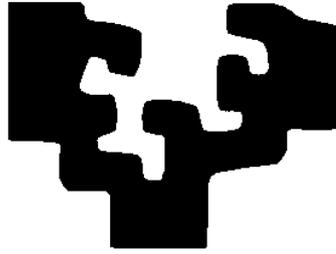


eman ta zabal zazu



**Universidad
del País Vasco**

**Euskal Herriko
Unibertsitatea**

Facultad de Medicina y Odontología

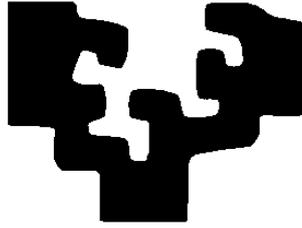
**Cuantificación y monitorización del hígado
graso no alcohólico mediante resonancia
magnética**

Raúl Jiménez Agüero

Tesis doctoral

2015

eman ta zabal zazu



**Universidad
del País Vasco**

**Euskal Herriko
Unibertsitatea**

Facultad de Medicina y Odontología

**Cuantificación y monitorización del hígado graso no alcohólico
mediante resonancia magnética**

Memoria presentada por D. Raúl Jiménez Agüero para aspirar al grado de Doctor por la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

San Sebastián, 20 de Agosto del 2015

Dr. José Ignacio Emparanza Knörr

Dr. Adolfo Beguiristain Gómez

Este trabajo se ha llevado a cabo con la ayuda de dos Proyectos de Investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI10/01984) y del Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco (2010111043).

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Una vez terminado este trabajo que comenzamos hace seis años y en el que tantas personas han participado, sin las cuales no hubiera sido posible su realización, me gustaría transmitirles mi más profundo agradecimiento, esperando no olvidar mencionar a nadie.

En primer lugar quisiera agradecer a la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y al Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física por permitirme realizar esta Tesis Doctoral.

El más profundo agradecimiento es para mis directores de tesis. En primer lugar al Dr. José Ignacio Emparanza Knörr por ser un gran apoyo durante estos seis años y especialmente en la culminación de la tesis, en la que su ayuda, trabajo y esfuerzo han sido impagables. También quiero agradecer al Dr. Adolfo Beguiristain Gómez, por su ayuda en la coordinación del proyecto y su inestimable apoyo en la realización de este trabajo. A ambos tengo que agradecer su optimismo y entusiasmo para afrontar tan longevo proyecto que me han impulsado a su realización.

Me gustaría agradecer especialmente al Profesor Dr. Luis Bujanda por el entusiasmo que pone en el desarrollo de cada proyecto en el que participa y que personalmente me ha permitido concluir este ilusionante trabajo.

No me quiero olvidar de todo el personal que ha colaborado directa o indirectamente en este trabajo. La calidad profesional y humana de este grupo es innegable, lo que ha hecho más fácil su desarrollo.

Tengo que comenzar por mis compañeros de la Sección de Cirugía Esófago-gástrica (Dr. Elorza, Dr. Larburu, Dr. Asensio, Dra. Eizagirre y Lourdes) del Servicio de Cirugía General y Digestiva, que desde un principio en el que les pedí colaboración mostraron la mayor disponibilidad.

Especial mención quiero hacer a todo el personal de Osatek por su inestimable ayuda, su paciencia, colaboración y disponibilidad para resolverme los problemas de programación. Gracias a todo el personal administrativo, técnicos y radiólogos. Gracias a Nieves, Eli García, Enma Salvador y en especial a Txema Alustiza, al que debo gran parte de mis conocimientos sobre la RM y el impulso constante para seguir adelante.

A Javier Sánchez, le agradezco su interés en la búsqueda de nuevos avances tecnológicos en el campo del diagnóstico que me ha permitido desarrollar esta tesis doctoral. Lander, gracias por el interés mostrado en esta línea de investigación que nos ha permitido trabajar juntos y que posiblemente nos permita seguir colaborando en equipo.

Gracias a mis compañeros de sección, Miguel Ángel, Inma, Xabi y Maialen, por su comprensión especialmente en la parte final de la tesis que me ha permitido dedicarle tiempo a su redacción y preparación final, sobrecargando en algunos momentos su actividad asistencial diaria.

Gracias a Eli Hijona que tanto me ha ayudado en la gestión y distribución de las biopsias así como en las comunicaciones fluidas con colaboradores externos. Gracias a Leixuri Aguirre y María P. Portillo del Departamento de Nutrición y Facultad de Farmacia de Vitoria por su ayuda tan importante en el desarrollo de este proyecto. También quiero agradecer a Mikel Larzabal y Maddi Garmendia, patólogos de nuestro Hospital, que me han prestado una colaboración desinteresada desde el mismo momento en que se lo pedí, sin la cual hubiera sido mucho más difícil la exitosa culminación de este proyecto.

Mención especial tengo que hacer hacia el personal del Departamento de Enfermedades Hepáticas y Gastrointestinales del Instituto Biodonostia por su apoyo constante, ayuda inestimable en muchos aspectos de la investigación y por sus muestras de amistad continua, haciéndome más llevaderos los peores momentos de la investigación. Gracias a Patricia, Oihane, Ander, Maite, Álvaro, Matxus y muy especialmente a Txus Bañales, pilar muy importante en el desarrollo de este proyecto y en el reencuentro positivo con el mundo de la investigación. Gracias Txus. Espero seguir manteniendo contigo esta relación de colaboración y amistad.

Por último, sin duda, a las personas más importantes de mi vida, mi familia. A mis padres por ser un referente y por su amor incondicional. A ambos les debo todo lo que he conseguido y sin ellos no hubiera sido posible culminar este trabajo. A mi madre que tanto ha luchado por conseguir lo mejor para su familia sorteando en todo momento los obstáculos que por medio se interpusieran y a mi padre, por ser para mí un modelo de superación y encaramiento de la vida por dura que esta sea. No te olvido. A mi hermana, por su ayuda, cariño y apoyo incondicional.

Gracias al resto de la familia, porque sin su labor diaria me hubiese sido mucho más difícil conciliar mi actividad investigadora y familiar.

A Nerea, por su comprensión, cariño y apoyo incondicional. A Henar y Javier, que me demuestran su amor todos los días, son fuente de inspiración para mí y me animan en los peores momentos sin pedir nada a cambio.

A los tres, gracias por estar ahí.

ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

2D	Dos dimensiones (<i>two dimensions</i>)
3D	Tres dimensiones (<i>three dimensions</i>)
STE	Intervalo de tiempo de eco
γ	Constante giromagnética
ACC	Acetil-CoA carboxilasa (<i>acetyl-CoA carboxilase</i>)
ACL	ATP: citrato liasa (<i>ATP citrate lyase</i>)
ACS	acetil-coenzima A sintetasa (<i>acetyl-coenzyme A synthetase</i>)
ADRP mRNA	RNA mensajero de la proteína relacionada con la diferenciación adiposa (<i>adipose differentiation-related protein messenger RNA</i>)
AGL	Ácidos grasos libres
AKT	= Proteína quinasa B
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de la varianza
ANT	Proteína transportadora de nucleótidos de adenina (<i>adenine nucleotide translocase</i>)
Apo B	Apolipoproteína B (<i>apolipoprotein B</i>)
APOC3	Apolipoproteína C3 (<i>apolipoprotein C3</i>)
asRNA	RNA antisentido (<i>antisense RNA</i>)
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
AUROC	Área bajo curva ROC (<i>area under receiver operating characteristic curve</i>)
B₀	Fuerza del campo magnético
C	Celsius

CEIC	Comité ético de investigaciones científicas
ChREBP	Proteína unida al elemento de respuesta a los carbohidratos (<i>carbohydrate-responsive element-binding protein</i>)
CMR	Remanentes de quilomicrones (<i>chylomicrones remanents</i>)
cms	Centímetros
CPT	Carnitina palmitiltransferasa (<i>carnitine palmityl transferase</i>)
CS	Citrato sintasa (<i>citrate synthase</i>)
CV	Coefficiente de variación
CYP-2E1	Citocromo P450 2E1 (<i>cytochrome P450 2E1</i>)
Cyt c	Citocromo c (<i>cytochrome c</i>)
DE	Desviación estándar
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa (<i>diglyceride acyltransferase</i>)
dl	decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
Drs	Doctores
EC	Ésteres de colesterol (<i>cholesterol ester</i>)
EEM	Error estándar de la media
e.g.	Por ejemplo (<i>exempli gratia</i>)
F	En fase
FA	Fosfatasa alcalina (<i>fosfatase alkaline</i>)
FAD	Flavin adenin dinucleotido (<i>flavin adenine dinucleotide</i>) (forma oxidada)
FADH₂	Flavin adenin dinucleotido (<i>flavin adenine dinucleotide</i>) (forma reducida)
FAS	Ácido graso sintasa (<i>fat acids sintase</i>)
FC	Colesterol libre (<i>free cholesterol</i>)

Fe	Hierro
FFA	Ácidos grasos libres (<i>free fat acids</i>)
FLI	Índice de grasa hepática (<i>fatty liver index</i>)
FO	Fase opuesta
FOV	Campo de visión (<i>field of visión</i>)
FPR	Tasa de progresión de fibrosis (<i>fibrosis progression rate</i>)
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
gr	gramo
Grb	Factor de crecimiento unido al receptor (<i>growth factor receptor-bound</i>)
HbA_{1c}	Hemoglobina glicosilada (<i>hemoglobin A1c</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>high density lipoprotein</i>)
HELLP	Anemia hemolítica, elevación de enzimas hepáticas, trombopenia (<i>hemolytic anemia, elevated liver enzyme, low platelet count</i>)
HFE	Gen de la hemocromatosis (<i>High Fe</i>)
Hg	Mercurio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (<i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A</i>)
HSL	Lipasa sensible a hormonas (<i>hormone-sensitive lipase</i>)
IDEAL	Método de descomposición de agua y grasa utilizado en resonancia magnética (<i>iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation</i>)
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia (<i>intermediate-density lipoprotein</i>)
i.e.	Es decir (<i>id est</i>)
IL-6	Interleucina 6 (<i>interleukin 6</i>)
IMC	Índice de masa corporal

IRS	Sustrato del receptor de la insulina (<i>insulin receptor substrate</i>)
Kg	Kilogramo
L	Litro
LAP	Producto de acumulación lipídico (<i>lipid accumulation product</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>low density lipoprotein</i>)
LPL	Lipoproteína lipasa (<i>lipoprotein lipase</i>)
M	Molar
m²	metro cuadrado
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
ME	Enzima málico (<i>malic enzyme</i>)
mg	miligramo
miRNA	MicroRNA
ml	mililitro
mm	milímetro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
ms	milisegundo
MTTP	Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>)
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>), (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>), (forma reducida)
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>), (forma oxidada)
NADPH⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>), (forma reducida)

NAFLD	Enfermedad por hígado graso no alcohólico (<i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica (<i>nonalcoholic steatohepatitis</i>)
NS	No significativo
OAA	Ácido oxalacético (<i>oxaloacetic acid</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
p	Probabilidad
PASH	Esteatohepatitis asociada a PNPLA3 (<i>PNPLA3-associated steatohepatitis</i>)
PC	Piruvato carboxilasa (<i>pyruvate carboxylase</i>)
PDH	Piruvato deshidrogenasa (<i>pyruvate dehydrogenase</i>)
PDK	Proteína quinasa dependiente de PIP ₃ (<i>3'-phosphoinositide-dependent kinase</i>)
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (<i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>)
PKC	Proteína quinasa C (<i>protein kinase C</i>)
PL	Fosfolípidos (<i>phospholipides</i>)
PNPLA3	Adiponutrina (<i>patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>)
PPAR-γ	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)
PPM	Partes por millón
PRIDE	<i>Philips research image development environment</i>
p.I148M	Variante genética de la adiponutrina
r	Coefficiente de correlación de Pearson
RM	Resonancia magnética
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)

ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RPC	Regla de predicción clínica
rpm	Revoluciones por minuto
SAOS	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
SREBP	Proteína de unión a elementos regulados por esteroides (<i>sterol regulatory element-binding protein</i>)
T	Tesla (unidad de inducción magnética)
T1	Tiempo de relajación longitudinal
T2	Tiempo de relajación transversal
T2*	Tiempo de relajación transversal en eco de gradiente
TAC	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (<i>tricarboxilic acids cycle</i>)
TC	Tomografía computarizada (<i>computed tomography</i>)
TE	Tiempo de eco
TG	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TR	Tiempo de repetición
UCP-2	Proteína desacoplante-2 (<i>uncoupling protein 2</i>)
U	Unidades
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (<i>very low-density lipoprotein</i>)
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
ω_0	Frecuencia de precesión
χ^2	chi cuadrado

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad hepática por depósito de grasa. Definición y categorización	3
2. Patogénesis	4
A. Resistencia periférica a la insulina	5
B. Acumulación de triglicéridos intrahepatocitarios	8
C. Daño hepatocelular	12
D. Factores etiopatogénicos	14
I. Antioxidantes	14
II. Hierro	15
III. Leptina	15
IV. Adiponectina	16
V. Resistina	16
VI. Flora bacteriana intestinal	16
VII. Otros:	17
E. Fibrosis	17
3. Epidemiología	18
4. Asociación con el síndrome metabólico y obesidad	19
A. Síndrome metabólico	19
I. Criterios diagnósticos	20
B. Obesidad	20
I. Detección	21
I.1. Índice de masa corporal (IMC)	21
I.2. Circunferencia de la cintura abdominal	21
5. Historia Natural	22
A. Factores de riesgo de progresión de la enfermedad hepática	23
6. Manifestaciones clínicas	25
7. Diagnóstico	25
A. Biopsia hepática y análisis histológico	25
B. Cuantificación bioquímica de la grasa	28
C. Biomarcadores serológicos	28

