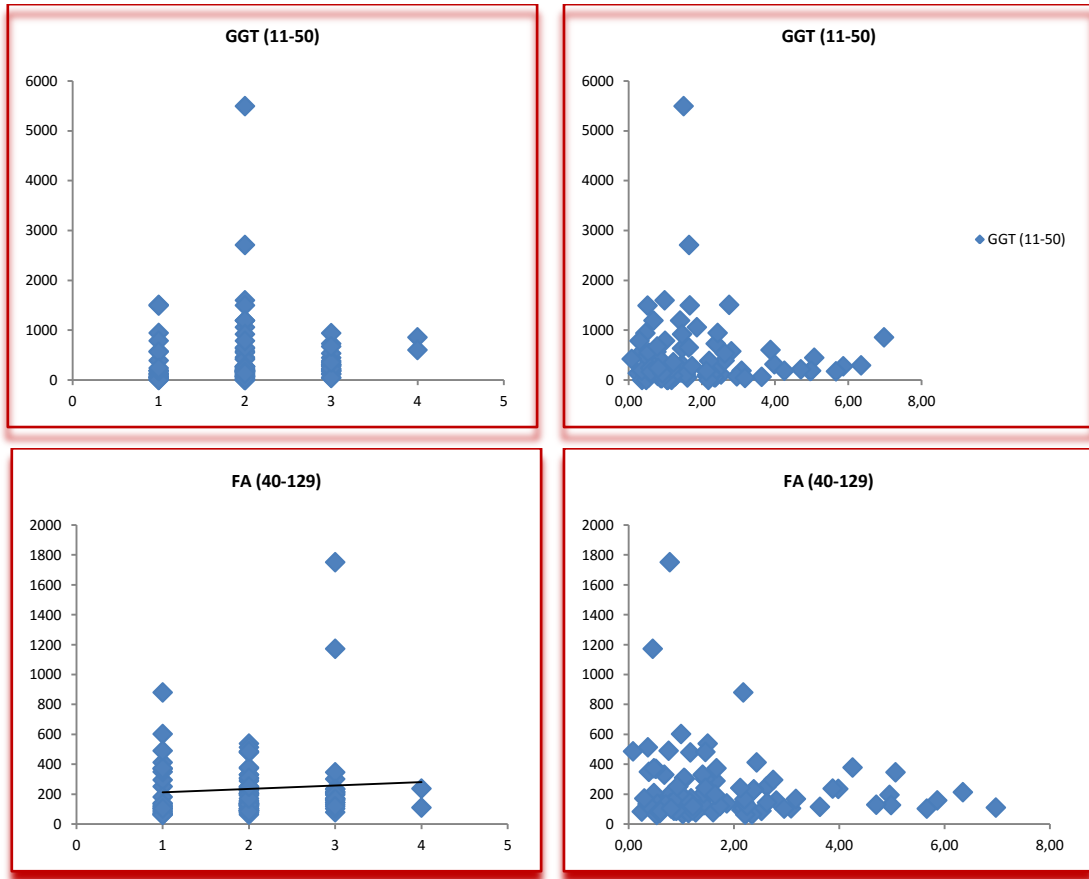
**Fig. 43:** Imágenes morfométricas de espacios portas de casos con fibrosis intermedia estadios F2. **B** (fibrosis blanca), **N** (fibrosis negra), **T** (fibrosis total).



8. Variable dependiente (Fibrosis) en relación con variables independientes (carga viral y parámetros bioquímicos)



**Fig. 44:** Discordancia entre las enzimas hepáticas y carga viral del virus VHC (ARN) y los estadios de fibrosis según valoración semicuantitativa y la fibrosis medida (fibrosis blanca).



**Fig. 45:** Discordancia entre pruebas bioquímicas colestásicas y los estadios de fibrosis según valoración semicuantitativa y la fibrosis medida (fibrosis blanca).

## DISCUSIÓN

La detección precoz del avance de la fibrosis hepática es un factor pronóstico fundamental en pacientes trasplantados y portadores de hepatitis C recurrente, donde el panorama es mucho más agresivo y precoz que en pacientes no trasplantados.<sup>203</sup>

Aunque diversos autores han desarrollado índices no invasivos para el diagnóstico de cirrosis o fibrosis avanzada obviando la realización de la biopsia hepática,<sup>205-208</sup> la misma sigue siendo la prueba gold standard para valorar la fibrosis, a pesar de que puede presentar un porcentaje no despreciable de falsos positivos y falsos negativos determinado por el error muestral y por la diferencia inter-observador.

El mayor problema radica en la valoración de los estadios iniciales e intermedios de fibrosis hepática. Los índices no invasivos permiten detectar con bastante exactitud los valores extremos de fibrosis F3 y F4, pero en pacientes con valores intermedios ofrecen solo una información parcial sobre la fibrosis hepática.<sup>203; 205; 207</sup>

En nuestro estudio se evaluó retrospectivamente un total de 115 biopsias correspondiente a 85 pacientes trasplantados con infección de VHC y portadores de infección recurrente del VHC, en el periodo del 2.007 - 2.011 (**Tabla 7**). El trabajo se realizó utilizando el método de cuantificación de fibrosis hepática por medio del análisis al microscopio óptico utilizando la tinción de Sirius Red y visualizándola por medio de la luz polarizada. Este método tradicional y no automatizado como los modelos (HISTOQUANT y DENSITOQUANT) ha sido utilizado en otros estudios y ha demostrado un incremento significativo de la fibrosis con respecto a los casos control.<sup>209</sup>

Estudios más recientes utilizan estos métodos automatizados. Es una manera más rápida y cómoda de trabajar, aunque mucho más costosa, no al alcance de todos los centros. Los valores promedios de la fibrosis por medio de métodos automatizados son algo superiores a los valores obtenidos por medio de los métodos tradicionales, pero se ha descrito una excelente correlación entre ambos métodos ( $r^2 = 0,92$ ).<sup>209</sup>

Centramos a continuación nuestra discusión en tres aspectos que entendemos son fundamentales en el tema que nos ocupa:

1. Valoración de la calidad de la muestra (principal problema que existe hasta el momento actual), haciendo una revisión de los trabajos más importantes que abordan este tema y correlacionándolos con nuestros resultados.
2. Análisis de la cuantificación de la fibrosis en pacientes con infección recurrente por VHC.
  - 2.1 Cálculo de variables dependientes (fibrosis) y correlación con los 4 estadios del sistema de METAVIR. Validez de ambos métodos.
  - 2.2 Cuantificación de fibrosis total contra fibrosis blanca, sobre tejido con sistema vascular y sin él. Valoración de las distintas variables dependientes.
  - 2.3 Predicción de la evolución de la fibrosis por medio del análisis bioquímico y la determinación de la carga RNA viral. Variable dependiente (fibrosis) en relación con variables independientes (bioquímica y microbiología).
  - 2.4 Evolución de la fibrosis en el tiempo.
3. Limitaciones y directrices futuras del método morfométrico de cuantificación de fibrosis en estos pacientes. Importancia en el momento actual y proyección de futuro.

## 1. Valoración de la calidad de la muestra con respecto a la cuantificación de la fibrosis.

La variabilidad y el tamaño de la muestra de biopsia es uno de los parámetros principales a considerar, que está cada vez más siendo motivo de estudio. En su valoración se sabe que, la heterogeneidad de la fibrosis en el hígado, constituye un problema. Es evidente que a mayor longitud de la muestra de biopsia, menor es el riesgo de una evaluación errónea debido a un error de muestreo.

Diferentes estudios coinciden en la dificultad causada por errores de muestreo en la valoración semicuantitativa de la fibrosis hepática, sin quedar establecido o protocolizado en la actualidad un rango de longitud para las muestras biopsicas.

Así, un estudio, Hohlund y cols.<sup>210</sup>, señalan que 25 mm. de longitud de la muestra es la ideal para establecer una adecuada concordancia con el diagnóstico de hepatitis crónica y la valoración de la fibrosis. De este cuadro sólo el 75 % de las muestras de biopsias se valoraron correctamente, utilizando la escala METAVIR con esta longitud. Este rendimiento disminuyó a un 65 % para las muestras de biopsias de 15 mm.. Estos autores concluyeron que el umbral generalmente aceptado para la evaluación de la fibrosis en ensayos clínicos debería ser entre 15 mm. y 25 mm. y que no se obtendría ninguna mejora importante con longitudes mayores de 25 mm.

De otra parte, Bravo y cols.<sup>206</sup> refieren que 15 mm. fue la longitud necesaria para el diagnóstico lesional, pero no especifican la longitud adecuada para el diagnóstico de este tipo de enfermedad difusa en el hígado.

En el contexto morfométrico, también la variabilidad muestral es un parámetro a valorar, pero quizás menos señalado que en estudios de valoración de la fibrosis hepática usando métodos semicuantitativos. Los estudios cuantitativos de Bedossa y cols.<sup>199</sup> y Colloredo y cols.<sup>205</sup> son probablemente en este sentido los más aceptados actualmente.

Bedossa y cols.<sup>199</sup> relacionaron la longitud del cilindro con la valoración de la fibrosis de la muestra. El método empleado fue el del Rojo Sirius, con luz polarizada, en biopsias de pacientes con hepatitis crónica. Como era de esperar, la heterogeneidad de la muestra también influyó sobre la cuantificación de la fibrosis. Todos los resultados de análisis de imágenes se correlacionaron con la valoración semicuantitativa utilizando el sistema de puntuación METAVIR. Este estudio concluye que la longitud mínima aceptable para la estadificación fue de 25 mm. y a su vez, que el aumento de longitud de la muestra (biopsias de 30-40 mm.) conlleva una escasa mejora con respecto a la categoría fibrosis/ longitud de la muestra.

El grupo italiano de Colloredo y cols.<sup>205</sup> utilizaron el sistema de puntuación de Ishak en 161 biopsias de pacientes con hepatitis B y C con longitud de 30mm., señalando la importancia también al ancho de la muestra. En ese análisis concluyeron que al menos 20 mm. de largo y 1,4 mm. de ancho sería lo ideal para establecer buena correlación. A su vez, se le dio mucha importancia al número de espacios porta, incluidos en una sección. Su recomendación para la clasificación era de un mínimo de 11 espacios portas completos. Cabe señalar que los tamaños de muestra recomendados tanto por Bedossa y cols.<sup>199</sup> como por Colloredo y cols.<sup>205</sup> son superiores a los habitualmente aceptados.<sup>204</sup>

Finalmente en un reciente estudio de la progresión natural de la hepatitis C realizado por Zarski y cols.<sup>211</sup> recomiendan 20 mm. como mínimo, igual que el grupo italiano de Colloredo y cols.<sup>205</sup>

Otro aspecto que parece influir, aunque en menor medida, en la variabilidad del muestreo es el *número de espacios portas*. Recientemente Poynard y cols.<sup>212-213</sup> han descubierto que los especímenes de más de 15 mm. que contienen 6 o más espacios porta, establecieron una mejor correlación con la histología y con marcadores bioquímicos predictores de la fibrosis y actividad necroinflamatoria de la enfermedad que las muestras biopsicas más pequeñas.

En este aspecto sin embargo, hay divergencia de criterios en los distintos trabajos. Así Kage y cols.<sup>207</sup> recomiendan al menos 5 espacios portas y Kaserer y cols.<sup>208</sup> unos 8 espacios portas. Otros estudios<sup>203; 205; 207</sup> recomiendan, por lo general, un número de espacios porta mayor de 10. Sin embargo, el umbral de longitud recomendado para evitar errores de muestreo es arbitrario, como hemos podido comprobar en los distintos trabajos y actualmente no hay estudios que definan de manera categórica el umbral de longitud de la muestra.

En nuestro estudio, en las 115 biopsias analizadas, el promedio de longitud fue de 22,1 mm. con una desviación estándar de 5,7 mm. (**Tabla 9**). La mayoría de las biopsias mostraban un solo fragmento largo, de más de 20 mm. (**Fig. 30**). En algunos casos, la longitud fue de menos de 10 mm., pero a su vez se podía visualizar espacios portas suficientes para la cuantificación. Solo en las biopsias de fibrosis 0, el promedio de longitud fue de 19 mm. con una desviación estándar de 6 mm.

Además de la longitud, el promedio de espacios portas encontrados adecuados para la cuantificación fue de 9,67 con una desviación estándar de 3,44 (**Tabla 11**).

Al analizar la calidad de nuestras muestras nos encontramos que, en ocasiones, tenemos cilindros con longitud mayor o igual 20 mm., pero algunos de los espacios portas no eran representativos, al ser espacios portas de gran tamaño hiliares, donde la cuantificación de la fibrosis podría dar un falso positivo. En otras ocasiones, por otra parte los espacios portas son incompletos (una sola estructura portal) o ubicados en un extremo lateral de la biopsia, imposibilitando su correcta cuantificación.

Por tanto, parece establecerse que independientemente del método utilizado (semicuantitativo o cuantitativo) y del importante papel que desarrolla la toma de muestras y el tamaño muestral en la valoración de la fibrosis; en la actualidad, estos aspectos son todavía en el momento actual muy controvertidos, no protocolizados y en constante evolución de criterios.<sup>214</sup>

Este aspecto tendrá mayor implicación en los múltiples estudios con métodos no invasivos de medición de la fibrosis, que utilizan la biopsia para correlacionar los datos obtenidos. A nuestro juicio consideramos que este parámetro (calidad de la muestra, referida a todos los aspectos mencionados) debe ser incluido en los estudios, siendo imprescindible el conseguir un consenso unificado y protocolizado sobre la calidad de la muestra de estudio.



