

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de la prevalencia y morbi-mortalidad de la enfermedad hepática grasa no alcohólica: Estudio prospectivo longitudinal de una cohorte de pacientes con colelitiasis**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Elvira del Pozo Maroto**

**Directores**

**Águeda González Rodríguez**  
**Carmelo García Monzón**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

*Caracterización de la prevalencia y morbi-mortalidad de la enfermedad  
hepática grasa no alcohólica: Estudio prospectivo longitudinal de una  
cohorte de pacientes con colelitiasis*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elvira del Pozo Maroto

DIRECTORES

Águeda González Rodríguez, Carmelo García Monzón



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación en ciencias médico-quirúrgicas

***TESIS DOCTORAL***

*Caracterización de la prevalencia y morbi-mortalidad de la enfermedad  
hepática grasa no alcohólica: Estudio prospectivo longitudinal de una  
cohorte de pacientes con colelitiasis*

**AUTOR:** ELVIRA DEL POZO MAROTO

**DIRECTORES DE TESIS:**

Dra. ÁGUEDA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

Dr. CARMELO GARCÍA MONZÓN

*A mis padres*

## *Agradecimientos*

Hacer una Tesis Doctoral es una carrera de fondo. Hace falta esfuerzo, paciencia, convencimiento... y lo más importante: saber rodearse de aquellas personas que pueden hacerte el camino, no sólo más fácil, sino posible. En mi caso he tenido suerte, son muchas las personas a las que les tengo que agradecer sinceramente el haber llegado hasta aquí.

Sin ninguna duda tengo que empezar por Carmelo, mi maestro, compañero y amigo. El haber llevado este proyecto a cabo ha sido gracias a ti. Gracias por tu entusiasmo, por tu motivación, por tu buen carácter, por tu amor a la investigación y por tu optimismo inalterable. He aprendido mucho de ti, sobre todo a pelear por aquello que queremos sin perder la esperanza y con una sonrisa en la cara.

Gracias a Águeda por tu energía, por tus consejos siempre acertados, por decir las cosas claras, por darme las indicaciones precisas y sobre todo por tu generosidad, me has ayudado mucho y también contigo me llevo un aprendizaje muy valioso.

Andrés, siempre amable y disponible, muchas gracias por haber conseguido que la estadística, algo que suele resultar complejo, haya sido fácil y didáctico.

Laura, mi resi mayor, mi amiga, la persona más generosa que conozco. Como solías decir “de ti he aprendido todo lo que sé”. En estos años he recordado muchas veces cuando fuiste tú quien defendió su tesis y me dijiste “Elvira, si yo he sido capaz de esto con lo desastre que soy, tú también puedes”. Y en efecto aquí estoy, he podido.

Nanete y Teruca, mis padres, a quiénes les dedico este trabajo. Gracias por haber sido mi ejemplo a seguir en la mayoría de los aspectos de mi vida.

Irene, mi hermana, gracias por conocerme tan bien, por hacerme reír siempre y por demostrarme que tengo un apoyo incondicional y perpetuo. Símplemente... eres la mejor.

A Javier por ser mi compañero de juegos, por apoyarme en todo, por confiar en mí, por animarme en los momentos de desánimo y por demostrarme que con esfuerzo y convencimiento podemos conseguir aquello que nos proponemos. Admiro tu fuerza de voluntad y tu seguridad cuando te involucras en algo. Tu técnica del desgaste funciona.

Y por último a Pedro, mi niño. Cuando empecé esta aventura todavía no habías nacido, llegaste en plena pandemia para darnos vidilla en una época tan triste. Verte crecer es un regalo y una motivación para, igual que tú, conseguir aquello que me propongo, como esta Tesis. Y te lo agradezco.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	4
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE TABLAS .....	15
ABREVIATURAS .....	17
INTRODUCCIÓN .....	20
Enfermedad hepática grasa no alcohólica.....	21
1.1. Definición .....	21
1.2. Epidemiología .....	23
1.3. Fisiopatología.....	24
1.3.1. Resistencia a la insulina.....	25
1.3.2. Lipotoxicidad.....	25
1.4. Histología.....	26
1.4.1. Lesiones parenquimatosas: .....	27
1.4.2. Lesiones portales/periportales: .....	28
1.4.3. Histología en niños .....	29
1.5. Historia natural.....	30
1.6. Diagnóstico .....	33
1.6.1. Cuadro clínico.....	33
1.6.2. Pruebas analíticas.....	33
1.6.3. Técnicas de imagen.....	34

1.6.4. Biopsia hepática.....	36
1.6.4.1. Evaluación histopatológica: gradación y estadiaje .....	37
1.6.4.2. Sistemas para la clasificación histopatológica.....	39
1.6.5. Algoritmos de diagnóstico no invasivos.....	39
1.7. Tratamiento .....	42
1.8. Comorbilidades asociadas.....	45
1.8.1. Obesidad .....	45
1.8.2. Diabetes Mellitus tipo 2.....	46
1.8.3. Síndrome de apnea obstructiva del sueño.....	46
1.8.4. Colelitiasis .....	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
3.1. Población de estudio .....	51
3.2. Diseño del estudio.....	52
3.2.1. Estudio transversal.....	52
3.2.2. Estudio longitudinal.....	55
3.3. Métodos.....	57
3.3.1. Cálculo del tamaño muestral.....	57
3.3.2. Análisis estadístico .....	57
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio transversal. ....	60
4.1.1. Prevalencia de la EHGNA y de sus formas histológicas. ....	65
4.1.2. Factores de riesgo de EHGNA y EHNA. ....	67
4.1.3. Nuevos algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA y EHNA.....	69

4.1.4. Precisión de otros algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA y de fibrosis hepática.....	73
4.2. Características de los pacientes incluidos en el estudio longitudinal. ....	76
4.2.1. Incidencia de comorbilidades metabólicas .....	80
4.2.2. Incidencia de comorbilidades cardiovasculares.....	81
4.2.3. Incidencia de comorbilidades neoplásicas.....	82
4.2.4. Incidencia de otras comorbilidades.....	83
4.2.5. Causas de mortalidad.....	83
<b>DISCUSIÓN</b> .....	85
5.1. Prevalencia y factores de riesgo de EHGNA y de EHNA en pacientes con colelitiasis. ....	86
5.2. Eficacia de los distintos métodos de diagnóstico no invasivos en las diferentes fases evolutivas de la EHGNA en pacientes con colelitiasis.....	94
5.3. Historia natural de los pacientes con EHGNA en pacientes con colelitiasis: morbilidad y mortalidad.....	107
5.4. Fortalezas y limitaciones.....	112
<b>CONCLUSIONES</b> .....	115
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	118
<b>ANEXOS</b> .....	135

## RESUMEN

### **Caracterización de la prevalencia y morbi-mortalidad de la enfermedad hepática grasa no alcohólica: Estudio prospectivo longitudinal de una cohorte de pacientes con colelitiasis.**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es actualmente la enfermedad hepática crónica más frecuente en los países occidentales, y su incidencia está experimentando un alarmante incremento en todo el mundo, estimándose una prevalencia media global del 25% en la población general. La EHGNA incluye dos formas histopatológicamente bien diferenciadas y con pronósticos distintos: la esteatosis simple no alcohólica (ESNA) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Si bien los algoritmos vigentes para el diagnóstico no invasivo de esteatosis y de fibrosis resultan de utilidad en los pacientes con EHGNA, la biopsia hepática sigue siendo el procedimiento de referencia para el diagnóstico definitivo y el único capaz de diferenciar ESNA de EHNA. Las comorbilidades asociadas a la EHGNA condicionan la supervivencia de estos pacientes, tanto por su implicación en la progresión de la hepatopatía como por su contribución a la aparición de enfermedades cardiovasculares y neoplásicas, contribuyendo a una mayor morbilidad y mortalidad. Numerosos estudios clínicos han sugerido que los pacientes con colelitiasis tienen una mayor probabilidad de desarrollar una EHGNA, sin embargo, la relación patogénica entre la colelitiasis y la EHGNA, así como los factores de riesgo asociados, no están bien definidos.

Los objetivos específicos del presente trabajo de Tesis Doctoral fueron determinar la prevalencia de las diferentes formas histológicas de la EHGNA en pacientes con

colecistitis, evaluar la eficacia de distintos algoritmos matemáticos para el diagnóstico no invasivo de las diferentes fases evolutivas de la EHGNA y conocer la historia natural de la EHGNA en pacientes con colecistitis, con especial énfasis en la morbilidad y mortalidad asociadas. Para ello, se estudiaron 242 pacientes con colecistitis a los que se les realizó una biopsia hepática percutánea, en el momento de la colecistectomía laparoscópica programada, y que fueron evaluados clínicamente tras un seguimiento de  $88\pm 24$  meses desde su inclusión. La edad media de los pacientes fue de 48,8 años, la mayoría eran mujeres (75,6%) y la raza predominante fue la caucásica (67,4%). El 32,6% de los pacientes presentaba obesidad, el 7,4% diabetes mellitus tipo 2 (DM2), el 22,7% hipertensión arterial (HTA) y el 62,4% dislipemia. El 26,4%, además, cumplía criterios de síndrome metabólico. De la cohorte estudiada de pacientes con colecistitis, el 49,6% tuvo un diagnóstico histológico de EHGNA, incluyendo ESNA (39,7%) y EHNA (9,9%), mientras que el 50,4% tenía un hígado histológicamente normal. Se identificaron 2 factores de riesgo relacionados con el diagnóstico de EHGNA, el perímetro de cintura y la ferritina, que combinados generaron el nuevo algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA con un área bajo la curva ROC (AUROC) de 0,82 (95% de IC: 0,74-0,95), con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 66%. Se comparó la precisión diagnóstica de los algoritmos Fatty Liver Index (FLI) y Hepatic Steatosis Index (HSI) con la del nuevo algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA obteniendo un valor de AUROC de 0,74, 0,70 y 0,82 respectivamente. Se analizó la precisión diagnóstica de los algoritmos de fibrosis obteniendo un valor predictivo negativo (VPN) de fibrosis hepática avanzada ( $\geq F3$ ) del 95% para el FIB-4, del 94% para el NAFLD Fibrosis Score (NFS) y

del 96% para el Hepamet Fibrosis Score (HFS) con un valor del AUROC inferior a 0,5 en los 3 algoritmos. Por otro lado, se identificaron 3 factores de riesgo asociados al diagnóstico de EHNA, el índice de masa corporal, la GPT y la insulina, que combinados generaron el nuevo algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA con un valor del AUROC de 0,76 (95% de IC: 0,65-0,87) con una sensibilidad del 67% y una especificidad del 78%. Tras un seguimiento de  $88 \pm 24$  meses, 74 de los 205 pacientes analizados (36,1%) desarrollaron alguna comorbilidad metabólica (DM2, HTA o dislipemia), 45 de los cuales (60,8%) presentaban signos histológicos de EHGNA en el momento de la inclusión en el estudio. Fueron 9 los pacientes que desarrollaron alguna comorbilidad cardiovascular (cardiopatía isquémica o accidente cardiovascular agudo), 7 de ellos (77,8%) tenían signos histológicos de EHGNA al inicio del estudio. Se registraron 18 casos de neoplasia, de las que 4 (22,2%) eran de origen digestivo o hepático y 3 de ellas (75%) se diagnosticaron en pacientes que tenían una EHGNA basalmente. Finalmente, se registraron 5 fallecimientos a lo largo del seguimiento, de los que 4 (80%) ocurrieron en pacientes con un diagnóstico histológico de EHGNA al inicio del estudio. En conclusión, la prevalencia de la EHGNA en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis fue del 49,6%, superior al 25% estimado en la población general, mientras que la prevalencia de EHNA fue del 9,9%, similar a la considerada en la población general (12,2%). Se generó el nuevo algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA que obtuvo una buena precisión diagnóstica (AUROC: 0,82) además de mostrar un mejor rendimiento que los algoritmos FLI y HSI (0,74 y 0,70, respectivamente) en estos pacientes. Los algoritmos de fibrosis FIB-4, NFS y HFS mostraron un VPN de fibrosis hepática avanzada ( $\geq$  F3)

superior al 90%. Se generó el nuevo algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA que obtuvo una eficacia diagnóstica aceptable (AUROC: 0,76). La prevalencia de comorbilidades metabólicas, cardiovasculares, renales y oncológicas, así como la mortalidad en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis fue más alta en los pacientes con EHGNA que en aquellos con un hígado histológicamente normal.

## ABSTRACT

### **Prevalence, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease: a prospective longitudinal study of a cohort of patients with gallstones.**

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease in the western world, and its incidence is increasing rapidly, with an estimated prevalence of 25% in the general population. NAFLD includes 2 different histological entities with different prognosis: simple steatosis (SS) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Steatosis and fibrosis scores are useful tools in NAFLD diagnosis, but liver biopsy is currently the gold standard test for NAFLD diagnosis and staging, thus permitting to distinguish individuals with SS from those with NASH. NAFLD patient's survival is conditioned by associated comorbidities, not only for liver disease progression but for its contribution in appearance of cardiovascular disease and malignancy, causing a higher morbidity and mortality. Clinical studies suggest that patients with gallstones have a higher risk for NAFLD, nevertheless, the pathogenic link between gallstones and NAFLD is uncertain, as well as risk factors are not well defined.

The specific aims of the present study for Doctoral Thesis were to determine the prevalence of different histological stages of NAFLD in patients with gallstones, to assess diagnostic accuracy of different scores for noninvasive diagnosis of NAFLD and to know the natural history of NAFLD in patients with gallstones, with special emphasis on morbidity and mortality. To this end, we studied 242 patients with gallstones to whom a liver biopsy during programmed laparoscopic cholecystectomy was carried out. Furthermore, all included patients were clinically evaluated after a follow-up of  $88 \pm 24$

months. At baseline, mean age of patients was 48.8 years, most of them were women (75.6%) and caucasian was the predominant race (67.4%). To highlight, 32.6% of individuals were obese, 7.4 % had known type 2 diabetes mellitus (T2DM), 22.7 % were known hypertensive, 62.4 % had dyslipidemia and 26.4% met the criteria for metabolic syndrome. In the cohort of patients with gallstones studied, 49.6% had histologic diagnosis of NAFLD, including SS (39.7%) and NASH (9.9%), whereas 50.4% had histologically normal liver. Two risk factors associated with NAFLD were identified, waist perimeter and ferritin, which in combination generated a new score for noninvasive diagnosis of NAFLD in patients with gallstones, called CINFER, with an AUROC of 0.82 (IC 95%: 0.74-0.95) with a sensitivity of 90% and a specificity of 66%. Interestingly, the diagnostic accuracy of algorithms fatty liver index (FLI) and hepatic steatosis index (HSI) were lower than observed for CINFER with AUROC values of 0.74 and 0.70, respectively. Moreover, accuracy of fibrosis scores was analysed obtaining a negative predictive value (NPV) for advanced fibrosis ( $\geq$  F3) of 95% for FIB-4, 94% for NAFLD fibrosis score (NFS) and 96% for Hepamet fibrosis score (HFS) with an AUROC below to 0.5 in all three scores. In addition, three risk factors associated with NASH were identified, body mass index, ALT and insulin, which in combination generated a new score for noninvasive diagnosis of NASH in patients with gallstones, called INTRIN, with an AUROC of 0.76 (IC 95%: 0.65-0.87) with a sensitivity of 67% and a specificity of 78%. After a follow-up of  $88\pm 24$  months, in 74 out of 205 patients included (39.1%) distinct metabolic comorbidities were developed (T2D, arterial hypertension or dyslipidemia), 45 of them (60.8%) with NAFLD diagnosis at baseline, and 9 patients developed cardiovascular disease (ischemic

cardiomyopathy or acute cerebrovascular stroke) of whom 7 (77.8%) had NAFLD initially. Noteworthy, during the follow-up, neoplasms were diagnosed in 18 patients of the study population, being these neoplasms of either digestive or liver origins in 4 patients of whom 3 (75%) had NAFLD at baseline. Finally, 5 deaths occurred during the follow-up, 4 of them (80%) in NAFLD patients. In conclusion, the prevalence of NAFLD in the cohort of patients with gallstones studied was 49.6%, greater than 25% estimated in the general population, whereas the prevalence of NASH was 9.9%, similar to that reported in the general population (12.2%). A new score for noninvasive diagnosis of NAFLD was generated, named CINFER, with a good diagnostic accuracy (AUROC 0.82) and better accuracy than both FLI and HSI (0.74 and 0.70, respectively). Moreover, FIB-4 score, NFS and HFS showed a NPV for advanced hepatic fibrosis ( $\geq$  F3) higher than 90% in all three scores. A new score for noninvasive diagnosis of NASH was developed, termed INTRIN, with an acceptable diagnostic accuracy (AUROC 0.76). Prevalence of metabolic comorbidities, cardiovascular diseases, renal disease and malignancies, as well as mortality, was greater in the study cohort of patients with gallstones who had NAFLD than in those with histologically normal liver.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos implicados en la lipotoxicidad hepática. ....	26
Figura 2. Histología de la EHGNA.....	27
Figura 3. Historia natural de la EHGNA. ....	32
Figura 4. Tratamiento de la EHGNA.....	43
Figura 5. Diagrama de flujo de los pacientes con colelitiasis estudiados.....	61
Figura 6. Prevalencia de las diferentes formas histológicas identificadas en la población de estudio. ....	65
Figura 7. Precisión del algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA	70
Figura 8. Precisión del algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA....	72
Figura 9. Precisión de otros algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA.....	73
Figura 10. Curvas ROC de los algoritmos de fibrosis hepática en la población de estudio. ....	76

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las lesiones histológicas en la EHGNA. ....	38
Tabla 2. Algoritmos de diagnóstico de esteatosis.....	40
Tabla 3. Algoritmos para el diagnóstico de fibrosis .....	42
Tabla 4. Características de la población de estudio . ....	62
Tabla 5. Características histológicas de la población de estudio . ....	63
Tabla 6. Características de la población de estudio según diagnóstico histológico .....	64
Tabla 7. Características de los pacientes con colelitiasis y EHGNA según diagnóstico histológico.....	66
Tabla 8. Factores de riesgo asociados a la EHGNA en la población de estudio .....	68
Tabla 9. Factores de riesgo asociados a la EHNA en la cohorte de pacientes con EHGNA .....	69
Tabla 10. Precisión del algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA	71
Tabla 11. Precisión del algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA...	72
Tabla 12. Eficacia de distintos algoritmos para el diagnóstico no invasivo EHGNA .....	74
Tabla 13. Eficacia de distintos de algoritmos para el diagnóstico no invasivo de fibrosis hepática .....	75
Tabla 14. Características de la cohorte analizada en el estudio longitudinal.....	77
Tabla 15. Evolución de las características de los pacientes con ESNA.....	78
Tabla 16. Evolución de las características en los pacientes con EHNA .....	79
Tabla 17. Incidencia de comorbilidades metabólicas durante el seguimiento.....	81
Tabla 18. Incidencia de comorbilidades cardiovasculares durante el seguimiento .....	81

Tabla 19. Incidencia de comorbilidades neoplásicas durante el seguimiento ..... 82

Tabla 20. Incidencia de otras comorbilidades durante el seguimiento ..... 83

## ABREVIATURAS

ACVA: Accidente cerebrovascular agudo.

AOC: ácido obeticólico.

AGL: ácidos grasos libres.

APRI: Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index.

CAP: Parámetro de Atenuación Controlada.

CHC: Carcinoma hepatocelular.

CI: Cardiopatía isquémica.

DE: Desviación estándar.

DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

E: Especificidad.

ECV: Enfermedad cardiovascular.

EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

EHmet: Esteatosis Hepática Metabólica.

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica.

ELF: Enhanced Liver Fibrosi.

ERC: Enfermedad renal crónica.

ESNA: Esteatosis simple no alcohólica.

ET: Elastografía de transición.

FA: Fosfatasa alcalina.

FGDP: fracción de grasa por densidad protónica.

FLI: Fatty liver index.

FLIP: Fatty liver inhibition of progression.

GGT: Gamma-glutamyl transpeptidasa.

GOT: Transaminasa glutámico-oxalacética.

GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica.

HDL: High density lipoprotein.

HFS: Hepamet Fibrosis Score.

HN: Hígado normal.

HSI: Hepatic steatosis index.

HTA: Hipertensión arterial.

IMC: Índice de masa corporal.

IC: Intervalo de confianza.

IST: Índice de saturación de la transferrina.

LDL: Low density lipoprotein.

NAS: NAFLD activity score.

NFS: NAFLD Fibrosis score.

OR: Odds ratio.

PCA: Perímetro de cadera.

PCI: Perímetro de cintura.

RI: Resistencia a la insulina.

RM: Resonancia magnética.

S: Sensibilidad

SAF: Steatosis Activity and Fibrosis score.

SAOS: Síndrome de apnea obstructiva del sueño.

SMet: Síndrome metabólico.

TG: Triglicéridos.

VLDL: Very low density lipoprotein.

VPN: Valor predictivo negativo.

VPP: Valor predictivo positivo.

## **INTRODUCCIÓN**

## **Enfermedad hepática grasa no alcohólica**

### **1.1. Definición**

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es actualmente la enfermedad hepática crónica más frecuente en los países occidentales. Debido al cambio en el estilo de vida con un aumento del aporte calórico de la dieta y una disminución de los hábitos de ejercicio, ha habido un alarmante incremento de los casos en todo el mundo, en paralelo con el de otras enfermedades metabólicas con las que se asocia frecuentemente, como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (1–3). Los avances y los cambios conceptuales en relación con la EHGNA son constantes, hasta el punto de que, recientemente, tras un consenso alcanzado en la comunidad hepatológica nacional, el término Esteatosis Hepática Metabólica, con su acrónimo EHmet, se ha considerado el más apropiado para la nueva denominación de la anteriormente conocida como EHGNA (4). Este cambio, por otro lado, no sólo ha significado un cambio en la terminología, sino que también engloba un cambio en los criterios diagnósticos. Las dos diferencias más importantes y significativas entre EHmet y EHGNA son que para el diagnóstico de EHmet no se excluyen los pacientes con ingesta enólica o con otras hepatopatías crónicas y que la presencia de alteraciones metabólicas es imprescindible para el diagnóstico de EHmet (5). Dado que cuando se empezó este trabajo aún no existía un consenso en la comunidad científica nacional e internacional acerca de la nueva denominación de esta enfermedad hepática, en esta Tesis Doctoral se continuará haciendo mención a la denominación previa de EHGNA.

La EHGNA se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa en el hígado, lo que desde un punto de vista histopatológico se define como la presencia de esteatosis en al menos un 5% de los hepatocitos o como la presencia de una fracción grasa de densidad protónica del hígado de al menos un 5,6% evaluada mediante espectroscopia de resonancia magnética (RM) protónica o mediante RM selectiva de grasa/agua cuantitativa.

La biopsia hepática sigue siendo el procedimiento de referencia para el diagnóstico de la EHGNA, que además exige descartar la presencia de causas no metabólicas de esteatosis hepática, siendo la más relevante el consumo diario de alcohol de más de 30 g en los varones y de más de 20 g en las mujeres (6) . La relación entre el alcohol y la lesión hepática depende de varios cofactores (tipo de bebida alcohólica, patrones de consumo, duración de la exposición, susceptibilidad individual o genética), lo cual hace que los umbrales cuantitativos simples sean, al menos en parte, arbitrarios. Otras potenciales causas de esteatosis hepática bien conocidas son la toma de fármacos esteatogénicos (amiodarona, valproato, metotrexate, y tamoxifeno entre los más frecuentes), la concurrencia de hepatopatías como la hepatitis crónica por virus C, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, la hepatitis autoinmune y otras patologías como la enfermedad celiaca, la lipodistrofia, la desnutrición severa, la alimentación parenteral y ciertas enfermedades metabólicas congénitas como la deficiencia de lipasa ácida lisosomal y la abetalipoproteinemia.

La EHGNA incluye dos formas histopatológicamente bien diferenciadas y que tienen pronósticos distintos: la esteatosis simple no alcohólica (ESNA), también denominada hepatoesteatosis o hígado graso no alcohólico, y la esteatohepatitis no

alcohólica (EHNA). Ésta última se caracteriza por su potencial fibrogénico y de progresión a formas más avanzadas de enfermedad hepática como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular.

## **1.2. Epidemiología**

Se calcula que la EHGNA puede afectar en la actualidad a unos 1.000 millones de personas en el mundo, estimándose que la prevalencia media global de esta enfermedad hepática sea del 25% de la población general (7). No obstante, los datos disponibles sobre la prevalencia de la EHGNA pueden variar sustancialmente en función de las características demográficas y antropométricas de la población estudiada, como la edad, el sexo, la raza, y sobre todo de las comorbilidades asociadas como la obesidad y la DM2, pero también de las diferencias geográficas y de los métodos utilizados para el diagnóstico de la EHGNA. De hecho, la prevalencia de esta enfermedad en pacientes obesos y diabéticos supera el 50% (1). La mayoría de las estimaciones sobre la prevalencia de la EHGNA proceden de estudios que han empleado técnicas diagnósticas no invasivas, especialmente ecografía o RM (6–9). La prevalencia de la EHGNA en estudios que han utilizado únicamente la ecografía como método de diagnóstico varía entre el 17 y el 46% (12). En España, la prevalencia estimada de EHGNA en estudios poblacionales es del 25,8%, mientras que se estima una prevalencia de fibrosis hepática significativa, evaluada mediante la combinación secuencial de elastografía de transición y biopsia hepática, del 2,8% en la población general (13). Los resultados de un meta-análisis reciente que incluye un total de 86 estudios de 22 países con más de 8 millones de individuos estudiados

muestran una prevalencia global de la EHGNA del 25% (11,14). Oriente medio y Sudamérica tienen las cifras más altas de prevalencia de la EHGNA y África las más bajas.

Existen pocos estudios que hayan investigado la incidencia de la EHGNA en la población general, registrando unas tasas de incidencia que varían entre 19,9 y 52,3 casos por 1000 personas/año en países asiáticos (15,16) y de 28 casos por 1000 personas/año en países occidentales (14). Es llamativa la tendencia creciente en las estimaciones de prevalencia e incidencia de la EHGNA, tanto en adultos como en niños y adolescentes, por lo que actualmente se considera a la EHGNA un problema global de salud que puede ocasionar una carga socioeconómica de gran magnitud a todos los países del mundo.

### **1.3. Fisiopatología**

Existen diversas hipótesis que intentan explicar de manera convincente los complejos mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la EHGNA. La más clásica se conoce como la hipótesis del "doble impacto" (17), descrita por James y Day en 1989, en la que el "primer impacto" sería la resistencia a la insulina (RI) en el tejido adiposo que produciría un acumulo excesivo de grasa en el hepatocito, lo cual predispondría a las células hepáticas a un "segundo impacto" que activaría las vías intracelulares pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas en el hepatocito. Esta teoría del doble impacto ha ido evolucionando a la que actualmente se conoce como la hipótesis de "los impactos múltiples" en la que se considera que diversas alteraciones metabólicas y moleculares ocurren de manera simultánea y sinérgica contribuyendo a la patogenia de la EHGNA (18). Se han descrito factores genéticos y epigenéticos, así como factores relacionados con la

diversidad bacteriana de la microbiota intestinal, que podrían jugar un papel patogénico en la EHGNA (18), pero actualmente se considera que la RI y la lipotoxicidad son los dos mecanismos más relevantes en la patogenia de la EHGNA.