D. Técnicas de imagen	29
I. Ecografía	29
II. Tomografía Computarizada	30
III. Resonancia Magnética	30
F. Diagnóstico diferencial	35
G. Severidad de la enfermedad hepática	36
8. Tratamiento	37
A. Pérdida de peso y ejercicio físico	37
B. Antioxidantes	38
C. Agentes hipoglucemiantes	38
D. Estatinas	39
E. Otros	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. Selección de Pacientes y diseño del estudio	49
2. Consideraciones éticas	50
3. Datos Clínicos	51
A. Variables	51
4. Análisis histológico hepático	52
5. Análisis bioquímico de lípidos intrahepáticos	52
6. Resonancia Magnética	53
A. Secuencia de adquisición	53
B. Postproceso	54
7. Recogida de los datos	55
8. Análisis estadístico	55
RESULTADOS	57
1. Descripción de los pacientes del estudio: Diagrama de Flujo.	59
A. Datos clínicos y biológicos	60

B. Estudio descriptivo de las variables según el valor bioquímico de Folch	62
C. Estudio descriptivo de las variables según el grado histológico de esteatosis	64
D. Estudio descriptivo de las variables según presencia/ausencia de esteatosis	66
2. Estadística analítica	69
A. Análisis histológico	69
B. Correlación entre la RM multieco y la estimación histológica de la esteatosis hepática	71
C. Correlación entre el análisis histológico y el método bioquímico	73
D. Características diagnósticas (RM multieco – gradación histológica de la esteatosis). Curva ROC y AUROC	75
E. Correlación entre la RM multieco y el método bioquímico	76
F. Cálculo de la concentración grasa hepática a través de la fracción grasa calculada con RM multieco	77
G. Análisis univariado de la concentración de grasa hepática y evaluación multivariante de la predicción del valor Folch por RM multieco	78
H. Monitorización de la esteatosis hepática con la RM multieco	78
I. Análisis multivariado de la mejoría de la esteatosis	83
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXOS	135

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Imágenes histológicas representativas de NAFLD	4
Figura 2. Teoría del doble daño o “ <i>second hit</i> ”	5
Figura 3. Resistencia periférica a la insulina producida por TNF- α	7
Figura 4: Metabolismo lipídico hepático	9
Figura 5. Metabolismo hepatocitario de los ácidos grasos en una situación de resistencia a la insulina	12
Figura 6. Disfunción mitocondrial en la esteatosis	13
Figura 7. Esquema Fase/Fase opuesta	32
Figura 8. Imagen representativa de hígado sano/esteatósico	33
Figura 9. Curvas representativas T2	34
Figura 10. Grados histológicos de esteatosis hepática	70
Figura 11. Mapas de intensidad de RM multienco	71
Figura 12. Distribución de las intensidades de señal por RM multienco según los grados histológicos de esteatosis	72
Figura 13. Distribución de los valores bioquímicos de Folch según los grados histológicos de esteatosis	74
Figura 14. Curva ROC RM multienco – análisis histológico	75
Figura 15. Curva de calibración RM multienco – Folch	76
Figura 16. Curva de calibración entre los valores de Folch medido y estimado utilizando la fórmula de predicción	77
Figura 17. Aumento de la esteatosis hepática en los pacientes obesos	79
Figura 18. Monitorización de la esteatosis tras cirugía bariátrica	81
Figura 19. Monitorización de la esteatosis tras cirugía hepática	82
Figura 20. Monitorización de la esteatosis por RM	96

TABLAS

Tabla 1. Clasificación histológica del espectro completo de la enfermedad grasa hepática	27
Tabla 2. Características clínicas de la población en estudio	61
Tabla 3. Variables categóricas en relación con el valor bioquímico de Folch	62
Tabla 4. Variables continuas en relación con el valor bioquímico de Folch	63
Tabla 5. Variables categóricas en relación con el grado histológico de esteatosis	64
Tabla 6. Variables continuas en relación con el grado histológico de esteatosis	65
Tabla 7. Variables categóricas en relación con la presencia/ausencia de esteatosis	67
Tabla 8. Variables continuas en relación con la presencia/ausencia de esteatosis	68
Tabla 9. Distribución de la esteatosis por grados histológicos	69
Tabla 10. Fracción grasa según el grado histológico de esteatosis	73
Tabla 11. Valores bioquímicos de Folch según los grados histológicos	74
Tabla 12. Análisis de regresión multivariante de la mejoría de la esteatosis	83

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad hepática por depósito de grasa. Definición y categorización

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (en inglés *nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD*) se define como la presencia de esteatosis (macro o microvesicular) en más del 5% de los hepatocitos sin consumo significativo de alcohol (<20 gr etanol/día) y después de excluir otras causas de enfermedad hepática. De acuerdo a los últimos datos, NAFLD afecta hasta el 30% de la población occidental [1, 2]. Así, la prevalencia de esta enfermedad en EEUU se estima alrededor de un 25% (aunque se considera infra-diagnosticada) [3] y es la causa más común de enfermedad hepática crónica [4-9].

NAFLD es un término que conlleva un amplio espectro histológico que va desde el depósito de grasa en los hepatocitos sin evidencia de daño hepático hasta la esteatosis acompañada de un componente necroinflamatorio con o sin fibrosis denominada esteatohepatitis no alcohólica (en inglés *nonalcoholic steatohepatitis, NASH*). La esteatohepatitis está caracterizada por respuesta inflamatoria y daño hepatocelular crónico que puede evolucionar a fibrosis hepática y en su etapa final a cirrosis con riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular.

Gran parte de las características histológicas de NAFLD pueden aparecer en otras enfermedades hepáticas, por lo que es recomendable hacer una exclusión de otras patologías hepáticas previa a su categorización histológica. Ésta debe ser estricta y permitir reconocer los diferentes grados de una misma enfermedad. Se han descrito 4 grandes categorías de la enfermedad hepática por depósito de grasa [10] (Figura 1):

- No evidencia significativa de esteatosis: < 5% de hepatocitos muestran esteatosis y no se objetivan cambios histológicos que sugieran esteatohepatitis.
- Esteatosis simple (en inglés *fatty liver*): presencia de esteatosis en > 5% de los hepatocitos sin cambios histológicos que sugieran esteatohepatitis.
- Esteatohepatitis (NASH): presencia de esteatosis, inflamación, “balonamiento” hepatocelular (degeneración hialina del hepatocito) con o sin fibrosis.
- Fibrosis/Cirrosis criptogénica (cirrosis de causa desconocida o inexplicada): presencia de fibrosis con ausencia o mínimos hallazgos de esteatosis o esteatohepatitis. En este caso, es necesario descartar otras causas (alcohol, virus...) de cirrosis hepática.

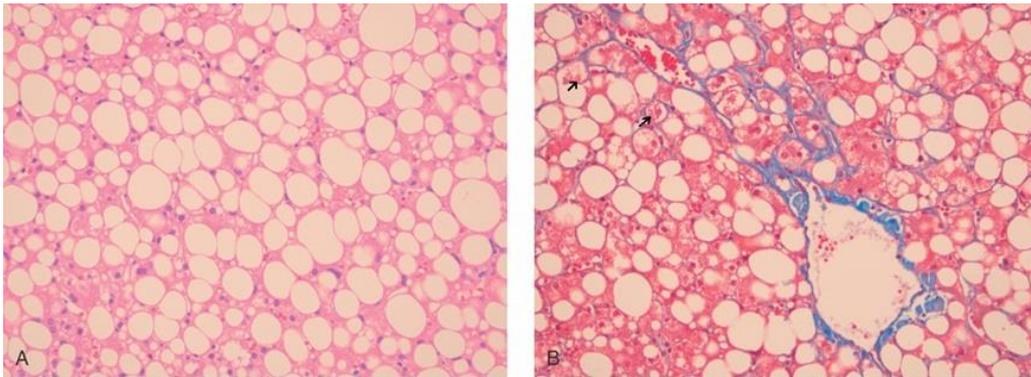


Figura 1. Imágenes histológicas representativas de NAFLD. A. Esteatosis simple macrovesicular (Tinción de hematoxilina-eosina). B. Esteatohepatitis, se observa fibrosis perivenosa y perisinusoidal (azul) y degeneración hialina de Mallory (flechas) (Tinción de Tricrómico de Masson). Imágenes obtenidas de Kumar *et al.* [11].

La historia natural varía según el diagnóstico histológico inicial. Aunque los pacientes con NAFLD normalmente presentan un curso benigno, pueden desarrollar formas progresivas a NASH, cirrosis y carcinoma hepatocelular [2, 12]. Hasta un 30-40% de los pacientes con NASH presentan en el momento del diagnóstico fibrosis avanzada. Se ha comprobado que la cirrosis es una etapa tardía de NAFLD que histológicamente ha perdido el patrón necroinflamatorio y esteatósico, implicándose como factor etiológico en hasta un 70% de casos de cirrosis criptogénica, especialmente entre mujeres mayores y diabéticas tipo 2 [13-15]. Los factores que influyen en la progresión de la enfermedad son múltiples. La esperanza de vida de los pacientes con NAFLD es inferior a la de la población sana debido a un aumento de la mortalidad por causas cardiovasculares y hepáticas [16-18].

2. Patogénesis

La patogénesis de NAFLD no está claramente definida. La teoría más aceptada considera la resistencia periférica a la insulina el mecanismo causal de la esteatosis hepática simple, y probablemente de la esteatohepatitis [19-21]. Es probable que NAFLD represente el componente hepático de un síndrome metabólico que en su expresión fenotípica completa está caracterizado por la presencia de resistencia periférica a la insulina, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial. La obesidad y la diabetes tipo 2 son condiciones asociadas con la resistencia periférica a la insulina y son frecuentemente observadas en pacientes con NAFLD [22, 23]. Se ha demostrado que el síndrome metabólico es un importante factor de riesgo para la aparición de NAFLD en la población general [24].

Hay una teoría que habla del “doble daño” (en inglés *second hit*) o “daño oxidativo adicional” necesario para la manifestación del componente necroinflamatorio de la esteatohepatitis a partir de la esteatosis hepática simple (Figura 2) [25]. Los daños oxidativos más frecuentes son el depósito de hierro en el hígado, la leptina (enzima producida en el tejido adiposo que aumenta la resistencia a la insulina), la deficiencia de antioxidantes, la translocación de componentes bacterianos del tracto gastrointestinal al hígado y las alteraciones mitocondriales de los hepatocitos. Los mecanismos que conducen al desarrollo de esteatosis hepática y posteriormente a la aparición de los fenómenos inflamatorios, solo se conocen de forma parcial aunque apoyan la hipótesis de múltiples estímulos paralelos [26].

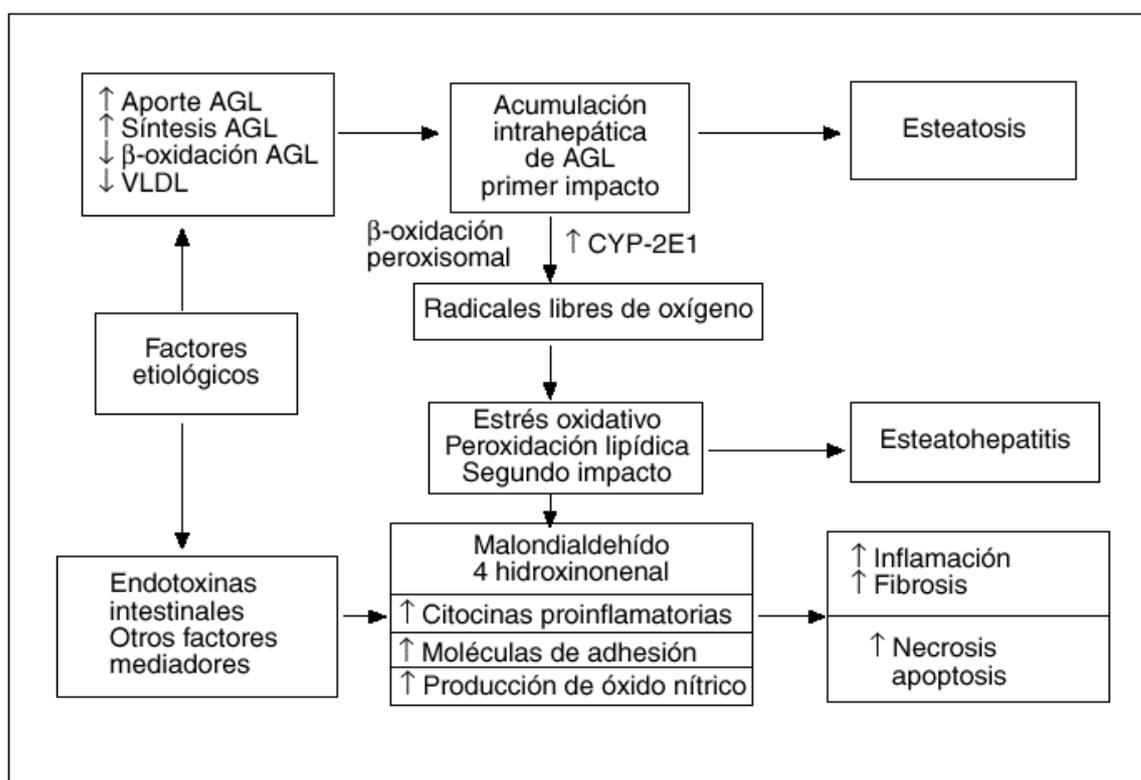


Figura 2. Teoría del doble daño o “second hit”. Esquema de la patogenia de NAFLD. CYP-2E1: Citocromo P450 2E1. Imagen modificada de Day *et al.* [25].