## 2. 1 Cálculo de variables dependientes (fibrosis) y correlación con los 4 estadios del Sistema de METAVIR. Validez de ambos métodos de valoración de la fibrosis.

El promedio de la fibrosis cuantificada en nuestro trabajo aumentó conjuntamente con el estadio de fibrosis (METAVIR), tal como se esperaba. Los estudios realizados, en cuanto a la comparación entre el índice METAVIR y el análisis cuantitativo de la fibrosis, confirman que un aumento en el estadio de METAVIR se asocia con un aumento progresivo en el área de fibrosis.

Pero curiosamente, este aumento de tejido fibrótico no es lineal, como se comprueba en los datos que hemos obtenido en nuestro estudio (**Fig. 33-35**). Una diversa gama de valores de colágeno se obtuvieron en los distintos estadios, apreciándose solapamiento, entre los mismos. Sin embargo, en el estadio 4 la mediana de todas las variables cuantificadas es claramente superior y con diferencia notable con los estadios iniciales. Por ejemplo, los estadios avanzados de fibrosis 3 y 4 presentan porcentajes de fibrosis 5 veces superior al estadio 0. A su vez, el estadio 2 supera en casi el doble la cuantificación del estadio 0. Los estadios avanzados de fibrosis revelaron un promedio de fibrosis de 5,28 % y 11,5 % (fibrosis total) y de 2,3 y 3,7 % respectivamente en (fibrosis blanca), con una desviación estándar de un 3 % aproximadamente (**Tabla 12**).

Estos rangos de referencia de los distintos estadios de fibrosis, son valores algo inferiores a los que destaca Bedossa y cols.<sup>199</sup>. Si bien, estos autores también obtienen un aumento en el promedio de la cuantificación de la fibrosis con respecto a los estadios de METAVIR valorados en su estudio.

Sin embargo existe una mínima diferencia en el valor global de los rangos entre el estudio de Bedossa y nuestro trabajo. Esta diferencia radica en el uso del método tradicional de medición por parte de nuestro estudio y los métodos morfológicos automatizados utilizados por estos autores.

De forma global en nuestro estudio, ambos métodos de valoración de la fibrosis (METAVIR y cuantificación morfométrica) tienen una correlación positiva pero débil en cualquiera de las variables de medición, siendo mayor el coeficiente correlación de Spearman de  $r^2 = 0,29$  en la fibrosis total y  $r^2=0,40$  en la fibrosis total sobre el tejido sin sistema vascular (**Tabla 13**). Datos que son concordantes con los que señalan Goodman y cols.<sup>201</sup> quienes utilizando el sistema semicuantitativo de ISHAK y métodos morfométricos automatizados, obtuvieron un  $r^2 = 0.49$  en los distintos estadios de fibrosis.

De otra parte, Manousou y cols.<sup>202</sup>, en un estudio de análisis de imagen digital en la cuantificación del colágeno en pacientes trasplantados, usando el método de la valoración de ISHAK, obtienen asimismo una buena correlación entre los estadios ( $r^2=0.60$ ). Estos datos nos confirman que, aunque existe correlación entre ambos métodos, en ocasiones, es una correlación débil donde otros factores ya mencionados, incluyendo la variabilidad inter observador en cualquier de los sistemas semicuantitativos, hace que existan diferencias a considerar.

Probablemente, la correlación positiva pero débil entre los dos métodos está influida también por la *heterogeneidad de la fibrosis* en el hígado.

La magnitud de la fibrosis en las distintas etapas de la enfermedad es una de las principales cuestiones aún por resolver, especialmente cuando se utiliza la biopsia de especímenes utilizada con fines diagnósticos por medio de estudios semicuantitativos de fibrosis en estadios avanzados. Probablemente este problema es más presente en los métodos de valoración subjetiva de la fibrosis hepática donde también influye la variación inter observador. Este aspecto podría ser resuelto probablemente con la realización de biopsias seriadas, proceder con siempre estrictos criterios éticos a pesar de la baja tasa de morbi-mortalidad señalada en la biopsia hepática.

El estudio de Maharaj y cols.<sup>107</sup> mediante la realización de 3 biopsias transcutánea en los pacientes cirróticos, con obtención de muestras en distintas regiones, señala que los cambios de fibrosis en estadio cirrótico estaban únicamente en el 50 % de los pacientes, confirmando el fenómeno de la heterogeneidad lesional.

Del mismo modo, Abdi y cols.<sup>215</sup> realizaron varias biopsias postmortem y mostraron en relación a los cambios de cirrosis, que con una única biopsia el rendimiento diagnóstico es menor, comparada con el 100% de rendimiento obtenido con 3 muestras de biopsias. Sin embargo para el diagnóstico de hepatitis crónica en estadios iniciales estos problemas se daban al parecer en menor medida. Menos favorables fueron los resultados publicados por Baunsgaard y cols.<sup>216</sup> que señalaron un rendimiento diagnóstico en un rango menor al evaluar la cantidad de fibrosis con 2 biopsias en un paciente.

Asimismo Soloway y cols.<sup>109</sup> también encontraron importantes discrepancias en el diagnóstico en pacientes cirróticos con biopsias secuenciales, en comparación con el 90% de grado de correlación en la valoración fibrótica en otros estadios. Todos estos estudios estaban basados en métodos de valoración semicuantitativos con un componente subjetivo de variación inter observador.

*La misma heterogeneidad de la fibrosis hepática se pone de manifiesto, pero en mucha menor cuantía con el uso de métodos de cuantificación y análisis de imágenes.* Varios estudios ya mencionados anteriormente intentan valorar la eficacia de los sistemas semicuantitativos en la evaluación de la fibrosis hepática por medio de la utilización de sistemas cuantitativos automatizados.

En el estudio de Hohlund y cols.<sup>210</sup> el comportamiento menos favorable fue para las fibrosis F3 y F1, mientras que el objetivo era mejor cumplido para correlacionar la FH entre los estadios F0 y F4. Este resultado parece ser de fácil comprensión al valorar que el método de estudio empleado por los autores para correlacionar la eficacia de la escala de METAVIR estaba basado en sistema cuantitativo- automatizado. Dado que los estadios F0 y F4 están en los extremos de la escala METAVIR, a la hora de cuantificar numéricamente estos estadios, se limitan aún más las posibilidades de diagnóstico erróneo. Por comparación con F1, F2, F3 que tienden a presentar mayor margen de solapamiento, al ser clasificados en la escala de METAVIR basado en los cambios arquitecturales.

En nuestro estudio al analizar la variación de los estadios de fibrosis y cuantificarlos encontramos un solapamiento en la cuantificación de fibrosis (tanto la blanca, como la total) fundamentalmente entre los estadios 1, 2 en ocasiones 0 y 1. (**Fig. 36**) La mediana de la fibrosis total de los estadios iniciales oscilaba entre 1,4 y 2,3 %, con una desviación estándar de 0,69 % a 1,49 %, apreciándose mayor desviación estándar sin ser significativamente importante en el estadio 1 (**Tabla 12**).

Para representar el análisis de la probabilidad de diagnóstico correcto (verdaderos positivos) y diagnóstico incorrecto (falsos positivos) en el sistema de METAVIR por medio de la cuantificación de la fibrosis en cada estadio, utilizamos la gráfica de curva ROC de sensibilidad (eje Y) y de especificidad en el (eje X) que se muestra en la (**Fig. 37**).

Partiendo de que el área total es 1 y calculando la misma a partir de valores de sensibilidad y especificidad para diferentes puntos de cortes, obtuvimos que los estadios extremos de la clasificación (F0, F1 y F4) son estadios de alta precisión y efectividad en el diagnóstico correcto de la fibrosis, con un área bajo la curva de 0,98, 0,86 y 0,96 respectivamente (**Fig. 37**).

Los estadios F0, F1 y F4, son los de mayores posibilidad para detectar correctamente la cuantificación de la fibrosis colágena, con menos probabilidad de falsos positivos. Una situación que limita las posibilidades de diagnóstico erróneo, en comparación con el estadio intermedio de fibrosis F2 y F3. En esta última, el área bajo la curva fue de 0,57. En el estadio F3, encontramos solapamiento de casos tanto con F2 como con F4.

La gráfica nos ejemplifica que si intentamos aumentar la sensibilidad del método de METAVIR (diagnóstico correcto de verdaderos positivos) en ese estadio, corremos el riesgo también de aumentar los casos falsos positivos (especificidad). Estos datos nos reafirman, el valor de la cuantificación morfométrica de la FH como una prueba diagnóstica de screening con alta precisión para detectar la variación cuantitativa de la FH en los distintos estadios. A su vez, los resultados nos revelan, que este método de valoración puede utilizarse como una herramienta fundamentalmente en los estadios intermedios de la clasificación de METAVIR, donde la sensibilidad y especificidad del sistema de evaluación en el diagnóstico de los casos, es menor debido al solapamiento con los estadios F2 y F4.

*Por otra parte, la cuantificación de la fibrosis incipiente, en estadios iniciales de la enfermedad, permite detectar la más mínima variación cuantitativa de la fibrosis en la biopsia de un mismo paciente y con ello los cambios en la progresión de la enfermedad antes de llegar a los estadios intermedios.*

Estos datos nos sugieren que verdaderamente, más que el grado de fibrosis, probablemente la clasificación de METAVIR muestra estadios con diferencias discretas entre sí, que quizás podrían representarse, con letras (Fa, Fb, Fc, Fd) en vez de números progresivos (F1, F2, F3, F4). Sin embargo este aspecto, puede quedar resuelto con la utilización de métodos morfométricos de cuantificación, los cuales nos permiten detectar que un aumento de la fibrosis no necesariamente implique una progresión en el estadio (F0 a F1, F1 a F2, F2 a F3 o F3 a F4). A su vez permitiría un seguimiento más estricto y una adecuación en la vigilancia de la evolución natural de la enfermedad desde estadios iniciales.

## 2.2 Cuantificación de distintas variables de medición de fibrosis

El uso de la medición tradicional por medio de la luz polarizada permitió en nuestro estudio cuantificar por separado la fibrosis que polariza por medio de la luz y a la que denominamos fibrosis blanca. Pero sin embargo, notamos una fibrosis no polarizante la cual denominamos fibrosis negra (fibrosis reticulínica fundamentalmente), que expandía el espacio portal y que también cuantificamos en el total (fibrosis total).

Nos propusimos en nuestro estudio desglosar la cuantificación de los distintos tipos de fibrosis en el parénquima hepático, incluyendo o no el sistema vascular (arteria, vena y capilares fenestrados). El índice de correlación de PEARSON obtenido en las 6 variables dependientes de medición oscilo entre  $r^2 = 0,8$  y  $r^2 = 0,9$  (valor muy cercano a 1), reflejando una excelente correlación entre las 6 variables y mostrando a su vez que cualquier variable de medición para la fibrosis nos proporcionaría una información de utilidad entre las mismas (**Tabla 12**).

Estos datos que quedan objetivados mediante los métodos de cuantificación utilizados, caen sin embargo en el ámbito subjetivo en la llamada valoración semicuantitativa (METAVIR), siendo imposible detectar esta información con el uso de clasificaciones basadas en los cambios arquitecturales y el uso de tinciones generales para la fibrosis como el tricromo de Masson.

En los casos de estadio con fibrosis F0 o Fibrosis incipiente, la cuantificación de las variables de fibrosis blanca, negra y total (**Fig. 38-39**), nos permitió evidenciar mínimas expansiones fibróticas periportales que quedaban sin embargo solapadas en la tinciones habituales de hematoxilina/ eosina o técnica de tinción para el colágeno (Tricromo de Masson).

Por otra parte, la valoración arquitectural con la formación de nodulaciones y septos completos e incompletos, que posibilita los sistemas semicuantitativos, como el de METAVIR en los estadios avanzados, es un aspecto que no se refleja en la valoración cuantitativa. Encontramos casos cuantificados como estadio 3 que, desde el punto de vista arquitectural, presentan deestructuración del parénquima hepático y que por tal condición ya debe ser valorado como un estadio de F4 (**Fig. 40-41**).

En el estadio intermedio de fibrosis donde se analizó un mayor número de biopsias resultó ser el estadio donde encontramos más solapamiento de casos. (**Fig. 42-43**) y donde probablemente influiría mucho, la experiencia, habilidad y el sesgo subjetivo de patólogo al valorar estas biopsias.



### 2.3 Variable dependiente (Fibrosis) en relación con variables independientes (determinaciones bioquímica y microbiológicas )

El análisis de las variables dependientes (fibrosis cuantitativa), con respecto a los datos bioquímicos (TGO, TGP, FA, GGT) y a la carga viral de ARN, no presentó ninguna correlación.

Así las enzimas aminotransferasas y la carga viral ARN del VHC no se correlacionan con los estadios de fibrosis en ninguno de las variables de medición cuantitativa. Estos resultados de discrepancia son concordantes con lo publicado en la literatura. En las gráficas (**Fig. 44 y Fig. 45**), se muestra una dispersión entre los valores bioquímicos y microbiológicos y la cuantificación de la fibrosis. Igualmente no se obtuvo variación de los valores bioquímicos en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad. Del mismo modo, analizando la carga viral en sangre no se obtuvo correlación lineal con respecto al estadio, encontrándose casos de estadio de fibrosis avanzado, con cargas virales bajas e incluso negativas.

Estos resultados reafirman que la biopsia hepática sigue siendo la prueba gold estándar y la que proporciona mayor información para el análisis de la progresión dentro de la historia natural de la enfermedad.