### 1.3.1. Resistencia a la insulina

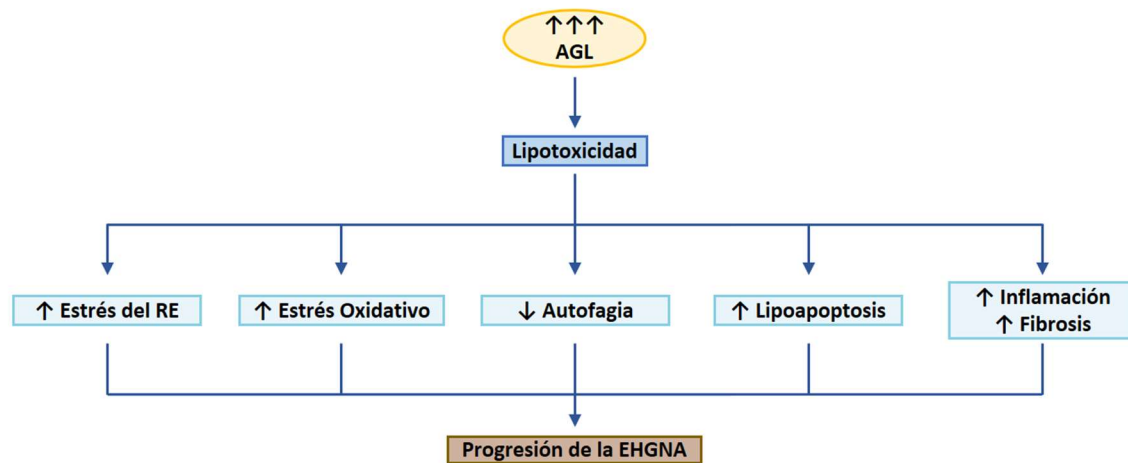
La RI tiene un papel fundamental en la patogenia de la EHGNA (19). Se define como la condición en la cual existe una disminución de la sensibilidad de las células de determinados tejidos (hígado, tejido adiposo y músculo como los principales) a la acción fisiológica de la insulina, lo que estimula al páncreas para secretar y sintetizar más insulina, provocando el aumento de los niveles circulantes de la misma (20).

### 1.3.2. Lipotoxicidad

Es un hecho bien conocido que los ácidos grasos libres (AGL) pueden ser citotóxicos si su concentración intracelular aumenta excesivamente, motivo por el cual los hepatocitos los procesan esterificándolos en lípidos más complejos, oxidándolos en las mitocondrias y en los peroxisomas ( $\beta$ -oxidación), así como en el retículo endoplásmico (RE) ( $\omega$ -oxidación) (21). La toxicidad mediada por los AGL se denomina lipotoxicidad y puede ocurrir en los hepatocitos cuando su capacidad para metabolizar los AGL, almacenarlos como triglicéridos (TG) y exportarlos a la circulación en las lipoproteínas VLDL, se ve sobrepasada por la llegada masiva de AGL procedentes del tejido adiposo periférico y por el aumento de la lipogénesis de novo, ambas consecuencias de la RI. Más allá de la hepatotoxicidad intrínseca de los AGL que se ha demostrado en estudios *in vitro* que han comprobado que los AGL monoinsaturados, como el oleico, son menos tóxicos para los hepatocitos que los saturados, como el palmítico y el esteárico (22–24), también hay

estudios clínicos que han observado una correlación positiva entre las concentraciones circulantes de AGL y la progresión histológica de la EHGNA (25,26).

Los mecanismos moleculares implicados en la lipotoxicidad hepática son múltiples y complejos y pueden afectar a diferentes rutas metabólicas del hepatocito (27), algunas de las más relevantes se muestran en la **Figura 1**.



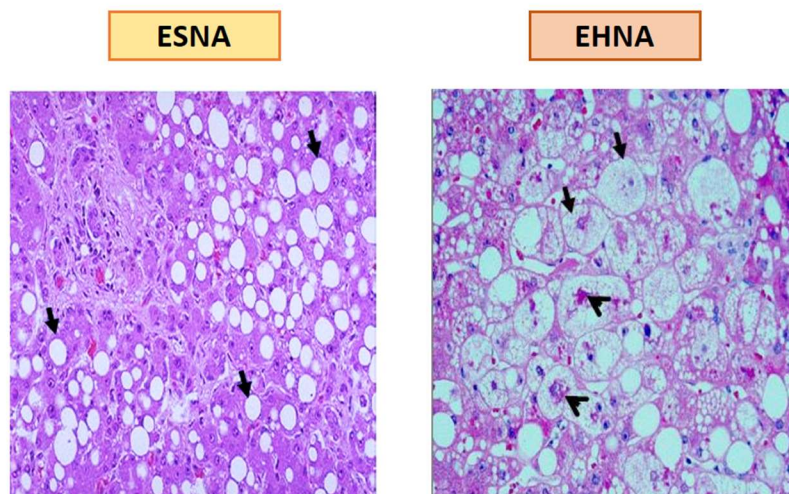
**Figura 1. Mecanismos implicados en la lipotoxicidad hepática.**

#### 1.4. Histología

La EHGNA es una enfermedad compleja desde el punto de vista histopatológico ya que engloba un amplio espectro de alteraciones histológicas que van desde la lesión hepática más benigna, la ESNA, que es típicamente macrovesicular, y la EHNA, que se caracteriza por presentar además de esteatosis, inflamación y degeneración hepatocitaria o balonización hepatocelular. Esta última es la lesión que define la EHNA y le confiere un potencial fibrogénico que hace que pueda progresar hasta desarrollar una cirrosis (28). Este concepto de espectro histopatológico simplifica en cierta medida la complejidad de la

enfermedad ya que induce a pensar que hay una evolución continua y lineal desde la ESNA hasta la EHNA y la cirrosis. Sin embargo, la historia natural de la EHGNA es variable y no del todo conocida, por lo que no está claro que todos los pacientes con ESNA evolucionen hasta desarrollar una EHNA con menor o mayor fibrosis.

En la **Figura 2** se muestran las características histopatológicas que definen y diferencian la ESNA de la EHNA.



**Figura 2. Histología de la EHGNA.**

Características histopatológicas diferenciales de la esteatosis simple y de la esteatohepatitis. En la esteatosis simple (panel de la izquierda), el acúmulo de grasa es predominantemente macrovesicular (flechas), y no hay infiltrados inflamatorios ni signos de daño hepatocelular. En la esteatohepatitis (panel de la derecha), se evidencian signos de daño hepático, generalmente en forma de hepatocitos balonizados (flechas), y focos inflamatorios. En ocasiones, se puede observar hialina de Mallory (cabezas de flecha).

#### 1.4.1. Lesiones parenquimatosas:

La ESNA es predominantemente macrovesicular, y aunque tiende a afectar inicialmente a la región perivenular, en casos más avanzados puede llegar a tener una distribución panacinar. Los criterios mínimos para el diagnóstico histológico de EHNA incluyen la presencia de esteatosis, daño hepatocelular (en forma de degeneración

balonizante) e infiltración inflamatoria lobulillar. La presencia de fibrosis leve es frecuente en la EHNA, pero no es un requisito necesario para el diagnóstico histológico (29,30). La balonización de los hepatocitos (en inglés, *ballooning*) es el hallazgo más característico de la EHNA, que típicamente va asociado a la presencia de hialina de Mallory y con menos frecuencia a la presencia de megamitocondrias. El infiltrado inflamatorio lobulillar, que es la lesión que genera un menor acuerdo entre anatomopatólogos (31), suele ser moderado y comprende distintas estirpes celulares como neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y ocasionalmente células Natural Killer.

La fibrosis que se observa en la EHGNA es típicamente de distribución perisinusoidal y/o pericelular, y en un 25% de los casos progresa a cirrosis, inicialmente con patrón micronodular que con el tiempo evoluciona a patrón macronodular.

Los rasgos histológicos característicos de la EHNA van desapareciendo una vez que la cirrosis se ha instaurado y pueden llegar a desaparecer por completo, lo que se conoce como “EHNA quemada” (en inglés, *burning NASH*). Esta es la razón por la que múltiples casos de cirrosis secundaria a EHNA fueron inicialmente clasificados como “cirrosis criptogénica”(32).

#### 1.4.2. Lesiones portales/periportales:

Un grado leve de inflamación portal junto con fibrosis portal y periportal son hallazgos comunes en esta enfermedad y pueden producir cambios que se asemejen a los visualizados en las hepatitis crónicas. Estos hallazgos usualmente ocurren de manera aislada, dando lugar al término “fibrosis portal aislada” que se ha empleado para describir aquellos casos de EHGNA que desarrollan fibrosis con expansión portal sin las

características típicas de EHNA. En los adultos, este patrón se observa particularmente entre los pacientes con obesidad mórbida, lo que se da en un 18-33% de los casos (33).

Puede observarse una reacción ductular que recuerda a las lesiones visualizadas en distintas patologías biliares, aunque suelen ser en un grado leve y se hacen más intensas en estadios avanzados de la EHGNA. Sin embargo, los cambios biliares no son característicos de la EHGNA, por lo que su detección obliga a descartar la presencia de una colangiopatía como la colangitis biliar primaria o colangitis esclerosante. No obstante, hay que tener en cuenta que la EHGNA puede coexistir junto con otras hepatopatías crónicas. En un estudio que incluía más de 3000 biopsias hepáticas por sospecha de hepatocarcinoma (34), se describió una probabilidad de coexistencia de EHGNA con hepatitis autoinmune, hemocromatosis, déficit de alfa-1 antitripsina o hepatitis crónica B del 2,6%.

#### 1.4.3. Histología en niños

En los niños, la EHGNA presenta muchas de las manifestaciones observadas en los adultos a pesar de que la distribución de las lesiones pueda ser diferente. La degeneración hepatocelular y la hialina de Mallory se observan tan solo de forma esporádica en la EHNA pediátrica, sin embargo hay un predominio de la inflamación portal (29). Basándose en el patrón histológico distintivo, se ha validado una puntuación histológica específica (puntuación histológica de la EHGNA pediátrica) para una mejor clasificación de los niños con o sin EHNA (35).

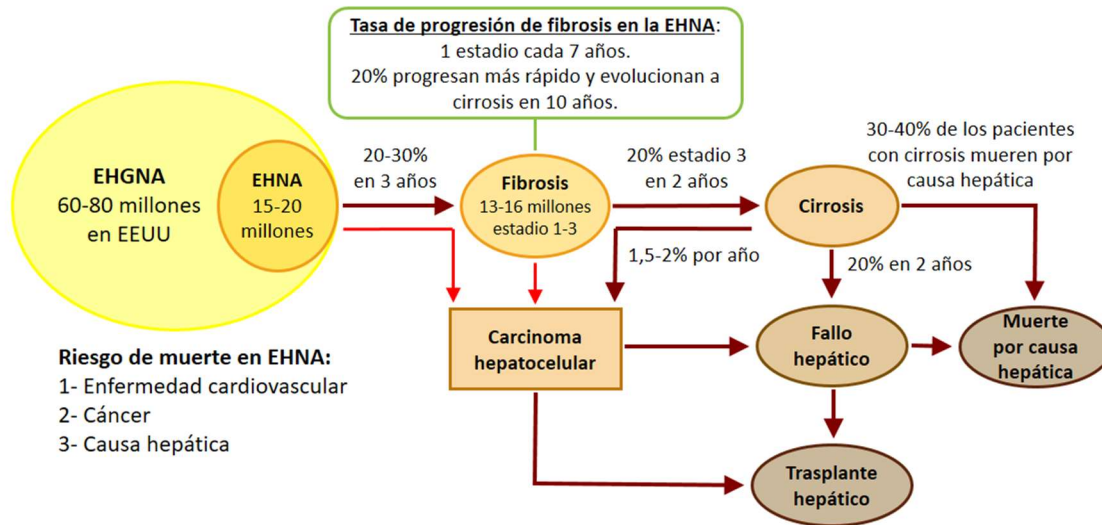
### **1.5. Historia natural**

Se han identificado distintos factores, dependientes del huésped o del entorno, que influyen en la historia natural de la EHGNA, ya sea directa o indirectamente. La edad es un importante factor de riesgo tanto para la EHGNA como para la EHNA con fibrosis avanzada, aunque no está claro si esta asociación epidemiológica se debe simplemente a un efecto acumulativo de los factores de riesgo metabólico con el paso del tiempo (36). El hecho de que en los últimos años se haya evidenciado un incremento de esta patología en edad pediátrica hace que surjan nuevas dudas por resolver. En cuanto al sexo, no hay datos concluyentes que demuestren una mayor prevalencia de la EHGNA en hombres o en mujeres, lo que ocurre igualmente con la raza del paciente.

Datos recientes de grandes estudios clínicos longitudinales con biopsias hepáticas pareadas sugieren que la transición de ESNA a EHNA sea bastante dinámica (37). Si bien siempre se ha considerado que la progresión a fibrosis era poco frecuente en pacientes con ESNA y más habitual en pacientes con EHNA, estos estudios sugieren que la ESNA pueda evolucionar a EHNA con fibrosis avanzada, lo que implica que no sea una condición del todo benigna. Tanto la progresión a fibrosis avanzada, considerada esta un estadio F3 o F4, como la progresión a cirrosis, están bien documentadas (37), sin embargo no se trata de una progresión homogénea y lineal. Por este motivo es importante reconocer cuáles son los factores que favorecen esta progresión para optimizar el seguimiento clínico de pacientes con EHGNA con el objeto de evitar el avance de la enfermedad hepática y la aparición de complicaciones. Parece que la presencia de inflamación en la biopsia inicial, así como la edad avanzada, son predictores independientes de progresión de la fibrosis hepática en

pacientes con EHNA (38). La velocidad de progresión de la fibrosis es significativamente más lenta en la ESNA, ya que son necesarios 14 años para incrementar 1 estadio de fibrosis, mientras que en la EHNA este tiempo se reduce a 7 años (37). No obstante, aproximadamente el 20% de pacientes con EHNA pueden tener una progresión rápida de tal manera que la progresión del estadio de fibrosis sea aún menor a 7 años. Los predictores para identificar a estos pacientes que progresan más rápido no han sido del todo definidos, pero incluyen niveles altos de transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) en suero, la presencia de DM2, una historia familiar de cirrosis en familiares de primer grado y, posiblemente, cierta susceptibilidad genética (39–41).

Se estima que sólo el 20% de los pacientes con EHGNA desarrollará una EHNA, de los cuales el 20% de ellos progresará a cirrosis en 3-4 décadas (37). Como es natural, la progresión a cirrosis incrementa la probabilidad de aparición de carcinoma hepatocelular (CHC). No obstante, existen datos contradictorios sobre si esta probabilidad está limitada a pacientes que presentan una cirrosis establecida (42) o si es posible que se presente en pacientes con EHNA en ausencia de cirrosis (43), ya que en los últimos años se ha observado que aproximadamente la mitad de los casos de CHC surgen en estadios precirróticos de la EHNA. El riesgo anual de desarrollar un CHC en caso de cirrosis secundaria a EHNA es del 1,5 al 2% (**Figura 3**). Por este motivo, en estos pacientes está recomendado el seguimiento y cribado rutinario de CHC con ecografía y determinación de las concentraciones séricas de alfa-fetoproteína cada 6 meses. Puesto que actualmente la tasa de incidencia de CHC en pacientes con EHGNA sin cirrosis es demasiado baja, no se recomienda dicho cribado a no ser que presenten una fibrosis avanzada o una cirrosis.



**Figura 3. Historia natural de la EHGNA.**

Modificada de Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease (Loomba y cols. Cell 2021.).

Los pacientes con EHGNA tienen una mayor mortalidad que la población sana, la cual está asociada con la edad y la presencia de cirrosis. El principal factor de riesgo de mortalidad es el estadio de fibrosis (44,45), por lo que los algoritmos no invasivos de fibrosis resultan ser útiles para predecir el riesgo de mortalidad durante el seguimiento clínico de estos pacientes (46). En pacientes con EHGNA, las enfermedades cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares, son la primera causa de mortalidad seguidas por las neoplasias extrahepáticas (47). No obstante, cuando la cirrosis ya se ha instaurado, las complicaciones derivadas de la enfermedad hepática se convierten en la principal causa de mortalidad.

La EHNA es una causa de trasplante hepático que está en aumento, principalmente en Europa y en Estados Unidos (48), habiéndose convertido en una de las principales causas de trasplante hepático en España (49).

## **1.6. Diagnóstico**

### 1.6.1. Cuadro clínico

La mayoría de los pacientes con EHGNA son asintomáticos, por lo que la enfermedad puede mantenerse silente hasta que progresa a una cirrosis (50). Los síntomas que refieren con mayor frecuencia los pacientes en estadios iniciales son el dolor en hemiabdomen superior y la fatiga.

En ausencia de un abuso crónico de alcohol, la presencia de trastornos metabólicos como la obesidad o la DM2 hace más probable el diagnóstico clínico de EHGNA, aunque es necesario descartar otras causas de enfermedades hepáticas crónicas utilizando pruebas analíticas, técnicas de imagen y en último término la biopsia hepática, pues el diagnóstico de EHGNA en la actualidad es de exclusión.

### 1.6.2. Pruebas analíticas

No existe ningún dato de laboratorio específico de la EHGNA. El dato más constante es una hipertransaminasemia leve-moderada, aunque su determinación de forma aislada tiene una correlación muy pobre con la intensidad y el riesgo de progresión de la enfermedad, ya que el 70% de los pacientes con transaminasas elevadas no tienen fibrosis significativa y el 30% de pacientes con fibrosis avanzada tienen transaminasas normales (51). Con menor frecuencia se pueden observar alteraciones de otras enzimas hepáticas como la gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT) y la fosfatasa alcalina (FA). Los pacientes con cirrosis pueden presentar elevación de las transaminasas y de la bilirrubina, así como un descenso de la albúmina, del tiempo de protrombina y de las plaquetas.

Es frecuente encontrar alteraciones bioquímicas que se relacionan con las comorbilidades que se asocian con la EHGNA, particularmente la obesidad y la DM2, con alteración de los lípidos séricos (hipertrigliceridemia y descenso de los valores de colesterol HDL), hiperglucemia e hiperinsulinemia. La ferritina sérica puede estar elevada en los pacientes con EHGNA, por lo que en estos casos se debe analizar la saturación de transferrina y, si está anormalmente aumentada, realizar el genotipado del gen de la hemocromatosis hereditaria (52).

Dado que la EHGNA puede coexistir con otras enfermedades hepáticas crónicas, es necesario descartarlas mediante determinaciones bioquímicas e inmunoserológicas que incluyan marcadores víricos, autoanticuerpos, cupremia, cupruria, ceruloplasminemia, alfa-1-antitripsina, hormonas tiroideas y anticuerpos antiendomisio o antitransglutaminasa. También debe descartarse de manera cuidadosa el consumo de fármacos potencialmente hepatotóxicos.

### 1.6.3. Técnicas de imagen

Como en cualquier paciente con sospecha de enfermedad hepática, es recomendable disponer de una técnica de imagen básica para descartar la presencia de lesiones hepáticas y evaluar signos indirectos de cirrosis e hipertensión portal, para lo que se suele emplear la ecografía. La presencia de un hígado brillante en la ecografía apoya el diagnóstico clínico de sospecha de la EHGNA, siendo capaz de diagnosticar con seguridad la esteatosis moderada o grave. Sin embargo, tiene una sensibilidad limitada y la ausencia de este hallazgo no descarta la presencia de una EHGNA. La RM, considerada el patrón de referencia para el diagnóstico por imagen de esteatosis, así como la tomografía axial

computerizada (TAC) abdominal, pueden ayudar a la identificación de esteatosis y/o cirrosis en pacientes seleccionados o que se someten a las pruebas por otra indicación, aunque debido a su coste son menos adecuadas para el manejo clínico de pacientes con EHGNA.

La RM avanzada es capaz de medir la cantidad de grasa hepática de manera objetiva y cuantitativa, para lo que utiliza distintas técnicas como la espectroscopia (53) o la técnica denominada fracción de grasa por densidad protónica (FGDP) (54). No obstante, tiene un coste elevado y la cuantificación del contenido de grasa carece de interés en la práctica clínica, siendo más útil actualmente en estudios experimentales.

Los métodos elastográficos evalúan la rigidez hepática mediante diferentes técnicas de imagen, lo que se ha correlacionado con la cantidad de fibrosis en el hígado. Existen varios métodos elastográficos que utilizan la elastografía por onda de cizallamiento (Fibroscan®, ARFI, pSWE, RM) con una capacidad diagnóstica similar para evaluar la rigidez del hígado. El método más utilizado en nuestro medio es la elastografía de transición (ET) que se realiza con el FibroScan®, un método que utiliza vibración de baja frecuencia y ultrasonidos. Además de ser una técnica no invasiva, la ET presenta otras ventajas como la facilidad de uso, el tiempo reducido de exploración y la inmediatez en la obtención de resultados, lo que la convierte en una herramienta útil en el entorno ambulatorio u hospitalario. No obstante, también tiene sus limitaciones, como el ser una técnica operador-dependiente, su uso limitado en pacientes obesos o en caso de ascitis. Ha demostrado su utilidad en pacientes con EHGNA para descartar fibrosis significativa y para confirmar cirrosis, aunque es menos fiable para definir estadios intermedios. Esta

capacidad diagnóstica ha sido ampliamente evaluada con la sonda M (55). Puntos de corte  $<8-8,5$  kPa pueden servir para descartar la presencia de fibrosis avanzada ( $\geq F3$ ), mientras que para confirmar su presencia se han propuesto puntos de corte elevados,  $>18-20$  kPa, con alta especificidad y valor predictivo positivo (56). Por tanto, cabe destacar que la utilización de la elastografía en la EHGNA no permite clasificar con suficiente fiabilidad a un elevado porcentaje de pacientes distribuidos en este amplio rango (8-18Kpa) en el que será difícil hacer estimaciones precisas del estadio de fibrosis. Inicialmente, la sonda original M mostró una aplicabilidad aproximada del 80%, presentando exploraciones fallidas sobre todo en pacientes obesos. Sin embargo, la experiencia del explorador y la utilización de la sonda XL en pacientes obesos ha permitido aumentar su aplicabilidad al 95-98% de los pacientes, limitando mucho el número de exploraciones no válidas (57). La ET actualmente incluye una tecnología mejorada: la elastografía de transición a vibración controlada y el parámetro de atenuación controlada o CAP (del inglés, *Controlled Attenuation Parameter*), que mide la atenuación de las ondas de ultrasonidos a medida que se propagan en el hígado ofreciendo información sobre el nivel de esteatosis hepática simultáneamente a la fibrosis, pero tiene una capacidad limitada de discriminación de los grados histológicos.

#### 1.6.4. Biopsia hepática

El diagnóstico de confirmación de la EHGNA es en última instancia histológico, por lo que la biopsia hepática es esencial y sigue siendo el método diagnóstico de referencia. Además, es la única técnica que permite diferenciar de manera fiable la ESNA de la EHNA, a pesar de las limitaciones que comporta la variabilidad en la muestra obtenida

de tejido hepático. Para que la biopsia se considere válida, de tal manera que permita una correcta interpretación, la aguja debe penetrar lo suficiente en el parénquima hepático para evitar que la muestra sea puramente subcapsular. Generalmente, la longitud de la biopsia se considera adecuada a partir de 1,5 cm de largo, lo que permite la inclusión de al menos 10 espacios porta. El grosor es también importante, ya que biopsias demasiado finas pueden no mostrar acinos completos o pueden cortar transversalmente los tractos portales, impidiendo una correcta valoración de la integridad arquitectural por parte de los anatomopatólogos (58).

#### 1.6.4.1. Evaluación histopatológica: gradación y estadiaje

Para realizar una completa y correcta caracterización de la EHGNA se debe evaluar el “grado de actividad histológica” y el “estadio de fibrosis”. Mientras que el primero es una medida global semicuantitativa del grado de esteatosis, de la inflamación y del daño hepatocelular, el segundo evalúa la localización (no la cantidad) de la fibrosis y de los cambios arquitecturales secundarios a la regeneración tisular (59). El “grado de actividad histológica” se obtiene combinando la puntuación de esteatosis, inflamación lobulillar y balonización hepatocitaria según la clasificación de Brunt y cols. (60) y modificada posteriormente por Kleiner y cols. (61), como se detalla en la **Tabla 1**. La esteatosis se puntúa como 0 cuando es menor del 5% del tejido hepático; 1 si es  $\geq 5-33\%$ ; 2 si es  $>33-65\%$  y 3 si es  $>65\%$ . El grado de inflamación lobulillar se puntúa como 0 si no hay focos inflamatorios; 1 si hay más de 2 focos; 2 si hay de 2 a 4 focos, y 3 si hay más de 4 focos. La balonización hepatocitaria se estimará como 0 (no balonización), 1 (escasas células balonizadas) o 2 (muchas células con balonización prominente). El “estadio de fibrosis” se

puntuación con un F0 si no hay fibrosis; F1 si hay fibrosis perisinusoidal o portal/peripoportal; F2 si hay fibrosis perisinusoidal y portal/peripoportal; F3 si hay puentes de fibrosis, y F4 si hay cirrosis.

**Tabla 1. Clasificación de las lesiones histológicas en la EHGNA.**

<b>Puntuación del grado de actividad histológica NAFLD Score (NAS)</b>	
Esteatosis (0-3)	0: <5% de tejido hepático con esteatosis con un objetivo 10x 1: 5-33% de esteatosis 2: 33-65% de esteatosis 3: >65% de esteatosis.
Inflamación (0-3)	0: sin focos inflamatorios en el tejido hepático con un objetivo 20x 1: <2 de focos 2: de 2 a 4 focos 3: > 4 focos
Balonización (0-2)	0: ausencia de balonización en el tejido hepático con un objetivo 20x. 1: algunos hepatocitos balonizados 2: muchos hepatocitos balonizados
<b>Puntuación del estadio de fibrosis</b>	
F0:	Ausencia de fibrosis
F1:	Fibrosis lobulillar perisinusoidal o fibrosis portal/peripoportal
F2:	Fibrosis perisinusoidal y fibrosis portal/peripoportal
F3:	Fibrosis en puentes
F4:	Cirrosis

El diagnóstico histológico de esteatosis se establece cuando se objetiva la presencia de gotas de grasa, predominantemente macrovesiculares, en más del 5% de los hepatocitos, y para hacer el diagnóstico de EHGNA, además de la presencia de esteatosis, se requiere también la presencia de daño hepatocitario (balonización) y de inflamación lobulillar (típicamente en la zona 3 del acino).

#### 1.6.4.2. Sistemas para la clasificación histopatológica

Dada la complejidad de las lesiones histológicas de la EHGNA, con el fin de minimizar la variabilidad interobservador y conseguir una clasificación histopatológica homogénea entre los diferentes pacientes, es recomendable el empleo de un protocolo de diagnóstico internacionalmente aceptado, como es el NAS (del inglés, *NAFLD Activity Score*) (**Tabla 1**) o el SAF (del inglés, *Steatosis Activity and Fibrosis score*). El NAS es un protocolo de puntuación con un rango que va de 0 a 8 que se obtiene de la suma de los grados de esteatosis, de inflamación y de balonización hepatocitaria (61,62) y su uso está validado para el empleo en ensayos clínicos. No debe utilizarse para el diagnóstico de la EHNA sino para la evaluación de la gravedad de la enfermedad, una vez establecido el diagnóstico mediante la evaluación histológica global. El SAF es otro protocolo de puntuación histopatológica que tiene una buena reproducibilidad y proporciona una descripción más exacta y completa. Evalúa el grado de esteatosis, el grado de actividad, concebida como la inflamación y la balonización hepatocitaria, y el estadio de fibrosis (63), lo que da lugar a un algoritmo conocido como FLIP (del inglés, *Fatty Liver Inhibition of Progresión*) (64,65).