A. Resistencia periférica a la insulina

Se trata de un desajuste en la capacidad de la insulina para regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Es un defecto temprano e importante asociado con obesidad y diabetes mellitus tipo 2 [27, 28] y una de las causas etiopatogénicas principales de la esteatosis hepática y probablemente de la

esteatohepatitis aunque no todos los pacientes con NASH presentan esta alteración. Este dato sugiere que se trata de un síndrome heterogéneo con múltiples factores que están involucrados en su patogenia.

En una situación postprandial, con una carga energética celular y glucemia elevadas, domina la acción de la insulina. En el tejido adiposo, frena la lipólisis de los triglicéridos almacenados al provocar la inactivación de la lipasa sensible a hormonas (HSL), aumenta la entrada de glucosa y su oxidación glucolítica, y activa la lipoproteína lipasa (LPL) del endotelio que rompe los triglicéridos de los quilomicrones y de VLDL liberando ácidos grasos, que entran en el adipocito [29]. La insulina aumenta el contenido de grasa del tejido adiposo y el almacén de glucosa y ácidos grasos en el tejido muscular, reduciendo la glucemia y la lipemia. Ante la hipoglucemia se activa el glucagón que intenta compensar los efectos de la insulina. Activa la HSL en el tejido adiposo generando glicerol que es utilizado por el hígado para la síntesis de glucosa y de ácidos grasos libres que servirán de combustible para la mayoría de los tejidos [29]. La insulina pone en marcha rutas de señalización específicas (Figura 3) y así, la unión a su receptor provoca una fosforilación cruzada en residuos de tirosina de las cadenas del interior celular del receptor que actúan como puntos de anclaje para sustratos del propio receptor, tales como IRS-1, IRS-2 o Grb-2 [30, 31].

El tejido adiposo es una fuente de señales moleculares (e.g., TNF- α e IL-6) que regulan la acción de la insulina [32, 33]. Dichas moléculas son las principales responsables de la resistencia a la insulina ya que desajustan la fosforilación cruzada del receptor [32]. En este sentido, se ha observado una elevada producción de TNF- α en individuos obesos. Así, la insulina no es capaz de revertir la activación de la HSL en la hipoglucemia, liberándose ácidos grasos libres desde el tejido adiposo al torrente circulatorio [30]. Los ácidos grasos y la hiperglucemia estimulan la secreción de insulina por las células β del páncreas, provocando hiperinsulinemia [30] y cuando se agota el páncreas, puede desembocar en la aparición de una diabetes tipo 2. Además, los niveles elevados de ácidos grasos libres evitan la activación de la LPL en el endotelio, impidiendo la metabolización de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones) lo que produce una elevación de su concentración sérica [34].

La base genética de la resistencia periférica a la insulina que suele ocurrir en pacientes con NAFLD no está clara, aunque existen evidencias de diferentes alteraciones genéticas involucradas, tales como polimorfismos en el gen *APOC3* que codifica para apolipoproteína C3 [35], en el gen *IL6* que codifica para interleucina 6 [36] o en el gen *PNPLA3* que codifica adiponutrina (proteína expresada en el tejido adiposo, piel e hígado) [37].

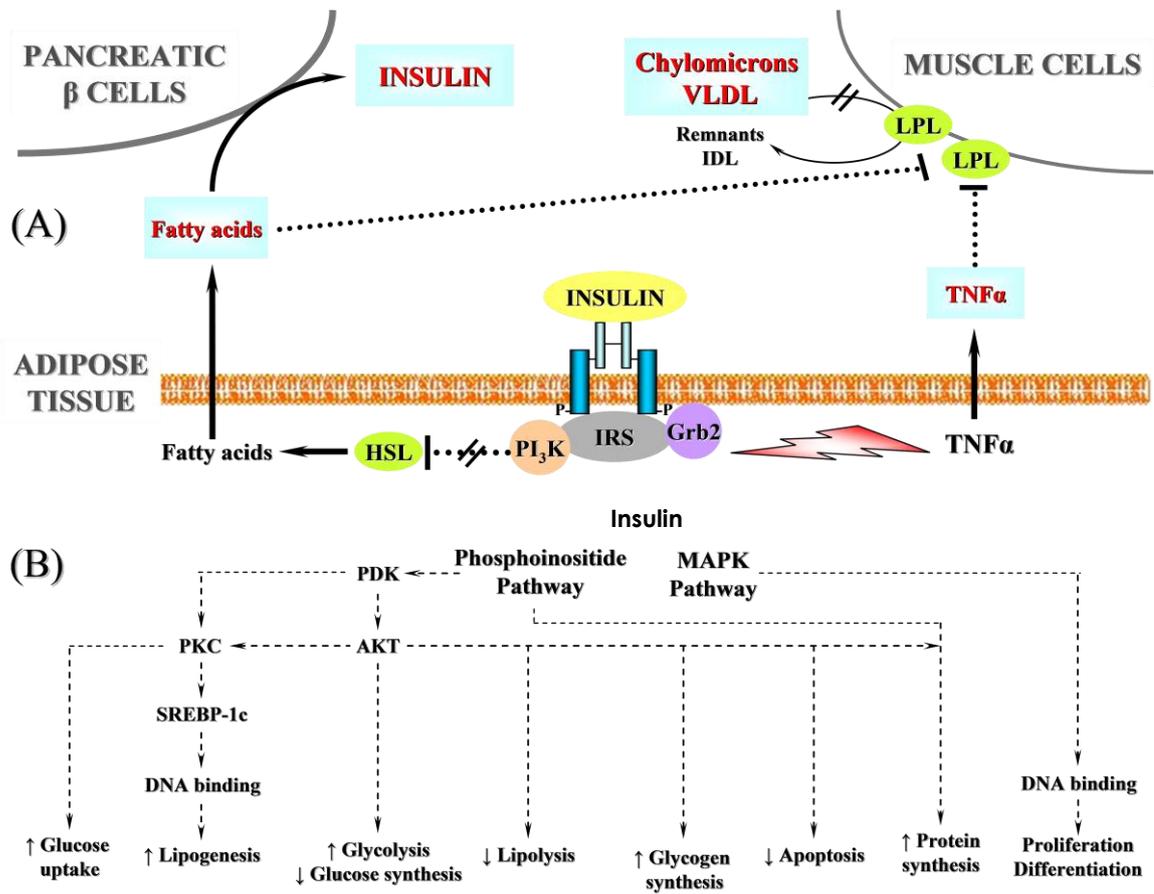


Figura 3. Resistencia periférica a la insulina producida por TNF- α . (A) La unión de la insulina a su receptor frena a la lipasa sensible a hormonas (HSL) y detiene la lipólisis en el tejido adiposo. El TNF- α impide la fosforilación de residuos de tirosina del receptor de insulina, el reclutamiento de sustratos IRS y la acción antilipolítica de la insulina; al liberarse ácidos grasos al torrente en periodos postprandiales, aumenta la secreción de insulina por células β pancreáticas y se bloquea la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) en músculo y tejido adiposo, causando hipertrigliceridemia asociada a quilomicrones y VLDL. (B) Principales acciones de la insulina. SREBP, proteína de unión a elementos regulados por esteroides; PDK, proteína quinasa dependiente de PIP₃; PKC, proteína quinasa C; AKT, proteína quinasa B; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; IDL, lipoproteína de densidad intermedia. Imagen obtenida de Buqué *et al.* [31]

Un aumento de concentración de grasa intrahepática se correlaciona con incremento de la gluconeogénesis, del nivel de ácidos grasos libres y de la resistencia a la insulina [38]. La resistencia periférica a la acción de la insulina produce cambios marcados del metabolismo de los lípidos, como son el aumento de la lipólisis periférica, síntesis de triglicéridos y captación hepática de ácidos grasos libres [39], lo que contribuye a la acumulación de triglicéridos hepatocelulares [40].

La presencia de grasa intrahepática favorece la aparición de fenómenos de inflamación y fibrosis, posiblemente mediados por la interleucina 6 [41]. Se ha demostrado que la resistencia a la insulina es importante en la etiopatogenia de esteatosis simple y NASH. Los fármacos que actúan sobre la glucosa, tales como rosiglitazona [42] y pioglitazona, producen efectos beneficiosos en pacientes con NAFLD [43]. Ambos son fármacos antidiabéticos de la familia de las tiazolidindionas que actúan a nivel del receptor nuclear PPAR- γ disminuyendo la resistencia a la insulina en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado y de forma secundaria, consiguen disminuir la esteatosis y los fenómenos inflamatorios y de necrosis celular en pacientes con NASH [44].

B. Acumulación de triglicéridos intrahepatocitarios

La esteatosis hepática es una manifestación del acúmulo excesivo de triglicéridos en el hígado. Estos triglicéridos provienen principalmente de ácidos grasos libres en suero liberados del tejido adiposo o de ácidos grasos generados en el hígado por lipogénesis *de novo* [45]. La insulina es lipogénica y antigluconeogénica en el hepatocito. En situación fisiológica, la insulina favorece la entrada de glucosa y su posterior conversión por fosforilación a glucosa 6-fosfato en el hepatocito, derivándola posteriormente a la formación de glucógeno primero y a su oxidación después [46]. De esta manera la glucosa proporciona el Acetil-CoA y el NADPH necesarios para la síntesis *de novo* de ácidos grasos [47].

Los ácidos grasos son biomoléculas de naturaleza lipídica formadas por una larga cadena hidrocarbonada lineal en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos que son las moléculas que constituyen la bicapa lipídica de todas las membranas celulares y, en los seres humanos, la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos que se almacenan en el tejido adiposo.

En el hígado el contenido lipídico está regulado por una serie de procesos fisiológicos, tales como la importación de ácidos grasos libres (AGL) desde el tejido adiposo, la síntesis *de novo*, la β -oxidación y la esterificación de los AGL en el hepatocito y la exportación de triglicéridos como VLDL. En los pacientes con NAFLD, la resistencia a la insulina favorece el acúmulo de lípidos en el hígado mediante el aumento de la lipólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo, el aumento de su síntesis y la disminución de la β -oxidación de AGL a nivel hepatocitario (Figura 4) [48].

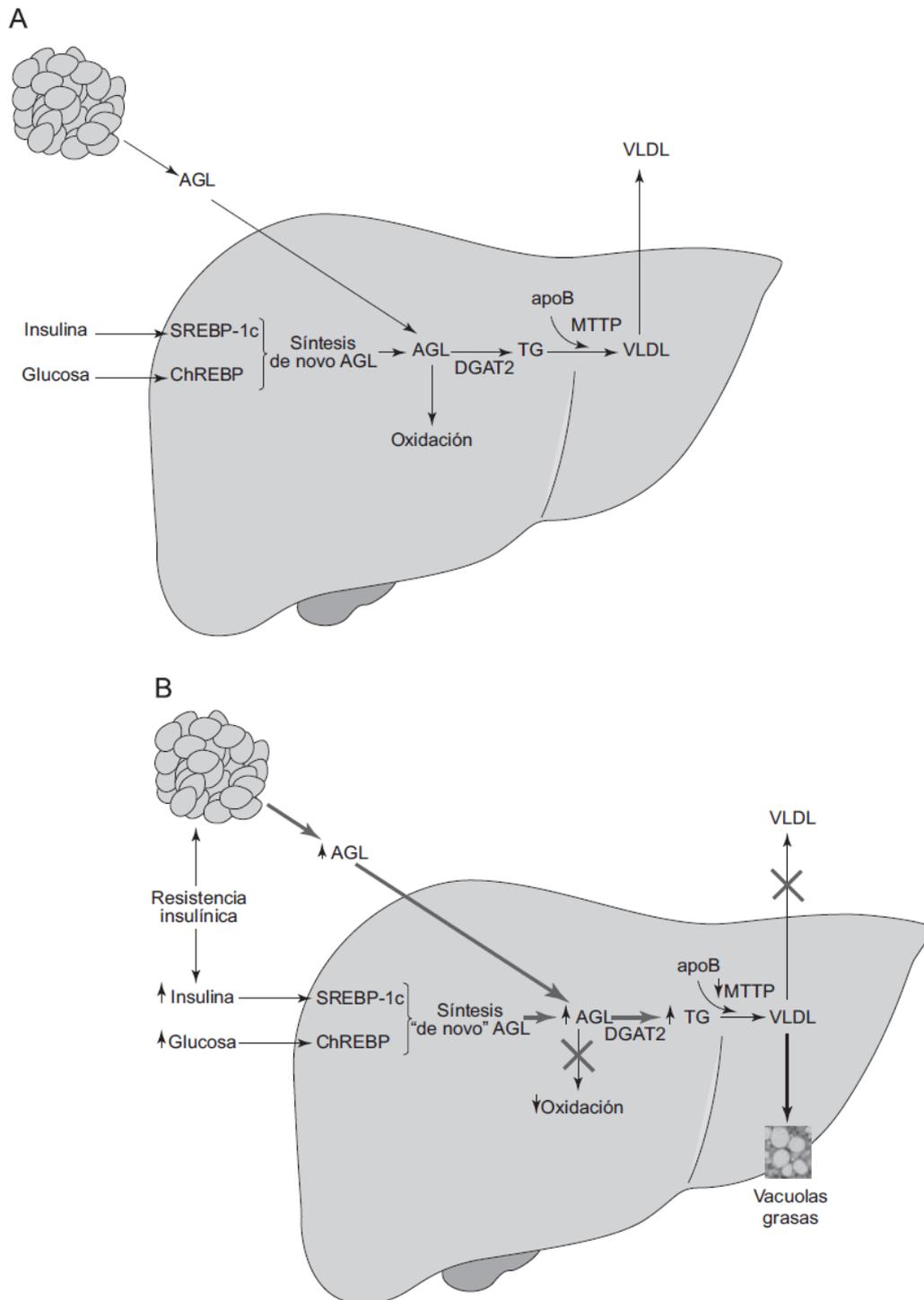


Figura 4. Metabolismo lipídico hepático. A) Síntesis hepática normal de triglicéridos y VLDL. El contenido lipídico del hígado está determinado por el equilibrio de varios procesos fisiológicos. B) En NAFLD, la resistencia a la insulina favorece el acúmulo de lípidos en el hígado. Imagen obtenida de Brea *et al.* [48]