## 2.4 Evolución de la fibrosis en el tiempo.

Una vez establecida la recurrencia de la infección VHC, ocasiona en la mayoría de los pacientes una lesión hepática con diferentes grados de actividad inflamatoria y de fibrosis. Mientras que la actividad tiene un carácter fluctuante, el estadio de fibrosis parece ser progresivo e irreversible<sup>212; 213</sup> si bien existen algunas controversias sobre esta progresión e irreversibilidad<sup>211</sup>. Todo ello se produce en un contexto donde el espectro clínico de la infección crónica VHC es muy variable y mientras algunos pacientes progresan a cirrosis y/o hepatocarcinoma, otros no desarrollan complicaciones.

En el momento actual, cada vez más se insiste en el valor del análisis de la progresión de la fibrosis hepática en los pacientes trasplantados a partir de la biopsia tiempo cero que se realiza en el acto quirúrgico del trasplante posterior a la reperusión considerándose que a pesar de que en más del 90% de las biopsias tiempo cero la valoración de la fibrosis semicuantitativo es F0, el inicio de la fibrinogénesis en el hígado ocurre a menudo muy rápidamente y de forma asimétrica, no lineal<sup>212</sup> (**Fig. 33**).

Esta idea se ve continuada en nuestro estudio al comprobar la curva de progresión de la fibrosis hepática en el tiempo por medio de los dos métodos de valoración (la cuantificación morfométrica y semicuantitativo de METAVIR). Esta variación sin embargo es mucho más manifiesta en la valoración por medio del método cuantitativo-morfométrico, que en la valoración semicuantitativa de los estadios de fibrosis por medio del sistema de METAVIR.

Estos resultados reafirman la hipótesis de que, los estadios de fibrosis (F0, F1, F2, F3, F4) no son grados progresivos de la enfermedad, sino estadios independientes dentro de la evolución de una misma enfermedad. (Fig. 34, 35).

Cabe recordar en este sentido el estudio transversal realizado por Poynard y cols.<sup>212</sup> que incluyó un total de 2.235 pacientes con hepatitis crónica C y donde se evaluó la progresión de la fibrosis. La mediana de progresión calculada fue de 0,133 unidades METAVIR/año, estimándose en unos 30 años el tiempo necesario para el desarrollo de cirrosis, si se asume el concepto de progresión lineal. Sin embargo, este concepto no está aceptado en la actualidad<sup>212</sup> y se considera que la progresión sigue una distribución asimétrica diferenciándose al menos tres patrones de progresión de la fibrosis: rápida, intermedia y lenta y cuatro periodos sucesivos para cada estadio de fibrosis desde la infección progresión de la fibrosis más lenta en los estadios iniciales que en los avanzados: (0,056 vs 0,137). Este ritmo de progresión ha sido validado y conformado en otros estudios.<sup>213-216</sup>

Desafortunadamente, algunos casos de nuestro estudio se analizaron exclusivamente con una sola biopsia. Los criterios de inclusión en cuanto a la variabilidad de la muestra (tamaño y número de espacios portas) de nuestro estudio, han influido sin duda para excluir algunas biopsias de seguimiento. Este hecho es frecuente en estudios de cohorte donde el sesgo de selección de la muestra influye en la evaluación de pacientes con más de dos biopsias.

El tema de la evolución de la fibrosis en el tiempo aparece ligado a la posible reversibilidad de la fibrosis y cirrosis, conceptos que no son nuevo.<sup>4</sup>

Actualmente los ensayos clínicos referentes al tratamiento de la infección por el VHC han hecho resurgir el interés por este concepto y han condicionado un cambio en el paradigma de la hepatología.<sup>217</sup> Es posible revertir o disminuir la fibrosis mediante tratamientos antivirales y/o actuando sobre aquellos factores asociados a una mayor agresividad de la enfermedad. La detención completa de la progresión de fibrosis sólo se conseguirá, no obstante, con la eliminación del virus de la hepatitis C.

### 3. Limitaciones y directrices futuras del método morfométrico de cuantificación para el estudio de la fibrosis hepática

Una de las cuestiones que cabe plantearse al finalizar la discusión de nuestro estudio es : *¿CUAL ES EL MÉTODO DE VALORACIÓN IDEAL PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN NATURAL Y PROGRESIÓN DE LA HEPATITIS C, EL ANÁLISIS MORFOMETRICO DE IMAGEN O LA ESTADIFICACIÓN SEMICUANTITATIVA?* La respuesta es sin duda que las dos. El análisis de imagen y estadificación semicuantitativa generan diferentes tipos de información y cada uno de ellos aportan información útil en la progresión de la enfermedad.

En este sentido asimismo cabe señalar que la distorsión de la arquitectura que acompaña a la regeneración nodular del parénquima nodular, así como la derivación de sangre a través de septos fibróticos vascularizados, puede ser de importancia igual o mayor que la cantidad de tejido de la cicatriz. Del mismo modo, la masa funcional del parénquima hepático funcional puede ser más importante que la proporción de parénquima reemplazado por tejido cicatricial. Por lo tanto, en la evaluación de un paciente individual, el diagnóstico histológico, basado en la combinación de los cambios en la arquitectura y del análisis cuantitativo con respecto a la fibrosis, pueden ser más importantes que la cantidad de fibrosis por sí sola.

Dado que la valoración semicuantitativa de la fibrosis es un método cómodo, rápido y de escaso coste, es usual que actualmente se mantengan estos métodos habituales de valoración de la fibrosis.

Pero a su vez, entendemos a la vista de nuestros resultados que cada vez más, debemos incluir y protocolizar, en la práctica diaria métodos homogéneos y objetivos para valorar la fibrosis hepática, que nos permitan conocer la evolución natural y progresión del VHC desde su comienzo. Por lo que sugerimos que ambos métodos de valoración de la FH deben constituir un acápite indispensable en los informes anatomopatológicos principalmente en los centros de referencia que abordan el estudio y tratamiento de la patología hepatobiliar y trasplante hepático.

Por lo tanto, opinamos que el presente y futuro del estudio de la biopsia hepática para la evaluación de la fibrosis hepática parece revelarnos que:<sup>218; 222.</sup>

- a) La evaluación de las biopsias es una forma rápida pero subjetiva de obtener información acerca de la lesión hepática.
- b) El diagnóstico histológico, así como la clasificación y estadificación de la hepatitis crónica VHC es una aproximación diagnóstica no exenta de errores.
- c) El margen de error usualmente se establece con un paso en las cuatro categorías de fibrosis incluso contando con experiencia adecuada del patólogo.
- d) En muchos casos, la opinión del patólogo puede estar limitada por el tamaño de la muestra.
- e) Actualmente todavía la *morfometría* a través de sistema computarizado no están estandarizados, probablemente por su elevado costo, pero abre una ventana a la clasificación subjetiva utilizada.

## **CONCLUSIONES**

1. El sistema de valoración cuantitativo morfométrico de la fibrosis hepática en el estudio de la evolución natural y la progresión de la VHC recurrente es un método sensible y preciso que permite evidenciar cambios cuantitativos ya presentes en estadios iniciales de la enfermedad.
2. Cualquier parámetro morfométrico de medición de la fibrosis hepática es fiable para la cuantificación de la misma. Tanto la medición de la fibrosis polarizante, la no polarizante o la cuantificación de la fibrosis total sobre el tejido vascular o sin él, son métodos con una excelente correlación entre sí para la medición de la fibrosis hepática.
3. La excelente correlación entre los distintos parámetros morfométricos cuantificados se ha alcanzado gracias a que las muestras utilizadas en nuestro estudio no mostraron la variabilidad de longitud referida por otros autores. La homogeneidad de las muestras es indispensable para la correcta utilización del método de cuantificación morfométrica en la fibrosis hepática.
4. Al comparar el sistema de valoración semicuantitativo de METAVIR con las determinaciones cuantitativas morfométricas se comprueba que el estadio F2 del sistema de METAVIR es el de menor sensibilidad y especificidad, siendo este aspecto crucial y de gran implicación en el inicio y manejo del tratamiento antifibrinolítico.

5. La biopsia hepática continúa siendo una prueba imprescindible para la valoración de la progresión de la fibrosis hepática, debido a que las pruebas bioquímicas estándar no reflejan los cambios en la cuantificación de la fibrosis. Los parámetros bioquímicos de función hepática (citólítico y colestásicos) no pueden predecir la progresión de la fibrosis hepática. La carga viral ARN del virus en sangre puede tener alta sensibilidad, pero poca especificidad para la correlación con el estadio de fibrosis y no predice la progresión de la enfermedad.



A modo de sugerencia y analizando las conclusiones de nuestro trabajo y con vista de la situación actual recomendamos:

1. Protocolizar y homogenizar el tamaño de la biopsia para una fiable valoración de la FH en los métodos de valoración morfométricos cuantitativos.
2. Extender el uso de grandes cohortes de pacientes y biopsias en los trabajos con métodos cuantitativos. En el estudio de un gran número de biopsias es probable que la variación de los resultados sea aleatoria y multidireccional y, por lo tanto, de menor importancia que en pequeñas series.

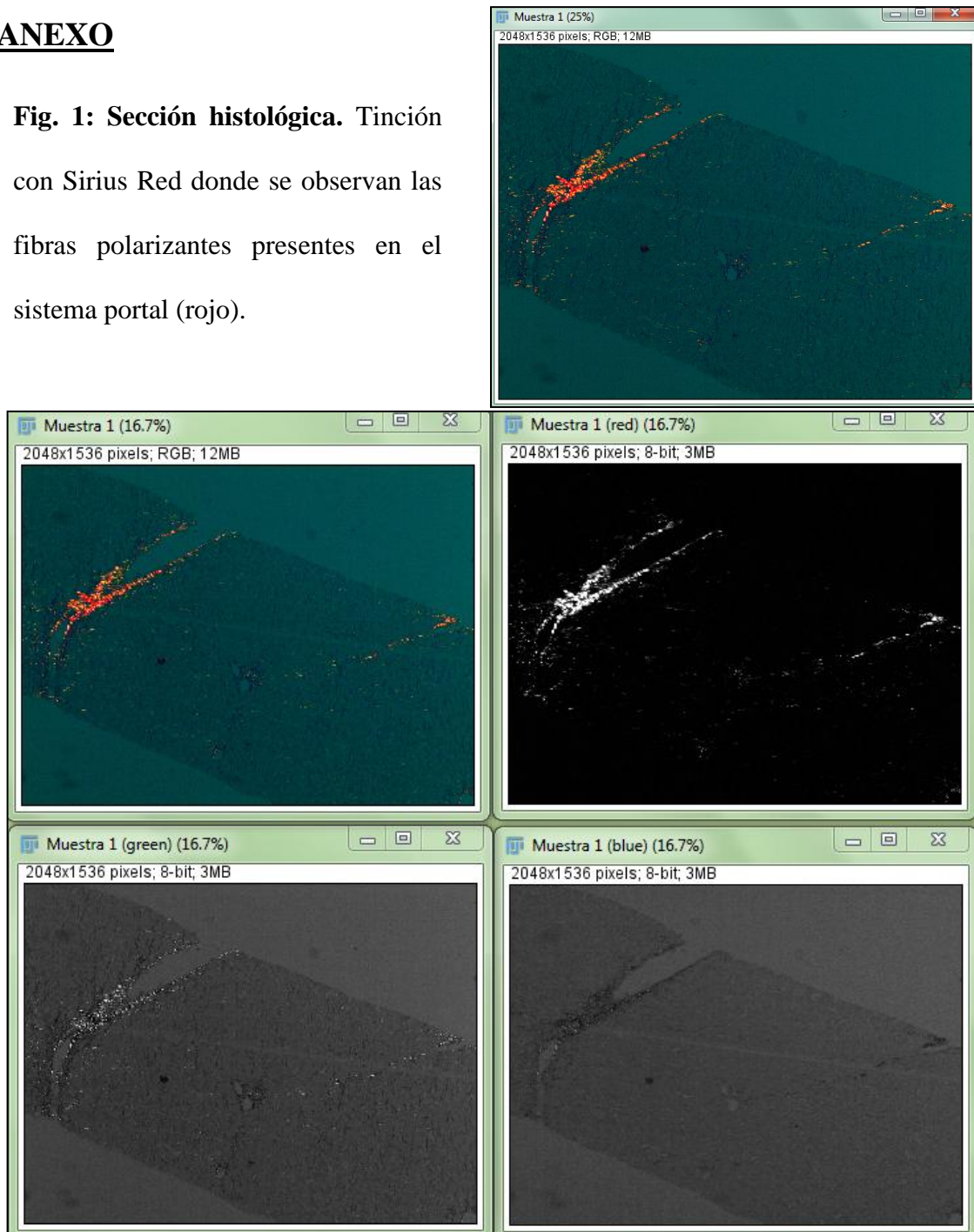
Estas dos primeras recomendaciones deben tenerse en cuenta principalmente, para futuros estudios sobre la progresión de la FH con el uso de métodos no invasivos, en la cual la biopsia hepática juega un papel fundamental en la correlación de los resultados.

3. Incluir en los informes de Anatomía Patológica el uso de métodos morfométricos para la valoración de la FH, principalmente en los centros de referencia en la patología del trasplante hepático y conjuntamente con un sistema de valoración semicuantitativo. Sin embargo, se necesitan más estudios para validar la importancia de este método diagnóstico e investigar la evolución de la enfermedad desde el periodo del pre-trasplante.