#### 1.6.5. Algoritmos de diagnóstico no invasivos

El uso integrado de pruebas de laboratorio en forma de índices o algoritmos de puntuación (en inglés, *scores*) con otros datos demográficos, antropométricos, clínicos y analíticos ha demostrado ser útil en el diagnóstico de EHGNA. Estos algoritmos tienen una capacidad limitada para el diagnóstico de esteatosis y/o inflamación (66), pero sí que son útiles para estimar la presencia o ausencia de fibrosis hepática significativa (67).

Entre los algoritmos más utilizados para estimar el grado de esteatosis el mejor estudiado es el FLI (del inglés, *Fatty Liver Index*) (68), un algoritmo que está constituido por el perímetro abdominal, el índice de masa corporal (IMC), la concentración sérica de TG y la de GGT. Los pacientes con un FLI  $\geq 60$  tienen con mucha probabilidad una EHGNA mientras que un FLI  $<30$  excluye este diagnóstico. Otro índice menos utilizado es el HSI (del inglés, *Hepatic Steatosis Index*) que incluye el IMC y las concentraciones séricas de transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) y de GPT en función del sexo del paciente y de la presencia o ausencia de DM2 (69). En este caso, un HSI  $<30$  nos indica una baja probabilidad de esteatosis mientras que un HSI  $\geq 36$  nos indica una alta probabilidad. Otros algoritmos menos extendidos, validados para el diagnóstico no invasivo de esteatosis, se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Algoritmos de diagnóstico de esteatosis**

Algoritmo	Variabes
FLI (68)	PCI, IMC, TG, $\gamma$ -GT
HSI (69)	IMC, GOT, GPT, DM2
ZJU index (70)	IMC, glucosa, TG, cociente GOT/GPT
Dallas steatosis index (71)	GPT, IMC, edad, sexo, TG, glucosa, DM, HTA y raza
Framingham steatosis index (72)	Edad, sexo, IMC, TG, HTA, DM2, cociente GOT/GPT
NAFLD liver fat score (73)	SMet, DM2, GOT, GPT
NAFLD ridge score (74)	GPT, colesterol HDL, HbA1c, TG, leucocitos, HTA.
Steatotest (75)	GGT, GPT, glucosa, TG, colesterol total, IMC, bilirrubina, apoA1, haptoglobina, $\alpha$ 2macroglobulina

DM2, diabetes mellitus tipo 2; FLI, Fatty liver index; HDL, high density lipoprotein; HSI, Hepatic steatosis index; HTA, hipertensión arterial; IMC, índice de masa corporal;  $\gamma$ -GT, gamma glutamiltranspeptidasa; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; HbA1c, hemoglobina glicosilada; NAFLD, non alcoholic faty liver disease; PCI, perímetro de cintura; SMet, síndrome metabólico; TG, triglicéridos.

Existen diferentes algoritmos sencillos y fácilmente accesibles para estimar la presencia o ausencia de fibrosis significativa. El FIB-4 es un algoritmo que incluye las concentraciones séricas de GOT, de GPT y de plaquetas en función de la edad del paciente (76). Un FIB-4  $<1,30$  indica una alta probabilidad de ausencia de fibrosis significativa (F0-F1) mientras que un valor de FIB-4  $>2,67$  indica una alta probabilidad de fibrosis avanzada ( $\geq$  F3). Otro algoritmo ampliamente extendido para la predicción de fibrosis, independientemente de la etiología de la hepatopatía, es el índice APRI (del inglés, *Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index*) que incluye el recuento de plaquetas y la concentración sérica de GOT (77). En cuanto al diagnóstico de fibrosis en pacientes con EHGNA, el algoritmo más utilizado es el NFS (del inglés, *Non alcoholic fatty liver disease Fibrosis Score*), que incluye el IMC, las concentraciones séricas de GOT, de GPT, y de albúmina y el recuento de plaquetas en función de la edad del paciente y de la presencia o ausencia de DM2 (78). En este caso, un NFS  $<-1,455$  predice la ausencia de fibrosis avanzada (F0-F2) mientras que un NFS  $>0,675$  predice la presencia de fibrosis avanzada ( $\geq$  F3). Tanto FIB-4 como NFS son muy útiles para descartar la presencia de fibrosis avanzada, es decir, tienen un elevado valor predictivo negativo, especialmente en poblaciones de baja prevalencia, como la población general o en los pacientes de atención primaria. Por tanto, son una buena herramienta para el cribado de la EHGNA en poblaciones con bajo riesgo de fibrosis avanzada como paso previo a la elastografía de transición y disminuir así la cantidad de exploraciones innecesarias.

Recientemente, el grupo español para el estudio de la enfermedad hepática grasa metabólica (HEPAmet) ha diseñado un nuevo algoritmo no invasivo, denominado

Hepamet Fibrosis Score (HFS), capaz de identificar a los pacientes con EHGNA y fibrosis hepática avanzada con un alto grado de especificidad, que en su validación ha demostrado tener una mayor precisión que los algoritmos FIB-4 y NFS (79). El HFS es muy fácil de calcular mediante una calculadora disponible en internet e incluye el sexo, la edad y la presencia o ausencia de DM2, así como los valores séricos de glucosa, de insulina, de GOT, de albúmina y el recuento de plaquetas, así como el índice HOMA. Valores de HFS  $<0,12$  indican un riesgo bajo de fibrosis significativa ( $< F2$ ) mientras que un HFS  $>0,47$  indican un riesgo alto de fibrosis significativa ( $\geq F2$ ). Otros algoritmos validados para el diagnóstico de fibrosis se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Algoritmos para el diagnóstico de fibrosis**

Algoritmo	Variables
FIB-4 (80)	Edad, GOT, GPT, plaquetas
APRI	GOT, plaquetas
NFS (78)	IMC, edad, DM2, GOT, GPT, plaquetas, albúmina
HFS (81)	Sexo, edad, DM2, glucosa, insulina, índice HOMA, GOT, albúmina, plaquetas
ELF (82)	Ácido hialurónico, TIMP1, PIIINP
BARD	IMC, coeficiente GOT/GPT, DM2
Fibro-Test® (75)	$\gamma$ -GT, bilirrubina, haptoglobina, apoA1, $\alpha$ 2macroglobulina

APRI, (Aspartate aminotransferase to platelet ratio index); DM2, diabetes mellitus tipo 2; ELF, Enhanced Liver Fibrosis; HFS, Hepamet fibrosis score; IMC, índice de masa corporal;  $\gamma$ -GT, gamma glutamiltranspeptidasa; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; NFS, NAFLD fibrosis score; PIIINP3, péptido aminoterminal de procógeno 3; TG, triglicéridos; TIMP1, inhibidor tisular de metaloproteínasa 1.

### 1.7. Tratamiento

Tal como se muestra en la **Figura 4**, un correcto diagnóstico del estadio de fibrosis es esencial para establecer recomendaciones terapéuticas adecuadas y personalizadas a los

pacientes con EHGNA, con el objetivo prioritario de prevenir la progresión a fases más avanzadas de la enfermedad hepática, como la cirrosis y el CHC (83).

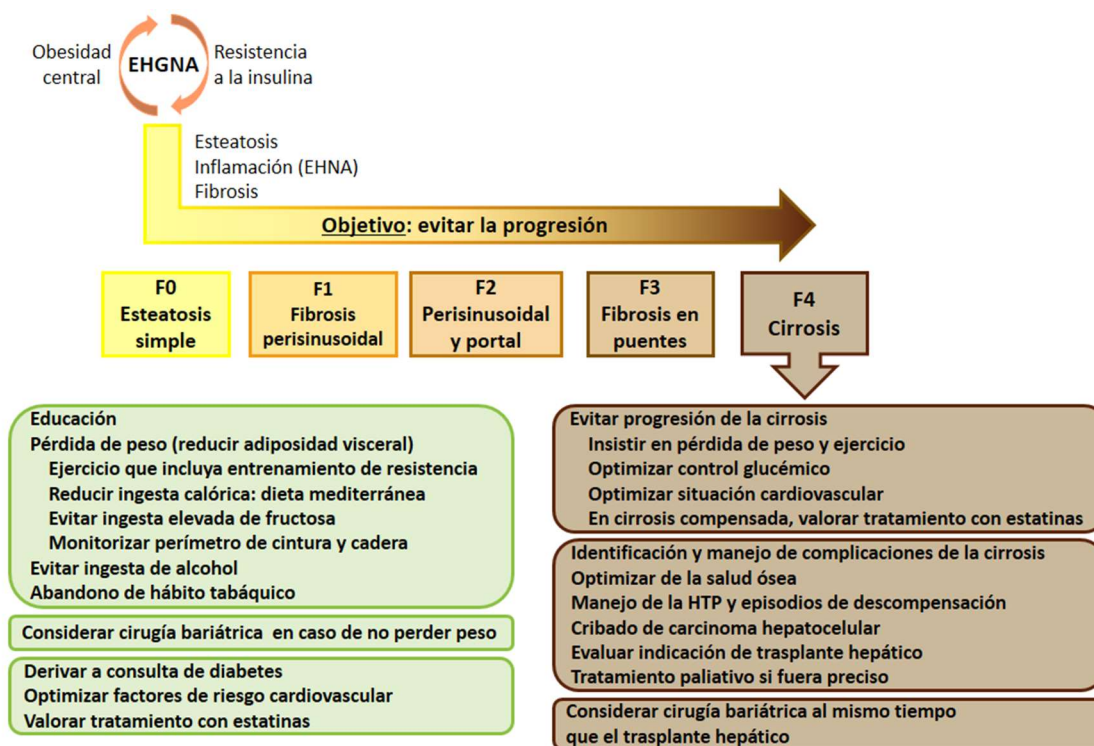


Figura 4. Tratamiento de la EHGNA.

En pacientes con EHGNA sin fibrosis significativa (< F2) la modificación del estilo de vida es crucial. Una pérdida de peso del 7-10% se asocia con una mejoría histológica, con disminución de la esteatosis, de la degeneración de los hepatocitos y de la inflamación lobulillar (84,85). Incluso pérdidas de peso más discretas, como del 5%, pueden disminuir la esteatosis (86), las enzimas hepáticas (87) y el riesgo de desarrollar DM2. La remisión de la EHGNA mediante el cambio de estilo de vida se ha demostrado en pacientes no obesos (88), aunque las causas de EHGNA en no obesos no son del todo conocidas. Las

guías clínicas recomiendan realizar un plan de ejercicio físico aeróbico y regular además de una dieta hipocalórica de estilo mediterráneo y evitar la ingesta excesiva de alimentos con fructosa, así como el consumo de alcohol. Además, el abandono del hábito tabáquico es igualmente importante para disminuir el riesgo cardiovascular.

En los pacientes con EHGNA y fibrosis hepática significativa ( $\geq$  F2), la tasa de mortalidad de causa hepática se incrementa de forma dramática (46), lo que justifica un seguimiento más estrecho para detectar y tratar las probables complicaciones secundarias a la cirrosis hepática. En estos pacientes se recomiendan las mismas modificaciones del estilo de vida que los pacientes con estadios de fibrosis F0 o F1.

Ya que el cáncer y la patología cardiovascular son las principales causas de mortalidad en pacientes con EHGNA y fibrosis significativa, es importante un buen manejo del SMet, así como estrategias de cribado del cáncer. Desafortunadamente, a día de hoy no hay fármacos que hayan sido aprobados para el tratamiento de la EHGNA. Más de 300 fármacos ya han sido evaluados en ensayos clínicos de fase II o III para el tratamiento de pacientes con EHGNA o EHNA (89,90), pero la mayoría de ellos ha demostrado poca efectividad (91). No obstante, en un reciente análisis intermedio de un ensayo clínico de fase III, aleatorizado y controlado con placebo, cuyo objetivo primario era evaluar la efectividad del ácido obeticólico, un agonista selectivo del receptor X farnesoide, se demostró que este fármaco mejoraba significativamente el estadio de la fibrosis en un 25% de los pacientes con EHNA tras 18 meses de tratamiento con 25 mg/día por vía oral (92). Más recientemente, un ensayo clínico de fase Iib, aleatorizado y controlado con placebo, para evaluar la eficacia de lanifibranor, un agonista pan-PPAR, demostró ser capaz de

mejorar un punto el estadio de fibrosis, así como mejorar e incluso conseguir la remisión de la EHNA, en los pacientes tratados con 1200 mg/día de lanifibranor por vía oral durante 6 meses pero no en los pacientes tratados con 800 mg/día (93). A la luz de estos prometedores resultados, es muy probable que un amplio repertorio de agentes farmacológicos podría estar disponible en un futuro cercano.

### **1.8. Comorbilidades asociadas**

La afectación hepática en la EHGNA es en realidad un componente más dentro de sus diferentes manifestaciones multiorgánicas con repercusión en los sistemas cardiovascular, renal y endocrino, entre otros. Por tanto, en el contexto global de esta enfermedad, es importante conocer sus comorbilidades asociadas (94–96).

#### **1.8.1. Obesidad**

La obesidad es el trastorno metabólico más frecuentemente asociado a la EHGNA (3). La probabilidad de padecer una EHGNA aumenta con el grado de obesidad, en la que la adiposidad visceral o central supone un riesgo mayor para su desarrollo que la adiposidad subcutánea o periférica. Hasta el 60-90% de las personas obesas presentan lesiones hepáticas que pueden abarcar todo el espectro histológico de la EHGNA, siendo más frecuente esta asociación en las mujeres (10). En un reciente estudio, García-Monzón y cols. observaron que el 77,6% de los individuos con ESNA y el 100% de aquellos con EHNA, diagnosticadas por biopsia hepática, tenían sobrepeso u obesidad (36).

### 1.8.2. Diabetes Mellitus tipo 2

La DM2 es otro trastorno metabólico que se asocia de manera muy significativa con la EHGNA, ya que se detecta en el 34%-75% de estos pacientes y con frecuencia conjuntamente con obesidad (3). Un hecho muy interesante es que la relación entre la DM2 y la EHGNA parece ser bidireccional, es decir, la DM2 influye en la progresión de la EHGNA y duplica la mortalidad global de estos pacientes, pero también los pacientes con EHGNA y fibrosis significativa tienen un mayor riesgo de desarrollar DM2 (97).

### 1.8.3. Síndrome de apnea obstructiva del sueño

Existe una creciente evidencia científica que indica que la hipoxia puede jugar un papel importante en la fisiopatología de la EHGNA (98). Un dato relevante que apoya esta hipótesis es que el síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS), un trastorno respiratorio muy frecuente que afecta al 4% de la población general y a un tercio de las personas obesas, se caracteriza por la aparición de episodios de apnea o hipopnea durante el sueño que producen una marcada hipoxia nocturna intermitente, lo que se ha relacionado con el desarrollo del SMet y con la aparición y progresión de la EHGNA (99). Aunque los mecanismos moleculares por los que la hipoxia puede contribuir a la aparición y progresión de la EHGNA no se conocen completamente, hay cada vez más evidencias que indican que la hipoxia altera el metabolismo hepático de los lípidos facilitando la captación de AGL por el hepatocito, disminuyendo la  $\beta$ -oxidación de los AGL e incrementando la lipogénesis de novo (98,100).

#### 1.8.4. Colelitiasis

Numerosos estudios clínicos han sugerido que los pacientes con colelitiasis tienen un alto riesgo de desarrollar una EHGNA, principalmente aquellos que tienen además factores de riesgo metabólico y RI (101–104). Existe evidencia clínica a favor de que la colelitiasis es más frecuente en pacientes con EHGNA que en la población general (105) y parece que la EHGNA se comporta como un factor de riesgo independiente de colelitiasis y viceversa (103,106). Aunque inicialmente se consideró que la colecistectomía no alteraba la composición de los ácidos biliares (107), estudios posteriores en ratones han descrito que la colecistectomía incrementa las concentraciones de ácidos biliares, lo que puede alterar el metabolismo hepático de los lípidos y favorecer la acumulación de grasa en el mismo (108,109). Hay controversia sobre la relación de la colelitiasis con la progresión de la EHGNA: mientras unos investigadores sugieren que la colelitiasis no aumenta el riesgo de EHNA ni de fibrosis hepática (110), otros autores indican que la colelitiasis se asocia con lesiones histopatológicas más avanzadas de la EHGNA (111).

A pesar de toda esta evidencia, la relación patogénica entre la colelitiasis y la EHGNA no está bien definida, en gran medida porque no se han llevado a cabo estudios prospectivos bien diseñados evaluando la prevalencia de EHGNA mediante biopsia hepática, así como tampoco lo están los factores de riesgo asociados en pacientes con colelitiasis.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis de este trabajo de Tesis Doctoral se fundamenta en tres aspectos fundamentales:

1. La relación causal entre la colelitiasis y la EHGNA no está definitivamente establecida.
2. No está bien definido el valor de los algoritmos matemáticos para el diagnóstico no invasivo de los distintos estadios evolutivos de la EHGNA en pacientes con colelitiasis.
3. Las comorbilidades asociadas condicionan la supervivencia de los pacientes con EHGNA, tanto por su implicación en la progresión de la hepatopatía como por su contribución a la aparición de enfermedades cardiovasculares y neoplásicas.

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es mejorar el conocimiento de la epidemiología y de la historia natural de la EHGNA en pacientes con colelitiasis, así como identificar los factores de riesgo que se asocian con la EHGNA con el fin de generar algoritmos matemáticos eficaces para el diagnóstico no invasivo de la EHGNA en los pacientes con colelitiasis. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la prevalencia de las diferentes formas histológicas de la EHGNA en pacientes con colelitiasis.
2. Evaluar la eficacia de distintos algoritmos matemáticos para el diagnóstico no invasivo de las diferentes formas histológicas de la EHGNA en pacientes con colelitiasis.
3. Conocer la historia natural de la EHGNA en pacientes con colelitiasis, con especial énfasis en la morbilidad y mortalidad asociadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Población de estudio**

Se estudiaron pacientes con un diagnóstico clínico y ecográfico de colelitiasis no complicada programados para colecistectomía laparoscópica que cumplieran los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Criterios de inclusión:
  - Edad entre 18 y 85 años.
  - Ausencia de un consumo significativo de alcohol (hombres <20 gramos al día y mujeres <10 gramos al día).
  - Signos histológicos de ESNA o de EHNA según criterios internacionalmente aceptados (61). Se incluyeron también pacientes con una biopsia hepática histológicamente normal, los cuales se consideraron grupo control.
  - Firma previa de un consentimiento informado por escrito, aprobado por el comité ético de investigación clínica institucional.
- Criterios de exclusión:
  - Edad < 18 y > 85 años.
  - Gestación activa.
  - Negación o revocación del consentimiento informado.
  - Consumo significativo de alcohol (hombres >20 gr/día y mujeres >10 gr/día).
  - Consumo crónico de drogas y/o de fármacos potencialmente hepatotóxicos, como tamoxifeno, valproato, amiodarona o metotrexate.

- Seropositividad para el virus de la inmunodeficiencia humana.
- Signos clínicos, analíticos, serológicos o histológicos de enfermedad hepática crónica de etiología conocida.
- Comorbilidades clínicamente inestables.

### **3.2. Diseño del estudio**

El diseño del presente trabajo de Tesis Doctoral tiene **2 fases** bien diferenciadas: Una **primera fase** que ha consistido en un estudio prospectivo observacional de corte transversal de una cohorte de pacientes con colelitiasis.

Una **segunda fase** que ha consistido en un estudio observacional longitudinal de los pacientes incluidos en el estudio transversal.

#### 3.2.1. Estudio transversal

Se incluyeron de manera consecutiva a los pacientes con colelitiasis que en el periodo comprendido entre el 1 de enero 2007 y el 28 de febrero de 2014 acudieron al Hospital Universitario Santa Cristina para la realización de una colecistectomía laparoscópica programada y que accedieron, mediante la firma previa de un consentimiento informado por escrito, a que se les practicase una biopsia hepática percutánea durante la intervención quirúrgica. Todos los procedimientos llevados a cabo en este estudio clínico fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa (dictamen de aprobación: PI-228/07) y se ajustaron a las

recomendaciones recogidas en la Declaración de Helsinki y conforme a las leyes nacionales y autonómicas vigentes al inicio del presente trabajo de Tesis Doctoral.

Cada uno de los pacientes incluidos en este estudio tuvo una consulta médica basal en la que se les recogieron sus datos demográficos, antropométricos y clínicos mediante una anamnesis y una exploración física completas. Posteriormente, a todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó, el mismo día de la colecistectomía laparoscópica, una extracción de sangre en ayunas antes del procedimiento quirúrgico y una biopsia hepática, utilizando una aguja de Menghini 15G/1,8mm (Hepafix, Melsungen, Alemania), por vía percutánea y con control laparoscópico al final del procedimiento quirúrgico.

En el estudio transversal se definieron las siguientes variables de estudio:

- Características demográficas: edad (años), sexo (hombre o mujer) y raza (amerindia, asiática, caucásica, gitana, mulata de Sudamérica, negra del norte de África y negra subsahariana).
- Características antropométricas: peso (kilogramos), talla (metros), perímetro de cintura (PCI) y cadera (PCA) (ambas en centímetros). El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso en kg por la talla en metros al cuadrado ( $m^2$ ). Se definió peso normal como un  $IMC \leq 25$ , sobrepeso como un IMC entre 25,1 y 29,9 y obesidad como un  $IMC \geq 30$ .
- Hábitos tóxicos: consumo de alcohol y tabaco.
- Antecedentes clínicos: factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial (HTA), dislipemia (definida como  $TG \geq 150mg/dl$  y/o  $HDL < 40 mg/dl$  en

hombres o HDL <50mg/dl en mujeres), diabetes mellitus tipo 1 o 2; patología tiroidea; presencia de SMet según criterios internacionalmente aceptados (112).

-Parámetros analíticos: mediante un hemograma se determinaron la hemoglobina (g/dL), el hematocrito (%), los leucocitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) y su fórmula, así como la concentración plasmática de plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ) y el fibrinógeno (mg/dL). En el suero se midieron las concentraciones de glucosa (mg/dL), de creatinina (mg/dL), de colesterol (LDL, HDL y VLDL; mg/dL), de TG (mg/dL), de hierro ( $\mu\text{g/dL}$ ), de ferritina ( $\mu\text{g/dL}$ ), de GOT (UI/L), de GPT (UI/L), de GGT (UI/L), de FA (UI/L) y de albúmina (g/L) así como el índice de saturación de transferrina (IST; %) y los anticuerpos antinucleares. También se determinaron en el suero los anticuerpos frente al virus de la hepatitis C, frente al virus de inmunodeficiencia humana y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B mediante un enzimoimmunoensayo (Murex, Dartford, UK). También se determinó la insulina plasmática mediante inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (ARCHITECT insulin; Abbot Park, IL) así como el índice de la resistencia a la insulina utilizando el modelo homeostático HOMA que se calculó mediante la fórmula:  $\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa (mmol/L)} / 22,5$  (132). Todas las variables analíticas se determinaron basalmente en muestras de sangre recogidas en ayunas en el momento de la biopsia hepática que se realizó a todos los pacientes incluidos en el estudio.

- Características histopatológicas: Una parte de cada biopsia hepática de al menos 15 mm de longitud se incluyó en un bloque de parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor que fueron posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina y

tricrómico de Masson, entre otras técnicas. Como norma general, con el fin de realizar una evaluación histopatológica adecuada, se excluían las biopsias hepáticas que mostraban menos de 10 espacios porta completos. Las biopsias hepáticas se valoraron por un único patólogo experto en histopatología hepática, el cual realizó el diagnóstico histopatológico teniendo en cuenta la clasificación de Brunt y cols. (60). Se establecieron 3 categorías de diagnóstico histopatológico: ESNA, EHNA e hígado histológicamente normal (HN). Además, el patólogo puntuó el grado de esteatosis (0-3), de inflamación lobulillar (0-3), de balonización hepatocelular (0-2) así como el estadio de fibrosis (0-4) según el sistema de puntuación histológica de Kleiner y cols. (61). Estas variables cuantitativas se recogieron en cada biopsia hepática y la suma de la puntuación del grado de esteatosis, de inflamación lobulillar y de balonización configuró una puntuación, el índice de actividad histológica de la EHGNA (en inglés, *NAS score*) (61,62).

- Algoritmos matemáticos de esteatosis hepática: Se calcularon los valores de los algoritmos FLI (68) y HSI (69) utilizando calculadoras disponibles en internet.

- Algoritmos matemáticos de fibrosis hepática: Se calcularon los valores de los algoritmos FIB-4 (76), NFS (78) y HFS (79) utilizando calculadoras disponibles en internet.

### 3.2.2. Estudio longitudinal

Entre enero de 2017 y mayo de 2019 se contactó con todos los pacientes diagnosticados de EHGNA en el estudio transversal para revisarlos en la consulta. En ella, se les realizó una analítica en ayunas similar a la realizada en el estudio transversal, se

tomaron sus medidas antropométricas y se registraron factores de riesgo cardiovascular, medicación crónica y eventos clínicos ocurridos desde el momento de la realización de la biopsia hepática. Los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio transversal que tenían un diagnóstico de hígado histológicamente normal se obtuvieron mediante la historia clínica electrónica de la Comunidad de Madrid a través de la plataforma HORUS.

En el estudio longitudinal se definieron las siguientes variables de estudio:

- Factores de riesgo cardiovascular: HTA, DM2 o dislipemia.
- Patología tiroidea.
- Cardiopatía isquémica: Angina o infarto de miocardio.
- Neoplasia: Tipo, estadio clínico y fecha de diagnóstico.
- Accidente cerebrovascular: Isquémico o hemorrágico
- Pólipos de colon.
- Enfermedad renal crónica.
- Síndrome de apnea/hiponea obstructiva del sueño.
- Cirrosis hepática y sus complicaciones.
- Indicación de trasplante hepático.
- Vasculopatía periférica.
- Mortalidad y causa de muerte.
- Otras comorbilidades: ingresos, cirugías, etc.

### **3.3. Métodos**

#### 3.3.1. Cálculo del tamaño muestral

Teniendo en cuenta los datos epidemiológicos publicados sobre la prevalencia de la EHGNA en la población general (25%) (14) y en la población con colelitiasis (55-60%) (102,103), estimamos que la frecuencia de este hallazgo oscilaría alrededor del 50% en nuestra población de estudio. Para obtener resultados estadísticos con un nivel de confianza del 95% (riesgo alfa de 0,05) y un margen de error del 5% (riesgo beta de 0,05), en un contraste unilateral y estimando una tasa de pérdidas de datos del 10%, se calculó que se precisaba analizar una cohorte de 143 sujetos (calculadora de tamaño muestral GRANMO, versión 7.12. <http://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/>), por lo que consideramos que el tamaño de la población de estudio de esta Tesis Doctoral (242 pacientes con colelitiasis) es óptimo para llevar a cabo un análisis con herramientas estadísticas robustas.