Se ha demostrado que los ácidos grasos libres pueden aumentar en el hígado debido a una mayor entrada de triglicéridos (obesidad y pérdida rápida de peso) o una excesiva conversión de carbohidratos y proteínas a triglicéridos debido a un excesivo aporte calórico que produce un aumento de la lipogénesis (secundario a una sobrealimentación o el uso de nutrición parenteral total) [49]. La alteración de la síntesis y secreción de VLDL son mecanismos patogénicos que ocurren durante la malnutrición proteica. Además, los pacientes con NASH pueden tener un defecto en la secreción de Apo B (Apoproteína B) postprandial que tiene como consecuencia el aumento del acúmulo de triglicéridos [50]. Se ha comprobado que el defecto en la lipidación de Apo B, causada por la inhibición de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP), puede ser un mecanismo clave en la presencia de NAFLD inducido por fármacos, tales como la amiodarona y las tetraciclinas [51]. Alteraciones en la síntesis y secreción de VLDL son más evidentes en pacientes con NASH, lo que favorece la oxidación lipídica y el daño oxidativo de los hepatocitos [52].

Por otro lado, la vitamina B5 es necesaria para formar coenzima A y se considera fundamental en el metabolismo y síntesis de carbohidratos, proteínas y grasas. El déficit de cualquiera de estas dos moléculas produce alteraciones en la β -oxidación de ácidos grasos libres a ATP (tratamiento con ácido valproico o uso crónico de aspirina). La capacidad de recuperarse de la depleción de ATP hepático está gravemente deteriorada en los pacientes obesos con NASH [53] y la homeostasis alterada del ATP hepático puede predisponer a la lesión inducida por otros agentes.

Además, la adiponectina, hormona sintetizada en el tejido adiposo que participa en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos, tiene un papel importante mejorando la oxidación y disminuyendo la síntesis de ácidos grasos [54] y su administración extrínseca mejora la esteatosis. La síntesis y oxidación de triglicéridos están reguladas parcialmente por la enzima acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1). La actividad de esta enzima es necesaria para el desarrollo de esteatosis hepática y por ello, los hepatocitos con deficiencia de DGAT1 no presentan NAFLD debido a la reducción de la síntesis de triglicéridos y el aumento de la oxidación de ácidos grasos [55].

Los microRNAs (miRNAs) también juegan un rol importante en el metabolismo lipídico hepatocelular y en la inmunidad. Se trata de pequeños fragmentos de RNAs no codificantes (~22 nucleótidos) que inhiben postranscripcionalmente la traducción de determinados mRNAs (RNA mensajeros), regulando así diversos procesos celulares como proliferación celular, inflamación y apoptosis [56].

Alteraciones en la expresión y/o actividad de miRNAs pueden favorecer la aparición de daño hepatocelular, apoptosis y fibrosis portal [57]. En NAFLD, determinados miRNAs (*miR-122*, *miR-192* entre otros) regulan la expresión de genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y que tienen influencia en el desarrollo de NAFLD [58]. Así, el uso experimental de oligonucleótidos antisentido (asRNAs, *antisense RNAs*) frente a ciertos mRNAs (e.g., ADRP mRNA) provoca la disminución de la síntesis y el aumento de la oxidación hepática de ácidos grasos [59, 60]. Los oligonucleótidos antisentido (~20-22 nucleótidos) son cadenas de una sola hebra de ácidos nucleicos no codificadora con una secuencia que es complementaria a la secuencia de determinados mRNA. Cuando los oligonucleótidos antisentido se unen al mRNA, inhiben su traducción (ie., degradan el mRNA o inhiben la traducción del mRNA a proteína).

Los pacientes obesos con resistencia periférica a la insulina suelen presentar elevada concentración de ácidos grasos libres (AGL) en el hepatocito, cuya acumulación es citotóxica. Los hepatocitos procesan los AGL incorporándolos en lípidos complejos y oxidándolos en mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático [61]. La principal vía de oxidación es la mitocondrial. Esta vía está bloqueada en el hepatocito normal produciéndose un flujo elevado de AGL hacia su incorporación en triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Normalmente, se eliminan en forma de VLDL o se secretan en la bilis como ácidos biliares. En presencia de esteatosis con resistencia a la insulina, la formación de triglicéridos supera su tasa de recambio y secreción en forma de VLDL. Los ácidos biliares son moléculas de 24 átomos de carbono dihidroxilados o trihidroxilados que derivan del colesterol. Por lo tanto son esteroides, una clase de lípidos insaponificables. Además, estos ácidos son derivados estructurales del ácido cólico que se caracteriza por tener en el carbono 17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono. Los ácidos biliares componen la bilis, en la que se encuentran formando sales que actúan como detergentes en el intestino delgado, al disminuir la tensión superficial de las grasas, provocando su emulsión y posterior degradación por la acción de las lipasas. Son necesarios para la absorción de vitaminas liposolubles.

Las adipocitoquinas, los AGL y la hiperglucemia pueden contribuir en el desarrollo de resistencia hepática a la insulina en pacientes con NAFLD, al modular su respuesta, el metabolismo lipídico o la respuesta inflamatoria del hígado [62, 63]. El TNF- α , al igual que en el tejido adiposo, puede alterar la señalización intracelular de la insulina en el hígado y el perfil de expresión de otras citoquinas que también alteran la señal de la hormona en el hepatocito (Figura 5) [62, 63].

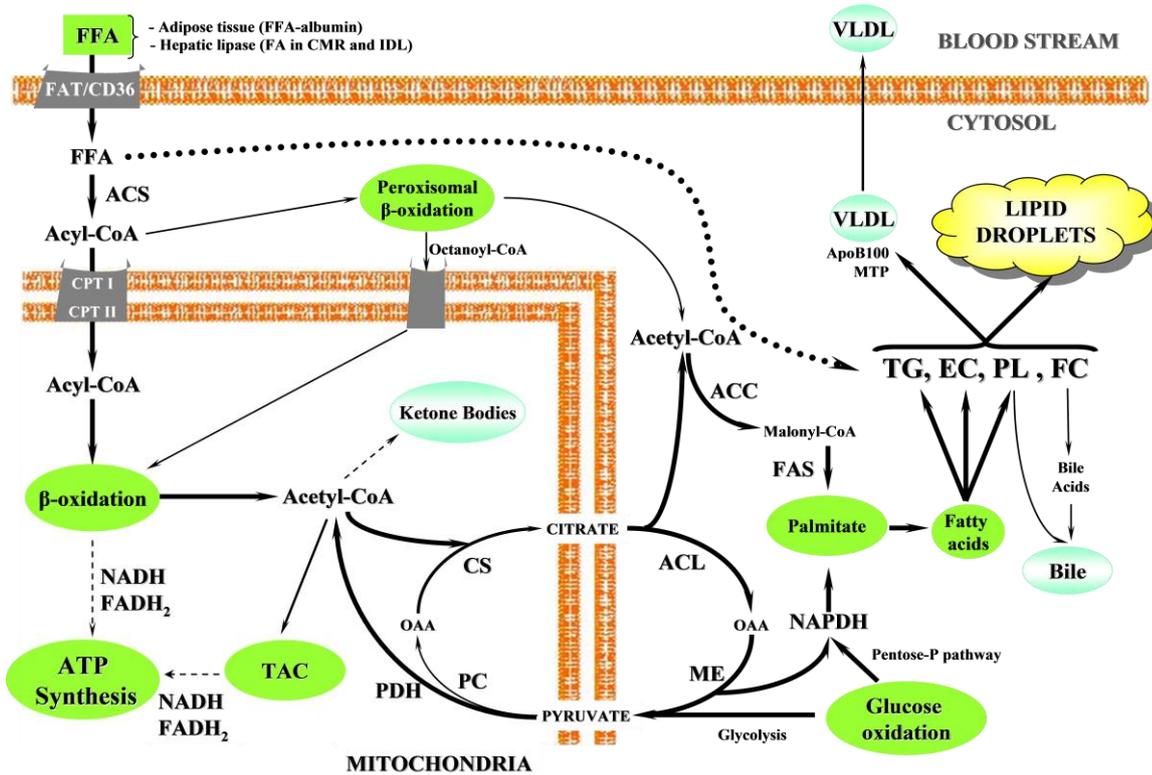


Figura 5. Metabolismo hepato-citocario de los ácidos grasos en una situación de resistencia a la insulina.

FFA: ácidos grasos libres; CMR: remanentes de quilomicroiones; ACS: acil-CoA sintetasa; CPT: carnitina palmitiltransferasa; TAC: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; PDH: piruvato deshidrogenasa; OAA: oxalacetato; CS: citrato sintasa; PC: piruvato carboxilasa; ACL: ATP:citrato liasa; ME: enzima málico; ACC: acetil-CoA carboxilasa; FAS: ácido graso sintasa; TG: triglicéridos; EC: ésteres de colesterol; PL: fosfolípidos; FC: colesterol libre; MTP: proteína transferidora de triglicéridos microsomal; apoB100: apolipoproteína B100. Imagen reproducida de Buqué *et al.* [31].

C. Daño hepato-celular

Los ácidos grasos libres son inductores de varias lipoxigenasas microsomales del citocromo P-450, capaces de producir radicales libres de oxígeno que son hepatotóxicos [64]. La β-oxidación de ácidos grasos libres, junto a los defectos de fosforilación oxidativa mitocondrial, generan radicales libres, daño hepato-celular y fibrosis. Se han observado importantes anomalías estructurales mitocondriales en pacientes con NASH que no están presentes en pacientes con esteatosis simple [30, 40]. Ante estos hallazgos microscópicos, se plantea la posibilidad de que en ausencia de defectos mitocondriales, la resistencia periférica a la insulina pueda producir únicamente esteatosis simple y por ello, se postula que en pacientes con NASH existe un descenso de expresión de genes involucrados en la función mitocondrial [65].

Las anomalías estructurales mitocondriales observadas en pacientes con NASH pueden ser consecuencia de los productos derivados de la peroxidación lipídica, ya que estos alteran el DNA y la respiración mitocondrial [66, 67]. La β -oxidación mitocondrial es la principal ruta de oxidación de los ácidos grasos [68]. En pacientes con NASH se ha encontrado disfunción mitocondrial (Figura 6), anomalías ultraestructurales, actividad reducida de los complejos de la cadena respiratoria, fosforilación oxidativa deficiente, menor capacidad para sintetizar ATP, descenso en la concentración del ATP intracelular y daño en el DNA mitocondrial [30].