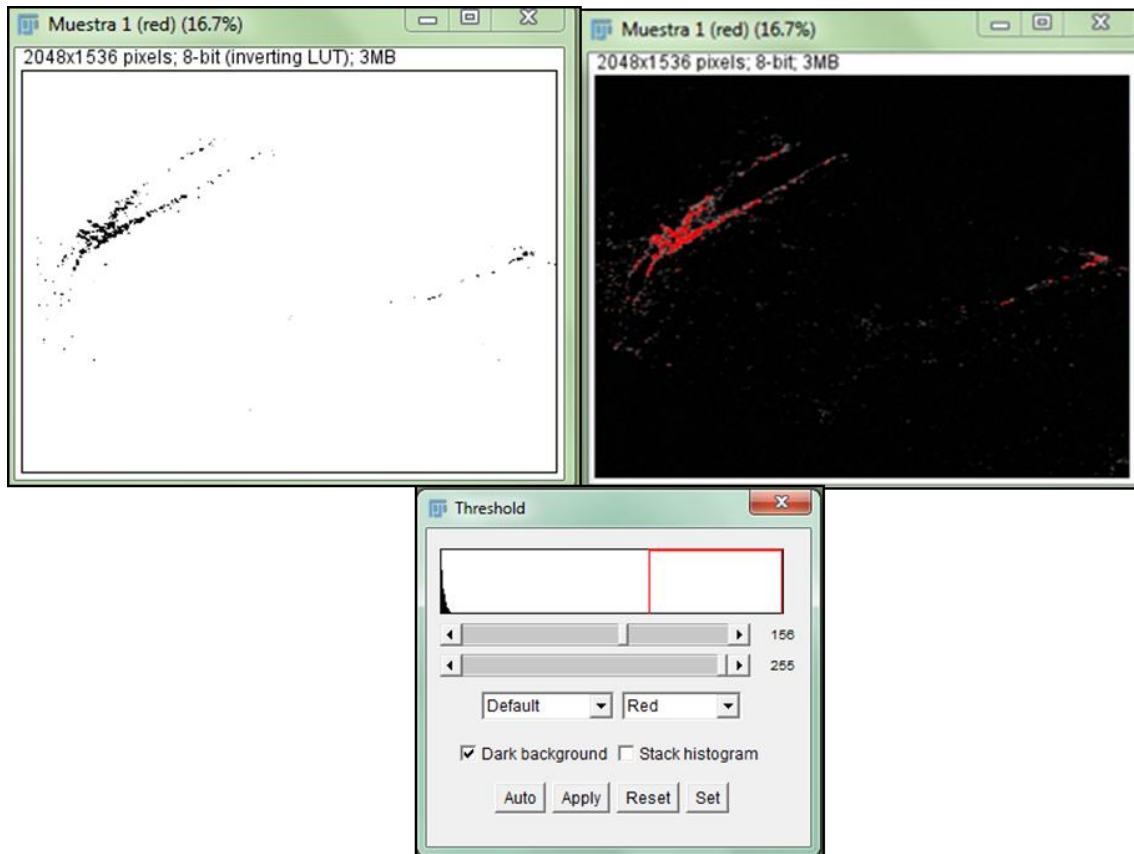
4. La valoración de la fibrosis en la biopsia hepática, debe ser realizada por un patólogo experimentado en el estudio de la patología hepática y con visión y conocimiento de la evolución natural y la progresión de la enfermedad por VHC. A su vez, debe hacerse un análisis comparativo de las biopsias del paciente en el tiempo, comenzando por la biopsia cero para valorar mejor la progresión de la enfermedad desde los inicio del injerto hepático.
  
5. Un reto futuro sería conocer si la verdadera progresión de la fibrosis hepática cuantificada por medios morfométricos, pudiera predecir la evolución de los resultados clínicos.

## ANEXO

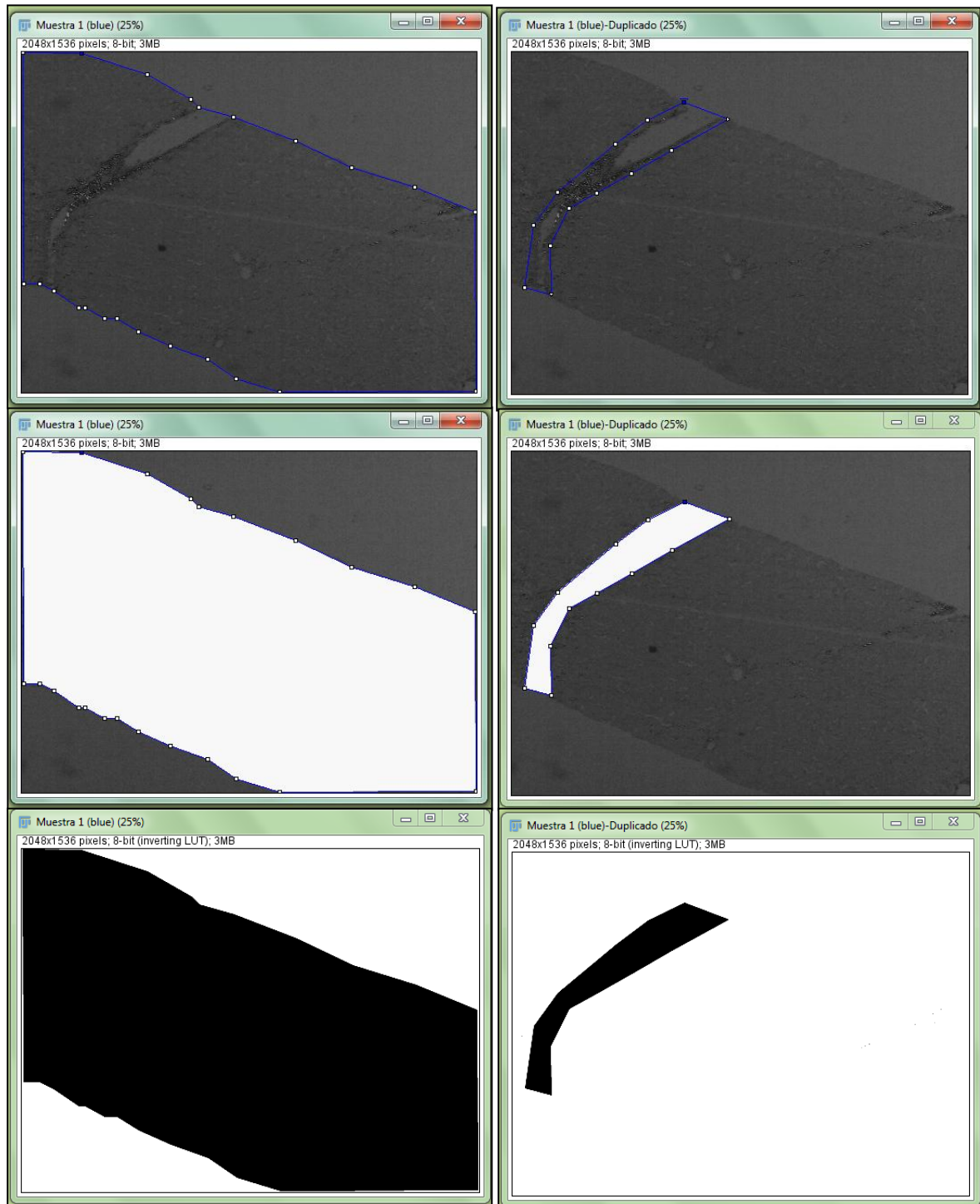
**Fig. 1: Sección histológica.** Tinción con Sirius Red donde se observan las fibras polarizantes presentes en el sistema portal (rojo).



**Fig. 2: Resultado de la operación *Split Channels*.** Muestra las tres imágenes que se obtienen al desglosar la titulada “Muestra 1” en los diferentes canales de color: rojo, verde y azul. Los niveles de gris cercanos al blanco representan una mayor intensidad del color de cada una de las bandas, y los niveles más cercanos al negro representan menor intensidad de los mismos.



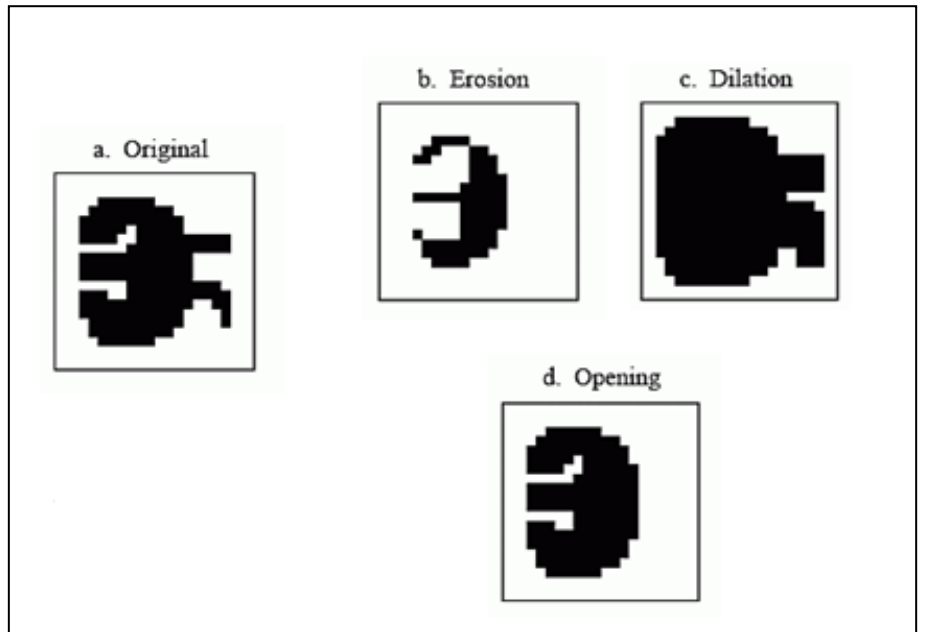
**Fig. 3: Segmentación de la imagen de la banda roja.** Durante la selección del umbral aparece la máscara (color rojo). Al aplicar el umbral aparece una segunda imagen (imagen inferior) en la que los píxeles seleccionados aparecen como binarios en color negro (1) sobre el fondo en blanco (0) y constituyen la máscara binaria de trabajo.

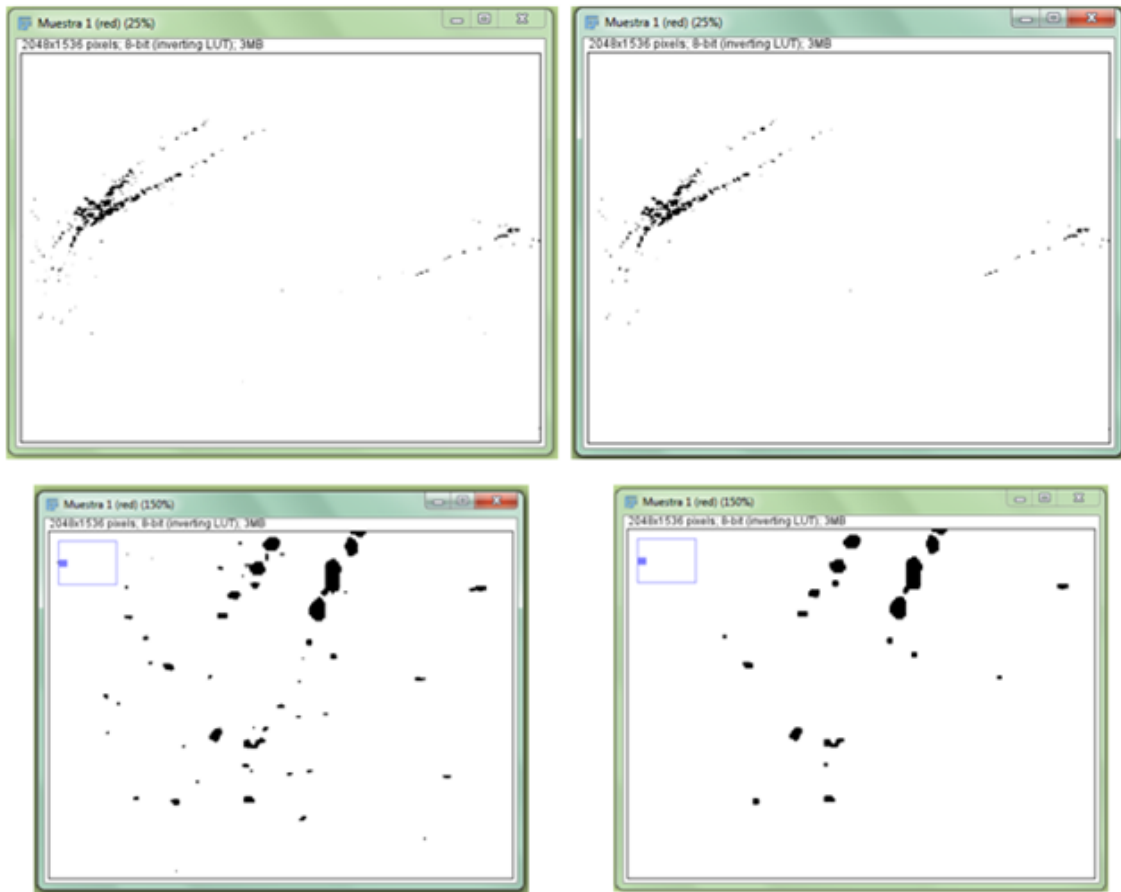


**Fig. 4: Proceso de selección de la fibra/sistema portal en la imagen de la banda azul.**

Las imágenes superiores muestran la selección de la zona de la que se quiere obtener el área. Bajo ésta, aparecen las imágenes en las que se ha rellenado la zona seleccionada con un color que quede dentro del umbral seleccionado en la segmentación de manera que se obtienen imágenes binarias con la zona a determinar el área en negro y el fondo blanco.