#### 3.3.2. Análisis estadístico

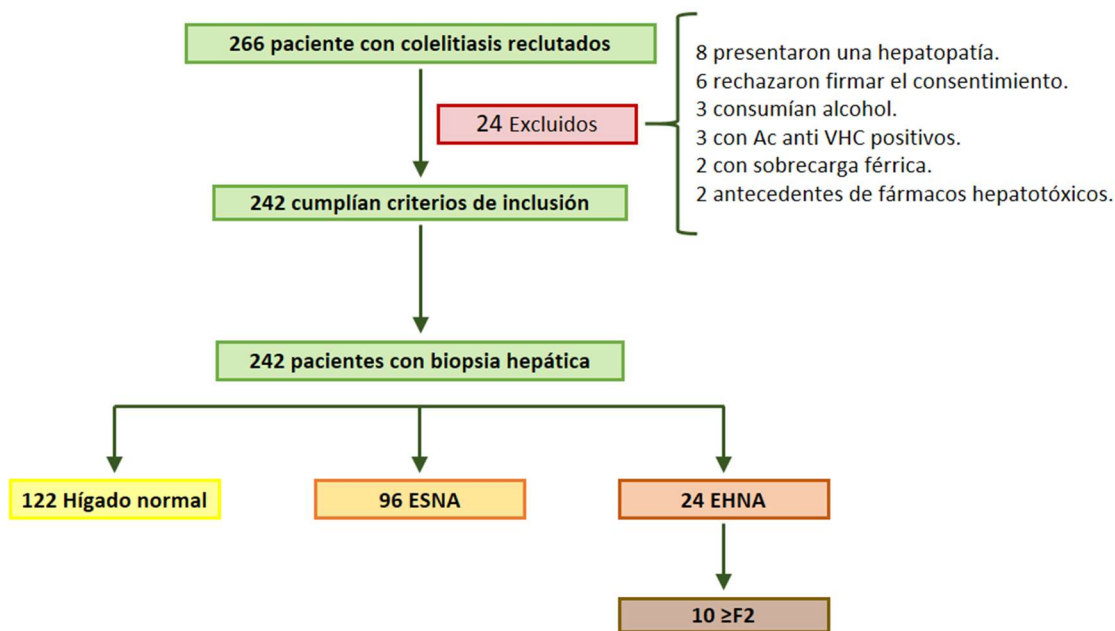
Las variables nominales se muestran como frecuencia absoluta (n) y porcentajes (%) y las variables cuantitativas como media y desviación estándar (DE). Para la comparación entre grupos de las variables nominales (HN, ESNA y EHNA) se utilizó la prueba de  $\chi^2$  y, en su defecto, la prueba exacta de Fisher. En el caso de las variables cuantitativas, para la comparación entre dos grupos se utilizó la t de Student y, en su defecto, la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, y para la comparación entre más de dos grupos se utilizó un ANOVA de un factor y posteriormente análisis post hoc con Tukey o, en su defecto, Games-Howell, en los casos en que no se pudieron asumir varianzas

iguales. Para llevar a cabo la comparación longitudinal en los dos momentos del estudio de las variables cuantitativas por grupos se empleó la prueba T para muestras relacionadas. Para los análisis de factores de riesgo se construyeron modelos de regresión logística univariante y multivariante, para lo que se estimó la Odds Ratio (OR), así como el intervalo de confianza al 95% (IC 95%), de cada una de las variables independientes analizadas. Las variables independientes que alcanzaron significación estadística (aquellas con un valor de p inferior a 0,05) fueron obtenidas utilizando el método de introducción por pasos (LR). Para el diseño de los nuevos algoritmos de diagnóstico no invasivo combinamos las variables independientes seleccionadas en los análisis de factores de riesgo con la fórmula matemática obtenida en sus respectivos modelos de regresión logística, transformando los valores de escala logit a valores de probabilidad. Para determinar la eficacia diagnóstica de estos nuevos algoritmos, así como de cada uno de los algoritmos matemáticos utilizados en el estudio transversal, se calculó su sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) mediante el diseño de curvas ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*) frente al patrón de referencia en el diagnóstico, la biopsia hepática. Finalmente, se registraron tanto la incidencia de comorbilidades como la tasa de mortalidad a lo largo del estudio en los distintos grupos, lo que se muestra de manera descriptiva. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el programa informático IBM SPSS 26.0.

## **RESULTADOS**

#### **4.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio transversal.**

Un total de 266 pacientes con colelitiasis se reclutaron desde 2007 hasta 2014 como se detalla en la **Figura 5**. De ellos, 24 pacientes fueron excluidos del estudio por diferentes motivos: 8 pacientes presentaron signos analíticos o histológicos de hepatopatía no conocida hasta el momento, como colestasis o hepatitis autoinmune; 6 pacientes rechazaron firmar el consentimiento informado; 3 presentaban un consumo significativo de alcohol >20gr/día; 3 pacientes eran seropositivos para el VHC; 2 pacientes tenían parámetros bioquímicos de sobrecarga férrica y 2 pacientes habían estado en tratamiento con fármacos hepatotóxicos como tamoxifeno y metotrexate. Por lo tanto, 242 pacientes con colelitiasis se incluyeron finalmente en el estudio y se les realizó una biopsia hepática durante la colecistectomía laparoscópica programada. Ninguno de ellos presentó complicaciones significativas relacionadas con la realización de la biopsia. Posteriormente, esta cohorte de pacientes fue objeto de revisión entre enero de 2017 y mayo de 2019, teniendo cada paciente una consulta de revisión después de un periodo superior a los 5 años.



**Figura 5. Diagrama de flujo de los pacientes con coleditiasis estudiados.**

Las características demográficas, antropométricas, clínicas y analíticas de la cohorte estudiada de pacientes con coleditiasis se detallan en la **Tabla 4** y las características histológicas de esta cohorte (n=242) se detallan en la **Tabla 5**. La edad media de los pacientes fue de 48,8 años, la mayoría eran mujeres (75,6%) y la raza predominante fue la caucásica (67,4%). El 32,6% de los individuos presentaba obesidad ( $IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$ ), el 7,4% estaba diagnosticado de DM2, el 22,7% presentaba HTA y el 62,4% tenía dislipemia (definida como  $TG \geq 150 \text{mg/dl}$  y/o  $HDL < 40 \text{mg/dl}$  en hombres o  $HDL < 50 \text{mg/dl}$  en mujeres). El 26,4% de la cohorte (n=64) además cumplía criterios de SMet.

**Tabla 4. Características de la población de estudio (n=242).**

<b>Características</b>	<b>Población de estudio</b>
Edad (años)	48,8 ± 13,8
Mujeres/Hombres, n (%)	183 (75,6)/59 (24,4)
Raza	
Caucásica, n (%)	163 (67,4)
Latinoamericana, n (%)	66 (27,3)
Africana, n (%)	4 (1,7)
Otras, n (%)	9 (3,7)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) ≥ 30, n (%)	79 (32,6)
Perímetro de cintura (cm)	96,9 ± 11,6
Perímetro de cadera (cm)	106,3 ± 11,1
Hipertensión arterial, n (%)	55 (22,7)
Diabetes mellitus tipo 2, n (%)	18 (7,4)
Dislipemia, n (%)	151 (62,4)
Síndrome metabólico, n (%)	64 (26,4)
Glucosa (mg/dL)	96,8 ± 17
Insulina (μU/L)	9,2 ± 5,4
Índice HOMA	2,3 ± 1,6
Triglicéridos (mg/dL)	123,8 ± 57,7
Colesterol total (mg/dL)	198,7 ± 38,2
Colesterol HDL (mg/dL)	48,9 ± 11,3
GOT (IU/L)	19,3 ± 7,1
GPT (IU/L)	22,3 ± 15,2
γ-GT (IU/L)	38,8 ± 4,1
FA (IU/L)	72,5 ± 26,6
Ferritina (ng/mL)	80,7 ± 66,6
Albúmina (mg/dL)	4,5 ± 0,4
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	253,3 ± 67,2

IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa; FA, fosfatasa alcalina.

La mayoría de los pacientes con signos histológicos de ESNA en la biopsia hepática presentaron una esteatosis leve o de grado 1 (69,8%) y no tenían fibrosis hepática significativa (F0-F1: 97,9%). En cambio, la mayoría de los pacientes con EHNA mostraron un grado moderado o severo de esteatosis (grado 2-3: 66,7%). Un aspecto a destacar es que

## Resultados

el 29,2% de los pacientes con EHNA presentaron fibrosis hepática significativa (F2-F3), aunque ninguno de ellos mostró signos histológicos de cirrosis hepática (F4).

**Tabla 5. Características histológicas de la población de estudio (n=242).**

	HN (n=122)	ESNA (n=96)	EHNA (n=24)	Valor de p
Esteatosis				<0,001
Grado 0	122 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grado 1	0 (0,0%)	67 (69,8%)	8 (33,3%)	
Grado 2	0 (0,0%)	20 (20,8%)	9 (37,5%)	
Grado 3	0 (0,0%)	9 (9,4%)	7 (29,2%)	
Inflamación				<0,001
Grado 0	118 (96,7%)	82 (84,4%)	0 (0,0%)	
Grado 1	4 (3,3%)	14 (14,6%)	21 (87,5%)	
Grado 2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (12,5%)	
Balonización				<0,001
Grado 0	122 (100,0%)	96 (100,0%)	0 (0,0%)	
Grado 1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	22 (91,7%)	
Grado 2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (8,3%)	
Fibrosis				<0,001
F0	121 (99,2%)	75 (78,1%)	5 (20,8%)	
F1	1 (0,8%)	19 (19,8%)	12 (50,0%)	
F2	0 (0,0%)	2 (2,1%)	3 (12,5%)	
F3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (16,7%)	
F4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

HN, hígado normal; ESNA, esteatosis simple no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.

Las características demográficas, antropométricas, clínicas y analíticas de la población de estudio estratificada por diagnóstico histológico se detallan en la **Tabla 6**. Cabe destacar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución etaria y racial de los pacientes con EHGNA y la de los pacientes con HN. En cambio, en la población de pacientes con EHGNA hubo una mayor frecuencia de hombres

## Resultados

( $p < 0,001$ ) así como de obesidad ( $p < 0,05$ ) y de SMet ( $p < 0,001$ ) con respecto a la observada en los pacientes con HN.

**Tabla 6. Características de la población de estudio según diagnóstico histológico (n=242).**

<b>Características</b>	<b>HN</b>	<b>EHGNA</b>	<b>Valor de p</b>
Frecuencia, n (%)	122 (50,4)	120 (49,6)	NA
Edad (años)	46,9 ± 13,7	50,8 ± 13,4	0,060
Mujeres/Hombres, n (%)	104 (42,9)/18 (14,8)	79 (32,6)/41 (34,2)	<b>&lt;0,001</b>
Raza			0,399
Caucásica, n (%)	86 (70,5)	77 (64,2)	
Latinoamericana, n (%)	28 (23)	38 (31,7)	
Africana, n (%)	3 (2,5)	1 (0,8)	
Otras, n (%)	4 (3,3)	4 (3,3)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) ≥ 30, n (%)	31 (25,4)	48 (40)	<b>0,016</b>
Perímetro de cintura (cm)	92,4 ± 11,1	101,4 ± 10,1	<b>&lt;0,001</b>
Perímetro de cadera (cm)	103,4 ± 10,9	109,3 ± 10,5	<b>&lt;0,001</b>
Hipertensión arterial, n (%)	22 (18)	33 (27,5)	0,079
Diabetes mellitus tipo 2, n (%)	6 (4,9)	12 (10)	0,132
Dislipemia, n (%)	76 (62,3)	75 (62,5)	0,974
Síndrome metabólico, n (%)	18 (14,8)	46 (38,3)	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (mg/dL)	93,7 ± 16,6	100,0 ± 16,9	<b>0,004</b>
Insulina (μU/L)	7,9 ± 5,1	10,5 ± 5,4	<b>&lt;0,001</b>
Índice HOMA	1,9 ± 1,4	2,6 ± 1,7	<b>&lt;0,001</b>
Triglicéridos (mg/dL)	111,7 ± 56,4	136,0 ± 56,7	<b>&lt;0,001</b>
Colesterol total (mg/dL)	193,4 ± 35,8	204,4 ± 39,9	<b>0,029</b>
Colesterol HDL (mg/dL)	49,4 ± 11,2	48,3 ± 11,5	0,464
GOT (IU/L)	17,6 ± 5,2	21,2 ± 8,3	<b>&lt;0,001</b>
GPT (IU/L)	17,3 ± 8,4	27,3 ± 18,6	<b>&lt;0,001</b>
γ-GT (IU/L)	30,8 ± 28,0	46,9 ± 49,7	<b>0,002</b>
FA (IU/L)	69,7 ± 22,3	75,4 ± 30,1	0,098
Ferritina (ng/mL)	54,5 ± 48,3	100,6 ± 72,1	<b>0,002</b>
Albúmina (mg/dL)	4,5 (0,4)	4,4 (0,4)	0,082
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	250,5 (70,8)	256,1 (63,6)	0,516

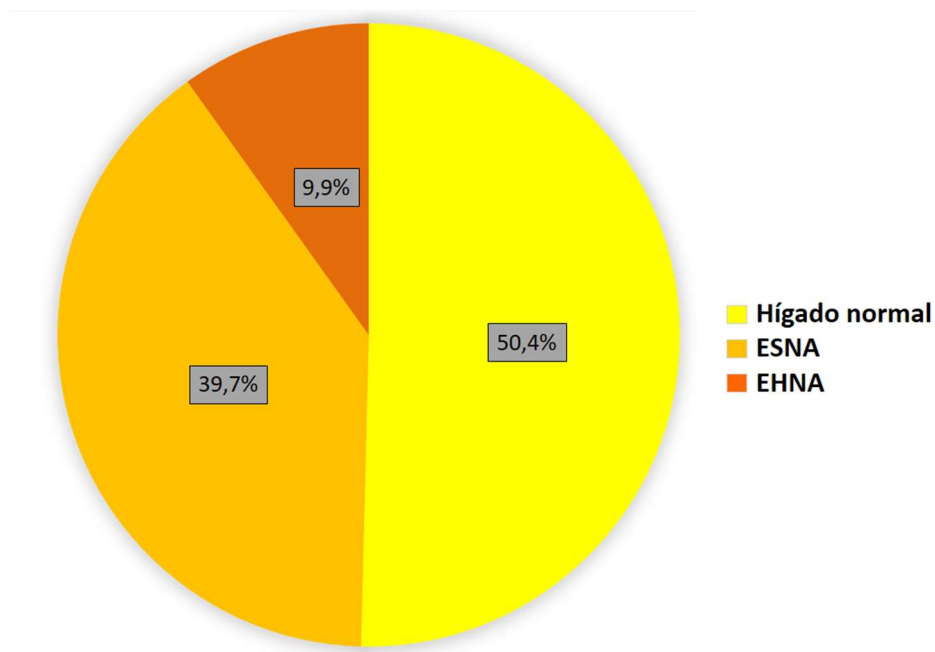
HN, hígado normal; EHGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa; FA, fosfatasa alcalina.

Además, las concentraciones séricas de TG, de GOT y de GPT, así como la de insulina plasmática y los valores del índice HOMA, fueron significativamente más

elevados ( $p < 0,001$  para todas) en los pacientes con EHGNA que en aquellos con HN, al igual que las concentraciones séricas de glucosa, de colesterol total, de GGT y de ferritina ( $p < 0,05$  para todas).

#### 4.1.1. Prevalencia de la EHGNA y de sus formas histológicas.

Tal como se muestra gráficamente en la **Figura 6**, un total de 120 pacientes con colelitiasis, el 49,6% de la cohorte estudiada, presentaron evidencia histológica de EHGNA, incluyendo ESNA (96 de 242, 39,7%) y EHNA (24 de 242, 9,9%), mientras que los restantes 122 pacientes con colelitiasis (50,4% de la cohorte estudiada) mostraron un hígado sin lesiones histológicas significativas.



**Figura 6. Prevalencia de las diferentes formas histológicas identificadas en la población de estudio (n=242).**

## Resultados

Las características diferenciales entre los pacientes con ESNA y con EHNA se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7. Características de los pacientes con colelitiasis y EHGNA según diagnóstico histológico (n = 120).**

Características	ESNA	EHNA	Valor de p
Frecuencia, n (%)	96 (80)	24 (20)	NA
Edad (años)	51,2 ± 13,9	48,7 ± 13,2	0,074
Mujeres/Hombres, n (%)	63 (52,5)/33 (27,5)	16 (13,3)/8 (6,6)	<b>0,002</b>
Raza			0,548
Caucásica, n (%)	63 (65,6)	14 (58,3)	
Latinoamericana, n (%)	29 (30,2)	9 (37,5)	
Otras, n (%)	4 (4,2)	1 (1,1)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) ≥ 30, n (%)	33 (34,4)	15 (62,5)	<b>0,002</b>
Perímetro de cintura (cm)	100,5 ± 10,1	105,2 ± 9,7	0,134
Perímetro de cadera (cm)	108,4 ± 9,5	112,8 ± 13,7	0,178
Hipertensión arterial, n (%)	26 (27,1)	7 (29,2)	0,209
Diabetes mellitus tipo 2, n (%)	9 (9,4)	3 (12,5)	0,281
Dislipemia, n (%)	57 (59,4)	18 (75)	0,368
Síndrome metabólico, n (%)	32 (33,3)	14 (58,3)	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa (mg/dL)	99,5 ± 15,9	101,8 ± 20,7	0,883
Insulina (μU/L)	9,7 ± 4,8	13,6 ± 6,2	<b>0,003</b>
Índice HOMA	2,4 ± 1,4	3,5 ± 2,4	<b>0,004</b>
Triglicéridos (mg/dL)	134,2 ± 58,32	143,3 ± 50,1	0,762
Colesterol HDL (mg/dL)	49,2 ± 11,9	44,8 ± 9,5	0,178
GOT (IU/L)	20,8 ± 8,7	22,5 ± 6,4	0,545
GPT (IU/L)	25,5 ± 17,9	34,5 ± 19,7	0,118
γ-GT (IU/L)	48,3 ± 54,4	41,2 ± 22,8	0,585
FA (IU/L)	72,8 ± 22,1	85,8 ± 50,4	0,077
Ferritina (ng/mL)	91,8 ± 66,9	138,0 ± 86,0	0,146
Albúmina (mg/dL)	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	0,205
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	257,9 ± 67,6	249,2 ± 44,5	0,691

ESNA, esteatosis simple no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa; FA, fosfatasa alcalina.

Como aspectos más destacables, el porcentaje de pacientes obesos fue significativamente mayor en los pacientes con EHNA que en aquellos con ESNA (62,5% vs 34,4%; p=0,012) así como la frecuencia de SMet (58,3% vs 33,3%; p<0,001). Además,

las concentraciones plasmáticas de insulina y los valores del índice HOMA también fueron significativamente más elevados en los pacientes con EHNA que en aquellos con ESNA ( $13,6\pm 6,2$   $\mu\text{U/L}$  vs  $9,7\pm 4,8$   $\mu\text{U/L}$ ,  $p=0,003$ ;  $3,5\pm 2,4$   $\mu\text{U/L}$  vs  $2,4\pm 1,4$   $\mu\text{U/L}$ ,  $p=0,004$ , respectivamente).

#### 4.1.2. Factores de riesgo de EHGNA y EHNA.

Con el fin de identificar los potenciales factores asociados con el riesgo de desarrollar una EHGNA, en primer lugar, se llevó a cabo un análisis mediante regresión logística univariante en toda la población de estudio ( $n=242$ ), incluyendo las variables independientes consideradas como clínicamente relevantes para el diagnóstico de EHGNA (variable dependiente).

En segundo lugar, con aquellas variables que alcanzaron un valor de  $p<0,1$  en el análisis univariante, se realizó un análisis mediante regresión logística multivariante. Por último, utilizando el método de introducción por pasos (LR), se encontraron únicamente 2 variables independientes significativamente asociadas al diagnóstico histológico de EHGNA, el PCI (OR: 1,09; 95% de IC: 1,03-1,14;  $p=0,002$ ) y la concentración sérica de ferritina (OR: 1,01; 95% de IC: 1,00-1,02;  $p=0,037$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8. Factores de riesgo asociados a la EHGNA en la población de estudio (n=242).**

Variables independientes	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	OR	95% IC	Valor de p	OR	95% IC	Valor de p
Edad (años)	1,02	[1,00-1,04]	0,029	1,09	[0,99-1,20]	0,075
Sexo (Mujer)	3,00	[1,62-5,61]	0,001	0,92	[0,8-10,86]	0,950
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	1,12	[1,05-1,19]	<0,001	0,87	[0,56-1,36]	0,555
Perímetro de cintura (cm)	1,08	[1,05-1,12]	<0,001	1,09	[1,03-1,15]	<b>0,002</b>
Perímetro de cadera (cm)	1,06	[1,03-1,08]	<0,001	0,99	[0,84-1,16]	0,861
Hipertensión arterial	1,70	[0,90-3,20]	0,098	0,00	[0,00-0,00]	1,00
Diabetes mellitus tipo 2	2,15	[0,78-5,92]	0,129			
Síndrome metabólico	3,59	[1,93-6,68]	<0,001	0,31	[0,02-4,18]	0,381
Glucosa (mg/dL)	1,03	[1,01-1,05]	0,002	0,98	[0,83-1,15]	0,782
Insulina	1,11	[1,05-1,18]	< 0,001			
Índice HOMA	1,46	[1,17-1,81]	<0,001	0,15	[0,00-49,01]	0,520
Triglicéridos (mg/dL)	1,01	[1,00-1,01]	0,001	0,99	[0,98-1,01]	0,264
Colesterol-HDL (mg/dL)	0,99	[0,97-1,01]	0,462	2,40	[0,55-10,57]	0,245
GOT (UI/L)	1,09	[1,04-1,14]	<0,001	1,24	[0,97-1,66]	0,079
GPT (IU/L)	1,07	[1,04-1,12]	<0,001	0,94	[0,84-1,06]	0,319
γ-GT (IU/L)	1,01	[1,00-1,02]	0,001	1,00	[0,96-1,04]	1,000
FA (UI/L)	1,01	[0,99-1,02]	0,091	1,01	[0,98-1,04]	0,552
Ferritina (ng/mL)	1,01	[1,00-1,02]	0,001	1,01	[1,00-1,02]	<b>0,037</b>

EHGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; OR, índice de probabilidad; IC, intervalo de confianza; IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa.

Una vez obtenidos los resultados descritos, se llevó a cabo la misma metodología para identificar las variables independientes asociadas al diagnóstico histológico de EHNA (variable dependiente). De esta manera, en primer lugar, se realizó una regresión logística univariante incluyendo las variables clínicamente relevantes con el diagnóstico de EHNA en la cohorte de pacientes diagnosticados histológicamente de EHGNA (n=120) y, en segundo lugar, una regresión logística multivariante con aquellas variables que alcanzaron un valor de  $p < 0,1$  en el análisis univariante. Estos resultados se muestran en la **Tabla 9**. Mediante el método de introducción por pasos (LR), se rescataron tres variables independientes, el IMC (OR: 1,16; 95% IC: 1,04-1,30;  $p=0,010$ ), la concentración sérica

## Resultados

de GPT (OR: 1,02; 95% de IC:1,00-1,05; p=0,040) y la concentración plasmática de insulina (OR: 1,10; 95% de IC: 1,00-1,20; p=0,041) que mostraron una asociación estadísticamente significativa con el diagnóstico histológico de EHNA.

**Tabla 9. Factores de riesgo asociados a la EHNA en la cohorte de pacientes con EHGNA (n=120).**

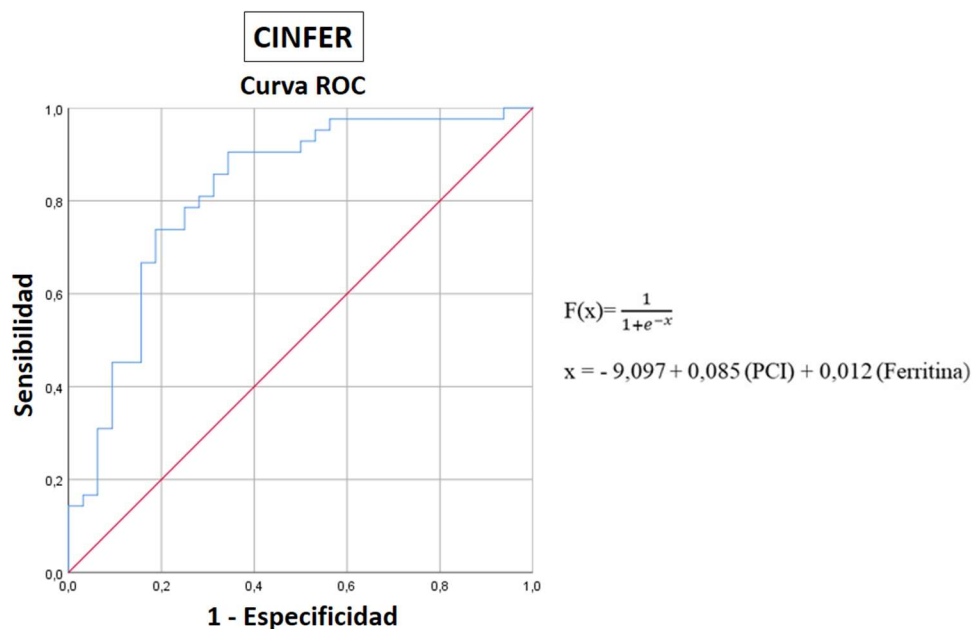
Variables independientes	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	OR	95% IC	P valor	OR	95% IC	P valor
Edad (años)	0,99	[0,96-1,02]	0,473			
Sexo (Mujer)	0,95	[0,37-2,46]	0,923			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	1,15	[1,04-1,27]	0,006	1,16	[1,04-1,30]	<b>0,010</b>
Perímetro de cintura (cm)	1,05	[1,00-1,10]	0,042	1,84	[0,55-6,11]	0,319
Perímetro de cadera (cm)	1,04	[1,00-1,08]	0,077	0,97	[0,89-1,06]	0,540
Hipertensión arterial	1,11	[0,41-2,98]	0,838			
Diabetes mellitus tipo 2	1,38	[0,34-5,55]	0,656			
Síndrome metabólico	2,80	[1,12-6,99]	0,028	2,14	[0,64-7,13]	0,216
Glucosa (mg/dL)	1,01	[0,98-1,03]	0,570			
Insulina (IU/L)	1,13	[1,04-1,23]		1,10	[1,00-1,20]	<b>0,041</b>
Índice HOMA	1,45	[1,08-1,95]	0,006	1,13	[0,50-2,54]	0,766
Triglicéridos (mg/dL)	1,00	[0,99-1,01]	0,489			
Colesterol-HDL (mg/dL)	0,96	[0,92-1,01]	0,080	1,00	[0,95-1,06]	0,853
GOT (IU/L)	1,02	[0,98-1,07]	0,389			
GPT (IU/L)	1,02	[1,02-1,05]	0,040	1,25	[1,00-1,05]	<b>0,040</b>
GGT (IU/L)	0,99	[0,98-1,01]	0,449			
FA (UI/L)	1,01	[0,99-1,03]	0,076	1,02	[0,98-1,05]	0,522
Ferritina (ng/mL)	1,01	[0,99-1,01]	0,111			

EHGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; OR, índice de probabilidad; IC, intervalo de confianza; IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica;  $\gamma$ -GT, gamma glutamiltranspeptidasa.

### 4.1.3. Nuevos algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA y EHNA.

Con el fin de predecir de manera no invasiva el diagnóstico histológico de EHGNA, basándonos en la fórmula matemática obtenida en el modelo de regresión logística y combinando las dos variables independientes significativamente asociadas a la variable dependiente EHGNA, se generó el algoritmo CINFER (CIN, perímetro de CINTura en cm + FER, concentración sérica de FERritina en ng/mL). Tal como se muestra en la **Figura 7**,

con el objetivo de evaluar la precisión de dicho algoritmo se calculó el área bajo la curva ROC (AUROC) (del inglés, *Area Under Receiver Operating Characteristic*), analizando solamente aquellos pacientes a los que se les había determinado la concentración sérica de ferritina (n=74). Se obtuvo un AUROC de 0,82 (95% de IC: 0,74-0,95; p<0,001) con una S del 90%, una E del 66%, un VPP del 78% y un VPN del 84%, lo que reveló un rendimiento global bueno del algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA en pacientes con colelitiasis, estableciendo en 0,36 el valor de corte óptimo, según el índice de Youden, para obtener una máxima precisión diagnóstica.