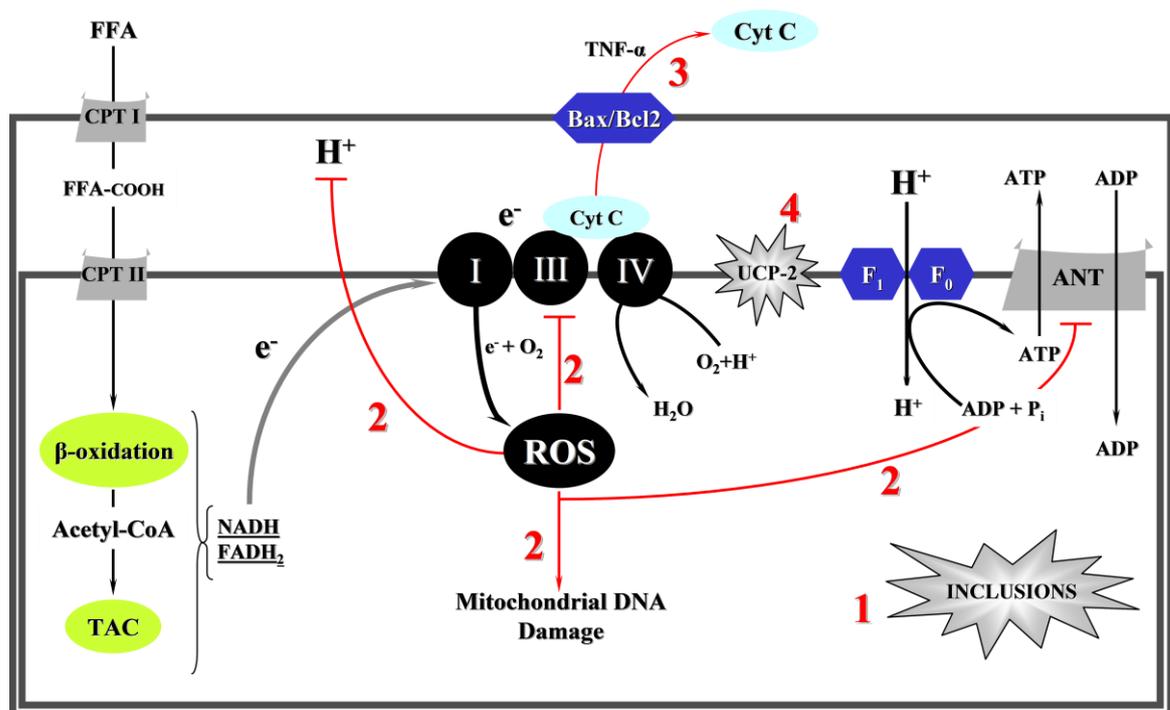


Figura 6. Disfunción mitocondrial en la esteatosis. Un transporte de electrones mitocondrial defectuoso produce una elevada síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y baja de ATP. La incorporación de protones a la matriz mitocondrial por exceso de FFA, ROS y proteína desacoplante UCP-2 (4) inhiben la ATP sintasa (F₀ y F₁), decayendo el potencial electroquímico de membrana y la síntesis de ATP. Además, los radicales libres de oxígeno lesionan los complejos de la cadena respiratoria, la proteína transportadora de nucleótidos de adenina ANT y el DNA mitocondrial (2). La formación de poros permite la salida del citocromo C (Cyt c) (3). Todo ello ocasiona el deterioro de la cadena respiratoria y la generación de más ROS, en un ciclo de autoperpetuación, y una reducida producción de ATP. CPT: carnitina palmitiltransferasa; TAC: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Imagen obtenida de Buqué *et al.* [31].

En el hepatocito esteatósico con mitocondrias disfuncionales, una parte sustancial de ácidos grasos se metabolizan por los sistemas oxidativos peroxisomal y microsomal con formación de radicales libres de oxígeno que producen estrés oxidativo en la célula. Se ha demostrado que este efecto puede aparecer en pacientes con esteatosis simple y NASH [69]. Los radicales libres de oxígeno provocan multitud de efectos tales como el aumento de la síntesis de TNF- α (resistencia a la insulina, necrosis y apoptosis), agotamiento de sustancias antioxidantes naturales, de ATP y NAD⁺, daño del DNA, alteración de la estabilidad proteínica, distorsión de membranas y secreción de citoquinas [70]. La teoría del “doble daño” o “*second hit*” defiende la necesidad de dos eventos para que se produzca el daño hepatocelular, por un lado la resistencia periférica a la insulina y por el otro, un segundo defecto producido por la acumulación de radicales libres de oxígeno. Además, es bien conocido que numerosas citoquinas proinflamatorias y mediadores de la inflamación parecen estar involucrados en el daño hepatocelular, tales como la activación de TNF- α , el sistema de complemento [71], mieloperoxidasa en plasma [72] y las células *natural killer* [73].

D. Factores etiopatogénicos

I. Antioxidantes

Los radicales libres de oxígeno procedentes de la peroxidación lipídica pueden agotar la acción de las enzimas antioxidantes, así como de otras moléculas con dicha función tales como glutatión, vitamina E, β -caroteno y vitamina C, haciendo que el hígado sea susceptible al daño oxidativo [74, 75].

La hemooxigenasa 1, principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo, juega un papel importante en la modulación de procesos inflamatorios, mecanismos de defensa antioxidante y bloqueo de procesos apoptóticos. Esta enzima interrumpe la progresión de NASH mediante la inducción de una vía antioxidante y la supresión de citoquinas proinflamatorias [76]. La xantina oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y posteriormente a ácido úrico. Esta enzima produce radicales libres de oxígeno y en los pacientes con NASH se aprecian niveles séricos elevados, mientras que los niveles de enzimas antioxidantes son más bajos que en la población sana [77]. Los linfocitos T reguladores o supresores pertenecen a una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa suprimiendo la activación del sistema inmunitario, manteniendo así la homeostasis de este sistema y favoreciendo la

tolerancia hacia autoantígenos. El efecto beneficioso de la terapia antioxidante parece estar mediado por las células T reguladoras, que se reducen en los ratones esteatósicos [78]. Los antioxidantes producen una reducción de la apoptosis de las células T reguladoras y una atenuación de la inflamación hepática.

II. Hierro

El aumento del hierro hepático parece jugar un papel importante en el desarrollo de NASH y además, la resistencia a la insulina se asocia con un aumento del nivel férrico intrahepático [79]. Un control adecuado de la glucemia mejora la cifra de ferritina sérica y la concentración férrica hepática [80]. Asimismo, el aumento de la concentración hepática de hierro en pacientes con NASH parece correlacionarse con la severidad de la fibrosis [81, 82].

El mecanismo específico por el cual el hierro intrahepático puede producir fenómenos inflamatorios o de necrosis celular es desconocido, aunque se cree que está relacionado con la generación de radicales libres de oxígeno que se producen en el proceso de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} [83]. En pacientes con NAFLD, la depleción del hierro intrahepático mejora tanto la hiperinsulinemia como la elevación de las transaminasas. La hemocromatosis es una enfermedad hereditaria que afecta al metabolismo del hierro, provocando un acúmulo excesivo e incorrecto de este metal en diferentes órganos. La etiología de la enfermedad es genética con herencia autonómica recesiva. Se produce por mutaciones del gen *HFE* y únicamente se desarrolla en estado homocigoto. La hemocromatosis no parece conferir mayor riesgo para el desarrollo de esteatosis simple [84] y por otra parte, no hay estudios suficientes que demuestren que la acumulación de hierro hepático aumenta la mortalidad o el riesgo de desarrollar cirrosis [85].

III. Leptina

Es un péptido producido principalmente en el tejido adiposo. Cuando aumenta la masa de tejido adiposo por encima del punto de equilibrio, aumenta la síntesis y secreción de leptina por lo que se estimulan varios efectos compensadores a nivel hipotalámico: disminución del apetito, aumento del gasto energético y de la temperatura corporal, además de la modificación del punto de equilibrio hormonal para reducir la lipogénesis y aumentar la lipólisis en el tejido adiposo. Muchos obesos tienen altas concentraciones de leptina en suero o resistencia a la misma. Esta hormona puede contribuir al desarrollo de

fibrosis en pacientes con NASH aunque no parece haber relación entre los niveles de leptina y el estadio de fibrosis. El mecanismo de acción de la leptina parece consistir en la inducción de la defosforilación del receptor tipo I de la insulina que produce en los hepatocitos mayor resistencia a la misma [86].

Por otra parte, la ausencia de leptina y adiponectina por déficit parcial o total de tejido adiposo (lipodistrofia) es clave en el desarrollo de las alteraciones metabólicas propias de esta patología donde se asocian resistencia a la insulina con hipertrigliceridemia, las cuales contribuyen al desarrollo de esteatosis simple y NASH en estos pacientes. La terapia con leptina disminuye el nivel sérico de triglicéridos y mejora el depósito de grasa en el hígado [87].

IV. Adiponectina

Es una hormona secretada exclusivamente por el tejido adiposo que produce efectos beneficiosos sobre el metabolismo de lípidos y efectos antiinflamatorios directos en el hígado. Los niveles bajos de adiponectina sérica se correlacionan con presencia de NAFLD, fibrosis hepática y mayor severidad del síndrome metabólico [88] y, de la misma manera, con mayor severidad de la histología hepática en NASH [89] y con aumento de resistencia a la insulina hepatocitaria [90]. Se ha comprobado que la administración de pioglitazona produce un aumento de los niveles de adiponectina con clara mejoría de la esteatosis hepática, necroinflamación y fibrosis [90, 91].

V. Resistina

Es una proteína derivada del tejido adiposo que parece tener un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes obesos [92, 93]. Estudios realizados en roedores han demostrado que la sobreexpresión de resistina produce intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia [94].

VI. Flora bacteriana intestinal

La flora bacteriana intestinal parece estar implicada en el daño oxidativo hepatotóxico. En este sentido, se han propuesto varios mecanismos de acción probables.

Por una parte, estos microorganismos bacterianos están capacitados para producir grandes cantidades de etanol y acetaldehído. Este último es fácilmente absorbido al torrente circulatorio y puede producir cambios histológicos hepáticos similares a los observados en NAFLD [95]. Las bacterias

intestinales también pueden contribuir a la lesión hepática mediante la producción de endotoxina. Así, se ha observado aumento de la endotoxemia portal en ratones obesos [96]. En pacientes con NASH, se ha podido comprobar aumento significativo de marcadores de permeabilidad intestinal y mayor prevalencia de proliferación bacteriana endoluminal, cambios que se correlacionan con la severidad de la esteatosis hepática [97].

En diferentes estudios se ha comprobado que la administración de antibióticos mejora la esteatosis hepática en roedores y seres humanos [98, 99]. Un estudio realizado en roedores con NAFLD ha demostrado que el uso de probióticos mejora la esteatosis y la hepatomegalia [100].

VII. Otros:

El **síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS)** se debe a episodios repetidos de obstrucción o colapso de la vía aérea superior que tiene lugar durante el sueño. La apnea es la interrupción temporal de la respiración de más de diez segundos de duración produciendo una disminución de los niveles de oxígeno y un aumento del nivel de anhídrido carbónico. El SAOS parece tener un papel importante en la inflamación que ocurre en NAFLD. Un estudio experimental realizado en roedores con alto contenido en grasas y sometidos a hipoxia intermitente crónica durante 6 meses ha demostrado daño hepático (inflamación y fibrosis centrolobulillar), aumento significativo de la peroxidación lipídica del hígado y de los niveles de citoquinas proinflamatorias hepáticas [101]. De forma similar, los pacientes con obesidad mórbida que tienen índices muy altos de desaturación de oxígeno (número de caídas en la saturación de oxígeno del 3%/hora) presentan cambios inflamatorios más severos en la biopsia hepática [102].

El **colesterol dietético** parece ser otro factor importante en el desarrollo de inflamación hepática. Se ha demostrado que roedores hiperlipidémicos alimentados con dietas altas en grasa (colesterol) desarrollan esteatosis hepática en comparación con los animales control normolipidémicos. La inflamación hepática está relacionada con niveles altos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y colesterol en suero [103].

E. Fibrosis

La fibrosis perisinusoidal en pacientes con NASH es una consecuencia del proceso inflamatorio crónico. Una lesión crónica hepatocitaria produce un enlentecimiento replicativo primario. La fibrosis tiene su origen en la activación

de una vía secundaria de replicación que afecta a células progenitoras hepáticas. Se produce entonces una reacción ductular que puede desembocar en fibrosis periportal. El incremento de esta reacción ductular se correlaciona con el grado de actividad de la esteatohepatitis, de fibrosis y el grado de enlentecimiento de la replicación primaria de los hepatocitos, que a su vez se asocia con resistencia a la insulina [104].

Se ha demostrado que la acumulación de ácidos grasos en el hepatocito produce fenómenos de peroxidación lipídica, generación de grandes cantidades de radicales libres de oxígeno, liberación de citoquinas y adipocinas y, finalmente, fibrosis hepática. Hay evidencia que demuestra que tanto la esteatosis simple como NASH pueden progresar hacia la fibrosis [105, 106]. La tasa de progresión de fibrosis (FPR) se define como el número de grados que aumenta la fibrosis entre dos biopsias y depende del tiempo que transcurre entre ambas. Los pacientes con NASH presentan una FPR mayor y una progresión más rápida a grados altos de fibrosis en comparación a los que presentan esteatosis simple [106]. La progresión de la fibrosis en pacientes con esteatosis representa una interacción compleja de factores genéticos, factores extrínsecos y factores microbianos intrínsecos [107-109].

3. Epidemiología

El creciente interés por esta enfermedad está motivado por varias circunstancias: la elevada prevalencia de NAFLD en el mundo occidental, su capacidad de progresión hacia formas histológicas agresivas y la asociación con enfermedades que incrementan el riesgo cardiovascular. Aunque se desconoce la prevalencia real de NAFLD, existe el consenso general de que ésta se ha incrementado de forma notable durante los últimos años, afectando a cerca de un tercio de la población adulta en los países desarrollados. El rango de prevalencia estimada oscila entre el 3 y el 46% de la población analizada, siendo esta extraordinaria variabilidad dependiente tanto de las herramientas utilizadas como de la población objeto del estudio [2, 110-112]. En la población adulta norte-americana, se ha demostrado que la prevalencia de NAFLD es superior a la sospechada con anterioridad, alcanzando cifras cercanas al 50% de la misma [113] y que ésta es diferente en función del sexo, raza, peso o los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}). Así, NAFLD es más prevalente en los hombres, hispanos (probablemente relacionado con una mayor tasa de obesidad en esta raza), individuos diabéticos con niveles elevados de HbA_{1c} y pacientes con criterios de obesidad [111, 113].