**Fig. 5: Operaciones lógicas para procesar imágenes binarias.** La imagen d. representa el proceso de apertura, en el que se realiza una erosión seguida de una dilatación permitiendo mantener el objeto y eliminando los píxeles que no tienen interés.

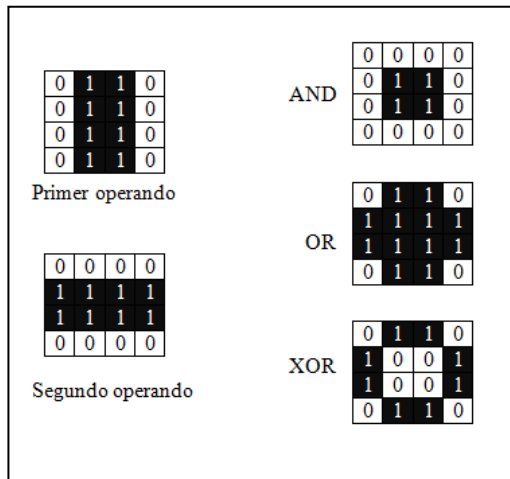




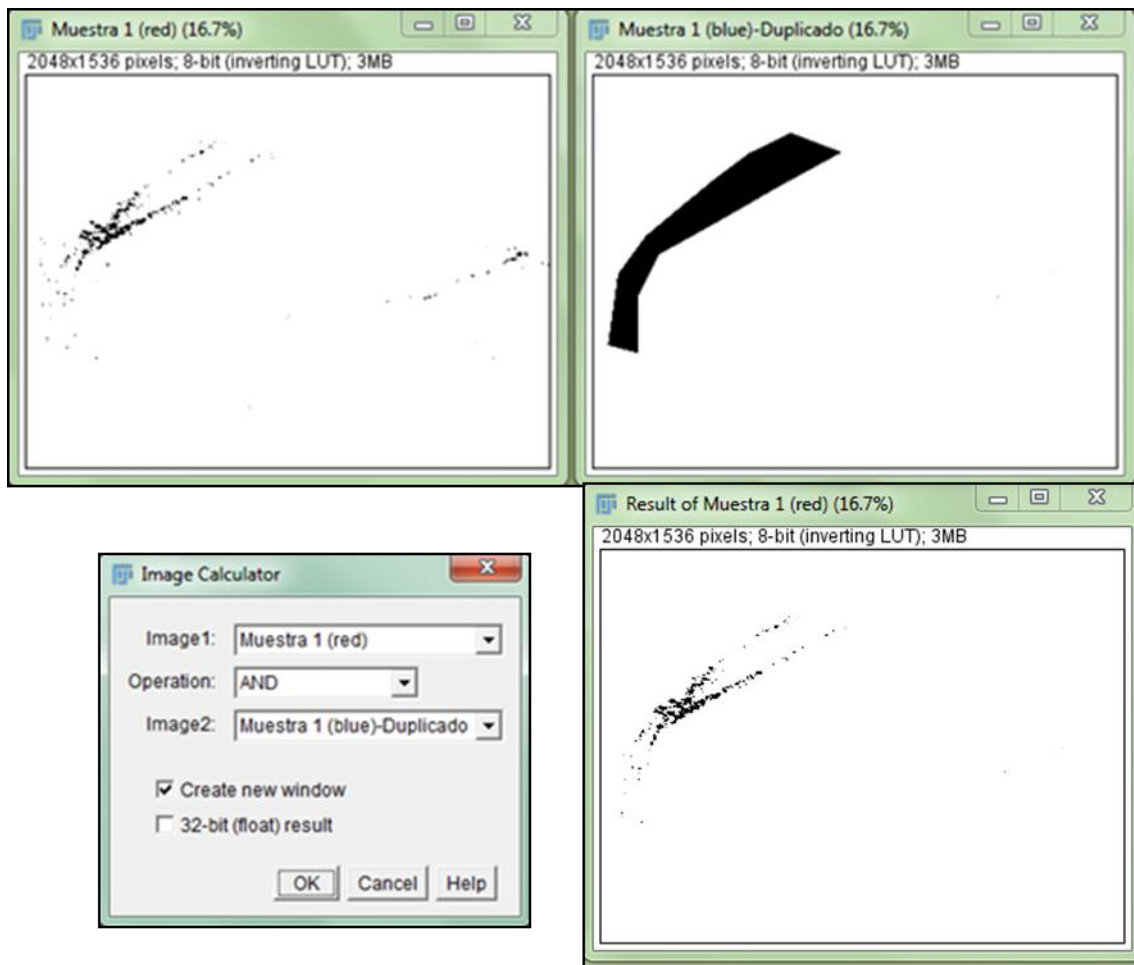
**Fig. 6: Proceso de apertura en la imagen de la banda de color rojo.** A la izquierda la imagen antes de la apertura, a la derecha tras la apertura. En la imagen general (superior) no se observa prácticamente ninguna diferencia, en las imágenes ampliadas (inferior) se muestra cómo se han eliminado ciertos píxeles.

**Fig. 7: Operaciones booleanas.**

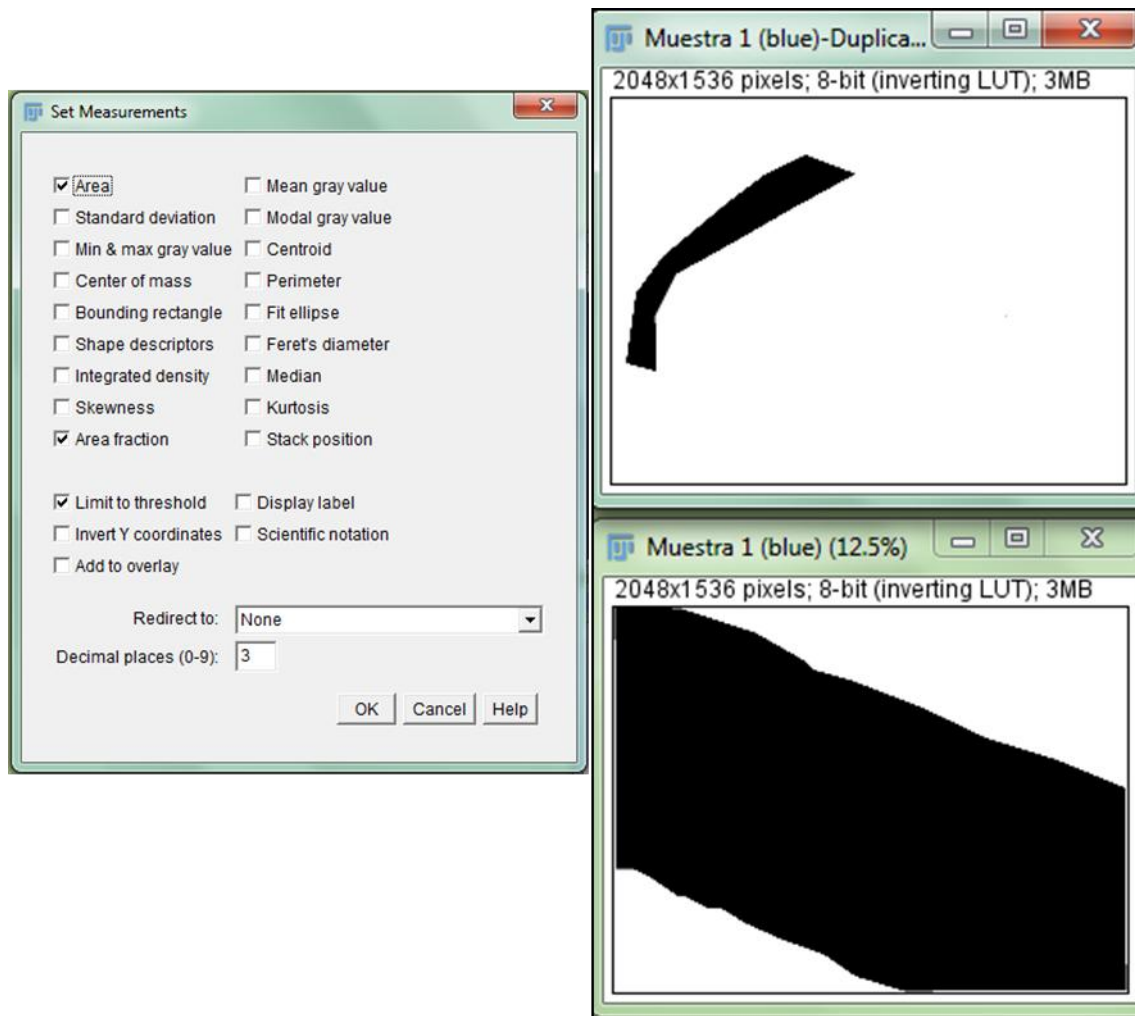
La imagen muestra el resultado de las tres operaciones booleanas (AND: producto, OR: suma y XOR: resta) que se obtendrían a partir de las dos imágenes (Primer y segundo operando).



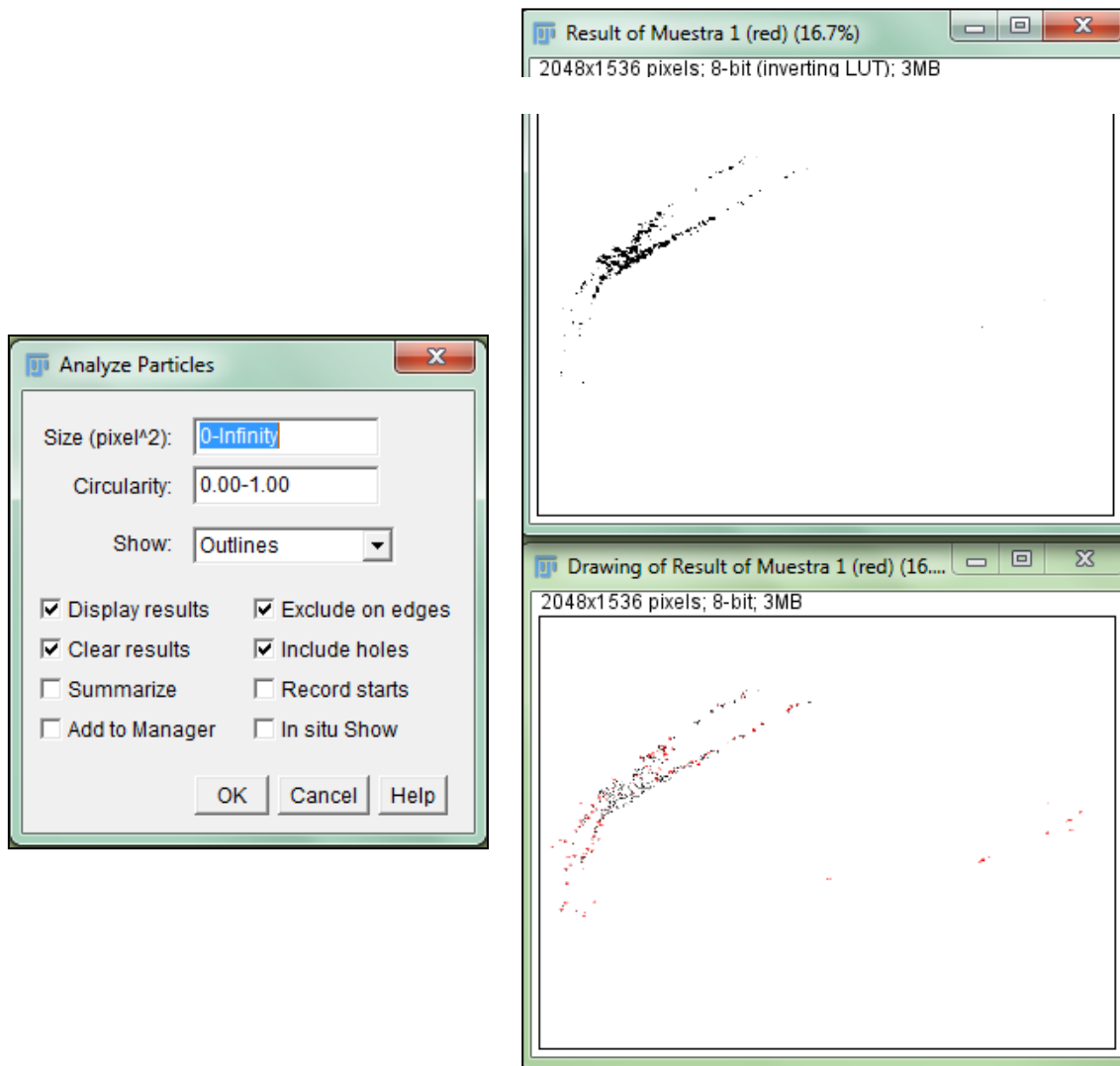




**Fig. 8: Resultado de la operación booleana AND.** Al realizar la operación con las dos imágenes superiores, las obtenidas tras el procesamiento de las correspondientes a las bandas azul y roja, se obtiene como resultado la imagen inferior.



**Fig. 9: Medidas que se pueden realizar en las imágenes binarias obtenidas tras el procesamiento de las mismas.** A la izquierda, *Set Measurements*, muestra las distintas medidas que se pueden realizar. A la derecha las imágenes que se analizan. Los resultados aparecen en forma de tabla (Tabla 1.Anexo).