**Figura 7. Precisión del algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA (n=74).**  
PCI, perímetro de cintura.

Posteriormente, se analizaron intervalos de 0,1 unidades de los valores del algoritmo CINFER para confirmar este resultado (**Tabla 10**), de tal manera que un valor de CINFER  $\leq 0,30$  sería útil para descartar el diagnóstico de EHGNA con un VPN del 89%

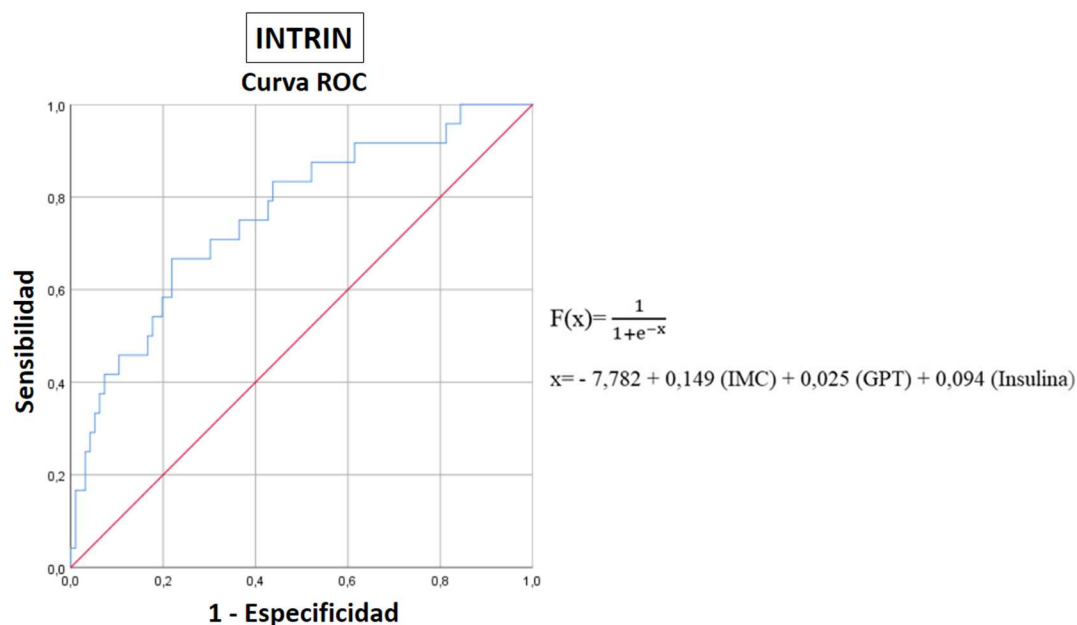
mientras que un valor de CINFER  $\geq 0,40$  resultaría de utilidad para diagnosticarla con un VPP del 79%.

**Tabla 10. Precisión del algoritmo CINFER para el diagnóstico no invasivo de EHGNA (n=74).**

Valor de corte	CC %	N %	S	E	VPP	VPN
$\geq 0,10$	59	56,7	1,00	0,06	0,58	1,00
$\geq 0,20$	66	55,4	0,98	0,25	0,63	0,89
$\geq 0,30$	<b>74</b>	<b>51,3</b>	<b>0,90</b>	<b>0,53</b>	<b>0,72</b>	<b>0,81</b>
$\geq 0,40$	<b>78</b>	<b>48,6</b>	<b>0,86</b>	<b>0,69</b>	<b>0,78</b>	<b>0,79</b>
$\geq 0,50$	77	45,9	0,81	0,72	0,79	0,74
$\geq 0,60$	76	41,8	0,74	0,78	0,82	0,69
$\geq 0,70$	68	31,0	0,55	0,84	0,82	0,59
$\geq 0,80$	62	22,9	0,53	0,45	0,49	0,49
$\geq 0,90$	51	18,8	0,19	0,94	0,80	0,47

CC %, porcentaje de pacientes correctamente clasificados; N %, porcentaje de pacientes con el valor de corte referido; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

Además, con el fin de predecir de manera no invasiva el diagnóstico histológico de EHNA, basándonos en la fórmula matemática obtenida en el modelo de regresión logística y combinando las tres variables independientes significativamente asociadas a la variable dependiente EHNA, se generó el algoritmo INTRIN (IN, Índice de masa corporal en  $\text{kg}/\text{m}^2$ ; TR, TRansaminasa glutámico-pirúvica en U/L; IN, INsulina plasmática en  $\mu\text{U}/\text{L}$ ). Tal como se muestra en la **Figura 8**, con el objetivo de evaluar la precisión de dicho algoritmo se calculó el AUROC, incluyendo la población completa de pacientes con diagnóstico histológico de EHGNA (n=120), que fue de 0,76 (95% de IC: 0,65-0,87;  $p < 0,001$ ) con una S del 67% y una E del 78%, con un VPP del 43% y un VPN del 90%, lo que revela un rendimiento global aceptable del algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA en pacientes con coleditiasis, estableciendo en 0,25 el valor de corte óptimo, según el índice de Youden, para obtener una máxima precisión diagnóstica.



**Figura 8. Precisión del algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA (n=120).** IMC, índice de masa corporal; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica.

Posteriormente, analizamos intervalos de 0,1 unidades de los valores del algoritmo INTRIN para confirmar este resultado (**Tabla 11**), de tal manera que un valor de INTRIN  $\leq 0,20$  se podría utilizar para descartar el diagnóstico de EHNA con un VPN del 93% mientras que un valor de INTRIN  $\geq 0,40$  sería útil para diagnosticarla con un VPP del 62%.

**Tabla 11. Precisión del algoritmo INTRIN para el diagnóstico no invasivo de EHNA (n=120).**

Valor de corte	CC%	N %	S	E	VPP	VPN
$\geq 0,10$	53	17,5	0,88	0,44	0,28	0,93
$\geq \mathbf{0,20}$	<b>67</b>	<b>14,6</b>	<b>0,71</b>	<b>0,66</b>	<b>0,34</b>	<b>0,90</b>
$\geq 0,30$	76	10,0	0,50	0,82	0,41	0,87
$\geq \mathbf{0,40}$	<b>83</b>	<b>6,6</b>	<b>0,33</b>	<b>0,95</b>	<b>0,62</b>	<b>0,85</b>
$\geq 0,50$	82	3,3	0,17	0,98	0,67	0,82
$\geq 0,60$	82	2,5	0,13	0,99	0,75	0,82
$\geq 0,70$	81	1,6	0,08	0,99	0,67	0,81
$\geq 0,80$	80	0,8	0,04	0,99	0,50	0,81
$\geq 0,90$	81	0,8	0,04	1,00	1,00	0,81

CC %, porcentaje de pacientes correctamente clasificados; N %, porcentaje de pacientes con el valor de corte referido; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

4.1.4. Precisión de otros algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA y de fibrosis hepática.

Con el objetivo de conocer la precisión diagnóstica de los algoritmos FLI y HSI para el diagnóstico no invasivo de EHGNA, ya validados previamente en la población general y en pacientes con hepatopatías crónicas (68,69), se analizaron mediante curvas ROC la S y E, así como el VPN y el VPN de cada uno de ellos en la población completa de estudio (n=242). Un total de 125 pacientes (51,6%) fueron correctamente diagnosticados con el algoritmo FLI, de los cuales 78 (62,4%) presentaban EHGNA. En lo que se refiere al algoritmo HSI, 105 pacientes (43,4%) fueron correctamente clasificados, de los cuales 95 (90,5%) tenían EHGNA (**Tabla 12**).

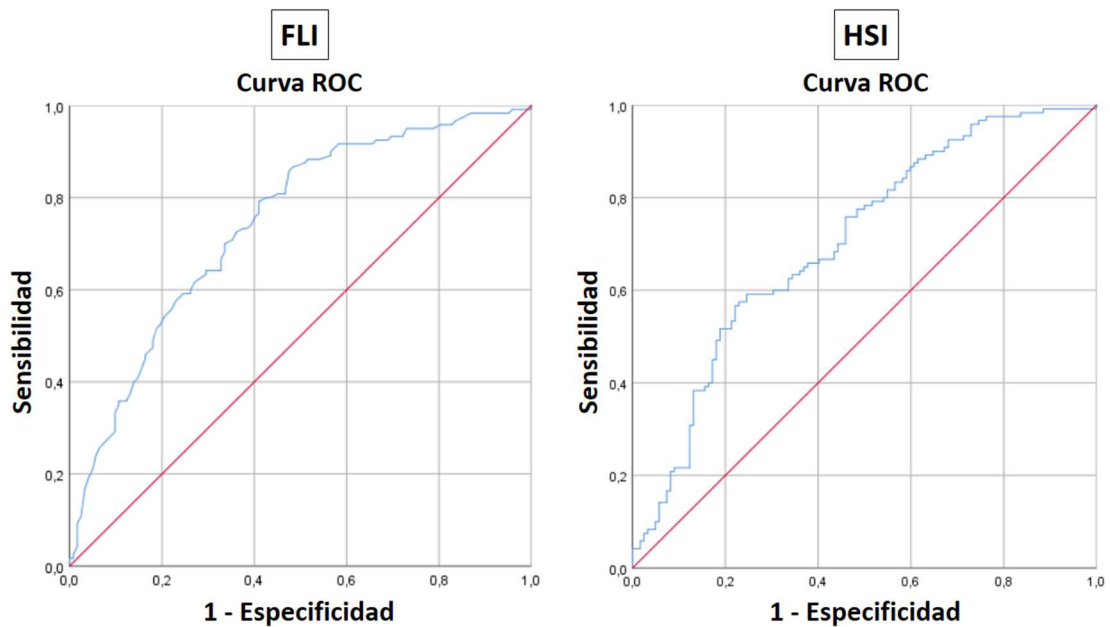


Figura 9. Precisión de otros algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA (n=242).

Como se muestra en la **Figura 9**, la precisión de ambos algoritmos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA, según los valores obtenidos del AUROC, fue regular tanto para el FLI (0,74) como para el HSI (0,70). Los porcentajes de S y E, así como el valor VPP y el VPN de ambos algoritmos fueron igualmente regulares.

A continuación, se comparó la precisión diagnóstica de los algoritmos FLI y HSI para el diagnóstico no invasivo de EHGNA en nuestra cohorte de pacientes con colestiasis con la del nuevo algoritmo CINFER, descrito por primera vez en esta Tesis Doctoral. Los resultados se detallan en la **Tabla 12**. Hay que destacar que el algoritmo CINFER diagnosticó correctamente al 70,3% de los pacientes a los que se les determinó, ya fueran pacientes con HN (32,7%) o con EHGNA confirmada mediante biopsia hepática (67,3%). La comparación de los 3 algoritmos puso de manifiesto un mejor rendimiento del CINFER para el diagnóstico no invasivo de la EHGNA en nuestra población de estudio, siendo especialmente destacable la mayor S del algoritmo CINFER para discriminar una EHGNA.

**Tabla 12. Eficacia de distintos algoritmos para el diagnóstico no invasivo EHGNA**

	<b>FLI</b> <b>(n=242)</b>	<b>HSI</b> <b>(n=242)</b>	<b>CINFER</b> <b>(n=74)</b>
<b>Valor de corte</b>	≥60	≥36	≥0,40
<b>CC n</b>	125	105	52
<b>CC%</b>	51,6	43,4	70,3
<b>CC HN</b>	47	10	17
<b>CC EHGNA</b>	78	95	35
<b>S</b>	74	70	90
<b>E</b>	61	54	66
<b>VPP</b>	65	60	78
<b>VPN</b>	70	65	84
<b>AUROC</b>	0,74	0,70	0,82

FLI, fatty liver index; HSI, hepatic steatosis index; CC, correctamente clasificados; HN, hígado normal; EHGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; AUROC, área bajo la curva ROC.

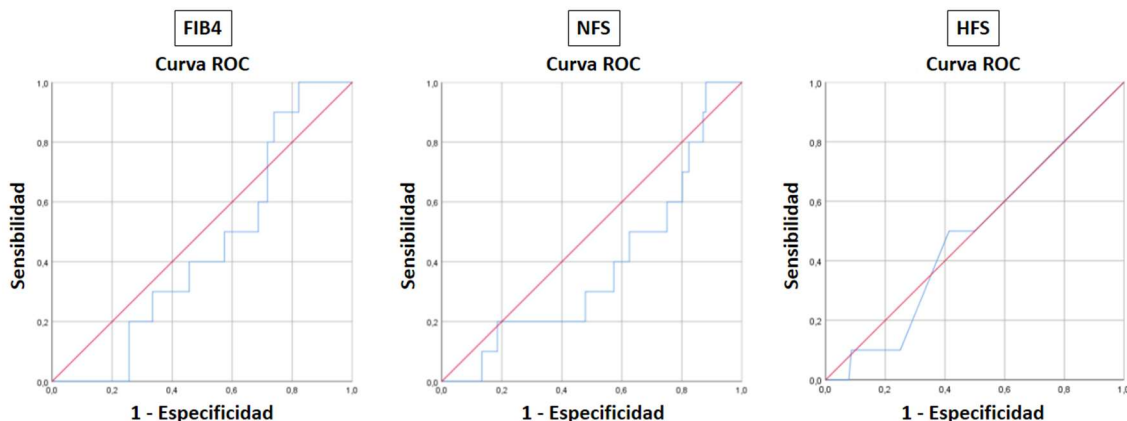
Por otro lado, se analizó el rendimiento diagnóstico de los distintos algoritmos de fibrosis (FIB-4, NFS y HFS), los cuales tienen puntos de corte validados para predecir la ausencia o presencia de fibrosis hepática avanzada en pacientes con hepatopatías crónicas (76,78,79). Con este objetivo, se analizó el AUROC para determinar la S y E, así como el VPP y el VPN de cada uno de los algoritmos de fibrosis mencionados. Los resultados de los tres algoritmos se detallan en la **Tabla 13**.

**Tabla 13. Eficacia de distintos de algoritmos para el diagnóstico no invasivo de fibrosis hepática (n=242)**

	<b>FIB-4</b>	<b>NFS</b>	<b>HFS</b>
<b>Punto de corte</b>	>2.67	>0.675	>0.47
<b>CC n</b>	194	171	212
<b>CC%</b>	72.65	64.04	79.40
<b>CC F0-F1</b>	194	171	212
<b>CC F2-F4</b>	0	0	0
<b>S</b>	40	40	50
<b>E</b>	47	43	50
<b>VPP</b>	3	3	4
<b>VPN</b>	95	94	96
<b>AUROC</b>	0.44	0.39	0.49

NFS, NAFLD fibrosis score; CC, correctamente clasificados; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; AUROC, área bajo la curva ROC.

Un total de 194 pacientes (72,6%) fueron correctamente clasificados con FIB-4, 171 (60,0%) con NFS y 212 (79,4%) con HFS, todos ellos sin fibrosis significativa (F0-F1). Ninguno de los pacientes con fibrosis significativa ( $\geq$  F2) fue correctamente categorizado con estos algoritmos. Los 3 tienen un VPN elevado, lo que les convierte en algoritmos con alta S para descartar fibrosis significativa, pero con baja E para predecir fibrosis significativa. Todos ellos obtuvieron un AUROC inferior a 0,5 (**Figura 10**).



**Figura 10. Curvas ROC de los algoritmos de fibrosis hepática en la población de estudio (n=242).**

#### 4.2. Características de los pacientes incluidos en el estudio longitudinal.

Las características demográficas, antropométricas, clínicas y analíticas de la cohorte de pacientes analizadas en el estudio longitudinal se detallan en la **Tabla 14**. No se pudo obtener datos del seguimiento de 37 pacientes (15,3%) de los 242 incluidos en el estudio. Cinco de estos pacientes fallecieron durante el seguimiento y de los otros 32 pacientes a los que no se les pudo realizar el seguimiento clínico, 18 tenían un HN en el estudio basal, 10 tenían ESNA y 4 tenían EHNA en la biopsia hepática inicial. El motivo de la pérdida del seguimiento fue el desplazamiento del paciente a otra comunidad autónoma en la mayoría de los casos (84,3%), y en los casos restantes se debió a la negativa expresa del paciente o a causas desconocidas.

**Tabla 14. Características de la cohorte analizada en el estudio longitudinal (n=205).**

<b>Características</b>	<b>Población de estudio</b>
Seguimiento, meses	88 ± 24
Edad (años)	56,2 ± 14,2
Mujeres/Hombres, n (%)	154 (75,1) / 51 (24,9)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) ≥ 30, n (%)	64 (42,7)
Perímetro de cintura (cm)	100,3 ± 12,1
Perímetro de cadera (cm)	107,7 ± 10
Hipertensión arterial, n (%)	78 (38)
Diabetes mellitus tipo 2, n (%)	28 (13,7)
Dislipemia, n (%)	125 (61)
Síndrome metabólico, n (%)	65 (31,7)
Glucosa (mg/dL)	99,2 ± 24,1
Insulina (μU/L)	12,4 ± 6,5
Índice HOMA	3,3 ± 2,0
Triglicéridos (mg/dL)	128,4 ± 75,5
Colesterol total (mg/dL)	198,9 ± 40,2
Colesterol HDL (mg/dL)	53,5 ± 12,7
GOT (IU/L)	22,5 ± 15,9
GPT (IU/L)	24,6 ± 18,1
γ-GT (IU/L)	37,6 ± 45
FA (IU/L)	77,0 ± 24,1
Ferritina (ng/mL)	96,5 ± 89,2
Albúmina (mg/dL)	4,2 ± 0,3
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	249,8 ± 64,5

IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa; FA, fosfatasa alcalina.

De los 205 pacientes incluidos en el estudio longitudinal, 86 (41.9%) tenían signos histológicos de ESNA y 20 (9,7%) tenían una EHNA en la biopsia hepática inicial, y los restantes 104 (50,7%) tenían un hígado histológicamente normal. Como se muestra en la **Tabla 15**, tras un seguimiento medio de 88 meses, los pacientes con ESNA presentaron un IMC significativamente más elevado que al inicio del estudio, así como las concentraciones séricas de glucosa, de insulina y de colesterol-HDL y los valores del índice HOMA se vieron igualmente aumentados. Por el contrario, la albúmina sérica y el recuento de

plaquetas disminuyeron significativamente con respecto a los valores detectados al inicio del estudio.

**Tabla 15. Evolución de las características de los pacientes con ESNA (n=86).**

Variables	Basal	Seguimiento	Valor de p
Edad (años)	51,4 ± 14,4	58,3 ± 14,5	<0,001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,9 ± 4,3	30,0 ± 4,9	<b>0,001</b>
PCI (cm)	100,2 ± 10,8	99,5 ± 12,7	0,473
PCA (cm)	108,1 ± 9,8	107,1 ± 10,4	0,249
Glucosa (mg/dL)	99,0 ± 15,9	105,4 ± 23,4	<b>0,002</b>
Insulina (μU/L)	9,4 ± 4,8	11,8 ± 6,7	<b>0,007</b>
Índice HOMA	2,3 ± 1,3	3,2 ± 2,2	<b>0,004</b>
Triglicéridos (mg/dL)	132,5 ± 54,5	143,4 ± 98,0	0,291
Colesterol total (mg/dL)	204,3 ± 41	200,1 ± 43,8	0,279
Colesterol HDL (mg/dL)	48,5 ± 11,4	51,3 ± 12,0	<b>0,006</b>
GOT (UI/L)	20,6 ± 8,6	23,4 ± 21,4	0,233
GPT (UI/L)	24,9 ± 17,4	26,1 ± 18,4	0,543
γ-GT (UI/L)	49,7 ± 58,0	46,4 ± 55,8	0,480
FA (UI/L)	71,9 ± 21,5	75,6 ± 23,3	0,112
Ferritina (ng/mL)	91,7 ± 68,8	103,0 ± 60,8	0,252
Albúmina (mg/dL)	4,4 ± 0,4	4,2 ± 0,3	<b>&lt;0,001</b>
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	257,2 ± 65,7	241,8 ± 55,0	<b>0,002</b>

ESNA, esteatosis simple no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa FA, fosfatasa alcalina.

Por otro lado, la evolución de las características antropométricas y analíticas de los pacientes con EHNA se muestra en la **Tabla 16**. A excepción de las concentraciones séricas de colesterol-HDL y de GGT, que aumentaron y disminuyeron respectivamente de manera significativa con respecto a los valores basales, no se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros clínicos evaluados en los pacientes con EHNA en la biopsia hepática basal.

Tabla 16. Evolución de las características en los pacientes con EHNA (n=20).

Variables	Basal	Seguimiento	Valor de p
Edad (años)	48,5 ± 13,5	55,4 ± 13,2	<0,001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,6 ± 3,0	30,7 ± 3,2	0,694
PCI (cm)	103,5 ± 7,7	103,1 ± 9,6	0,791
PCA (cm)	111,2 ± 11,3	109,3 ± 8,6	0,139
Glucosa (mg/dL)	103,6 ± 22,2	106,3 ± 35,4	0,665
Insulina (μU/L)	13,6 ± 6,8	14,2 ± 5,4	0,802
Índice HOMA	3,7 ± 2,9	3,5 ± 1,3	0,822
Triglicéridos (mg/dL)	148,6 ± 48,6	137,6 ± 59,9	0,351
Colesterol total (mg/dL)	200,0 ± 39,9	195,2 ± 39,9	0,547
Colesterol HDL (mg/dL)	43,2 ± 8,3	48,7 ± 8,5	<0,001
GOT (UI/L)	23,1 ± 6,6	26,2 ± 13,2	0,284
GPT (UI/L)	36,7 ± 20,8	37,0 ± 30,1	0,949
γ-GT (UI/L)	40,6 ± 16,8	32,6 ± 11,5	<b>0,043</b>
FA (UI/L)	74,9 ± 23,8	83,1 ± 22,6	0,116
Albúmina (mg/dL)	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,2	0,946
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	250,2 ± 44,9	231,5 ± 52,9	0,087

IMC, índice de masa corporal; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; γ-GT, gamma glutamiltranspeptidasa; FA, fosfatasa alcalina.

Finalmente, se evaluó la incidencia de comorbilidades metabólicas, cardiovasculares, neoplásicas y otras frecuentemente asociadas a la EHGNA, así como la tasa de mortalidad en la cohorte de pacientes con colelitiasis, estratificada según las diferentes formas histológicas de EHGNA observadas en la biopsia hepática inicial. Como se ha explicado previamente, por diversos motivos no se pudo obtener información del seguimiento clínico de 37 pacientes incluidos en el estudio basal, por lo que finalmente se obtuvieron y analizaron los datos completos al final del seguimiento de una población de 205 pacientes con colelitiasis y biopsia hepática inicial. Los resultados de este análisis se muestran de una manera descriptiva en los siguientes apartados. Como se puede observar, el número de casos registrados de las diferentes comorbilidades estudiadas, al igual que el número de fallecimientos, fue muy bajo al final del seguimiento, lo que impidió realizar un

análisis estadístico mediante curvas de regresión de Cox y de Kaplan-Meier para determinar la incidencia acumulada de comorbilidades y la tasa de mortalidad, respectivamente, en la población de estudio.

#### 4.2.1. Incidencia de comorbilidades metabólicas

Tal como se muestra en la **Tabla 17**, 15 pacientes de la cohorte analizada desarrollaron una DM2 al final del seguimiento, de los cuáles 10 (66,6%) tenían signos histológicos de EHGNA en la biopsia hepática inicial (9 con ESNA y 1 con EHNA). Un dato a tener en cuenta es que a la mayoría de estos pacientes (11 de 15, 73,3%) se les realizó el diagnóstico de DM2 en los primeros cinco años de seguimiento. Por otro lado, 33 pacientes de la población de estudio fueron diagnosticados de HTA durante el seguimiento, más de la mitad (57,6%, 19 de 33) en los primeros 5 años. De estos pacientes hipertensos, 15 (45,5%) tenían ESNA y 5 (15,2%) tenían EHNA en la biopsia hepática inicial. Por último, 26 pacientes de la población de estudio fueron diagnosticados durante el seguimiento de dislipemia (definida como TG  $\geq$ 150 mg/dl y/o colesterol-HDL <40 mg/dl en hombres o colesterol-HDL <50 mg/dl en mujeres), más de la mitad (61,5%, 16 de 26) en los primeros 5 años. Un aspecto destacable es que de los 16 pacientes que desarrollaron una dislipemia durante los primeros 5 años de seguimiento, la mayoría (94%, 15 de 16) tenían signos histológicos de EHGNA en la biopsia hepática inicial, concretamente 12 tenían ESNA y 3 tenían EHNA.

**Tabla 17. Incidencia de comorbilidades metabólicas durante el seguimiento (88 ± 24 meses).**

	DM2	HTA	DL
<b>Totales n</b>	15	33	26
<b>HN n, (%)</b>	5 (33,4)	13 (39,4)	11 (42,3)
<b>ESNA n, (%)</b>	9 (60)	15 (45,5)	12 (46,2)
<b>EHNA n, (%)</b>	1 (6,7)	5 (15,1)	3 (11,5)

DM2, diabetes mellitus tipo2; HTA, hipertensión arterial; DL, dislipemia; HN, hígado normal; ESNA, esteatosis simple no alcohólica, EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.

#### 4.2.2. Incidencia de comorbilidades cardiovasculares.

En la **Tabla 18** se muestran en detalle los casos de cardiopatía isquémica (CI) y accidente cerebrovascular agudo (ACVA) que se registraron al final del periodo de seguimiento de la población de estudio. De los 4 pacientes que fueron diagnosticados de CI, 3 de ellos tuvieron un infarto de miocardio y 1 un episodio de angina inestable. Hay que destacar que 3 de estos pacientes fueron diagnosticados de CI en los primeros 5 años de seguimiento y tenían un diagnóstico histológico de EHGNA inicialmente (1 con ESNA y 2 con EHNA).

**Tabla 18. Incidencia de comorbilidades cardiovasculares durante el seguimiento (88 ± 24 meses).**

	CI	ACVA
<b>Totales n</b>	4	5
<b>HN n, (%)</b>	1 (25)	1 (20)
<b>ESNA n, (%)</b>	1 (25)	3 (60)
<b>EHNA n, (%)</b>	2 (50)	1 (20)

CI, cardiopatía isquémica; ACVA, accidente cerebrovascular agudo; HN, hígado normal; ESNA, esteatosis simple no alcohólica, EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.

Por otro lado, 5 pacientes tuvieron un ACVA isquémico durante el seguimiento, de los cuales 4 tenían un diagnóstico histológico de EHGNA inicialmente (3 con ESNA y 1 con EHNA) y 3 ocurrieron en los primeros 5 años de seguimiento.

#### 4.2.3. Incidencia de comorbilidades neoplásicas.

De la cohorte analizada al final del seguimiento, 18 pacientes desarrollaron una enfermedad neoplásica, de los cuales 4 casos fueron neoplasias de origen digestivo, 2 de ellas de origen hepático (1 hepatocarcinoma y 1 adenoma hepático) y 2 de origen extrahepático (1 adenocarcinoma gástrico y 1 adenocarcinoma intramucoso de vesícula biliar). Los 14 casos restantes fueron neoplasias de origen extradigestivo, 10 de origen ginecológico (6 adenocarcinomas de mama, 2 neoplasias de cérvix uterino y 2 adenocarcinomas de endometrio), 1 cáncer microcítico de pulmón, 1 linfoma no Hodgkin, 1 melanoma y 1 carcinoma *in situ* cutáneo. En la **Tabla 19** se muestra la distribución de los casos registrados de neoplasias en función de las diferentes formas histológicas de EHGNA en la biopsia hepática inicial.