NAFLD presenta mayor prevalencia en grupos de alto riesgo. Así, la **obesidad** es un factor de riesgo bien documentado de NAFLD [114]. En pacientes con criterios de obesidad mórbida candidatos a cirugía bariátrica la prevalencia de NAFLD alcanza valores del 90% y de cirrosis insospechada por encima del 5% [2, 115]. Asimismo, la prevalencia de NAFLD entre pacientes con **diabetes tipo 2** puede ser hasta del 70% [28, 116, 117] y en individuos con **dislipemia** hasta del 50% [118]. Hay datos que sugieren que el hipotiroidismo, el hipopituitarismo, el hipogonadismo y el síndrome de apnea obstructiva del sueño son factores de riesgo independientes de NAFLD [119].

La prevalencia de NASH en la población general no se conoce bien, principalmente a causa de las limitaciones de los métodos incruentos en el diagnóstico de dicha patología. La prevalencia de NASH confirmada por biopsia hepática es del 12% en los pacientes con diagnóstico ecográfico de esteatosis en un estudio poblacional realizado en EEUU, cifra superior a la que se manejaba con anterioridad [113]. En pacientes con obesidad mórbida ésta asciende hasta el 37% [120].

La mayoría de los casos debutan entre los 40 y 60 años, aunque se ha comprobado que NAFLD es la causa más común de enfermedad hepática en edad adolescente [121, 122]. Es de destacar que los gastos económicos de atención sanitaria son significativamente más elevados en personas con NAFLD respecto a la población sana [123].

4. Asociación con el síndrome metabólico y obesidad

A. Síndrome metabólico

Es bien conocida la asociación frecuente de NAFLD con la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la hiperlipemia y la hipertensión arterial. Dicha asociación combinatoria recibe el nombre de síndrome metabólico (síndrome X, cuarteto de la muerte, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome obesidad-dislipemia). La obesidad, especialmente la obesidad abdominal, se asocia con resistencia periférica a la insulina y suele conducir al desarrollo de una diabetes mellitus tipo 2. La asociación de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia/hiperglucemia y adipoquinas (citoquinas de los adipocitos) puede conducir a disfunción vascular endotelial, perfil lipídico anormal, hipertensión arterial e inflamación vascular, todo lo cual promueve el desarrollo de una enfermedad cardiovascular aterosclerótica [124].

I. Criterios diagnósticos

Las guías clínicas actuales definen el síndrome metabólico como la presencia de 3 de los siguientes criterios [125]:

- Obesidad abdominal definida por la presencia en individuos adultos de una circunferencia de cintura abdominal en hombres ≥ 102 cms y en mujeres ≥ 88 cms.
- Triglicéridos séricos ≥ 150 mg/dl.
- Lipoproteína de alta densidad (HDL) sérica < 40 mg/dl en hombres o < 50 mg/dl en mujeres.
- Tensión arterial $\geq 130/85$ mm Hg.
- Glucosa sérica en ayunas ≥ 100 mg/dl.

El síndrome metabólico es significativamente más frecuente en pacientes con NASH que en los que presentan únicamente esteatosis [19]. La pérdida de peso secundaria a la cirugía bariátrica produce mejoría del síndrome metabólico y de la esteatosis hepática [126-128]. De la misma forma, en los pacientes con NASH se ha observado diabetes tipo 2 en el 34-75% e hiperlipemia en el 20-80% de los casos [129, 130].

B. Obesidad

La obesidad, considerada la epidemia global del siglo XXI, es una enfermedad crónica cuya prevalencia está aumentando en adultos, adolescentes y niños. Las tasas de prevalencia de obesidad ($IMC \geq 30$ kg/m²) varía según las áreas geográficas desde el 20 al 35% en los países industrializados. Todos los resultados sugieren que en la mayoría de los países se ha incrementado el porcentaje de sobrepeso en los últimos 30 años [131, 132]. La obesidad se asocia con un aumento significativo de la mortalidad [133] y con un riesgo elevado de muchos trastornos, tales como diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipemia, enfermedad cardíaca, accidente cerebro-vascular, síndrome de apnea obstructiva del sueño y cáncer. Los gastos económicos de atención sanitaria son significativamente más elevados en personas con sobrepeso y obesidad [134, 135]. Estudios epidemiológicos revelan que entre el 30 y el 97% de los individuos con NASH son obesos [33, 136] y, viceversa, el 60-90% de los pacientes con obesidad mórbida presentan alguna característica histológica de NAFLD [137].

Los beneficios potenciales de la detección de la obesidad en adultos parecen ser superiores a los riesgos. Los exámenes más habituales son el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de la cintura abdominal y la

evaluación de los factores de riesgo. Por desgracia, la detección de la obesidad todavía no parece ser una práctica de rutina y se ha comprobado que menos del 25% de los obesos tienen diagnóstico clínico de obesidad o se les ha recomendado un plan terapéutico [138].

I. Detección

I.1. Índice de masa corporal (IMC)

El cálculo del IMC depende del peso y la talla del paciente. Las diferentes clasificaciones consideran el riesgo de enfermedades cardiovasculares [139] y se basan en las recomendaciones dadas por la organización mundial de la salud (OMS) [140] para caucásicos, hispanos y negros:

- Bajo peso: $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$
- Peso normal: $IMC: 18.5-24.9 \text{ kg/m}^2$
- Sobrepeso: $IMC: 25-29.9 \text{ kg/m}^2$
- Obesidad: $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$
 - o Obesidad clase I: $IMC: 30-34.9 \text{ kg/m}^2$
 - o Obesidad clase II: $IMC: 35-39.9 \text{ kg/m}^2$
 - o Obesidad clase III: $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$

I.2. Circunferencia de la cintura abdominal

La presencia de obesidad abdominal se considera un factor de riesgo cardiometabólico. La medición de la circunferencia de cintura abdominal es recomendable en pacientes adultos con sobrepeso y obesidad clase I ($IMC: 25-35 \text{ Kg/m}^2$) y es necesaria cuando el IMC es $\geq 35 \text{ Kg/m}^2$. Una circunferencia abdominal $\geq 102 \text{ cms}$ en hombres y $\geq 88 \text{ cms}$ en mujeres es indicativa de mayor riesgo cardiometabólico [141]. Los pacientes con obesidad abdominal (obesidad central, visceral, androide) tienen mayor riesgo de enfermedades cardiacas, diabetes, hipertensión, dislipemia y NAFLD [142-145].

5. Historia Natural

Existe poca evidencia acerca de la historia natural de los pacientes con NAFLD debido a la naturaleza indolente del proceso y a la ausencia de grandes estudios prospectivos. La historia natural varía según el diagnóstico histológico inicial.

Los pacientes con NAFLD tienen una mortalidad global aumentada en comparación con la población control [14], sobre todo en relación a patología cardiovascular [5]. Por ello, se recomienda la vigilancia de las enfermedades cardiovasculares en los pacientes diagnosticados de esteatosis simple y NASH [16]. Además, los pacientes con NASH presentan tasa de mortalidad elevada atribuida a la enfermedad hepática.

La morbi-mortalidad atribuida al hígado parece estar relacionada con la extensión de la fibrosis e inflamación en la biopsia hepática. Las complicaciones derivadas del hígado incluyen la insuficiencia hepática, la hipertensión portal, el síndrome hepato-pulmonar y el carcinoma hepatocelular [146]. Los pacientes con cirrosis por NASH parecen tener mejor pronóstico en relación a las complicaciones relacionadas directamente con el hígado que los pacientes con cirrosis vírica por hepatitis C. Así, existe una menor tasa de mortalidad y de riesgo de hepatocarcinoma en los pacientes con cirrosis-NASH en comparación con el grupo que presenta cirrosis vírica [147, 148]. En general, se considera que los pacientes con NASH tienen mejor pronóstico que los que padecen una esteatohepatitis alcohólica o vírica.

En la mayor parte de pacientes, la evolución de la enfermedad es insidiosa apreciándose pocos cambios en la función hepática. Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes que evoluciona hacia enfermedad hepática en fase terminal. Así, se han demostrado mayores tasas de mortalidad en relación al aumento progresivo del estadio histológico de la enfermedad [149]. Por tanto, la detección precoz de pacientes que tienen riesgo elevado de desarrollar NASH es fundamental para prevenir la progresión de la enfermedad hepática. Ante la escasa presencia de técnicas de imagen adecuadas y marcadores no invasivos, actualmente la biopsia hepática es todavía necesaria para detectar o excluir la presencia de esteatosis y sobre todo, de NASH [150, 151].

En la actualidad se manejan una serie de criterios para definir NASH [152, 153]:

- Criterios histológicos: Presencia de esteatosis, degeneración vacuolar de los hepatocitos, inflamación aguda y crónica moderada y difusa del lobulillo hepático, depósito de colágeno perisinusoidal y perivenoso. Otros hallazgos histológicos pueden estar presentes: hialina

de Mallory (acumulaciones eosinofílicas hepatocitarias), núcleos vacuolados de los hepatocitos periportales, lipogranulomas y fibrosis periportal en estadios avanzados de cirrosis. Estos hallazgos son indistinguibles de los encontrados en la esteatohepatitis alcohólica.

- Ausencia de consumo significativo de alcohol (< 20 gr de etanol/día).
- Ausencia de evidencia serológica de infección por virus de hepatitis B o C.

Diferentes estudios han analizado la evolución histológica de la enfermedad mediante biopsias hepáticas en serie. Se ha comprobado que un 35-40% de los pacientes diagnosticados de NASH muestran un estadio de fibrosis avanzada en el momento de la primera biopsia o progresión de la fibrosis en las biopsias seriadas [154, 155].

A. Factores de riesgo de progresión de la enfermedad hepática

Los factores predictivos independientes de progresión a fibrosis en los pacientes con esteatosis simple o NASH no están claramente definidos aunque destacan la presencia de inflamación en la biopsia hepática inicial, la edad avanzada [156], la presencia de diabetes mellitus, hipertensión arterial, concentraciones altas de transaminasas hepáticas en sangre e índice AST/ALT bajo [106, 157]. La presencia de degeneración vacuolar asociada a hialina de Mallory en la biopsia hepática inicial de los pacientes diagnosticados de esteatosis simple aumenta la probabilidad de progresión a cirrosis en comparación con el grupo que presenta únicamente esteatosis en dicha biopsia [12].

Cuando se habla de factores de riesgo para la progresión de la enfermedad hepática, en la literatura podemos encontrar el término “**Índice de adiposidad visceral**” que tiene en cuenta la circunferencia de la cintura abdominal, el índice de masa corporal (IMC), la concentración de triglicéridos y lipoproteína de baja densidad (LDL) en suero. Se trata de un factor predictivo de fibrosis y por ello, los pacientes con NAFLD que tienen un índice de adiposidad visceral elevado presentan más fibrosis en la biopsia hepática que aquellos con índice bajo [158].

Ciertos polimorfismos genéticos se han relacionado con el pronóstico de NAFLD, pero su utilidad clínica aún no se ha establecido claramente. La predisposición genética causada por la variante frecuente p.I148M del gen de la enzima adiponutrina (*PNPLA3*) es bien conocida, emergiendo como una causa genética importante en el desarrollo de esteatosis simple y NASH, así como de cirrosis y carcinoma hepatocelular [159]. El gen *PNPLA3* codifica una

enzima transmembrana expresada en los adipocitos y los portadores homocigotos de la variante p.I148M tienen mayor predisposición a desarrollar cirrosis cuando están diagnosticados de NAFLD. Esta variante se ha relacionado también con mayor riesgo de esteatosis y fibrosis en otras enfermedades hepáticas crónicas [160]. Así, la variante *PNPLA3* p.I148M está asociada con mayor riesgo de esteatosis simple, NASH y fibrosis [159]. La esteatohepatitis asociada a *PNPLA3* (en inglés *PNPLA3-associated steatohepatitis, PASH*) se ha definido como un nuevo término de enfermedad grasa hepática con base genética [160]. Como la prevalencia de este alelo de riesgo es 40-50% entre la población europea, la identificación de esta mutación en el gen *PNPLA3* debe ser considerado en el estudio diagnóstico de NAFLD y los portadores homocigotos de dicha variante podrían beneficiarse de una vigilancia periódica que permita descartar o realizar un diagnóstico precoz del carcinoma hepatocelular [161].

Con la excepción de ciertas características histológicas, no hay características clínicas o de laboratorio que puedan predecir la progresión de la enfermedad hepática. El grado de obesidad no altera significativamente el curso clínico, aunque hay evidencia de que la pérdida de peso tiene impacto beneficioso sobre la histología hepática. Así, los pacientes que tienen pérdida de peso después de la cirugía bariátrica muestran mejoría de la inflamación y fibrosis en una biopsia hepática realizada a los dos años de la intervención [162, 163].

A pesar de la similitud histológica entre NASH y esteatohepatitis alcohólica, el pronóstico es mucho mejor en la primera. El 40-50% de los pacientes con esteatohepatitis de origen alcohólico progresan hacia cirrosis en un periodo de 7 años, siendo este porcentaje mayor en aquellos que son alcohólicos activos. Por el contrario, únicamente el 3-26% de pacientes con NASH progresan a cirrosis. Así, se ha demostrado que la supervivencia a 5 y 10 años es mayor en los pacientes con NASH respecto a los que padecen esteatohepatitis alcohólica [164, 165]. Los pacientes con NASH que desarrollan cirrosis tienen mayor riesgo de desarrollar hepatocarcinoma, particularmente si beben de forma regular alcohol [166-168].

Los datos precisos sobre el porcentaje de trasplantes hepáticos realizados en pacientes con cirrosis relacionada con NASH se desconocen. En un estudio que analiza una serie larga de trasplantes hepáticos se ha demostrado que la causa del trasplante es una cirrosis relacionada con NASH en el 1,2% de los casos y que la mayoría de estos pacientes presentan infiltración grasa persistente en el hígado sano al año del trasplante [169].