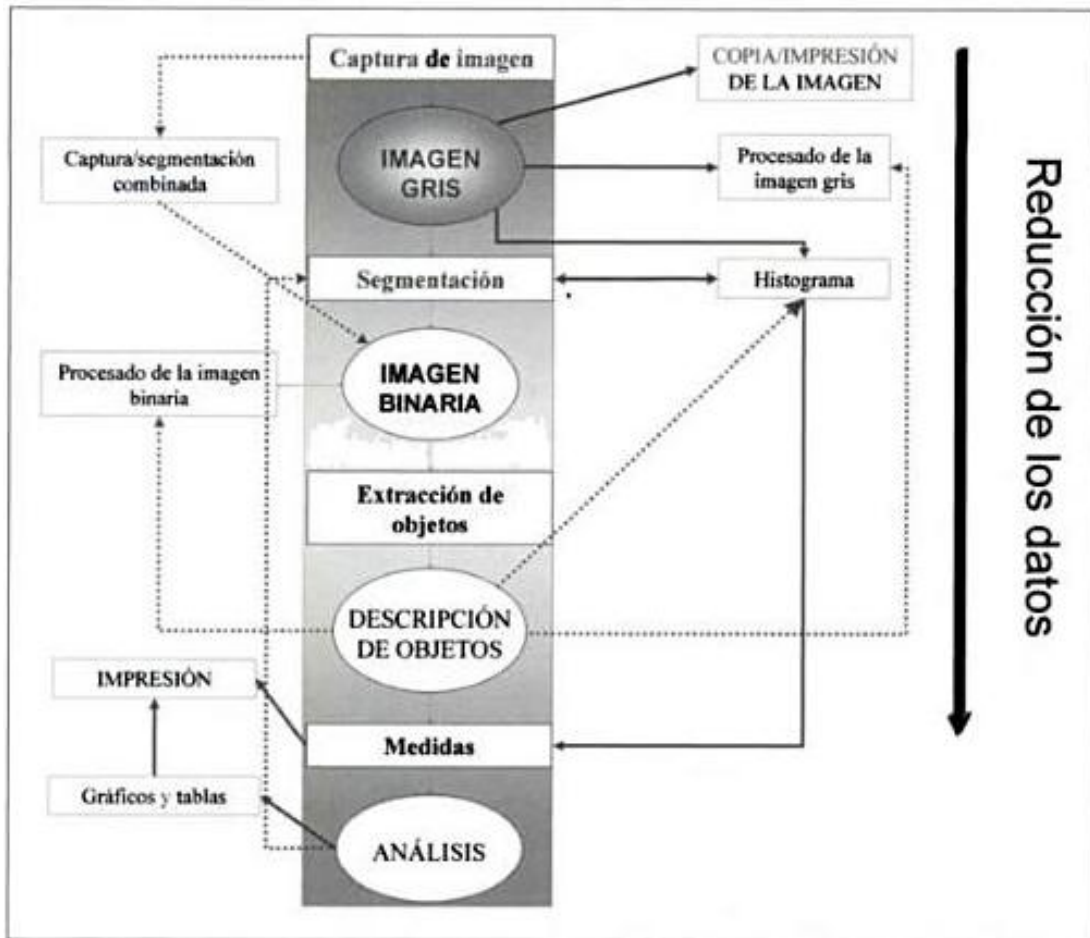
**Fig. 10: Análisis de las partículas que aparecen en la imagen.** Selección de exclusión de partículas que se encuentren en el límite de la imagen así como la inclusión de los huecos que pueda haber en el interior de las mismas. En la imagen inferior muestra el contorno de las partículas analizadas (*Outlines*) tras realizar el análisis de las partículas. Los resultados aparecen en forma de tabla (Tabla 1. Anexo).

```

1
2 //Este Plug-In calcula el área ocupada por la zona de fribosis de un
3 cilindro de biopsia de hígado. Forma parte del trabajo del Dpto de Patología del
4 Hospital LA FE de Valencia.
5
6
7
8
9 */
10
11
12 if (nImages==0){
13     waitForUser("No Images are open");
14     exit;
15 }
16 else {
17     run("Split Channels");
18     fileArray=newArray(nImages);
19
20 //Carga un vector con los nombres de las imágenes de cada canal
21 for (i=1; i<=nImages; i++) {
22     selectImage(i);
23     imal=getTitle();
24     fileArray[i-1]=imal;
25     print (i, " "+fileArray[i-1]);
26 }
27 }
28
29
30 //Caja de selección de imágenes
31 Dialog.create("Select Images");
32 Dialog.addChoice("Selecciona Imagen para medida de áreas", fileArray);
33 Dialog.addChoice("Selecciona Imagen para referencia de brillo", fileArray);
34 Dialog.show();
35 imal = Dialog.getChoice();
36 title0 = Dialog.getChoice();
37
38 selectImage(title0);
39 print (getTitle());
40 run("Duplicate...", "title=ima0r1s");
41 //Selección de imagen (imal) y duplicado(title2) para comenzar la medida;
42 selectImage(imal);
43 print (getTitle());
44 run("Duplicate...", "title=title2");
45 print (getTitle());
46
47
48
49 run("Duplicate...", "title=title2");
50 print (getTitle());
51
52 waitForUser ("parada");
53
54
55 run("Set Measurements...", "area mean integrated area_fraction display redirect=[imaGris] de
56 setTool("polygon");
57 waitForUser ("marca el polígono del área del hígado");
58 //makePolygon(.....);
59 run("Measure");
60 run("Select None");
61 //makePolygon(.....);
62 run("Measure");
63 setForegroundColor(255, 255, 255);
64 run("Fill", "slice");
65 //si se selecciona el color, la segmentación será directa
66 setAutoThreshold("Default dark");
67 //run("Threshold...");
68 setThreshold(254, 255);
69 run("Convert to Mask");
70 resetThreshold();
71 //Cuidado a la morfología matemática
72 run("Open");
73 waitForUser ("ahora se prepara la segunda imagen");
74
75
76 //Selección de imagen (imal) y duplicado(title1) para comenzar la medida;
77 selectImage(imal);
78 print (imal, getTitle(), title0);
79 run("Duplicate...", "title=tifibras");
80 print (getTitle());
81
82
83 //waitForUser ("selecciona el nivel de segmentación de la imagen");
84 run("Threshold...");
85
86 waitForUser ("selecciona el nivel de segmentación");
87
88
89 run("BinaryReconstruct ", "mask=[tifibras] seed=[title2] create white");
90 run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display");
91 //saveAs("Results", "L:\\Proyectos\\Judith\\I3M\\editado-1.txt");

```

**Fig. 11: Automatización del proceso mediante la secuencia de macroinstrucciones generada.** Los comandos se ejecutan de manera automática. Existe la posibilidad de añadir comentarios (verde) para explicar diferentes pasos o aclarar las instrucciones así como aplicar un montaje de falso color que permita distinguir los diferentes comandos.



**Fig. 12: Esquema procesamiento y análisis de imagen.** Paso u operaciones que se siguen en el proceso mediante el cual se obtienen la imagen de la que se extrae la información cuantitativa.

The screenshot shows a window titled 'Results' with a menu bar containing 'File', 'Edit', 'Font', and 'Results'. Below the menu bar is a table with the following data:

	Area	%Area
1	3145728	69.273
2	153342	4.875

**Tabla 1. Medidas de área que ocupa la sección de hígado y el sistema portal.**

Dato 1: medida del área (Área) y fracción del área (%Área) en la imagen que representa la sección de hígado (superior izquierda).

Dato 2: medida del área (Área) y fracción del área (% Área) en la imagen que representa la zona portal (superior derecha).

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. WHO Health Organization Classification of Tumours of the digestive System. Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon December 10- 12, 2009.
2. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S35-S46.
3. Pagliaro L, Peri V, Linea C, Camma C, Giunta M, Magrin S. Natural history of chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 28-44.
4. McCombs J, Matsuda T, Tonnu-Mihara I, Saab S, Hines P, L'italien G, *et al.* The risk of long-term morbidity and mortality in patients with chronic hepatitis C: results from an analysis of data from a Department of Veterans Affairs Clinical Registry. *JAMA Intern Med* 2014; 174: 204-212.
5. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 553-562.
6. WHO. World Health Report 2014. Disponible en: <http://www.who.int>.
7. WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection April 2014. Disponible en: <http://www.who.int>.

8. Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Loinaz C, Barrios C, Clemente G, *et al.* Liver transplantation in hepatitis C. A spanish multicentre experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 771- 776.
9. Schiff ER. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology* 1997; 26: 39S-42S.
10. Gane E, Munn S. Indications for liver transplantation. *N Z Med J* 1998; 111:177-179.
11. McMaster P. Transplantation for alcoholic liver disease in an era of organ shortage. *Lancet* 2000; 355: 424-425.
12. Lim JK, Keeffe EB. Liver transplantation for alcoholic liver disease: current concepts and length of sobriety. *Liver Transpl* 2004; 10: S31-S38.
13. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, *et al.* Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 815-820.
14. Prieto M, Berenguer M, Rayón JM, Córdoba J, Arguello L, Carrasco D, *et al.* High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29: 250-256.



15. Berenguer M, Prieto M, San-Juan F, Rayón JM, Martínez F, Carrasco D, *et al.* Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36: 202-210.
16. Pera M, García-Valdecasas JC, Grande L, Rimola A, Fuster J, Lacy AM, *et al.* Liver transplantation for alcoholic cirrhosis with anti-HCV antibodies. *Transpl Int* 1997; 10: 289-292.
17. Burra P, Mioni D, Cecchetto A, Cillo U, Zanus G, Fagiuoli S, *et al.* Histological features after liver transplantation in alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 716-722.
18. Dhar S, Omran L, Bacon BR, Solomon H, Di Bisceglie AM. Liver transplantation in patients with chronic hepatitis C and alcoholism. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 2003-2007.
19. Goldar-Najafi A, Gordon FD, Lewis WD, Pomfret E, Pomposelli JJ, Jenkins RL, *et al.* Liver transplantation for alcoholic liver disease with or without hepatitis C. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 115-122.
20. Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Croce LS, Mazzoran L, *et al.* Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut* 1999; 44: 874-880.
21. Cromie SL, Jenkins PJ, Bowden DS, Dudley FJ. Chronic hepatitis C: effect of alcohol on hepatic activity and viral titre. *J Hepatol* 1996; 25: 821-826.

22. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Martinot- Peignoux M, *et al.* Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27: 1717-1722.
23. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 24: 359-362.
24. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2057-2061.
25. Neyts J, Leyssen P, De Clercq E. Infections with flaviviridae. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1999; 61: 661-697.
26. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1527-1538.
27. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63.
28. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5547-5551.

- 29.** Furione M, Simoncini L, Gatti M, Baldanti F, Grazia RM, Gerna G. HCV genotyping by three methods: analysis of discordant results based on sequencing. *J Clin Virol* 1999; 13: 121-130.
- 30.** Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2291-2295.
- 31.** Thomas HC, Torok ME, Forton DM, Taylor-Robinson SD. Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31: 152-159.
- 32.** Pavio N, Taylor DR, Lai MM. Detection of a novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelope protein that is located in the cytosol and interacts with PKR. *J Virol* 2002; 76: 1265-1272.
- 33.** Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, *et al.* Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.
- 34.** Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, *et al.* Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 119-127.

35. Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002; 76: 3720-3730.
36. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* 1995; 69: 7461-7471.
37. Kwong AD, Kim JL, Rao G, Lipovsek D, Raybuck SA. Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res* 1999; 41: 67-84.
38. Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, *et al.* Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1998; 72: 6758-6769.
39. Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 1996; 70: 8477-8484.
40. Hahm B, Han DS, Back SH, Song OK, Cho MJ, Kim CJ, *et al.* NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J Virol* 1995; 69: 2534-2539.
41. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001; 75: 1437-1449.

42. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, *et al.* Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 77-81.
43. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
44. Domingo E, Menendez-Arias L, Quinones-Mateu ME, Holguin A, Gutierrez-Rivas M, Martinez MA, *et al.* Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog Drug Res* 1997; 48: 99-128.
45. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3392-3396.
46. Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, *et al.* Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894-899.
47. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570-583.
48. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, *et al.* Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19: 13-18.

- 49.** Esteban JI, López-Talavera JC, Genesca J, Madoz P, Viladomiu L, Muniz E, *et al.* High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991; 115: 443-449.
- 50.** Prieto M, Olaso V, Verdú C, Córdoba J, Gisbert C, Rayón M, *et al.* Does the healthy Hepatitis C Virus carrier state really exist? An analysis using polymerase chain reaction. *Hepatology* 1995; 22: 413-417.
- 51.** Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-1500.
- 52.** Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Yawn DH, McAllister HA, *et al.* The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 369-373.
- 53.** Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, *et al.* Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 1691-1696.
- 54.** Pereira BJ, Wright TL, Schmid CH, Levey AS. A controlled study of hepatitis C transmission by organ transplantation. The New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. *Lancet* 1995; 345: 484-487.

- 55.** Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Nakano Y, Furuta S, Nishioka K, *et al.* Hepatitis C in hospital employees with needlestick injuries. *Ann Intern Med* 1991; 115: 367-369.
- 56.** Schiff ER. Hepatitis C among health care providers: risk factors and possible prophylaxis. *Hepatology* 1992; 16: 1300-1301.
- 57.** Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, *et al.* Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337: 237-240.
- 58.** Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S99-105.
- 59.** Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1991; 14: 969-974.
- 60.** Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26: 34S-38S.
- 61.** El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36: S74-S83.