**Tabla 19. Incidencia de comorbilidades neoplásicas durante el seguimiento (88 ± 24 meses).**

	Neoplasias Hepáticas	Neoplasias Digestivas	Otras neoplasias
<b>Total, n</b>	2	2	14
<b>HN, n (%)</b>	0 (0)	1 (50)	8 (57,1)
<b>ESNA, n (%)</b>	2 (100)	0 (0)	6 (42,9)
<b>EHNA, n (%)</b>	0 (0)	1 (50)	0 (0)

HN, hígado normal; ESNA, esteatosis simple no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.

4.2.4. Incidencia de otras comorbilidades.

Tal como se detalla en la **Tabla 20**, al final del periodo de seguimiento de la cohorte de pacientes con colelitiasis analizada, se registraron 4 casos de ERC. Hay que destacar que 3 de estos pacientes desarrollaron la ERC en los primeros 5 años de seguimiento y tenían un diagnóstico histológico de EHGNA inicialmente (2 con ESNA y 1 con EHNA). Por otro lado, se registraron 9 pacientes con SAOS, todos en los primeros 5 años de seguimiento, 6 de los cuales tenían un diagnóstico histológico de EHGNA en la biopsia hepática inicial (3 ESNA y 3 EHNA).

**Tabla 20. Incidencia de otras comorbilidades durante el seguimiento (88 ± 24 meses).**

	ERC	SAOS
<b>Totales, n</b>	4	9
<b>HN, n (%)</b>	1 (25)	3 (33,3)
<b>ESNA, n (%)</b>	2 (50)	3 (33,3)
<b>EHNA, n (%)</b>	1 (25)	3 (33,3)

ERC, enfermedad renal crónica; SAOS, síndrome de apnea obstructiva del sueño; HN, hígado normal; ESNA, esteatosis simple no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.

4.2.5. Causas de mortalidad.

De los 210 pacientes incluidos en el estudio longitudinal, 5 pacientes (2,4%) fallecieron tras un seguimiento de 88 ± 24 meses desde la biopsia hepática inicial. De las 5 muertes registradas, 4 de ellas se produjeron en pacientes con un diagnóstico histológico de EHGNA, más concretamente de ESNA. No se pudo conocer de manera fehaciente la fecha y la causa de la muerte de 2 de los 5 pacientes que fallecieron, mientras que los otros 3 pacientes fallecieron después del quinto año de seguimiento y la muerte se produjo por

## *Resultados*

---

causa oncológica, concretamente un adenocarcinoma gástrico, un colangiocarcinoma y un carcinoma epidermoide pulmonar.

## **DISCUSIÓN**

### **5.1. Prevalencia y factores de riesgo de EHGNA y de EHNA en pacientes con colelitiasis.**

La EHGNA es la enfermedad hepática crónica más frecuente en los países desarrollados, estimándose una prevalencia media de un 25% en la población general (7). Según estudios recientes, esta prevalencia aumenta en pacientes con colelitiasis mostrando una prevalencia cercana al 50% (113), lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio en el que un 49,6% de la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis tenían criterios histológicos de EHGNA, incluyendo ESNA (96 de 242; 39,7%) y EHNA (24 de 242; 9,9%).

Considerando que la colelitiasis y la EHGNA son trastornos frecuentes del aparato digestivo que comparten varios factores de riesgo, como la obesidad y el SMet y que frecuentemente coexisten (10), hay un interés creciente en conocer mejor las características epidemiológicas de los pacientes con colelitiasis y, en particular, si la colelitiasis *per se* incrementa el riesgo de desarrollar EHGNA más allá del riesgo inherente a la presencia de alteraciones metabólicas concomitantes. En este sentido, la asociación entre colelitiasis y EHGNA ha sido analizada en varios estudios observacionales en los que se evaluó tanto la frecuencia de EHGNA en pacientes con colelitiasis como, al contrario, la frecuencia de colelitiasis en pacientes con EHGNA, gracias a los cuáles se puede afirmar que la coexistencia de ambos trastornos es más que una mera coincidencia epidemiológica. En un estudio de Koller y cols. (103) en el que incluyeron 482 pacientes con factores de riesgo metabólico, evaluados mediante ecografía abdominal, demostraron que la presencia de colelitiasis estaba asociada de manera independiente con el diagnóstico de EHGNA

(OR=1,77; IC 95% 1,15-2,73). En este mismo estudio, por otro lado, encontraron una mayor prevalencia de colelitiasis en pacientes con criterios ecográficos compatibles con EHGNA en comparación con los pacientes con un hígado ecográficamente normal (47% frente a 26%, respectivamente;  $p < 0,0001$ ), concluyendo que la EHGNA se comporta como un predictor independiente de colelitiasis. Loria y cols. (105), en un estudio observacional de una cohorte de 161 pacientes con diagnóstico ecográfico de EHGNA, llegaron a conclusiones similares al encontrar una mayor prevalencia de colelitiasis en la cohorte de estudio que en la población general. Por último, un meta-análisis que incluyó doce estudios clínicos observacionales con un total de 79.629 pacientes analizados (113), demostró que existía una asociación estadísticamente significativa entre colelitiasis y EHGNA, con una OR de 1,33 (IC al 95%, 1,14-1,55). Los autores concluyeron que estos resultados eran convincentes a pesar de que existió una notable heterogeneidad entre los distintos estudios analizados y que los factores metabólicos de confusión no pudieron excluirse por completo en dicha asociación.

Hay que tener en cuenta que muchos de los estudios anteriormente mencionados incluyen en las cohortes de estudio tanto pacientes colecistectomizados como pacientes con colelitiasis. Esto puede suponer un sesgo en la interpretación de los resultados ya que dos estudios clínicos recientes, llevados a cabo en poblaciones asiáticas distintas, encontraron que el riesgo de EHGNA fue significativamente mayor en pacientes colecistectomizados que en pacientes con colelitiasis con la vesícula biliar *in situ*, después de ajustar por factores de confusión (114,115), sugiriendo que la colecistectomía *per se*, y no la colelitiasis, es un factor de riesgo para el desarrollo de EHGNA. En línea con esta

hipótesis, un estudio observacional dirigido por Jaruvongvanich y cols. evaluó el depósito hepático de grasa mediante RM abdominal, observando que 2 años después de la colecistectomía la cantidad de grasa en el hígado era mayor en pacientes colecistectomizados que en los no colecistectomizados, independientemente del peso corporal de los pacientes (116). De igual manera, un amplio estudio llevado a cabo en la población norteamericana, dirigido por Ruhl y cols. (109), mostró claramente que la colecistectomía, pero no la colelitiasis, estaba asociada con el diagnóstico ecográfico de EHGNA. Aunque las razones de esta fuerte asociación entre la EHGNA y la colecistectomía no están del todo claras, la ausencia de vesícula biliar puede ser por sí mismo un factor de riesgo para el desarrollo de EHGNA debido a que la ausencia de vesícula biliar altera significativamente la homeostasis de los ácidos biliares produciendo un incremento en la producción hepática de TG y de VLDL (107,108). Apoyando esta teoría, en nuestra cohorte de pacientes colecistectomizados observamos un incremento de los niveles séricos de TG con el paso del tiempo, aunque este hallazgo no alcanzó significación estadística.

No sólo se ha hablado de la relación existente entre colelitiasis y EHGNA, sino que se ha planteado la hipótesis de que la colelitiasis pueda favorecer la aparición de formas clínicas más graves de EHGNA. Únicamente 3 estudios han reportado la prevalencia de EHNA, diagnosticada por biopsia hepática, en pacientes con colelitiasis, con tasas que varían ampliamente desde el 18% al 77% (102,104,111). No obstante, existen importantes limitaciones en la interpretación de los resultados obtenidos en estos estudios clínicos debido fundamentalmente a la heterogeneidad de la población de estudio, así como a la

falta de criterios histológicos bien definidos para el diagnóstico de EHNA. En cambio, en el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos utilizado los criterios de diagnóstico histológico de EHNA propuestos por Brunt y cols. (60) y validados por Kleiner y cols. (61) y hemos encontrado una prevalencia de EHNA en nuestra población de estudio del 9,9%, marcadamente inferior a la que había sido reportada previamente y, sin embargo, muy similar a la obtenida en la población general estadounidense (12,2%) (10). Este hallazgo está en consonancia con los resultados de un estudio previo que incluía 441 pacientes con EHNA diagnosticada por biopsia hepática en los que la presencia de colelitiasis no estaba asociada de manera independiente con la presencia de fibrosis avanzada o de EHNA (110). Por todo ello, los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral indican de manera convincente que los pacientes con colelitiasis no tienen un mayor riesgo de EHNA que la población general.

En resumen, existe evidencia clínica suficiente como para confirmar que la colelitiasis y la EHGNA están asociadas de manera significativa, lo que se basa en una relación compleja y bidireccional. Aunque se han propuesto distintas hipótesis que intentan explicar esta asociación, los estudios llevados a cabo demuestran únicamente que hay relación epidemiológica, pero no causalidad. Además, el diagnóstico de EHGNA en la mayoría de estos estudios se ha llevado a cabo mediante técnicas no invasivas, como diagnóstico por imagen con ecografía abdominal y algoritmos matemáticos validados, por lo que no disponen de diagnóstico histológico. Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios prospectivos que analicen los mecanismos fisiopatológicos subyacentes que expliquen esta relación.

En un amplio estudio clínico observacional llevado a cabo en EE.UU., en el que se evaluó la prevalencia de las distintas causas de hepatopatía en 58.731 pacientes a lo largo de los últimos 30 años (1), los autores observaron que la frecuencia de enfermedades hepáticas crónicas, como la hepatitis por virus B y la enfermedad hepática inducida por alcohol, se mantenía estable, o incluso en descenso como en el caso de la hepatitis C, mientras que la EHGNA era la única causa de hepatopatía que presentaba una prevalencia creciente, en sincronía con el incremento de la prevalencia de la obesidad y de la DM2. Sin embargo, no se conocen bien todos los factores de riesgo asociados a la EHGNA de la misma manera que tampoco se conocen de forma precisa los mecanismos moleculares implicados en la progresión de la EHGNA hacia formas histológicas clínicamente más graves como la EHNA, la fibrosis avanzada y la cirrosis. Por este motivo, las opciones terapéuticas son escasas y es difícil diseñar programas de salud encaminados tanto a prevenir la aparición de nuevos casos de EHGNA como a atenuar o incluso impedir su progresión clínica.

Es un hecho bien conocido que los factores de riesgo metabólico están implicados en la patogenia de la EHGNA. Los resultados obtenidos por Younossi y cols. (1) mostraron que los dos predictores independientes de EHGNA más robustos eran la obesidad (OR: 10,4; 95% IC: 9,5-11,3;  $p < 0,0001$ ) y la DM2 (OR: 3,7; 95% IC: 3,2-4,2;  $p < 0,0001$ ). De hecho, en los pacientes obesos con DM2, la prevalencia de EHGNA era del 80,5% mientras que en aquellos que solo tenían una de las dos patologías era del 47% y 55%, respectivamente, en contraposición con una prevalencia de EHGNA de solo el 10,9% en aquellos pacientes sin obesidad ni DM2. La HTA, otro componente del SMet, parece tener

una relación bidireccional con la EHGNA, lo que quiere decir que se comporta como un predictor independiente de la EHGNA y a su vez la EHGNA es un factor de riesgo para la HTA (117).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral encontramos que únicamente dos variables se mostraron como predictores independientes de EHGNA. Estas fueron el PCI (OR: 1,09; 95% de IC: 1,03-1,14; p=0,002) y la ferritina (OR: 1,01; 95% de IC: 1,00-1,02; p=0,037). El principal interés de estos hallazgos reside en que se trata de datos clínicos que se pueden obtener de forma sencilla en la consulta ya que únicamente es necesario llevar a cabo una exploración física y realizar una analítica de sangre. Por este motivo se puede plantear su uso potencial como herramientas de cribado de EHGNA en pacientes con colestiasis.

La relevancia de la EHNA, desde un punto de vista sanitario, reside en que estos pacientes tienen un mayor riesgo de progresión a formas clínicas más graves de enfermedad hepática, aproximadamente el 41% de ellos desarrollan fibrosis hepática en mayor o menor grado (14), lo que favorece la aparición de cirrosis y sus complicaciones. Además, se ha comprobado que los estadios avanzados de fibrosis hepática (F3 y F4) se asocian con una mayor morbilidad y mortalidad (118). De los 242 pacientes con colestiasis incluidos en este trabajo de Tesis Doctoral, solo 4 (1,6%) presentaron fibrosis hepática avanzada (F3 o F4), pero todos ellos tenían un diagnóstico histológico de EHNA, lo que supone el 16,7% de los 24 pacientes con EHNA estudiados (**Tabla 5**). Estos resultados demuestran que son los pacientes con EHNA los que presentan más riesgo de progresar a estadios avanzados de enfermedad hepática.

Por otro lado, la edad se considera un factor de riesgo para la aparición de EHGNA y de EHNA con fibrosis avanzada (119), aunque no está claro si esto se debe a un efecto acumulativo de los factores de riesgo metabólico a lo largo de los años en esta población. En cuanto al sexo, no hay datos concluyentes que lo relacionen como factor de riesgo para el desarrollo de EHGNA. Tanto la vida sedentaria como una dieta con alto contenido en carbohidratos favorecen la progresión de la EHGNA hacia formas más graves (120), así como la exposición pasiva o activa al tabaco, ya que este contribuye a la progresión del daño hepático alterando la historia natural de los pacientes con EHGNA (121).

Considerando los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, 3 variables se comportaron como factores de riesgo significativamente asociados a la presencia de EHNA y fueron el IMC (OR: 1,16; 95% de IC: 1,04-1,30; p=0,010), la concentración sérica de GPT (OR: 1,02; 95% de IC:1,00-1,05; p=0,040) y la concentración plasmática de insulina (OR: 1,10; 95% de IC: 1,00-1,20; p=0,041).

En línea con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, Li y cols (122) llevaron a cabo un meta-análisis en el que incluyeron 21 estudios clínicos para conocer la magnitud del riesgo de EHGNA en relación con la obesidad, tras el que reportaron que los pacientes obesos tenían un riesgo 3,5 veces mayor que los no obesos de desarrollar una EHGNA y que había evidencias suficientes para afirmar que existe una correlación positiva entre el IMC y el riesgo de EHGNA.

Existe una mayor controversia respecto a la consideración de la concentración sérica de GPT como un factor de riesgo de EHNA. Desde hace tiempo, esta se ha utilizado como un marcador indirecto de daño hepático (123). No obstante, es bien sabido que las

concentraciones séricas de GPT no se correlacionan con la gravedad del daño hepático histológico en pacientes con hepatopatía crónica, lo que es particularmente cierto cuando se tiene en cuenta el estadio de fibrosis. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral confirman que esto se cumple también en la EHGNA. Más concretamente, la mayoría (85%) de los pacientes analizados con colelitiasis y diagnóstico histológico de EHGNA tenían una concentración sérica de GPT dentro del rango de la normalidad ( $\leq 40$  IU/L), independientemente de la presencia de ESNA (88,5%) o de EHNA (70,8%), lo que indica que las concentraciones séricas de GPT no guardan relación con la histología en la EHGNA. Estos datos están en consonancia con lo que muestra el estudio de Mofrad y cols. (51), en el que concluyen que todo el espectro histológico de la EHGNA se puede observar en pacientes con concentraciones séricas normales de GPT, sin diferencias estadísticamente significativas con los pacientes con concentraciones elevadas.

Son varios los estudios clínicos (124,125) que han incluido indicadores del metabolismo de la glucosa en modelos de predicción de EHNA. En un estudio llevado a cabo por Ulitsky y cols. (124) se evidenció que los pacientes con DM2 y EHNA tenían peor control glucémico que aquellos con DM2 sin EHNA, ya que presentaban valores más elevados de hemoglobina glicada. Estos hallazgos se ven apoyados por Gholam y cols. (125), quienes observaron que un peor control glucémico con valores más altos de RI se relacionaban con la progresión de ESNA a EHNA. En este sentido, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral refuerzan los de los estudios previamente comentados al demostrar que los pacientes con EHNA presentaron concentraciones circulantes de glucosa basal e

insulina, así como valores del índice HOMA, significativamente más elevados que los observados en los pacientes con ESNA (**Tabla 7**).

## **5.2. Eficacia de los distintos métodos de diagnóstico no invasivos en las diferentes fases evolutivas de la EHGNA en pacientes con colelitiasis.**

Como se ha comentado previamente, la prevalencia de la EHGNA está aumentando rápidamente a nivel mundial lo que implica un mayor número de casos de EHNA con el consiguiente incremento de escenarios clínicos más graves de enfermedad hepática, como la cirrosis y sus complicaciones asociadas. A día de hoy, la biopsia hepática es el método de elección para establecer su diagnóstico y para diferenciar con fiabilidad la EHGNA de la EHNA, así como también para valorar el estadio de fibrosis (6). Hay que tener en cuenta, no obstante, que la biopsia hepática es un procedimiento invasivo con una tasa de mortalidad alrededor del 0,1% de los procedimientos, debido fundamentalmente al riesgo de hemorragia intraperitoneal, que existe una significativa variabilidad interobservador en su interpretación histopatológica y que únicamente evalúa una mínima parte del parénquima hepático (126). Ante estos datos, es evidente la necesidad de estrategias no invasivas que permitan llevar a cabo el diagnóstico de EHGNA, especialmente en pacientes con enfermedades crónicas concomitantes o en aquellos en los que la biopsia hepática esté contraindicada (127). En este aspecto, el descubrimiento de métodos fiables para la detección no invasiva de la EHGNA se ha convertido en una de las áreas más activas de la investigación clínica en el campo de la hepatología.

Las enzimas hepáticas *per se* no son útiles como predictores diagnósticos en la EHGNA ya que pueden ser normales hasta en un 80% de estos pacientes, por lo que la esteatosis debe identificarse inicialmente mediante técnicas de imagen. La ecografía es capaz de diagnosticar con seguridad la esteatosis moderada o grave y aporta una información hepatobiliar adicional, sin embargo, tiene una sensibilidad limitada y no detecta de manera fiable la esteatosis cuando es menor del 20% (128) o en los casos en los que los individuos tienen un IMC elevado ( $>40$  kg/m<sup>2</sup>). La RM convencional se considera el patrón de referencia, pero su coste la convierte en una prueba diagnóstica menos accesible. La RM avanzada, ya sea por espectroscopia (53) o por fracción de grasa por densidad protónica (FGDP) (54), es capaz de medir la cantidad de grasa hepática de manera objetiva y cuantitativa. Resulta útil en estudios de investigación clínica, habiendo sido validada frente a la histología demostrando ser más sensible en la detección de cambios en el contenido de grasa hepática y en la respuesta al tratamiento en ensayos clínicos. En un estudio que evaluaba la eficacia del tratamiento con ezetimib en pacientes con EHNA, se observó una reducción del 29% de la cantidad de grasa hepática, evidenciada mediante la técnica de RM-FGDP, que se correlacionaba positivamente con la mejoría de la esteatosis en el estudio histológico (129). No obstante, además de tener un coste elevado, la cuantificación del contenido de grasa carece de interés en la práctica clínica, por lo que no suele recomendarse. Otra técnica de imagen, el parámetro de atenuación controlada (CAP), permite diagnosticar la esteatosis pero tiene una capacidad limitada para la discriminación de los diferentes grados histológicos. Además, los datos de comparación del CAP con la ecografía no son concluyentes y no se ha realizado ningún

estudio de comparación con la RM (130), por lo que son necesarios más estudios para poder definir el papel del CAP en la práctica clínica. Todos estos datos indican, que la ecografía, al menos por ahora, es la técnica de imagen de elección para el diagnóstico inicial de esteatosis.

Se entiende por biomarcador aquella molécula, proteína o enzima que puede medirse objetivamente y que puede constituir un indicador de un proceso biológico normal o patológico, o puede ser de utilidad para la monitorización de la respuesta al tratamiento. En los últimos años han sido muchos los biomarcadores y algoritmos matemáticos basados en una combinación de biomarcadores que se han descrito y evaluado su utilidad para el diagnóstico de la EHGNA. Para el diagnóstico de esteatosis, concretamente, dos de los algoritmos más validados son el FLI y el HSI.

El algoritmo FLI ha demostrado ser útil con una S del 61% y una especificidad del 86% (AUROC: 0,85) (68) tras haber sido validado externamente en la población general en Europa, Asia y Norte América. No obstante, su validación se ha llevado a cabo comparándolo con el diagnóstico de esteatosis por imagen mediante ecografía en lugar de haberse validado frente al diagnóstico histológico de esteatosis. El HSI es un algoritmos sencillo que ha sido validado únicamente en la población coreana, mostrando una S del 66% y una especificidad del 69% (AUROC: 0,81) (69). En el presente trabajo de Tesis Doctoral obtuvimos los valores de FLI y HSI de cada paciente en el momento basal del estudio y comprobamos que la precisión de estos algoritmos para el diagnóstico de EHGNA en nuestra cohorte de pacientes con colelitiasis fue claramente inferior a lo

descrito previamente, con un valor de AUROC de 0,74 para el algoritmo FLI y de 0,70 para el algoritmo HSI.

El algoritmo denominado NAFLD liver fat score ha demostrado una muy buena precisión para el diagnóstico de EHGNA, alcanzando un valor de AUROC de 0,86 en una cohorte de validación de 157 pacientes con esteatosis diagnosticada por RM (73). No obstante, la utilidad de este algoritmo no ha sido validada externamente por lo que no se utiliza en la práctica clínica.

Otro algoritmo para el diagnóstico de EHGNA, denominado NAFLD ridge score, fue diseñado en la Universidad de Hong Kong e incluía las variables GPT, colesterol HDL, hemoglobina glicada, TG, recuento de leucocitos e HTA. Al validarse en la población china frente al diagnóstico de EHGNA mediante espectroscopia por RM (74) obtuvo un AUROC de 0,74, pero no ha sido posteriormente validado en otras cohortes independientes por lo que no se utiliza en la práctica clínica. (131).

El VAI (del inglés, *Visceral Adiposity Index*) (132), un biomarcador de adiposidad visceral, y el TyG (del inglés, *Triglyceride and Glucose Index*) (133), son dos biomarcadores que han demostrado estar asociados de manera independiente con el diagnóstico histológico de esteatosis en pacientes con infección por el VHC. Existen también test comerciales diseñados para el diagnóstico de esteatosis, de los que el más validado es el Steatotest (75). No obstante, no se utiliza en la práctica clínica y su principal inconveniente, coincidiendo con los biomarcadores previamente descritos, es que no tiene capacidad para diferenciar los diferentes grados de esteatosis y, por consiguiente, evaluar la respuesta a posibles tratamientos.

A la luz de estos datos, podemos afirmar que los algoritmos actualmente vigentes para el diagnóstico no invasivo de esteatosis son más sensibles que específicos, aunque no consiguen ni una S ni un VPN suficientemente óptimos como para poder considerarlos un buen test de cribado. Con el fin de identificar algoritmos más eficaces, generamos el algoritmo CINFER, descrito por primera vez en esta Tesis Doctoral, capaz de predecir de manera no invasiva y con una buena precisión la presencia de EHGNA (AUROC: 0,82) en nuestra cohorte de pacientes con colelitiasis. Al llevar a cabo la comparación entre el algoritmo CINFER, el FLI y el HSI, se puso de manifiesto un mejor rendimiento del CINFER para el diagnóstico no invasivo de la EHGNA en nuestra población de estudio, siendo especialmente destacable la mayor S del algoritmo CINFER para discriminar una EHGNA y, por tanto, podría ser de utilidad para descartar la presencia de una EHGNA en pacientes con colelitiasis con mayor fiabilidad que los algoritmos FLI y HSI.

En un estudio realizado en Francia que incluía a 125.052 pacientes hospitalizados con diagnóstico de EHGNA y/o EHNA, alrededor del 10% de los pacientes presentó cirrosis en el momento del diagnóstico, tanto compensada como descompensada. Además, el diagnóstico de EHNA se asoció con una progresión rápida de la hepatopatía y el 27,5% de los pacientes presentaron una descompensación de su cirrosis en un periodo de 7 años (134). Este escenario enfatiza la necesidad de métodos diagnósticos no invasivos que permitan distinguir la ESNA de la EHNA en pacientes con EHGNA, así como el diagnóstico temprano de fibrosis hepática significativa asociada a la EHNA.

En este aspecto, el proyecto LITMUS (del Inglés “*Liver Investigation: Testing Marker Utility in Steatohepatitis*”), une a investigadores clínicos y básicos de centros

académicos de toda Europa y de la Federación Española de la Industria Farmacéutica para lidiar con el reto de caracterizar biomarcadores que, de manera individual o combinados, puedan detectar y monitorizar la progresión o regresión de la EHGNA (135). El objetivo común de este grupo es identificar y validar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de EHGNA, EHNA y fibrosis asociada. En este contexto, LITMUS busca biomarcadores específicos que diferencien la presencia de EHNA en pacientes con diagnóstico de EHGNA, que evalúen la progresión de la EHGNA y/o que monitoricen la respuesta terapéutica y que sean capaces de predecir qué pacientes tienen un mayor riesgo de progresión a EHNA y a fibrosis hepática significativa ( $\geq$  F2) o con un mayor riesgo de mortalidad por cualquier causa. Por todo esto se espera que el proyecto LITMUS pueda aportar importantes contribuciones en el campo de la EHGNA.

Son múltiples los biomarcadores estudiados con estos mismos objetivos. Los fragmentos de citoqueratina-18 (CK-18), que se generan durante la muerte celular (fragmentos M65) o la apoptosis (fragmentos M30), tienen una exactitud modesta en el diagnóstico de la EHNA (S del 66%, especificidad del 82%) (55). Los cambios observados en los CK-18 son paralelos a la mejoría histológica, pero no dan mejores resultados que la concentración sérica de GPT en la identificación de los pacientes con respuesta histológica (136).

Pelekar y cols. (137) desarrollaron un algoritmo para el diagnóstico no invasivo de EHNA que incluía 6 variables, que son la edad, el sexo, la GOT, el IMC, la relación GOT/GPT y los valores séricos de ácido hialurónico, con el que obtuvieron un AUROC de 0,76. Otro algoritmo diseñado por Poynard y cols., el NASHTest, combinaba 13 variables

bioquímicas y clínicas (edad, sexo, altura, peso, TG, colesterol, GOT, GPT, GGT, bilirrubina total,  $\alpha$ -macroglobulina, apolipoproteína A1 y haptoglobina) para predecir la presencia o ausencia de EHNA, alcanzando una S, una E, un VPP y un VPN de 33%, 94%, 66% y 81%, respectivamente, y un AUROC de 0,79 (138). Ambos algoritmos requieren variables que no se solicitan de manera rutinaria, lo que limita su utilidad en la práctica clínica.