6. Manifestaciones clínicas

La mayoría de los pacientes con esteatosis simple o NASH son asintomáticos. Algunos presentan fatiga, malestar general o ligera molestia abdominal en el hipocondrio derecho. Los pacientes diagnosticados de NASH tienen a menudo niveles elevados de ferritina sérica y hepatomegalia [170].

La presentación más común es la elevación de las aminotransferasas hepáticas. AST y ALT se elevan en casi el 90% de los pacientes, siendo la relación AST/ALT inferior a 1 en la mayor parte de los casos. Este dato es diferente a la hepatitis alcohólica donde este valor suele ser mayor de 2 [171, 172]. Sin embargo, el valor normal de las aminotransferasas no excluye el diagnóstico de NAFLD en cualquiera de sus formas evolutivas. Hay evidencia que demuestra que un porcentaje elevado de pacientes con diagnóstico histológico de NAFLD puede tener un valor normal de aminotransferasas e incluso progresión de la enfermedad con fibrosis y cirrosis establecida hasta en el 35% de los casos [173].

7. Diagnóstico

El hígado graso no alcohólico suele ser asintomático en el momento del diagnóstico [174]. Por lo tanto, la determinación del contenido lipídico del hígado plantea un desafío importante en términos de identificación, tratamiento y control de la progresión de la enfermedad [175].

El diagnóstico de NAFLD requiere la presencia de los siguientes criterios [4]:

- Demostración de esteatosis hepática por técnicas de imagen o biopsia.
- Exclusión de consumo alcohólico > 20 gr/día.
- Exclusión de otras causas de esteatosis hepática.

La mayor parte de las técnicas de imagen nos aportan un diagnóstico cualitativo de depósito graso en el hígado. Así, el diagnóstico de NAFLD se ha realizado principalmente por el análisis histológico de biopsia hepática que es cruento y semicuantitativo. El diagnóstico y el tratamiento precoz de la esteatosis hepática son importantes para prevenir el desarrollo de enfermedad hepática hacia un estado terminal o de hepatocarcinoma.

A. Biopsia hepática y análisis histológico

En ausencia de pruebas diagnósticas definitivas, la biopsia hepática ha sido tradicionalmente la única forma de confirmar el diagnóstico de esteatosis simple

o NASH [176]. Permite determinar la gravedad, el daño estructural (inflamación, necrosis, fibrosis) y proporcionar información sobre el pronóstico de dicha enfermedad. La biopsia hepática se considera en la actualidad el único método diagnóstico para diferenciar la esteatosis simple de NASH. Al tratarse de una prueba cruenta, no está exenta de riesgos y potenciales complicaciones como infección, hemorragia o fuga biliar [177], alcanzando cifras de morbilidad del 3% y mortalidad del 0,03% [178]. En algunas series hasta el 30% de los pacientes tienen dolor tras el procedimiento y una tasa de complicaciones severas cercana al 0,3% [179, 180].

En los protocolos diagnósticos actuales se recomienda la realización de una biopsia hepática en pacientes diagnosticados de esteatosis con sospecha de NASH y que tengan alguna de las siguientes características clínicas o de laboratorio:

- Estigmas periféricos de enfermedad hepática crónica.
- Esplenomegalia.
- Citopenias.
- Estudios anormales del hierro.
- Presencia de diabetes u obesidad significativa en una persona con edad superior a 45 años.

En caso de duda diagnóstica o interés por conocer el daño hepático real puede estar indicada la realización de una biopsia hepática. Como hemos dicho previamente, se trata de una prueba diagnóstica invasiva que la hace inadecuada en el *screening* de gran número de pacientes en riesgo o en el seguimiento longitudinal de pacientes con NAFLD sometidos a tratamientos [181].

El primer sistema de evaluación histológico semicuantitativo solo era aplicable a NASH, sin validez para la esteatosis simple ni para pacientes pediátricos [182]. Actualmente, se utiliza otro sistema histológico semicuantitativo que permite hacer una evaluación histológica del espectro completo de NAFLD y que es también aplicable a la población pediátrica (Tabla 1) [183].

El sistema de puntuación histológico se puede utilizar para evaluar la respuesta a un tratamiento específico [182]. La principal limitación que tiene esta prueba en el diagnóstico de NAFLD y en el estadiaje de NASH sigue siendo la gran variabilidad muestral [184] y la gradación semicuantitativa subjetiva de la esteatosis hepática [182]. Se trata igualmente de una técnica cara, tomando en consideración la realización de la biopsia y el procesamiento de la muestra [184].

Actualmente, el procedimiento estándar para evaluar la esteatosis hepática es el examen histológico de secciones hepáticas y la estimación semicuantitativa del porcentaje de hepatocitos (0% -100%) que contienen grasa macrovesicular, que se clasifica en una escala de 0-3 [184]. La estimación histológica es bidimensional (2D) y considera fracciones de células en lugar de fracciones de volumen. Esta estimación desvirtúa la realidad ya que desestima la información procedente de la 3ª dimensión. Es importante añadir que la biopsia hepática aporta información de una pequeña parte del hígado que a veces no es representativa de un proceso difuso hepático (i.e., esteatosis parcheada). Presenta diferencias inter-individuales del cálculo cualitativo y cuantitativo de los depósitos de grasa hepática [185, 186] y los resultados dependen de la experiencia del patólogo, resultando habitualmente en una sobreestimación del contenido de grasa en el hígado [187]. Para conseguir resultados más objetivos, es posible la evaluación de la esteatosis usando análisis de imagen computacional de cortes histológicos, pero no se lleva a cabo de forma rutinaria en la práctica clínica [188, 189].

Clasificación histológica de NAFLD

Esteatosis

- Grado I (leve): afectación de menos del 33% de los hepatocitos
- Grado II (moderada): afectación del 33-66% de los hepatocitos
- Grado III (severa): afectación de más del 66% de los hepatocitos

Esteatohepatitis (NASH)

Actividad necroinflamatoria

- Grado I (leve): esteatosis de menos del 66% de los hepatocitos, "balonamiento" de algunos hepatocitos de la zona 3, algún foco inflamatorio e infiltrado polinuclear en el lobulillo e inflamación portal ausente o leve
- Grado II (moderada): esteatosis de cualquier grado, importante "balonamiento" de los hepatocitos, inflamación portal y lobulillar leve o moderada
- Grado III (severa): esteatosis, "balonamiento" difuso de los hepatocitos, inflamación e infiltrado polinuclear en la zona 3 e inflamación portal

Fibrosis

- Estadio I: fibrosis pericelular/perisinusoidal de la zona 3
 - Estadio II: fibrosis pericelular/perisinusoidal de la zona 3 con fibrosis periportal focal o extensa
 - Estadio III: fibrosis pericelular/perisinusoidal de la zona 3 con fibrosis portal focal y puentes de fibrosis
 - Estadio IV: cirrosis
-

Tabla 1. Clasificación histológica del espectro completo de la enfermedad grasa hepática.

Modificado de Kleiner *et al.* [183].

Hoy en día, existen métodos bioquímicos más precisos que permiten cuantificar la grasa hepática con exactitud y se están mejorando igualmente las diferentes técnicas de imagen.

B. Cuantificación bioquímica de la grasa

La determinación de la grasa total de cualquier órgano se realiza habitualmente mediante el método bioquímico descrito por *Folch et al* [190] que permite cuantificar la grasa exacta (triglicéridos) en la muestra analizada. La exactitud diagnóstica permite considerar el método bioquímico como una prueba "gold standard" adecuada, con la que se pueden comparar otras pruebas diagnósticas en estudio. En la práctica clínica, la extracción y medición bioquímica de los triglicéridos hepáticos raramente es utilizada debido a la destrucción de la muestra hepática obtenida con la biopsia que impide su utilización en otro tipo de estudios.

C. Biomarcadores serológicos

Ante las limitaciones que tiene la biopsia hepática, la búsqueda de biomarcadores incruentos para la estimación de daño hepático como la presencia de esteatosis se ha convertido en un objetivo prioritario en muchos estudios de investigación. Así, el **fibrotest** se ha validado con el análisis histológico como un marcador de fibrosis en hepatitis crónica C [191], B [192], alcohólica [193, 194] y en NAFLD [195]. Por otro lado, el **ActiTest** se ha validado con el análisis histológico de biopsia hepática como marcador de necrosis en pacientes con hepatitis crónica C [191] y B [192].

En los últimos años, se han descrito varios índices de biomarcadores serológicos para la predicción de esteatosis hepática como **SteatoTest** [196], **FLI** (en inglés *fatty liver index*) [197], **LAP** (en inglés *lipid accumulation product*) [198] y **NAFLD Liver Fat Score** [199]. Sin embargo, únicamente el SteatoTest está validado con los resultados obtenidos mediante el análisis histológico.

La **metabolómica** es el estudio científico de los procesos químicos que involucran metabolitos de molécula pequeña. El metaboloma representa la colección de todos los metabolitos en una célula, tejido, órgano u organismo que son producto de los procesos celulares. En este sentido, el metaboloma en suero se ha validado con el análisis histológico, obteniéndose cerca de 700 metabolitos séricos dependientes del IMC mediante una técnica denominada cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Interesantemente, se ha descrito que el patrón diferencial de metabolitos en suero es capaz de distinguir entre esteatosis simple y NASH [200].

D. Técnicas de imagen

Es esencial establecer nuevos métodos incruentos para determinar con precisión la concentración de grasa hepática, que permita el diagnóstico correcto y el seguimiento adecuado de la esteatosis. Entre estos procedimientos diagnósticos no invasivos destacan las técnicas de imagen.

Varias técnicas de imagen pueden detectar la presencia de grasa en el hígado pero ninguna es capaz de diferenciar entre los diferentes subtipos histológicos de NAFLD [201].

El diagnóstico radiológico cualitativo de NAFLD es suficiente si se cumplen las siguientes condiciones:

- Imagen de infiltración grasa en el hígado.
- Exclusión de otras causas de enfermedad hepática.
- Ausencia de signos o síntomas de cirrosis.
- Ausencia de riesgo elevado para la presencia de fibrosis avanzada o cirrosis.

I. Ecografía

La ecografía a menudo muestra una imagen hiperecogénica o hígado brillante debido a la infiltración grasa difusa con acúmulo intracelular de vacuolas grasas. Sin embargo, otras lesiones como la fibrosis hepática pueden determinar un resultado similar. La sensibilidad y especificidad de la ecografía son 85% y 94% respectivamente cuando se usa la biopsia hepática como *gold standard* [202]. Sin embargo, esta sensibilidad es menor en pacientes con criterios de obesidad mórbida, no superando el 50% [203, 204]. Es una prueba diagnóstica que está sujeta a variabilidad intra-observador e inter-observadores [205].

Por otra parte, se trata de una prueba diagnóstica muy accesible y económica, que la hace muy adecuada en la detección de esteatosis hepática en pacientes asintomáticos con enzimas hepáticas elevadas y sospechosos de presentar NAFLD [206]. La ecografía convencional es una prueba dinámica que presenta un sesgo importante ya que ofrece una información diagnóstica observador-dependiente y por esa razón, no se trata de un método diagnóstico adecuado para realizar una cuantificación objetiva de la concentración de grasa hepática [204, 207, 208].

Por el contrario, debido principalmente a la baja precisión diagnóstica en casos de esteatosis leve, la dependencia del observador y la ausencia de un

tratamiento posterior de las imágenes obtenidas, la ecografía convencional no debe utilizarse como herramienta en la monitorización de los pacientes con NAFLD sometidos a cualquier tipo de tratamiento. Así, métodos computarizados de análisis cuantitativo pueden solucionar en parte dichas limitaciones pero necesitan una correcta validación clínica [181]. En dos estudios muy recientes, comparan los resultados de ecografía computarizada con los de una técnica de RM utilizada como prueba de referencia mostrando una correlación positiva [209, 210].

II. Tomografía Computarizada

La TC es también sensible para la detección de esteatosis mostrando hipodensidad hepática en comparación al hígado normal. Tiene bastante precisión para el diagnóstico de esteatosis hepática moderada-severa aunque es menor cuando la concentración grasa hepática es baja. En la literatura encontramos una gran variabilidad en relación a los valores umbrales que permiten diferenciar el grado de esteatosis, lo que limita el uso generalizado de la TC en el diagnóstico de NAFLD [181]. Otros factores diferentes a la grasa hepática tales como la presencia de hierro en el hígado y la ingestión de ciertas drogas como la amiodarona pueden influir en el valor de atenuación o densidad hepática de la TC e interferir en la evaluación de la esteatosis [211-213]. La baja precisión de la TC para detectar esteatosis leve sugiere que este método no es adecuado para el diagnóstico de NAFLD. El depósito escaso de grasa hepática en la mayor parte de los pacientes y el potencial peligro derivado de la radiación ionizante utilizada en la TC hacen que su uso no sea recomendable en niños, ni en la monitorización longitudinal de pacientes con NAFLD sometidos a algún tipo de tratamiento [154, 214].

Tanto la tomografía computarizada como la resonancia magnética pueden identificar la esteatosis pero no son sensibles para la detección de inflamación o fibrosis [215].