- 62.** Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34: 730-739.
- 63.** Zeuzem S, Scheuermann EH, Waschk D, Lee JH, Blaser C, Franke A, *et al.* Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 896-902.
- 64.** López-Labrador FX, Ampurdanes S, Forns X, Castells A, Saiz JC, Costa J, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 959-965.
- 65.** Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, Roudot-Thoraval F, Germanidis G, Bastie A, *et al.* Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998; 54: 256-264.
- 66.** Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000; 20:17-35.
- 67.** Tong MJ, el Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332: 1463-1466.



- 68.** Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000; 32: 91-96.
- 69.** Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 1228-1233.
- 70.** Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002; 36: 729-736.
- 71.** Soto B, Sánchez-Quijano A, Rodrigo L, Olmo JA, García- Bengoechea M, Hernández-Quero J, *et al.* Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenteral acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1-5.
- 72.** Ortíz V, Berenguer M, Rayón JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2408 - 2414.
- 73.** EASL (European Association for the Study of the Liver) Clinical Practical Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55: 245-264.

- 74.** Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, Mondala T, Pockros PJ, Lindsay KL, *et al.* Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 1996; 3: 75-78.
- 75.** Chazouilleres O, Kim M, Combs C, Ferrell L, Bacchetti P, Roberts J, *et al.* Quantitation of hepatitis C virus RNA in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1994; 106: 994-999.
- 76.** Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, *et al.* Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002; 36: 211-218.
- 77.** Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1554-1568.
- 78.** Hendricks DA, Friesenhahn M, Tanimoto L, Goergen B, Dodge D, Comanor L. Multicenter evaluation of the VERSANT HCV RNA qualitative assay for detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 651-656.
- 79.** Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol* 2005; 32: 92-101.
- 80.** Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999; 76: 149-158.

- 81.** Gourolain K, Soulier A, Pellegrin B, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, *et al.* Dynamic range of hepatitis C virus RNA quantification with the Cobas Ampliprep-Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1669-1673.
- 82.** Schuttler CG, Thomas C, Discher T, Friese G, Lohmeyer J, Schuster R, *et al.* Variable ratio of hepatitis C virus RNA to viral core antigen in patient sera. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1977-1981.
- 83.** Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B antibodies. *Science* 1989; 244: 362-364.
- 84.** Ebeling F, Naukkarinen R, Leikola J. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as predictor of infectivity. *Lancet* 1990 21; 335: 982-983.
- 85.** McHutchison JG, Person JL, Govindarajan S, Valinluck B, Gore T, Lee SR, *et al.* Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology* 1992; 15: 19-25.
- 86.** Riezu-Boj JI, Parker D, Civeira MP, Phippard D, Corbishley TP, Camps J, *et al.* Detection of hepatitis C virus antibodies with new recombinant antigens: assessment in chronic liver diseases. *J Hepatol* 1992; 15: 309-313.
- 87.** Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S65-S73.

- 88.** Ortiz de Lejarazu R, Avellón A, Eiros JM. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 194-204.
- 89.** Aguilera V, Berenguer M. Hepatitis C y fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 402-414.
- 90.** Schuppan. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: Collagens and glicoproteins. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 1-10.
- 91.** Areson DM, Friedman, Bissell DM, Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology* 1998; 95: 441-7.
- 92.** Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-69.
- 93.** Pérez I. Fibrosis hepática de origen incierto en pacientes infectados por el VIH. Prevalencia y factores asociados. Tesis doctoral. Universidad de Cordova, servicio de publicaciones 2009.
- 94.** Knodell KG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
- 95.** Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Grootes J, Gudat F, *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699.

- 96.** Bedossa P, Poynard T. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289-293.
- 97.** Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
- 98.** Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, *et al.* Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology* 2005; 42: 282-92.
- 99.** Saadeh S, Cammell G, Carey WD, Younossi Z, Barnes D, Easley K. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 196-200.
- 100.** Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-71.
- 101.** Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey for the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology* 2000; 32: 477-481.
- 102.** Poynard T, Ratziu V, Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterology* 2000; 14: 543-548.
- 103.** Perrault J, McGill DB, Ott BJ, Taylor WF. Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients. *Gastroenterology* 1978; 74:103-106.

- 104.** Bonny C, Rayssiguier R, Ughetto S, Aublet-Cuvelier B, Baranger J, Blanchet G, *et al.* Medical practices and expectations of general practitioners in relation to hepatitis C virus infection in the Auvergne region. *Gastroenterology Clin Biol* 2003; 27: 1021-1025.
- 105.** Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver Biopsy. *Hepatology* 2009; 49: 3.
- 106.** Lagging LM, Westin J, Svensson E, Aires N, Dhillon AP, Lindh M, *et al.* Progression of fibrosis in untreated patients with hepatitis C virus infection. *Liver* 2002; 22: 136-144.
- 107.** Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, *et al.* Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986; 1: 523-525.
- 108.** Soloway RD, Baggenstoss AH, Schoenfield LJ, Summerskill WH. Observer error and sampling variability tested in evaluation of hepatitis and cirrhosis by liver biopsy. *Am J Dig Dis* 1971; 16: 1082-1086.
- 109.** Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DTY, *et al.* The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta*, 2007; 381: 119-123.

- 110.** Layden TJ. Percutaneous needle biopsy specimens. Sampling variability in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Arch Intern Med* 1979; 139: 856-860.
- 111.** Regev A, Berho M , Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2614- 2618.
- 112.** McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, *et al.* Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus interferon study group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 945-951.
- 113.** Croquet V, Vuillemin E, Ternisien C, Pilette C, Oberti F, Gallois Y, *et al.* Prothrombin index is an indirect marker of severe liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1133-1141.
- 114.** Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, *et al.* Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology* 2005; 42: 282-292.
- 115.** Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T, *et al.* Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069-1075.

- 116.** Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, *et al.* Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36: 986-992.
- 117.** Adams LA, Bursara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, *et al.* Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005; 51: 1867-1873.
- 118.** Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-526.
- 119.** Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, *et al.* A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005; 42: 1373-1381.
- 120.** Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, *et al.* Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 271- 279.
- 121.** Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, *et al.* Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared to MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon alpha and ribavirin. *J Viral Hepat* 2006; 13: 643-51.



- 122.** Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, *et al.* Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007; 46: 775-82.
- 123.** Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, *et al.* Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968; 168: 392-415.
- 124.** Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, *et al.* Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*, 2006; 55: 403-408.
- 125.** Starzl TE, Koep LJ, Halgrimson CG, Hood J, Schroter GP, Porter KA, *et al.* Fifteen years of clinical liver transplantation. *Gastroenterology* 1979; 77: 375-388.
- 126.** Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, *et al.* Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982; 2: 614-636.
- 127.** Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, *et al.* Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; 14: 1694-1707.
- 128.** Adam R, Hoti E. Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis* 2009; 29: 3-18.

- 129.** Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, Rolles K, Ringe B Hepatic transplantation in Europe. First Report of the European Liver Transplant Registry. *Lancet* 1987; 2: 674-676.
- 130.** Barber K, Blackwell J, Collett D, Neuberger J. Life expectancy of adult liver allograft recipients in the UK. *Gut* 2007; 56: 279-282.
- 131.** Historia de los trasplantes. Organización Nacional de Trasplantes. Disponible en: <http://www.ont.es/home/Paginas/Trasplantedehigado.aspx>.
- 132.** Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, *et al.* Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003; 9: 1231-1243.
- 133.** Yoo HY, Maheshwari A, Thuluvath PJ. Retransplantation of liver: primary graft nonfunction and hepatitis C virus are associated with worse outcome. *Liver Transpl* 2003; 9: 897-904.
- 134.** Kashyap R, Jain A, Reyes J, Demetris AJ, Elmagd KA, Dodson SF, *et al.* Causes of retransplantation after primary liver transplantation in 4000 consecutive patients: 2 to 19 years follow-up. *Transplant Proc* 2001; 33: 1486-1487.

- 135.** Schlitt HJ, Nashan B, Krick P, Ringe B, Wittekind C, Wonigeit K, *et al.* Intragraft immune events after human liver transplantation. Correlation with clinical signs of acute rejection and influence of immunosuppression. *Transplantation* 1992; 54: 273-278.
- 136.** Bartlett AS, Ramadas R, Furness S, Gane E, McCall JL. The natural history of acute histologic rejection without biochemical graft dysfunction in orthotopic liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl* 2002; 8: 1147-1153.
- 137.** Banff Working Group, Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, *et al.* Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology* 2006; 44: 489-501.
- 138.** Mells G, Mann C, Hubscher S, Neuberger J. Late protocol liver biopsies in the liver allograft: a neglected investigation? *Liver Transpl* 2009; 15: 931-938.
- 139.** Mells G, Neuberger J. Protocol liver allograft biopsies. *Transplantation* 2008; 85: 1686-1692.
- 140.** Hubscher SG. Recurrent and de-novo disease in the liver allograft. *Curr Opin Organ Transpl* 2006; 11: 283-288.
- 141.** McCaughan GW, Zekry A: Pathogenesis of hepatitis C virus recurrence in the liver allograft. *Liver Transpl* 2002; 8: S7-S13.

- 142.** Garcia-Retortillo M , Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, *et al.* Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680-687.
- 143.** Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, *et al.* A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 110: 167-177.
- 144.** Gane EJ. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl* 2008; 14: S36-S44.
- 145.** Ramírez S, Pérez-Del-Pulgar S, Forns X. Virology and pathogenesis of hepatitis C virus recurrence. *Liver Transpl* 2008; 14: S27-S35.
- 146.** Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Wilber J, David MF, *et al.* The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 1137-1143.
- 147.** Sánchez-Fueyo A, Restrepo JC, Quinto L, Bruguera M, Grande L, Sánchez-Tapias JM, *et al.* Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft. *Transplantation* 2002; 73: 56-63.
- 148.** Gane E: The natural history and outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected recipients. *Liver Transpl* 2003; 9: S28-S34.

**149.** Charlton M. Recurrence of hepatitis C infection: Where are we now? *Liver Transpl* 2005; 11: S57-S62.

**150.** Berenguer M: What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol* 2005; 42: 448-456.

**151.** Selzner M, Kashfi A, Selzner N, McCluskey S, Greig PD, Cattral MS, *et al.* Recipient age affects long-term outcome and hepatitis C recurrence in old donor livers following transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1288-1295.

**152.** Walter T, Dumortier J, Guillaud O, Hervieu V, Scoazec JY, Boillot O. Factors influencing the progression of fibrosis in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation under antiviral therapy: a retrospective analysis of 939 liver biopsies in a single center. *Liver Transpl* 2007; 13: 294-301.

**153.** Katz LH, Mor E, Brown M, Bar-Nathan N, Shaharabani E, Sulkes J, *et al.* Recurrent hepatitis C virus disease after liver transplantation and concurrent biliary tract complications: poor outcome. *Clin Transplant* 2006; 20: 465-470.

**154.** Manousou P, Samonakis D, Cholongitas E, Patch D, O'Beirne J, Dhillon AP, *et al.* Outcome of recurrent hepatitis C virus after liver transplantation in a randomized trial of tacrolimus monotherapy versus triple therapy. *Liver Transpl* 2009; 15: 1783-1791.

- 155.** Shackel NA, Jamias J, Rahman W, Prakoso E, Strasser SI, Koorey DJ, *et al.* Early high peak hepatitis C viral load levels independently predict hepatitis C-related liver failure post-liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 709-718.
- 156.** Sreekumar R, Gonzalez-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J, *et al.* Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 1125-1130.
- 157.** Guido M, Faggioli S, Tessari G, Burra P, Leandro G, Boccagni P, *et al.* Histology predicts cirrhotic evolution of post- transplant hepatitis C. *Gut* 2002; 50: 697-700.
- 158.** Meriden Z, Forde KA, Pasha TL, Hui JJ, Reddy KR, Furth EE, *et al.* Histologic predictors of fibrosis progression in liver allografts in patients with hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 289-296.
- 159.** Guido M, Ruge M, Leandro G, Fiel IM, Thung SN. Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts. *Hepatology* 1997; 26: 310-314.
- 160.** Gawrieh S, Papouchado BG, Burgart LJ, Kobayashi S, Charlton MR, Gores GJ. Early hepatic stellate cell activation predicts severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 1207-1213.

- 161.** Russo MW, Firpi RJ, Nelson DR, Schoonhoven R, Shrestha R, Fried MW, *et al.* Early hepatic stellate cell activation is associated with advanced fibrosis after liver transplantation in recipients with hepatitis C. *Liver Transpl* 2005; 11: 1235-1241.
- 162.** Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, Franchitto A, Merli M, *et al.* Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 349-356.
- 163.** Berenguer M, López-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35: 666-678.
- 164.** Berenguer M, Rayón JM, Prieto M, Aguilera V, Nicolás D, Ortiz V, *et al.* Are posttransplantation protocol liver biopsies useful in the long term? *Liver Transpl* 2001; 7: 790-796.
- 165.** Firpi RJ, Abdelmalek MF, Soldevila-Pico C, Cabrera R, Shuster JJ, Theriaque D, *et al.* One-year protocol liver biopsy can stratify fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2004; 10: 1240-1247.
- 166.** Neumann UP, Berg T, Bahra M, Seehofer D, Langrehr JM, Neuhaus R, *et al.* Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C. *J Hepatol* 2004; 41: 830-836.