Las concentraciones séricas del propéptido n-terminal del colágeno tipo III (Pro-C3) reflejan la tasa de degradación de la matriz extracelular. Este biomarcador es capaz de diferenciar ESNA de EHNA y se correlaciona con la severidad de la EHNA (AUROC 0,85–0,87) y del estadio de fibrosis con un AUROC de 0,86 (95% CI 0,78–0,94) (139). En una amplia cohorte internacional de pacientes con diagnóstico histológico de EHGNA con fibrosis avanzada, el Pro-C3 mostró un AUROC de 0,83 frente al 0,73 del FIB-4 para identificar pacientes con estadio de fibrosis  $\geq$  F3 (140). Del mismo modo, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que existe un incremento en la concentración hepática y circulante de la proteína morfogenética ósea BMP2 en pacientes con diagnóstico histológico de EHGNA en comparación con individuos con HN (141). Usando la concentración sérica de BMP2 combinada con las variables edad, sexo, IMC, glucosa y GGT, se generó, mediante un modelo de regresión logística, el algoritmo denominado SAN (del inglés, *Screening Algorithm for NASH*), con una muy buena precisión para el diagnóstico no invasivo de la EHGNA (AUROC: 0,88). Una vez más, una de las variables necesarias para el cálculo de Pro-C3 o del SAN no se determina de forma rutinaria, lo que dificulta su utilización en la práctica clínica.

El test OWLiver es un algoritmo de diagnóstico que combina 25 metabolitos junto con el ICM del paciente. Se trata de un test metabolómico comercial que ha sido desarrollado para discriminar entre hígado sano y EHGNA, así como entre ESNA y EHNA (142), en adultos con un IMC >25 y con sospecha clínica de EHNA. Tras ser validado en una cohorte de 197 pacientes (7 con HN, 109 con EHGNA y 76 con EHNA) obtuvo un AUROC de 0,79 (143). En el momento actual, su coste elevado limita su inclusión dentro de las pruebas disponibles al alcance de los profesionales sanitarios.

A pesar de este amplio repertorio de biomarcadores estudiados, a día de hoy ninguno de ellos ha sido validado para el diagnóstico de EHNA en la población general, por lo que la biopsia hepática continúa siendo esencial para un diagnóstico de certeza. En este aspecto, uno de los hallazgos más novedosos del presente trabajo de Tesis Doctoral es la identificación de 3 variables independientes asociadas de manera estadísticamente significativa a la EHNA en pacientes con colelitiasis, que son el IMC, la GPT y la insulina, las cuales conforman el algoritmo matemático INTRIN, capaz de predecir la presencia de EHNA en pacientes con colelitiasis con una precisión aceptable (AUROC 0,76). Los valores de las variables que son necesarios para calcular este algoritmo, descrito por primera vez en esta Tesis Doctoral, se obtienen fácilmente en la evaluación preoperatoria de los pacientes candidatos a colecistectomía por colelitiasis. No obstante, dado que los valores de AUROC del algoritmo INTRIN no son óptimos, es necesario que este algoritmo sea validado en cohortes más grandes e independientes de pacientes con colelitiasis antes de recomendar su implementación en la práctica clínica. En cualquier caso, el algoritmo INTRIN podría ser de utilidad identificando en el preoperatorio a los pacientes con

colecistitis que tienen un alto riesgo de EHNA, a los que se les indicaría la realización de una biopsia hepática durante la colecistectomía laparoscópica con el fin de confirmar el diagnóstico e iniciar una intervención terapéutica temprana dirigida a prevenir o atenuar la progresión de una potencial EHNA.

Teniendo en cuenta que una proporción considerable de pacientes con EHNA puede progresar a estadios avanzados de fibrosis hepática (14), es importante disponer de métodos diagnósticos accesibles y fiables. En este aspecto, la tendencia en el momento actual para la predicción y el diagnóstico de fibrosis hepática se centra en el desarrollo de algoritmos que incluyen una combinación de distintos marcadores serológicos (144). Es más, diversos estudios han demostrado que el empleo de estos algoritmos podría evitar el 38-80% de las biopsias hepáticas realizadas (145,146).

Se han descrito un buen número de algoritmos basados en combinaciones de marcadores séricos que se han mostrado eficaces para el diagnóstico no invasivo de fibrosis hepática (147). Los algoritmos FIB-4 y NFS han sido validadas externamente en poblaciones con EHNA de orígenes étnicos diferentes, con resultados uniformes. El algoritmo FIB-4 tiene un AUROC que oscila entre 0,80-0,86 con una S de 0,84, una E de 0,68, VPN 0,95 y un VPP de 0,70 (148). No obstante, diferentes estudios han argumentado que la inclusión de la edad en el algoritmo FIB-4 implica un incremento de falsos positivos en los pacientes de más edad (149). El NFS predice fibrosis avanzada en pacientes con EHNA con un AUROC de 0,77 (S de 0,82, E de 0,77, VPN de 0,93 y de VPP 0,93), sin embargo, tiene un valor limitado para predecir cambios en el estadio de fibrosis, pero predice de manera precisa la morbilidad y mortalidad en todos los estadios de fibrosis

(150). En el presente trabajo de Tesis Doctoral analizamos la precisión diagnóstica de estos 2 algoritmos en nuestra cohorte de pacientes con colelitiasis. Nuestros resultados mostraron que un FIB-4  $<1,45$  tuvo un VPN de 95,1% para fibrosis avanzada ( $\geq F3$ ). En contraste, un FIB-4  $>3,25$  no obtuvo un VPP para fibrosis avanzada ya que ninguno de nuestros pacientes con EHGNA y fibrosis avanzada tuvo un valor en ese rango. Cabe destacar que únicamente el 10% de pacientes con EHGNA tuvieron un valor de FIB-4 indeterminado (1,45-3,25). Por otro lado, el algoritmo NFS fue igualmente un buen predictor de ausencia de fibrosis avanzada, ya que un valor  $<-1,455$  obtuvo un VPN de 94% para fibrosis avanzada. De manera similar, el NFS no obtuvo un VPP para fibrosis avanzada ya que ninguno de nuestros pacientes con EHGNA con fibrosis avanzada tuvo un NFS  $>0,625$ . En este caso, el 25% de pacientes con EHGNA tuvieron un valor de NFS indeterminado (-1,455-0,625). Estos resultados demuestran que los algoritmos FIB-4 y el NFS tienen un mejor rendimiento para diferenciar la fibrosis avanzada ( $\geq F3$ ) de la ausencia de fibrosis significativa (F0-F1) en nuestra cohorte de pacientes con colelitiasis, en consonancia con lo publicado al respecto (151,152). En consecuencia, estos algoritmos pueden usarse de manera fiable para una estratificación de primera línea del riesgo, con objeto de descartar la presencia de una fibrosis hepática avanzad (F3-F4). No obstante, los valores predictivos dependen de las tasas de prevalencia y la mayoría de estos estudios se han realizado en cohortes de pacientes con EHGNA diagnosticados en hospitales terciarios, en los que la probabilidad pre-test de una fibrosis hepática avanzada es superior a la existente en la comunidad.

El algoritmo diseñado recientemente por el grupo español para el estudio de la enfermedad hepática grasa, el HFS, ha demostrado ser capaz de identificar pacientes con fibrosis avanzada con un alto grado de especificidad (0,97) tras su validación en una población de 2452 pacientes de América, Europa y Asia, con una S de 0,74, un VPN de 0,92, un VPP de 0,76 con un AUROC de 0,94 (153). Según los resultados de HFS obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, de los 221 pacientes con un valor de HFS  $<0,12$ , hubo 212 (95,9%) que tenían un estadio de fibrosis F0-F1, pero arrojó falsos negativos en 9 pacientes con fibrosis significativa ( $\geq F2$ ). Sin embargo, la mayoría de los pacientes con valores indeterminados del HFS (0,12 – 0,47) o con valores superiores a 0,47 no tenían fibrosis en el estudio histológico, lo que indica que la capacidad del algoritmo HFS para discriminar entre diferentes estadios de fibrosis demostró ser limitada en nuestra cohorte de pacientes con colelitiasis, aunque hay que tener en cuenta que había pocos casos de fibrosis hepática significativa en la población de estudio.

El test ELF (del inglés, *Enhanced Liver Fibrosis*) incluye una combinación de biomarcadores de fibrogénesis hepática no disponibles de forma rutinaria en la práctica clínica, como los niveles serológicos de ácido hialurónico, el inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP1) y el péptido aminoterminal del pro-colageno 3 (PIIINP). Inicialmente se diseñó para predecir fibrosis avanzada en niños y adultos con diagnóstico de EHGNA (154). Posteriormente se describió el test ELF simplificado al excluir la edad del algoritmo, demostrando una excelente capacidad para la predicción de fibrosis en pacientes con EHGNA con un AUROC de 0,9. La inclusión de 5 nuevos parámetros en los cálculos (IMC, número de plaquetas, presencia de DM2, niveles séricos de albúmina y la

relación GOT/GPT) mejoró sus resultados obteniendo un AUROC de 0,98, motivo por el que se plantea su utilidad como test de cribado de fibrosis avanzada, considerándose que podría llegar a reducir la necesidad de biopsia hepática en un 60% (82). Su principal limitación es su elevado coste.

Muy recientemente se han publicado los resultados de un estudio multicéntrico que incluyó 250 pacientes con diagnóstico histológico de EHGNA con o sin EHNA y/o fibrosis, en el que se han identificado dos proteínas de las células monocíticas, la PLIN2 y la RAB14, capaces de predecir la presencia de EHNA y el estadio de fibrosis, respectivamente, permitiendo así el desarrollo de dos nuevos algoritmos (155). El algoritmo para el diagnóstico de EHNA combina la intensidad de fluorescencia media de PLIN2 con los valores de PCI, de TG, de GPT y la presencia o ausencia de DM2 con una S del 88% y una E del 100%, así como un AUROC del 97,8 % (IC al 95,8% to 99,8%). El algoritmo para el diagnóstico de fibrosis incluye la intensidad de fluorescencia media de RAB14 junto con la edad, el PCI, los niveles séricos de colesterol LDL y de GPT, así como el nivel plasmático de glucosa para predecir la presencia de fibrosis con un AUROC del 99,3%, una S y E de 99% y 89.6%, respectivamente. Este nuevo algoritmo ha demostrado ser superior a los algoritmos FIB-4, NFS y el índice APRI para el diagnóstico de fibrosis, con una precisión diagnóstica comparable a la elastografía 2D-SWE. Serán necesarios más estudios clínicos en distintas cohortes de pacientes con EHGNA para validar sus prometedores resultados.

En la última década se ha extendido el uso de métodos elastográficos para el diagnóstico de fibrosis hepática. El método más utilizado en nuestro medio, el FibroScan®,

ha presentado unos valores de AUROC para el diagnóstico de fibrosis avanzada ( $\geq$  F3) utilizando la sonda M y XL de 0,88 y de 0,85, respectivamente. No obstante, también tiene sus limitaciones. En una serie europea no seleccionada, hasta un 20% de las exploraciones produjeron resultados poco fiables (156), sobre todo en pacientes obesos, y se debe interpretar con precaución en pacientes con hipertransaminasemia, congestión sinusoidal o colestasis extrahepática. La elastografía de punto de onda de corte o pSWE (del inglés, *Point Shear Wave Elastography*), también conocida como ARFI (del inglés, *Acoustic Radiation Force Impulse*) es una técnica de elastografía integrada en un ecógrafo que estudia la elasticidad de los tejidos mediante la medición de la velocidad de cizallamiento en una región de interés (157). La velocidad de cizallamiento se relaciona con las propiedades visco-elásticas de los tejidos ya que aumenta al aumentar la rigidez del tejido hepático. De manera similar que la ET, es más precisa en diagnosticar estadios de fibrosis F4 que estadios F3. De todos modos, ARFI no ha sido evaluada de manera extensa para el diagnóstico de EHNA. Son necesarios más estudios para determinar la utilidad de ARFI y para dilucidar las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos en el lóbulo hepático derecho con respecto al izquierdo.

La elastografía por RM, al igual que aquellas que emplean ultrasonidos, es capaz de determinar la rigidez hepática a través del análisis de ondas mecánicas transmitidas a través del tejido hepático. Utiliza un método de contraste para mostrar la propagación de la onda de cizallamiento en el hígado, por lo que no se ve influenciada por el fenotipo del paciente, como el grosor de la pared abdominal o la obesidad (158). En un meta-análisis que agrupó 9 estudios en los que se incluyeron un total de 232 pacientes con EHNA, la

elastografía por RM fue capaz de evaluar la fibrosis hepática con un elevado nivel de precisión, independientemente de la inflamación histológica y del IMC de los pacientes, con un AUROC de 0,86-0,91 para todos los estadios de fibrosis (159). A la luz de estos resultados, se considera el método más preciso para el diagnóstico no invasivo de fibrosis hepática, pero su uso está limitado por su coste elevado, por su escasa disponibilidad y por el tiempo necesario para realizar la prueba.

En resumen, es esencial diagnosticar precozmente la EHGNA antes de la aparición de formas clínicas potencialmente fibrogénicas que pueden progresar a cirrosis y CHC. Para ello, utilizando algoritmos sencillos y eficaces, se deben implementar programas de cribado en poblaciones con un alto riesgo de fibrosis hepática significativa, como los pacientes con DM2 entre otros, algo que continúa siendo una necesidad sanitaria no cubierta.

### **5.3. Historia natural de los pacientes con EHGNA en pacientes con colelitiasis: morbilidad y mortalidad.**

Hay una evidencia creciente de que los pacientes con EHNA, particularmente aquellos con fibrosis hepática avanzada, tienen mayores tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a causas cardiovasculares y hepáticas (45,46,160,161). Con objeto de conocer la morbilidad asociada a la presencia de EHGNA en pacientes con colelitiasis, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se registró la incidencia de comorbilidades metabólicas, cardiovasculares, neoplásicas y otras como la ERC y el SAOS tras un periodo medio de 88 meses después de la biopsia hepática inicial. Igualmente se registraron los casos de muerte

y sus causas para conocer la tasa de mortalidad en nuestra cohorte de pacientes con colelitiasis. No obstante, debido al pequeño número de eventos clínicos significativos observado en el periodo mencionado no se han podido utilizar herramientas estadísticas robustas como el método de Kaplan Meier o la regresión de Cox, pero hemos observado una mayor tendencia a la aparición de comorbilidades en aquellos pacientes con colelitiasis que tenían un diagnóstico histológico de EHGNA o de EHNA al inicio del estudio, en línea con lo publicado hasta ahora (162).

Es un hecho bien conocido que la DM2 se asocia de manera muy significativa con la EHGNA, detectándose en el 34%-75% de estos pacientes (3), y que frecuentemente coexisten incrementando el riesgo de desarrollo de comorbilidades, tanto hepáticas como extrahepáticas. En un amplio estudio prospectivo llevado a cabo por Loomba y cols. con pacientes diagnosticados de EHGNA mediante biopsia hepática, concluyeron que la DM2 influía en la evolución de la EHGNA siendo uno de los factores de riesgo más importantes en acelerar su progresión a estadios avanzados de fibrosis hepática e incluso favoreciendo la aparición de CHC (12,163). Por otro lado, un meta-análisis reciente que incluyó 33 estudios observacionales demostró que los pacientes con EHGNA y fibrosis hepática significativa tenían un mayor riesgo de desarrollar una DM2 (164), independientemente de la presencia de obesidad u otros factores de riesgo metabólico, de tal manera que pacientes con estadios más avanzados de fibrosis hepática tenían un mayor riesgo de desarrollar una DM2 (165). Al final de nuestro estudio, un total de 15 pacientes presentaban una DM2, de los cuáles el 66,6% (10 de 15) tenían signos histológicos de EHGNA (9 con ESNA y 1 con EHNA) en la biopsia hepática inicial.

Hay pocos estudios que evalúen la relación existente entre HTA y EHGNA. En un estudio poblacional llevado a cabo por López-Suárez y cols (166), la prevalencia de EHGNA fue del 50 % entre pacientes con HTA, mientras que en otro estudio epidemiológico dirigido por Liao y cols. la prevalencia de HTA fue significativamente mayor en pacientes con EHGNA comparados con aquellos que no la tenían (167). Estos resultados demuestran que se trata de una relación bidireccional, independientemente de la presencia de otros componentes del SMet como la obesidad o la DM2 (117). En el presente trabajo de Tesis Doctoral encontramos que 33 pacientes con colelitiasis fueron diagnosticados de HTA durante el seguimiento, más de la mitad (57,6%, 19 de 33) en los primeros 5 años, de los cuales el 45,5% (15 de 33) tenían una ESNA y el 15,2% (5 de 33) tenían una EHNA en la biopsia hepática inicial. Un aspecto a tener en cuenta es que la presencia de HTA se asocia a un empeoramiento de la fibrosis, según los resultados de un meta-análisis que incluyó estudios que emplearon la biopsia hepática para evaluar el estadio de fibrosis en la EHGNA (168), por lo que parece razonable que, debido al mayor riesgo de progresión de la enfermedad, los pacientes hipertensos con EHGNA deben ser seguidos más estrechamente.

Por otro lado, un total de 26 pacientes desarrollaron dislipemia a lo largo del estudio, más de la mitad (16 de 26) tenían un diagnóstico histológico de EHGNA (12 con ESNA y con 3 EHNA) en la biopsia hepática realizada al inicio del estudio. Estos resultados van en consonancia con la literatura científica vigente, en la que diversos estudios demuestran que, al igual que otros factores integrantes del SMet, la EHGNA está relacionada con el desarrollo de dislipemia (169). Un aspecto destacable es que la

dislipemia, a su vez, se comporta como uno de los principales factores de riesgo de ECV, una de las comorbilidades más frecuentes en los pacientes con EHGNA y la principal causa de mortalidad en estos pacientes (170). La prevalencia e incidencia de ECV es superior en los pacientes con EHGNA en comparación con los controles sanos. Aunque inicialmente se asumió que la asociación entre EHGNA y ECV se debía a la mayor prevalencia de los componentes del SMet (171), en estudios observacionales en los que el análisis se realizó ajustando por factores de confusión metabólicos, la asociación de EHGNA y ECV se mantuvo estadísticamente significativa (172,173). En el presente trabajo de Tesis Doctoral, 3 pacientes tuvieron un infarto de miocardio, 1 paciente tuvo un episodio de angina inestable, y otros 5 pacientes tuvieron un ACVA isquémico durante el seguimiento. De estos 9 pacientes que desarrollaron ECV a lo largo del estudio, un total de 7 pacientes (77,8%) tenían un diagnóstico histológico de EHGNA en la biopsia hepática inicial, de los cuales 4 tenían ESNA y 3 EHNA.

Existe una evidencia científica creciente que relaciona la presencia de EHGNA con la aparición de neoplasias, tanto de origen hepático como extrahepático (174). Los datos no son homogéneos en cuanto al tipo de cáncer más frecuente, entre los que se encuentran el cáncer de colon (164), el cáncer de tiroides, el cáncer de páncreas (175) o el colangiocarcinoma (174). Un total de 18 pacientes de la cohorte analizada fueron diagnosticados de cáncer a lo largo del seguimiento, de los que 4 casos fueron neoplasias de origen digestivo (2 de ellas de origen hepático y 2 de origen extrahepático), la mayoría (75%) en pacientes con un diagnóstico de EHGNA en la biopsia hepática basal. La neoplasia diagnosticada con más frecuencia fue el adenocarcinoma de mama, que se

registró en 6 de los 18 pacientes, la mayoría (4 de 6) en pacientes con un hígado histológicamente normal al inicio del estudio.

En los últimos años se ha observado un marcado interés en conocer la relación existente entre la EHGNA y la ERC. Un meta-análisis llevado a cabo por Musso y cols. que incluyó 23 estudios clínicos evidenció que la EHGNA se asociaba con una mayor prevalencia e incidencia de ERC (176), pudiéndose observar hasta en un 20-50% de los pacientes con EHGNA, fundamentalmente en pacientes con EHNA demostrada mediante biopsia. Además, la gravedad de la hepatopatía en la EHGNA se asociaba con un mayor riesgo y gravedad de la ERC, independientemente de la presencia de DM2, de obesidad o de RI, así como de otros factores de riesgo tradicionalmente asociados con la ERC. Fueron 4 los pacientes que desarrollaron una ERC durante el seguimiento de nuestro estudio, 3 de ellos con EHGNA (2 con ESNA y 1 con EHNA).

Existe una creciente evidencia científica que relaciona el SAOS con la aparición y progresión de la EHGNA. En una revisión reciente llevada a cabo por nuestro equipo de investigación se estudió el impacto de la hipoxia en los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la esteatosis hepática (177). En ella, los resultados obtenidos en los distintos estudios incluidos, tanto clínicos como experimentales, confirmaron esta relación y evidenciaron que la severidad de la hipoxia intermitente que experimentan los pacientes con SAOS predice la severidad de la EHGNA en la biopsia hepática. A lo largo del seguimiento de nuestro estudio, un total de 9 pacientes desarrollaron un SAOS, de los cuales 6 tenían un diagnóstico histológico de EHGNA en la biopsia hepática inicial.

Es bien sabido que la EHGNA se asocia con una mayor tasa de mortalidad global en comparación con la población general (178). En un estudio prospectivo reciente en el que se incluyeron 1773 pacientes con diagnóstico histológico de EHGNA se observó que la tasa de mortalidad aumentaba con el incremento del estadio de fibrosis, siendo el estadio de fibrosis el principal factor de riesgo asociado (161). Son varios los estudios que concluyen que la principal causa de muerte en pacientes con EHGNA es la ECV, seguida en frecuencia por el cáncer y la hepatopatía (161,164,174). En nuestro estudio se registraron un total de 5 muertes, 4 de las cuales se produjeron en pacientes con un diagnóstico histológico de EHGNA en la biopsia hepática realizada al inicio del estudio y las 4 fueron por causa oncológica.

#### **5.4. Fortalezas y limitaciones.**

Son varias las fortalezas del presente trabajo de Tesis Doctoral. Una de ellas es su diseño prospectivo con 2 fases bien diferenciadas, un estudio transversal y otro longitudinal con un seguimiento medio de más de 7 años. Otro aspecto importante es que se ha estudiado una amplia cohorte de pacientes con colelitiasis en la que el diagnóstico de EHGNA se llevó a cabo mediante biopsia hepática, considerada el patrón de referencia, a diferencia de la mayoría de los estudios clínicos previos en los que el diagnóstico se llevó a cabo por imagen o empleando algoritmos no invasivos. Es interesante recalcar que las biopsias hepáticas se valoraron por un único patólogo experto en histopatología hepática, el cual realizó el diagnóstico histopatológico teniendo en cuenta criterios validados internacionalmente. Algo enriquecedor desde el punto de vista de la práctica clínica es la

incorporación de algoritmos no invasivos de esteatosis y de fibrosis en la valoración inicial de los pacientes con EHGNA. Lo más novedoso del presente trabajo de Tesis Doctoral es la descripción de nuevos algoritmos matemáticos para el diagnóstico no invasivo de EHGNA (algoritmo CINFER) y de EHNA (algoritmo INTRIN) que han demostrado un buen rendimiento en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis, cuya utilidad en la práctica clínica deberá ser validada en posteriores estudios clínicos en cohortes independientes de pacientes con colelitiasis.

A pesar de las fortalezas descritas, es necesario interpretar nuestros hallazgos considerando una serie de limitaciones. Un hecho a tener en cuenta es que no se pudo obtener datos del seguimiento de 37 pacientes de los 242 incluidos en el estudio (15,3%). Para asegurar que este hecho no provocó un sesgo por pérdida de seguimiento disminuyendo así la potencia del estudio, se analizó si dichas pérdidas eran homogéneas. Para ello, por un lado se calculó la prevalencia de los 3 escenarios histológicos posibles (HN, ESNA y EHNA) en el estudio transversal y en el estudio longitudinal, comprobando que la distribución en ambas cohortes se mantenía similar, y por otro lado se seleccionaron aquellas variables significativas en el estudio transversal y se comprobó que seguían siendo significativas en el estudio longitudinal. Por estos motivos podemos concluir que las pérdidas son homogéneas y por lo tanto la muestra resultante en el estudio longitudinal es representativa de la cohorte inicial a pesar de las pérdidas descritas. Otra limitación es el reducido número de pacientes con fibrosis avanzada ( $\geq$  F3), así como también el número de eventos clínicos extrahepáticos y de muertes registrados a lo largo del estudio. Si bien ambas situaciones se observaron con mayor frecuencia en pacientes con EHGNA, al

tratarse de un número escaso de eventos de estudio no se pudieron llevar a cabo análisis estadísticos robustos que nos permitieran obtener resultados sólidos en relación con la incidencia de comorbilidades y con la tasa de moratalidad asociadas a la EHGNA en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis.

## **CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral derivan las conclusiones que se exponen a continuación:

1. La prevalencia de EHGNA en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis fue del 49,6%, superior al 25% estimado en la población general, mientras que la prevalencia de EHNA fue del 9,9%, similar a la considerada en la población general (12,2%).
2. Se ha generado un nuevo algoritmo, denominado CINFER, para el diagnóstico no invasivo de EHGNA en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis, el cual combina las variables PCI y ferritina, mostrando una buena eficacia diagnóstica (AUROC 0,82).
3. El algoritmo CINFER mostró un mejor rendimiento para el diagnóstico no invasivo de EHGNA en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis que los algoritmos FLI y HSI (AUROC 0,82 frente a 0,74 y 0,70, respectivamente).
4. Se ha generado un nuevo algoritmo, denominado INTRIN, para el diagnóstico no invasivo de EHNA en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis, el cual combina las variables IMC, GPT e insulina, mostrando una aceptable eficacia diagnóstica (AUROC 0,76).
5. Los algoritmos FIB-4, NFS y HFS mostraron un alto valor predictivo negativo para fibrosis hepática avanzada ( $\geq$  F3) del 95,1%, 94% y 96%, respectivamente, en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis.

6. La prevalencia de comorbilidades metabólicas, cardiovasculares, renales y respiratorias, así como la de neoplasias digestivas en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis fue más alta en los pacientes con EHGNA que en aquellos con un hígado histológicamente normal.
7. La mortalidad en la cohorte estudiada de pacientes con colelitiasis fue más alta en los pacientes con EHGNA que en aquellos con un hígado histológicamente normal.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Younossi ZM, Stepanova M, Younossi Y, Golabi P, Mishra A, Rafiq N, et al. Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. *Gut*. 1 de marzo de 2020;69(3):564-8.
2. Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem. *Clin Med*. abril de 2011;11(2):176-8.
3. Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci*. abril de 2013;1281:106-22.
4. Romero-Gómez M, Ampuero J. Looking for a new name for non-alcoholic fatty liver disease in Spanish: esteatosis hepática metabólica (EHmet). *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig*. marzo de 2021;113(3):161-3.
5. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 1 de julio de 2020;73(1):202-9.
6. Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 1 de noviembre de 2015;13(12):2062-70.
7. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Sharma BC, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019;69(6):2672-82.
8. Mary E. Rinella. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review | Endocrinology | JAMA | JAMA Network. 2015. junio de 2015;313(22):2263-73.
9. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Gastroenterology*. noviembre de 2013;10(11):686-90.
10. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 1 de enero de 2011;140(1):124-31.
11. Ching-Yeung Yu B, Kwok D, Wong VWS. Magnitude of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Eastern Perspective. *J Clin Exp Hepatol*. 1 de julio de 2019;9(4):491-6.
12. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.

13. Caballeria L. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* junio de 2009;22:24-32.
14. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes: *HEPATOLOGY*, Vol. XX, No. X 2016. *Hepatology.* julio de 2016;64(1):73-84.
15. Tsuneto A, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Ichimaru S, Nakashima E, et al. Fatty liver incidence and predictive variables. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* junio de 2010;33(6):638-43.
16. Chang Y, Jung HS, Cho J, Zhang Y, Yun KE, Lazo M, et al. Metabolically Healthy Obesity and the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(8):1133-40.
17. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two «hits»? *Gastroenterology.* abril de 1998;114(4):842-5.
18. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell.* 13 de mayo de 2021;184(10):2537-64.
19. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatol Baltim Md.* febrero de 2006;43(2 Suppl 1):S99-112.
20. Lann D, LeRoith D. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med Clin North Am.* noviembre de 2007;91(6):1063-77, viii.
21. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys.* 2000;32 Spring:73-87.
22. Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol.* abril de 2010;52(4):586-93.
23. Wei Y, Wang D, Gentile CL, Pagliassotti MJ. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Mol Cell Biochem.* noviembre de 2009;331(1-2):31-40.
24. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* mayo de 2009;24(5):830-40.

25. García-Monzón C, Lo Iacono O, Mayoral R, González-Rodríguez A, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, et al. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J Hepatol.* enero de 2011;54(1):142-52.
26. Pardo V, González-Rodríguez Á, Muntané J, Kozma SC, Valverde ÁM. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* junio de 2015;80:298-309.
27. Rada P, González-Rodríguez Á, García-Monzón C, Valverde ÁM. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis.* septiembre de 2020;11(9):802.
28. Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology.* noviembre de 2006;49(5):450-65.
29. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, et al. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;42(3):641-9.
30. Brunt EM. Non-alcoholic fatty liver disease: what's new under the microscope? *Gut.* 1 de agosto de 2011;60(8):1152-8.
31. Fukusato T, Fukushima J, Shiga J, Takahashi Y, Nakano T, Maeyama S, et al. Interobserver variation in the histopathological assessment of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 1 de octubre de 2005;33(2):122-7.
32. Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years [*Hepatology* 1990; 11:74–80]. *J Hepatol.* 1 de abril de 2004;40(4):578-84.
33. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2004;40(2):475-83.
34. Brunt EM, Ramrakhiani S, Cordes BG, Neuschwander-Tetri BA, Janney CG, Bacon BR, et al. Concurrence of Histologic Features of Steatohepatitis with Other Forms of Chronic Liver Disease. *Mod Pathol.* 1 de enero de 2003;16(1):49-56.
35. N A, R DV, A A, L Y, R L, Ae F, et al. Development and Validation of a New Histological Score for Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol.* diciembre de 2012;57(6):1312-8.

36. García-Monzón C, Vargas-Castrillón J, Porrero JL, Alonso MT, Bonachía O, Castillo MJ, et al. Prevalence and risk factors for biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort of adult patients with gallstones. *Liver Int.* 2015;35(8):1983-91.
37. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 1 de abril de 2015;13(4):643-654.e9.
38. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AMS, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* agosto de 2009;51(2):371-9.
39. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 1 de febrero de 2009;7(2):234-8.
40. Caussy C, Soni M, Cui J, Bettencourt R, Schork N, Chen CH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease with cirrhosis increases familial risk for advanced fibrosis. *J Clin Invest.* 30 de junio de 2017;127(7):2697-704.
41. Stender S, Loomba R. PNPLA3 Genotype and Risk of Liver and All-Cause Mortality. *Hepatology.* 2020;71(3):777-9.
42. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk for Hepatocellular Cancer, Based on Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 1 de diciembre de 2012;10(12):1342-1359.e2.
43. Kawada N, Imanaka K, Kawaguchi T, Tamai C, Ishihara R, Matsunaga T, et al. Hepatocellular carcinoma arising from non-cirrhotic nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 12 de agosto de 2009;44(12):1190.
44. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology.* 2013;57(4):1357-65.
45. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatol Baltim Md.* mayo de 2015;61(5):1547-54.
46. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 1 de agosto de 2015;149(2):389-397.e10.

47. Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology*. 1 de julio de 2005;129(1):113-21.
48. Durand F, Pavesi M, Cheung R. Liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis in Europe: Where do we stand? *J Hepatol*. agosto de 2019;71(2):240-2.
49. Digital P. Cuáles son las principales causas de trasplante hepático [Internet]. *IM Medico*. 2023 [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.immedicohospitalario.es/noticia/37310/cuales-son-las-principales-causas-de-trasplante-hepatico.html>
50. Spengler EK, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clin Proc*. 1 de septiembre de 2015;90(9):1233-46.
51. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37(6):1286-92.
52. Hernaez R, Yeung E, Clark JM, Kowdley KV, Brancati FL, Kao WHL. Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. noviembre de 2011;55(5):1079-85.
53. Reeder SB, Cruite I, Hamilton G, Sirlin CB. Quantitative Assessment of Liver Fat with Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *J Magn Reson Imaging JMRI*. octubre de 2011;34(4):729-49.
54. Idilman IS, Keskin O, Celik A, Savas B, Elhan AH, Idilman R, et al. A comparison of liver fat content as determined by magnetic resonance imaging-proton density fat fraction and MRS versus liver histology in non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Radiol Stockh Swed* 1987. marzo de 2016;57(3):271-8.
55. Kwok R, Tse YK, Wong GLH, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease – the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(3):254-69.
56. Wong VWS, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GLH, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. agosto de 2018;15(8):461-78.
57. Puigvehí M, Broquetas T, Coll S, Garcia-Retortillo M, Cañete N, Fernández R, et al. Impact of anthropometric features on the applicability and accuracy of FibroScan®

- (M and XL) in overweight/obese patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(10):1746-53.
58. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009;49(3):1017-44.
59. Kleiner D, Brunt E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathologic Patterns and Biopsy Evaluation in Clinical Research. *Semin Liver Dis*. febrero de 2012;32(01):003-13.
60. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1 de septiembre de 1999;94(9):2467-74.
61. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
62. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011;53(3):810-20.
63. Bedossa P. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565-75.
64. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
65. Nascimbeni F, Bedossa P, Fedchuk L, Pais R, Charlotte F, Lebray P, et al. Clinical validation of the FLIP algorithm and the SAF score in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 1 de mayo de 2020;72(5):828-38.
66. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(10):1209-22.
67. Anstee QM, Lawitz EJ, Alkhoury N, Wong VWS, Romero-Gomez M, Okanoue T, et al. Noninvasive Tests Accurately Identify Advanced Fibrosis due to NASH: Baseline Data From the S<sup>TELL</sup>LAR Trials. *Hepatology*. 2019;70(5):1521-30.
68. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2 de noviembre de 2006;6:33.

69. Lee JH, Kim D, Kim HJ, Lee CH, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. julio de 2010;42(7):503-8.
70. Wang J, Xu C, Xun Y, Lu Z, Shi J, Yu C, et al. ZJU index: a novel model for predicting nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese population. *Sci Rep*. 16 de noviembre de 2015;5(1):16494.
71. McHenry S, Park Y, Browning JD, Sayuk G, Davidson NO. Dallas Steatosis Index Identifies Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. agosto de 2020;18(9):2073-2080.e7.
72. Long MT, Pedley A, Colantonio LD, Massaro JM, Hoffmann U, Muntner P, et al. Development and Validation of the Framingham Steatosis Index to Identify Persons With Hepatic Steatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. agosto de 2016;14(8):1172-1180.e2.
73. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*. septiembre de 2009;137(3):865-72.
74. Yip TCF, Ma AJ, Wong VWS, Tse YK, Chan HLY, Yuen PC, et al. Laboratory parameter-based machine learning model for excluding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the general population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(4):447-56.
75. Poynard T, Lassailly G, Diaz E, Clement K, Caiazzo R, Tordjman J, et al. Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PloS One*. 2012;7(3):e30325.
76. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. octubre de 2009;7(10):1104-12.
77. Wai CT, Greenon 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(2):518-26.
78. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 1 de abril de 2007;45(4):846-54.

79. Ampuero J, Pais R, Aller R, Gallego-Durán R, Crespo J, García-Monzón C, et al. Development and Validation of Hepamet Fibrosis Scoring System A Simple, Noninvasive Test to Identify Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease With Advanced Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 10 de junio de 2019;18(1):216-25.
80. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*. julio de 2007;46(1):32-6.
81. Ampuero J, Aller R, Gallego-Durán R, Banales J, Crespo J, Vilar-Gomez E, et al. Hepamet Score: a new non-invasive method for NAFLD-related fibrosis screening in clinical practice. *J Hepatol*. abril de 2018;68:S97-8.
82. Pinzani M. The ELF panel: a new crystal ball in hepatology? *Gut*. 1 de septiembre de 2010;59(9):1165-7.
83. Hartl L, Elias J, Prager G, Reiberger T, Unger LW. Individualized treatment options for patients with non-cirrhotic and cirrhotic liver disease. *World J Gastroenterol*. 21 de mayo de 2021;27(19):2281-98.
84. Peng L, Wang J, Li F. Weight reduction for non-alcoholic fatty liver disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 15 de junio de 2011;(6):CD003619.
85. Uusitupa M. Lifestyle changes and cardiovascular risk reduction in diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. noviembre de 2016;4(11):877-8.
86. Lazo M, Solga SF, Horska A, Bonekamp S, Diehl AM, Brancati FL, et al. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. octubre de 2010;33(10):2156-63.
87. Suzuki A, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, et al. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. diciembre de 2005;43(6):1060-6.
88. Wong VWS, Wong GLH, Chan RSM, Shu SST, Cheung BHK, Li LS, et al. Beneficial effects of lifestyle intervention in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. diciembre de 2018;69(6):1349-56.
89. Drew L. Drug development: Sprint finish. *Nature*. 23 de noviembre de 2017;551(7681).
90. Eslam M, Alvaní R, Shiha G. Obeticholic acid: towards first approval for NASH. *Lancet Lond Engl*. 14 de diciembre de 2019;394(10215):2131-3.

91. Jalili R, Somi MH, Hosseinfard H, Salehnia F, Ghojazadeh M, Makhdami N, et al. The Evaluation of Effective Drugs for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Adv Pharm Bull.* septiembre de 2020;10(4):542-55.
92. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 14 de diciembre de 2019;394(10215):2184-96.
93. Francque SM, Bedossa P, Ratziu V, Anstee QM, Bugianesi E, Sanyal AJ, et al. A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *N Engl J Med.* 21 de octubre de 2021;385(17):1547-58.
94. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;59(3):1174-97.
95. VanWagner LB, Rinella ME. Extrahepatic Manifestations of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Hepatol Rep.* junio de 2016;15(2):75-85.
96. Li AA, Ahmed A, Kim D. Extrahepatic Manifestations of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gut Liver.* 15 de marzo de 2020;14(2):168-78.
97. Ampuero J, Aller R, Gallego-Durán R, Crespo J, Calleja JL, García-Monzón C, et al. Significant fibrosis predicts new-onset diabetes mellitus and arterial hypertension in patients with NASH. *J Hepatol.* julio de 2020;73(1):17-25.
98. Isaza SC, Del Pozo-Maroto E, Domínguez-Alcón L, Elbouayadi L, González-Rodríguez Á, García-Monzón C. Hypoxia and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Med.* 2020;7:578001.
99. Musso G, Cassader M, Olivetti C, Rosina F, Carbone G, Gambino R. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* mayo de 2013;14(5):417-31.
100. Rey E, Meléndez-Rodríguez F, Marañón P, Gil-Valle M, Carrasco AG, Torres-Capelli M, et al. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36. *Liver Int.* 2020;40(10):2553-67.
101. Nervi F, Miquel JF, Alvarez M, Ferreccio C, García-Zattera MJ, González R, et al. Gallbladder disease is associated with insulin resistance in a high risk Hispanic population. *J Hepatol.* 1 de agosto de 2006;45(2):299-305.

102. Yener O, Aksoy F, Demir M, Özçelik A, Erengül C. Gallstones associated with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome. *Turk J Gastroenterol Off J Turk Soc Gastroenterol.* diciembre de 2010;21(4):411-5.
103. Koller T, Kollerova J, Hlavaty T, Huorka M, Payer J. Cholelithiasis and markers of nonalcoholic fatty liver disease in patients with metabolic risk factors. *Scand J Gastroenterol.* febrero de 2012;47(2):197-203.
104. Liew PL, Lee WJ, Wang W, Lee YC, Chen WY, Fang CL, et al. Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Gallbladder Disease in Morbid Obesity. *Obes Surg.* 1 de julio de 2008;18(7):847-53.
105. Loria P, Lonardo A, Lombardini S, Carulli L, Verrone A, Ganazzi D, et al. Gallstone disease in non-alcoholic fatty liver: Prevalence and associated factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20(8):1176-84.
106. Ma J, Hwang SJ, Pedley A, Massaro JM, Hoffmann U, Chung RT, et al. Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *J Hepatol.* 2017;66(2):390-7.
107. Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Berr F. Long-term effects of cholecystectomy on bile acid metabolism. *Hepatology.* 1 de enero de 1995;21(1):41-5.
108. Amigo L, Husche C, Zanlungo S, Lütjohann D, Arrese M, Miquel JF, et al. Cholecystectomy increases hepatic triglyceride content and very-low-density lipoproteins production in mice. *Liver Int.* 2011;31(1):52-64.
109. Ruhl CE, Everhart JE. Relationship of Non-alcoholic Fatty Liver Disease With Cholecystectomy in the US Population. *Am J Gastroenterol.* junio de 2013;108(6):952.
110. Yilmaz Y, Ayyildiz T, Akin H, Colak Y, Ozturk O, Senates E, et al. Gallstone disease does not predict liver histology in nonalcoholic fatty liver disease. *Gut Liver.* mayo de 2014;8(3):313-7.
111. Fracanzani AL, Valenti L, Russello M, Miele L, Bertelli C, Bellia A, et al. Gallstone disease is associated with more severe liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PloS One.* 2012;7(7):e41183.
112. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet Lond Engl.* 16 de enero de 2010;375(9710):181-3.
113. Jaruvongvanich V, Sanguankeo A, Upala S. Significant Association Between Gallstone Disease and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci.* 1 de agosto de 2016;61(8):2389-96.

114. Yun S, Choi D, Lee KG, Kim HJ, Kang BK, Kim H, et al. Cholecystectomy Causes Ultrasound Evidence of Increased Hepatic Steatosis. *World J Surg.* 1 de junio de 2016;40(6):1412-21.
115. Kwak MS, Kim D, Chung GE, Kim W, Kim YJ, Yoon JH. Cholecystectomy is independently associated with nonalcoholic fatty liver disease in an Asian population. *World J Gastroenterol WJG.* 28 de mayo de 2015;21(20):6287-95.
116. Jaruvongvanich V, Sanguankeo A, Jaruvongvanich S, Upala S. Association Between Cholecystectomy and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis. *World J Surg.* 1 de noviembre de 2016;40(11):2816-7.
117. Oikonomou D, Georgiopoulos G, Katsi V, Kourek C, Tsioufis C, Alexopoulou A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and hypertension: coprevalent or correlated? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* septiembre de 2018;30(9):979-85.
118. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases: *Hepatology*, Vol. XX, No. X, 2017. *Hepatology.* enero de 2018;67(1):328-57.
119. Frith J, Day CP, Henderson E, Burt AD, Newton JL. Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology.* 2009;55(6):607-13.
120. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AMS, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* agosto de 2009;51(2):371-9.
121. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* agosto de 2015;35(3):221-35.
122. Li L, Liu DW, Yan HY, Wang ZY, Zhao SH, Wang B. Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies. *Obes Rev.* 2016;17(6):510-9.
123. Kallai L, Hahn A, Roeder V, Zupanic V. Correlation between histological findings and serum transaminase values in chronic diseases of the liver. *Acta Med Scand.* enero de 1964;175:49-56.
124. Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Komorowski R, Wallace J, Surapaneni SN, Franco J, et al. A noninvasive clinical scoring model predicts risk of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obes Surg.* junio de 2010;20(6):685-91.
125. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol.* febrero de 2007;102(2):399-408.

126. Zhang JZ, Cai JJ, Yu Y, She ZG, Li H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Update on the Diagnosis. *Gene Expr.* 4 de noviembre de 2019;19(3):187-98.
127. Khalifa A, Rockey DC. The utility of liver biopsy in 2020. *Curr Opin Gastroenterol.* mayo de 2020;36(3):184-91.
128. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* septiembre de 2002;123(3):745-50.
129. Patel J, Bettencourt R, Cui J, Salotti J, Hooker J, Bhatt A, et al. Association of noninvasive quantitative decline in liver fat content on MRI with histologic response in nonalcoholic steatohepatitis. *Ther Adv Gastroenterol.* septiembre de 2016;9(5):692-701.
130. de Lédinghen V, Wong GLH, Vergniol J, Chan HLY, Hiriart JB, Chan AWH, et al. Controlled attenuation parameter for the diagnosis of steatosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* abril de 2016;31(4):848-55.
131. Wong VWS, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GLH, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* agosto de 2018;15(8):461-78.
132. Pascot A, Lemieux S, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, et al. Age-related increase in visceral adipose tissue and body fat and the metabolic risk profile of premenopausal women. *Diabetes Care.* septiembre de 1999;22(9):1471-8.
133. Zhang S, Du T, Zhang J, Lu H, Lin X, Xie J, et al. The triglyceride and glucose index (TyG) is an effective biomarker to identify nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 19 de enero de 2017;16(1):15.
134. Boursier J, Shreay S, Fabron C, Torretón E, Frayssé J. Hospitalization costs and risk of mortality in adults with nonalcoholic steatohepatitis: Analysis of a French national hospital database. *EClinicalMedicine.* 1 de agosto de 2020;25:100445.
135. LITMUS Project [Internet]. [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://litmus-project.eu/>
136. Vuppalanchi R, Jain AK, Deppe R, Yates K, Comerford M, Masuoka HC, et al. Relationship between changes in serum levels of keratin 18 and changes in liver histology in children and adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* diciembre de 2014;12(12):2121-2130.e1-2.
137. Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with

- nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. marzo de 2006;26(2):151-6.
138. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Messous D, Munteanu M, Imbert-Bismut F, et al. Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 10 de noviembre de 2006;6:34.
139. Tanwar S, Trembling PM, Guha IN, Parkes J, Kaye P, Burt AD, et al. Validation of terminal peptide of procollagen III for the detection and assessment of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Baltim Md*. enero de 2013;57(1):103-11.
140. Boyle M, Tiniakos D, Schattenberg JM, Ratziu V, Bugianessi E, Petta S, et al. Performance of the PRO-C3 collagen neo-epitope biomarker in non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep Innov Hepatol*. septiembre de 2019;1(3):188-98.
141. Marañón P, Fernández-García CE, Isaza SC, Rey E, Gallego-Durán R, Montero-Vallejo R, et al. Bone morphogenetic protein 2 is a new molecular target linked to non-alcoholic fatty liver disease with potential value as non-invasive screening tool. *Biomark Res*. 25 de mayo de 2022;10(1):35.
142. Iruarrizaga-Lejarreta M, Martínez-Arranz I, Morrison MC, Varela-Rey M, Ramos DF, Delacruz-Villar L, et al. Targeting the NAFLD metabolome and the shaping of precision medicine for patients with NASH. *J Hepatol*. 1 de abril de 2018;68:S362-3.
143. Mayo R, Crespo J, Martínez-Arranz I, Banales JM, Arias M, Mincholé I, et al. Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: Results from discovery and validation cohorts. *Hepatology Commun*. julio de 2018;2(7):807-20.
144. Zhang F, Liu T, Gao P, Fei S. Predictive Value of a Noninvasive Serological Hepatic Fibrosis Scoring System in Cirrhosis Combined with Oesophageal Varices. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:7671508.
145. Ballestri S, Mantovani A, Baldelli E, Lugari S, Maurantonio M, Nascimbeni F, et al. Liver Fibrosis Biomarkers Accurately Exclude Advanced Fibrosis and Are Associated with Higher Cardiovascular Risk Scores in Patients with NAFLD or Viral Chronic Liver Disease. *Diagn Basel Switz*. 9 de enero de 2021;11(1):98.
146. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. septiembre de 2010;59(9):1265-9.
147. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 1 de julio de 2015;63(1):237-64.

148. Marella HK, Reddy YK, Jiang Y, Ganguli S, Podila PSB, Snell PD, et al. Accuracy of Noninvasive Fibrosis Scoring Systems in African American and White Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Transl Gastroenterol*. abril de 2020;11(4):e00165.
149. Cheng CH, Chu CY, Chen HL, Lin IT, Wu CH, Lee YK, et al. Subgroup analysis of the predictive ability of aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) and fibrosis-4 (FIB-4) for assessing hepatic fibrosis among patients with chronic hepatitis C. *J Microbiol Immunol Infect*. 1 de agosto de 2020;53(4):542-9.
150. Lee J, Vali Y, Boursier J, Spijker R, Anstee QM, Bossuyt PM, et al. Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. febrero de 2021;41(2):261-70.
151. McPherson S, Anstee QM, Henderson E, Day CP, Burt AD. Are simple noninvasive scoring systems for fibrosis reliable in patients with NAFLD and normal ALT levels? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. junio de 2013;25(6):652-8.
152. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatol Baltim Md*. febrero de 2008;47(2):455-60.
153. Ballestri S, Mantovani A, Baldelli E, Lugari S, Maurantonio M, Nascimbeni F, et al. Liver Fibrosis Biomarkers Accurately Exclude Advanced Fibrosis and Are Associated with Higher Cardiovascular Risk Scores in Patients with NAFLD or Viral Chronic Liver Disease. *Diagn Basel Switz*. 9 de enero de 2021;11(1):98.
154. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology*. diciembre de 2004;127(6):1704-13.
155. Angelini G, Panunzi S, Castagneto-Gissey L, Pellicanò F, De Gaetano A, Pompili M, et al. Accurate liquid biopsy for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *Gut*. febrero de 2023;72(2):392-403.
156. Castéra L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatol Baltim Md*. marzo de 2010;51(3):828-35.
157. Agbim U, Asrani SK. Non-invasive assessment of liver fibrosis and prognosis: an update on serum and elastography markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. abril de 2019;13(4):361-74.

158. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, Miller FH, Motosugi U, Low RN, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* marzo de 2015;13(3):440-451.e6.
159. Loomba R, Cui J, Wolfson T, Haufe W, Hooker J, Szeverenyi N, et al. Novel 3D Magnetic Resonance Elastography for the Noninvasive Diagnosis of Advanced Fibrosis in NAFLD: A Prospective Study. *Am J Gastroenterol.* julio de 2016;111(7):986-94.
160. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, Targher G. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 21 de febrero de 2014;20(7):1724-45.
161. Sanyal AJ, Van Natta ML, Clark J, Neuschwander-Tetri BA, Diehl A, Dasarathy S, et al. Prospective Study of Outcomes in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med.* 21 de octubre de 2021;385(17):1559-69.
162. Younossi ZM, Yilmaz Y, Yu ML, Wong VWS, Fernandez MC, Isakov VA, et al. Clinical and Patient-Reported Outcomes From Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Across the World: Data From the Global Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)/ Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Registry. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 1 de octubre de 2022;20(10):2296-2306.e6.
163. Loomba R, Abraham M, Tech B, Unalp A, Wilson L, Lavine J, et al. Association between diabetes, family history of diabetes and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatol Baltim Md.* septiembre de 2012;56(3):943-51.
164. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;59(3):1174-97.
165. Targher G, Corey KE, Byrne CD, Roden M. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus — mechanisms and treatments. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* septiembre de 2021;18(9):599-612.
166. López-Suárez A, Guerrero JMR, Elvira-González J, Beltrán-Robles M, Cañas-Hormigo F, Bascuñana-Quirell A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with blood pressure in hypertensive and nonhypertensive individuals from the general population with normal levels of alanine aminotransferase. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* noviembre de 2011;23(11):1011-7.
167. Liao XH, Cao X, Liu J, Xie XH, Sun YH, Zhong BH. Prevalence and features of fatty liver detected by physical examination in Guangzhou. *World J Gastroenterol.* 28 de agosto de 2013;19(32):5334-9.

168. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* abril de 2015;13(4):643-654.
169. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metab - Clin Exp.* 1 de agosto de 2016;65(8):1109-23.
170. Zhang QQ, Lu LG. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Dyslipidemia, Risk for Cardiovascular Complications, and Treatment Strategy. *J Clin Transl Hepatol.* marzo de 2015;3(1):78-84.
171. Santos RD, Valenti L, Romeo S. Does nonalcoholic fatty liver disease cause cardiovascular disease? Current knowledge and gaps. *Atherosclerosis.* marzo de 2019;282:110-20.
172. Targher G, Byrne CD, Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications. *Gut.* 1 de septiembre de 2020;69(9):1691-705.
173. Oni ET, Agatston AS, Blaha MJ, Fialkow J, Cury R, Sposito A, et al. A systematic review: burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; should we care? *Atherosclerosis.* octubre de 2013;230(2):258-67.
174. Yi M, Peng W, Feng X, Teng F, Tang Y, Kong Q, et al. Extrahepatic morbidities and mortality of NAFLD: an umbrella review of meta-analyses. *Aliment Pharmacol Ther.* octubre de 2022;56(7):1119-30.
175. Liu Z, Suo C, Fan H, Zhang T, Jin L, Chen X. Dissecting causal relationships between nonalcoholic fatty liver disease proxied by chronically elevated alanine transaminase levels and 34 extrahepatic diseases. *Metabolism.* 1 de octubre de 2022;135:155270.
176. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* julio de 2014;11(7):e1001680.
177. Isaza SC, Del Pozo-Maroto E, Domínguez-Alcón L, Elbouayadi L, González-Rodríguez Á, García-Monzón C. Hypoxia and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Med.* 2020;7:578001.
178. Haflidadottir S, Jonasson JG, Norland H, Einarsdottir SO, Kleiner DE, Lund SH, et al. Long-term follow-up and liver-related death rate in patients with non-alcoholic and alcoholic related fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 27 de septiembre de 2014;14:166.

## **ANEXOS**

Durante esta Tesis Doctoral he participado en el siguiente artículo científico como primera autora:

1. Rey E\*, del Pozo-Maroto E\*, Marañón P, Beeler B, García-García Y, Landete P, González A et al (\*autores con igual contribución). Intrahepatic Expression of Fatty Acid Translocase CD36 Is Increased in Obstructive Sleep Apnea. *Front Med.* 11 de agosto de 2020; 7:450. doi:10.3389/fmed.2020.00450.

Y he contribuído en otras publicaciones:

1. García-Monzón C, Vargas-Castrillón J, Porrero JL, Alonso MT, Bonachía O, Castillo MJ, et al. Prevalence and risk factors for biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort of adult patients with gallstones. *Liver Int.* 2015;35(8):1983-91, doi:10.1111/liv.12813.
2. García-Monzón C, Petrov PD, Rey E, Marañón P, Del Pozo-Maroto E, Guzmán C, et al. Angiopoietin-Like Protein 8 Is a Novel Vitamin D Receptor Target Gene Involved in Nonalcoholic Fatty Liver Pathogenesis. *Am J Pathol.* diciembre de 2018;188(12):2800-10, doi: 10.1016/j.ajpath.2018.07.028.
3. Isaza SC, Del Pozo-Maroto E, Domínguez-Alcón L, Elbouayadi L, González-Rodríguez Á, García-Monzón C. Hypoxia and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Med.* 2020;7:578001, doi:10.3389/fmed.2020.578001.
4. Rey E, Meléndez-Rodríguez F, Marañón P, Gil-Valle M, Carrasco AG, Torres-Capelli M, et al. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36. *Liver Int.* 2020;40(10):2553-67.
5. Solís-Muñoz P, Berlana Á, Pozo-Maroto E del, Domínguez-Alcón L, Elbouayadi L, García-Monzón C, et al. Insights on the disruption of glucose metabolism and hepatic insulin resistance induced by hepatitis C virus. *Metab Target Organ Damage.* 15 de marzo de 2022;2(2):5, doi:10.20517/mtod.2021.18.