- 167.** Zimmermann T, Otto C, Hoppe-Lotichius M, Biesterfeld S, Lautem A, Knaak M, *et al.* Risk factors in patients with rapid recurrent hepatitis C virus-related cirrhosis within 1 year after liver transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 2549-2556.
- 168.** Samuel D, Roche B. Ribavirin in the treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation: difficult to manage but essential for success. *J Hepatol* 2007; 46: 988-991.
- 169.** Bahra M, Neumann UP, Jacob D, Langrehr JM, Berg T, Neuhaus R, *et al.* Fibrosis progression in hepatitis C positive liver recipients after sustained virologic response to antiviral combination therapy (interferon-ribavirin therapy). *Transplantation* 2007; 83: 351-353.
- 170.** Berenguer M. Non-invasive biomarkers of liver fibrosis in liver transplant patients with hepatitis C: can we avoid liver biopsies? *Dig Liver Dis* 2009; 41: 226-228.
- 171.** Gordon FD, Pomfret EA, Pomposelli JJ, Lewis WD, Jenkins RL, Khettry U, *et al.* Severe steatosis as the initial histologic manifestation of recurrent hepatitis C genotype 3. *Hum Pathol* 2004; 35: 636-638.
- 172.** Saraf N, Fiel MI, Deboccardo G, Emre S, Schiano TD. Rapidly progressive recurrent hepatitis C virus infection starting 9 days after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 913-917.



- 173.** Cotler SJ, Taylor SL, Gretch DR, Bronner MP, Rizk R, Perkins JD, *et al.* Hyperbilirubinemia and cholestatic liver injury in hepatitis C-infected liver transplant recipients. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 753-759.
- 174.** Baiocchi L, Angelico M, Petrolati A, Perrone L, Palmieri G, Battista S, *et al.* Correlation between liver fibrosis and inflammation in patients transplanted for HCV liver disease. *Am J Transplant* 2008; 8: 673-678.
- 175.** Morita K, Taketomi A, Soejima Y, Ikegami T, Fukuhara T, Iguchi T, *et al.* De novo hepatocellular carcinoma in a liver graft with sustained hepatitis C virus clearance after living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1412-1416.
- 176.** Rosen HR. Hepatitis B and C in the liver transplant recipient: current understanding and treatment. *Liver Transpl* 2001; 7: S87-S98.
- 177.** Dixon LR, Crawford JM. Early histologic changes in fibrosing cholestatic hepatitis C. *Liver Transpl* 2007; 13: 219-226.
- 178.** Mariuzzi GM, Collan Y. Some reflections on the history, and presence of quantitative pathology. *Pathologica* 1995; 87: 215-220.
- 179.** Givan A. Flow Citometry: An Introduction. *Methods Mol Biol* 2011; 1: 1-29.

- 180.** Goodman ZD, Becker RL, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* 2007; 45: 886-894.
- 181.** Pertusa JF. Técnicas de análisis de imagen. Aplicaciones en Biología. Universidad de Valencia 2003: 352.
- 182.** Pérez J, Martínez LA, Vera JF, Prieto M, Artes MJ, García A. Análisis morfométrico de la citología urinaria en pacientes trasplantados renales con infección del virus BK. *Dial Traspl* 2013; 34: 107-114.
- 183.** Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Ríos C, Méndez-Sánchez N, *et al.* In vivo 3T spectroscopic quantification of liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease: correlation with biochemical method and morphometry. *J Hepatol* 2010; 53: 732-737.
- 184.** Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet, *et al.* Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol* 1998; 28: 439-446.
- 185.** Sandrini J, Boursier J, Chaigneau J, Sturm N, Zarski JP, Le Bail B, *et al.* Quantification of portal-bridging fibrosis area more accurately reflects fibrosis stage and liver stiffness than whole fibrosis or perisinusoidal fibrosis areas in chronic hepatitis C. *Mod Pathol* 2014; 27: 1035-1045.

**186.** Mariño Z, Mensa L, Crespo G, Miquel R, Bruguera M, Pérez-Del-Pulgar S, *et al.* Early periportal sinusoidal fibrosis is an accurate marker of accelerated HCV recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 2014; 61: 270-277.

**187.** Servais A, Meas-Yedid V, Buchler M, Morelon E, Olivo-Marin JC, Thervet E. Quantification of interstitial fibrosis by image analysis on routine renal biopsy 1 year after transplantation in patients managed by C2 monitoring of cyclosporine microemulsion. *Transplant Proc* 2007; 39: 2560-2562.

**188.** Vasiljević JD, Popović ZB, Otasević P, Popović ZV, Vidaković R, Mirić M, *et al.* Myocardial fibrosis assessment by semiquantitative, point-counting and computer-based methods in patients with heart muscle disease: a comparative study. *Histopathology* 2001; 38: 338–343.

**189.** Hadi AM, Mouchaers KT, Schalić I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, *et al.* Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cell Oncol* 2011; 34: 343-354.

**190.** Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 1978; 41: 267-274.

**191.** Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11: 447-455.

- 192.** Montes GS, Junqueira LC. The use of Picrosirius red polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 1-11.
- 193.** Coleman R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem* 2011; 113: 231-233.
- 194.** López-Mínguez JR, Climent V, Yen-Ho S, González-Fernández R, Nogales-Asensio JM, Sánchez-Quintana D. Características estructurales de los senos de Valsalva y porción proximal de las arterias coronarias. Su relevancia durante la disección retrógrada aortocoronaria. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59: 696-702.
- 195.** Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, *et al.* Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; 62: 751-758.
- 196.** Wied GL, Bartels PH, Bibbo M, Dytch HE. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* 1989; 20:549-571.
- 197.** Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, *et al.* Correlation of FIBROSpect II with histologic and morphometric evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 242-247.
- 198.** Moragas A, Allende H, Sans M. Characteristics of perisinusoidal collagenization in liver cirrhosis: computer-assisted quantitative analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20: 169-177.

- 199.** Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.
- 200.** Lagging LM, Westin J, Svensson E, Aires N, Dhillon AP, Lindh M, *et al.* Progression of fibrosis in untreated patients with hepatitis C virus infection. *Liver* 2002; 22: 136-44.
- 201.** Goodman ZD, Becker RL Jr, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology*. 2007; 45: 886-894.
- 202.** Manousou P, Dhillon AP, Isgro G, Calvaruso V, Luong TV, Tsochatzis E, *et al.* Digital image analysis of liver collagen predicts clinical outcome of recurrent hepatitis C virus 1 year after liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 178-88.
- 203.** Manousou P, Burroughs AK, Tsochatzis E, Isgro G, Hall A, Green A, *et al.* Digital image analysis of collagen assessment of progression of fibrosis in recurrent HCV after liver transplantation. *J Hepatol* 2013; 58: 962-968.
- 204.** Crawford AR, Lin XZ, Crawford JM. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 1998; 28: 323-331.

- 205.** Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol* 2003; 39: 239-244.
- 206.** Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344: 495-500.
- 207.** Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997; 25: 1028-1031.
- 208.** Kaserer K, Fiedler R, Steindl P. Liver biopsy is a useful predictor of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Histopathology* 1998; 32: 454-461.
- 209.** Hadi AM, Mouchaers KT, Schaliij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, *et al.* Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cell Oncol (Dordr)* 2011; 34: 343-354.
- 210.** Hohlund B, Poulsen H, Schlichting P. Reproducibility of liver biopsy diagnosis in relation to the size of the specimen. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 329-335.
- 211.** Zarski JP, McHutchison J, Bronowicki JP, Sturm N, Garcia-Kennedy R, Hodaj E, *et al.* Rate of natural disease progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38: 307-314.

- 212.** Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-832.
- 213.** Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34: 730-739.
- 214.** Sobesky R, Mathurin P, Charlotte F, *et al.* Modeling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. *Gastroenterology* 1999; 116: 378-386.
- 215.** Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, *et al.* Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 517-524.
- 216.** Poynard T, McHutchison J, Manns M, *et al.* Impact of pegylated interferon  $\alpha$ -2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1303-13.
- 217.** Poynard T, McHutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology* 2003; 38: 481-492.

- 218.** King RR. Hepatitis C. Past, present and future issues. *Adv Nurse Pract* 1997; 5: 55-56.
- 219.** Buti M, Esteban R. Presente y futuro del tratamiento de la hepatitis C. *Form Med Contin Aten Prim* 2002; 09: 553-554.
- 220.** Chatterjee A, Smith PF, Perelson AS. Hepatitis C viral kinetics: the past, present, and future. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 13-26.
- 221.** Dumortier J, Boillot O, Scoazec JY. Natural history, treatment and prevention of hepatitis C recurrence after liver transplantation: past, present and future. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 11069-11079.
- 222.** Hatzakis A, Chulanov V, Gadano AC, Bergin C, Ben-Ari Z, Mossong J. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infections with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* 2015; 1: 26-45.



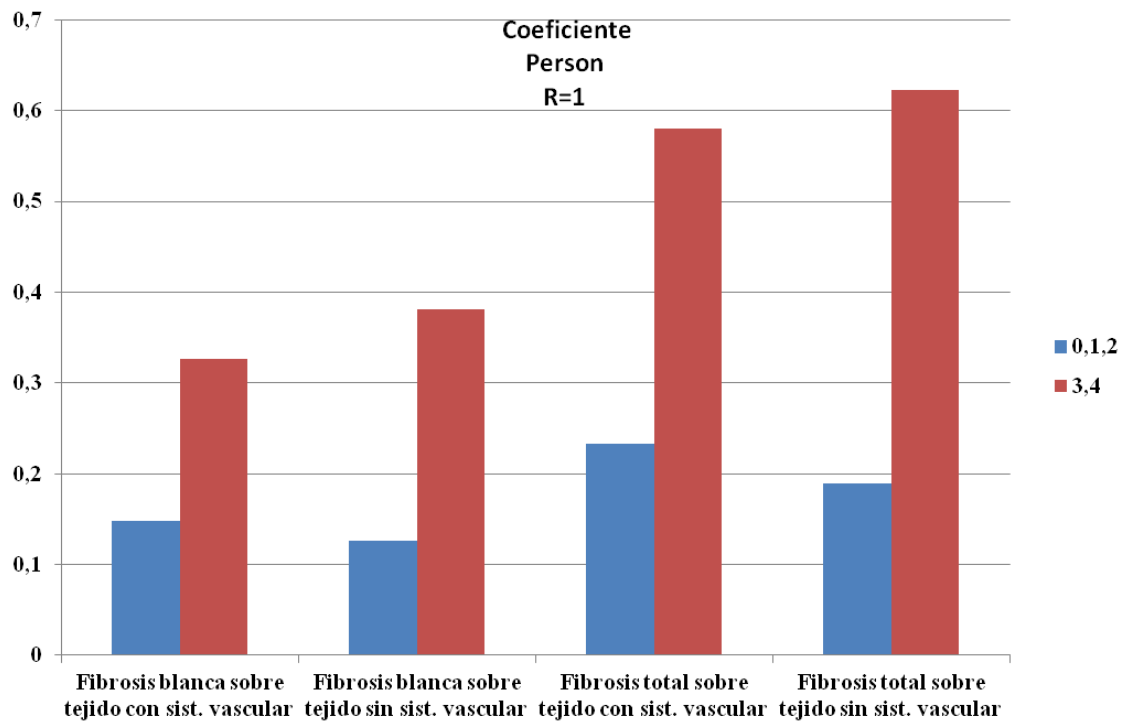
## ANEXO 2

### PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR, RANGO INFERIOR Y SUPERIOR DE LAS CUATROS VARIABLES CUANTIFICADAS

<b>% AREA DE FIBROSIS BLANCA</b>								
<b>SOBRE TEJIDO CON VASOS</b>					<b>SOBRE TEJIDO SIN VASOS</b>			
F	PROMEDIO	DESV STD	RANGO INFERIOR	RANGO SUPERIOR	PROMEDIO	DESV STD	RANGO INFERIOR	RANGO SUPERIOR
0	0,96%	0,73%	0,24%	1,69%	1,27%	0,99%	0,28%	2,26%
1	2,49%	1,66%	0,83%	4,14%	2,82%	2,01%	0,81%	4,83%
2	2,33%	0,98%	1,35%	3,31%	2,65%	1,06%	1,59%	3,70%
3	4,42%	2,17%	2,24%	6,59%	4,70%	2,33%	2,37%	7,03%
4	6,30%	2,79%	3,50%	9,09%	7,05%	2,63%	4,41%	9,68%

<b>% AREA DE FIBROSIS TOTAL</b>								
<b>FIB. TOTAL TEJIDO CON VASOS</b>					<b>FIB. TOTAL TEJIDO SIN VASOS</b>			
F	PROMEDIO	DESV STD	RANGO INFERIOR	RANGO SUPERIOR	PROMEDIO	DESV STD	RANGO INFERIOR	RANGO SUPERIOR
0	1,89%	0,61%	1,28%	2,50%	2,49%	0,84%	1,65%	3,33%
1	3,67%	2,38%	1,29%	6,05%	4,22%	3,19%	1,03%	7,40%
2	3,90%	1,39%	2,50%	5,29%	4,48%	1,65%	2,83%	6,13%
3	8,67%	4,88%	3,79%	13,55%	9,25%	5,31%	3,94%	14,57%
4	17,01%	4,91%	12,10%	21,92%	19,14%	4,35%	14,79%	23,49%

**CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CUANTIFICADAS Y LOS ESTADIOS METAVIR (FIBROSIS INICIAL, FIBROSIS AVANZADA)**



ESTADIO	FB + V	FB sin v	FT +V	FT sin V
<b>Fibrosis inicial (0, 1, 2)</b>	<b>0,14</b>	<b>0,12</b>	<b>0,23</b>	<b>0,18</b>
<b>Fibrosis avanzada (3,4)</b>	<b>0,32</b>	<b>0,38</b>	<b>0,58</b>	<b>0,62</b>