III. Resonancia Magnética

La RM tiene capacidad de cuantificar la grasa hepática de forma incruenta con gran exactitud y se trata de la técnica de imagen más sensible y específica para el diagnóstico de esteatosis hepática [216]. Tanto las técnicas de imagen por RM como la espectroscopia por RM tienen la capacidad de cuantificar la grasa hepática lo que las convierte en un adecuado biomarcador incruento de

NAFLD. Esta capacidad se basa en que el campo magnético local que percibe la RM de los núcleos de hidrógeno es diferente si forman parte de la molécula de agua o de la grasa y por tanto, esta diferencia se refleja en la frecuencia de precesión alrededor del campo magnético principal. Ésta se define como la frecuencia o número de giros por segundo que realiza un protón en relación a la fuerza del campo magnético externo a la que está sometido. Se representa por ω y se calcula por la ecuación de Larmor $\omega_0 = \gamma B_0$, donde ω_0 es la frecuencia de precesión; γ es la constante giromagnética, específica de cada material, y B_0 es la fuerza del campo magnético medido en teslas.

La espectroscopia por RM permite distinguir entre estos componentes codificando la información espectral de la señal de RM y haciendo que cada pico corresponda a una frecuencia de precesión determinada. El pico del agua tiene una frecuencia de 4.7 ppm y el pico dominante de la grasa (metileno) es de 1.3 ppm. La altura de cada pico depende de la cantidad de átomos de hidrógeno girando con la frecuencia correspondiente. Al comparar la altura de los dos picos, la espectroscopia es capaz de cuantificar la proporción de agua y grasa. Los inconvenientes de la espectroscopia por RM son el estudio de un volumen limitado del hígado y la poca accesibilidad en las máquinas operativas [217].

En los estudios de Imagen por RM puede evaluarse tanto cualitativa como cuantitativamente la esteatosis hepática mediante el efecto de desplazamiento químico en secuencias eco de gradiente. Este desplazamiento químico es la consecuencia de adquirir imágenes sensibles a las diferencias en frecuencia de precesión entre el agua y la grasa. Ajustando diferentes parámetros en estas secuencias de adquisición, principalmente el Tiempo de Eco (TE), se hace más evidente esta diferencia en la frecuencia de precesión del agua y de la grasa en aquellas circunstancias en que ambos componentes compartan el mismo voxel de la imagen, como suele ocurrir en pacientes con esteatosis hepática. En aquellos casos donde el TE ajusta para que las diferencias de frecuencia entre ambos componentes hagan que la magnetización de la grasa se reste a la del agua se denomina "Fase Opuesta" (FO). Por otro lado, si la magnetización de ambos componentes se deja evolucionar, habrá un TE en que ambos se encuentren alineados en la misma orientación y se denomina en "Fase" (F). (Figura 7).

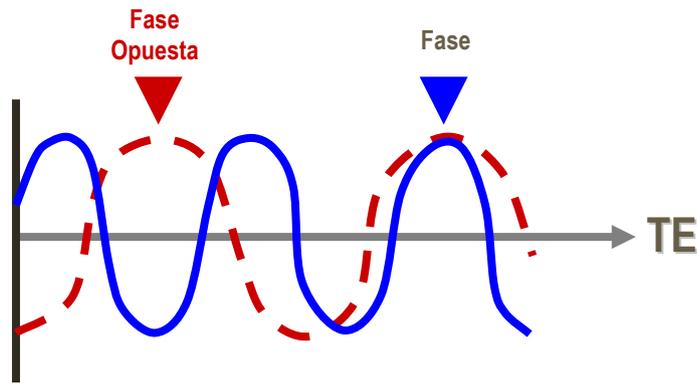


Figura 7. Esquema Fase/Fase opuesta. Oscilación de la señal del agua (rojo) y de la grasa (azul) con la variación del Tiempo de Eco (TE). En Fase Opuesta la separación de la señal del agua (positiva) y de la grasa (negativa) es máxima de forma que se anulan entre sí. En el hígado con esteatosis se apreciará una ausencia de señal en la imagen. En Fase, la señal del agua y de la grasa coinciden absolutamente: las dos son positivas y con la misma intensidad. La señal del hígado con esteatosis hepática en este TE será igual a la del hígado normal. (Ver

Figura 8)

En esta técnica de imagen, los átomos de hidrógeno que se encuentran en un medio graso como la esteatosis hepática tienen un comportamiento específico que no puede ser reproducido por ninguna otra lesión hepática y que permite su cuantificación mediante diferentes métodos [175, 218-222]. Comparando imágenes en Fase y en Fase Opuesta es muy fácil reconocer el depósito de grasa en el hígado. Como la esteatosis es una combinación de agua y grasa, el antagonismo de la señal de ambos componentes en Fase Opuesta se traducirá en una gran disminución de la señal. Sin embargo, en TE en Fase, el hígado presentará una señal normal (Figura 8). Este comportamiento en las imágenes en Fase y en Fase Opuesta es específico de la esteatosis hepática.

La relajación en el ámbito de imagen por RM es el conjunto de procesos por los que la magnetización nuclear recupera el equilibrio tras un pulso de un campo magnético externo. Se distinguen dos tipos: **relajación longitudinal** que se caracteriza por una constante de tiempo T1 y **relajación transversal** que se caracteriza por una constante de tiempo T2 ($T2^* = T2$ en eco de gradiente). Actualmente en todos los estudios de imagen por RM del abdomen se realiza una secuencia con dos tiempos de eco en Fase y en Fase Opuesta para poder reconocer la esteatosis hepática. Existe un consenso generalizado de que la RM con esta secuencia en Eco de gradiente es la técnica más sensible para el diagnóstico de la esteatosis. La técnica Fase/Fase Opuesta (Dual eco) es precisa para el diagnóstico cualitativo de depósito graso; sin embargo, esta

secuencia con dos ecos no puede cuantificar la concentración de grasa en el hígado de manera fiable.

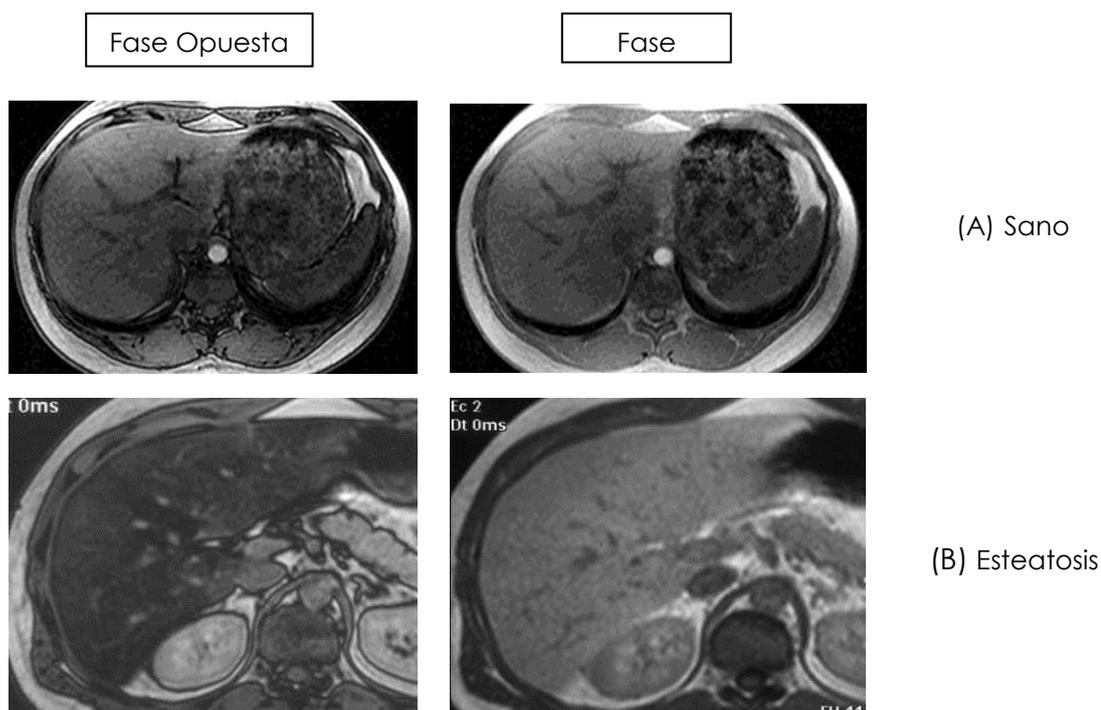


Figura 8. Imagen representativa de hígado sano/esteatósico. Hígado sano (A) e hígado con esteatosis difusa (B) en las secuencias en Fase y en Fase Opuesta. Hígado Sano: no hay diferencias significativas de la intensidad de señal del hígado en ambos TE. Esteatosis Hepática: gran disminución de la señal de todo el hígado en TE en Fase Opuesta con normalidad completa de la Señal en TE en Fase, similar a la del hígado sano. Esta diferencia de comportamiento en ambos TE es específica de la esteatosis.

La sobrecarga férrica, que con frecuencia coexiste con el acúmulo de grasa en la enfermedad hepática crónica [223, 224], genera una disminución de la señal que es más importante en las secuencias con TE más prolongados, debido a que acorta el T2*. Esto se traducirá en una mayor disminución de la señal a medida que aumenta el TE de la secuencia, lo que a 1.5 Teslas se traducirá en una disminución de la señal más importante en Fase (4.6 ms) que en Fase Opuesta (2.3ms) y por tanto distorsionará el análisis comparativo entre ambas imágenes cualitativa y cuantitativamente. Para obviar este problema es necesario utilizar más de dos ecos. De esta forma puede medirse la disminución de señal en función de la variación del TE y corregir así el efecto T2* (Figura 9).

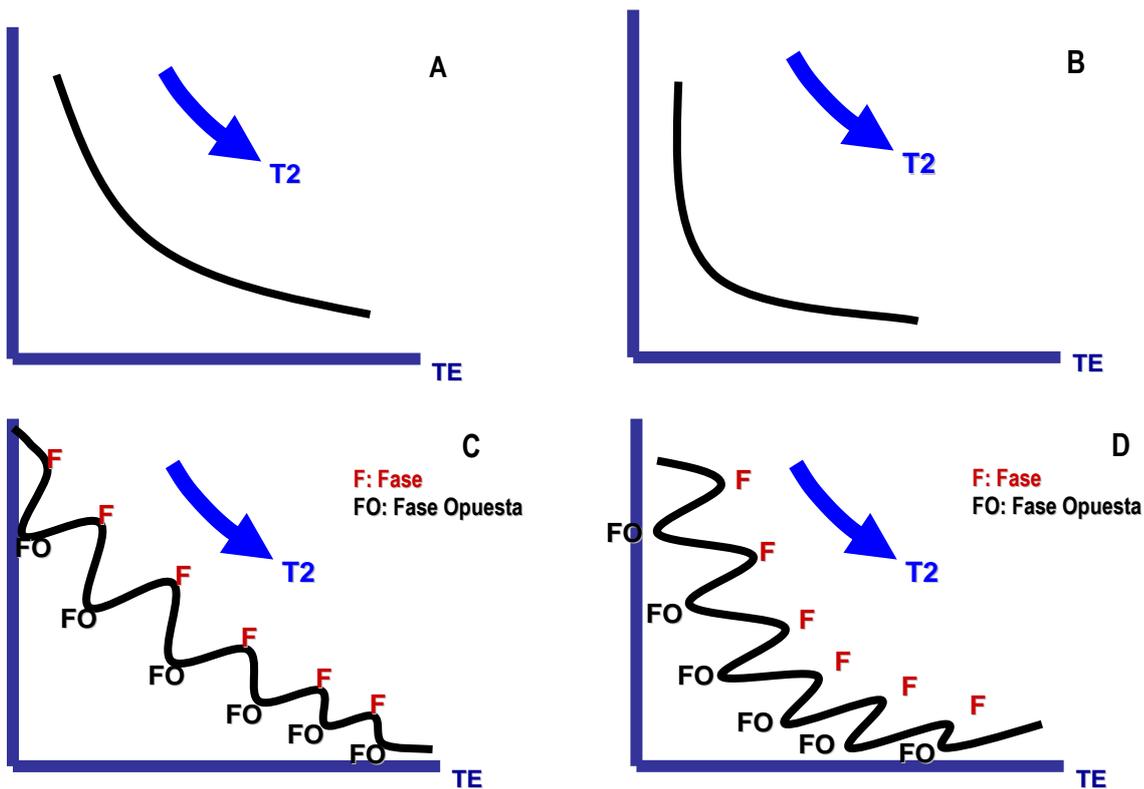


Figura 9. Curvas representativas T2. Variación de la curva de decaimiento T2 en caso de esteatosis hepática. Cada medición corresponde a un TE.

- A.- Curva T2 del hígado normal (sin sobrecarga de hierro y sin sobrecarga de grasa).
- B.- Curva T2 en un hígado con sobrecarga de hierro sin sobrecarga de grasa. Observamos una verticalización de la curva que se traduce en un acortamiento del T2.
- C.- Curva T2 en un hígado con esteatosis hepática sin sobrecarga de hierro. Oscilación importante de la señal entre los TE en Fase Opuesta (FO) y en Fase (F). La pendiente es la misma que en la curva A.
- D.- Curva T2 de un paciente con esteatosis hepática y sobrecarga férrica. La sobrecarga férrica modifica la pendiente que se verticaliza de manera similar a la curva B y la esteatosis hepática genera una gran oscilación simultánea de la señal entre los TE en Fase (F) y en Fase Opuesta (FO).

La fibrosis y la inflamación, también coexistentes con la esteatosis en la hepatopatía crónica, generan variaciones en la señal de intensidad de las secuencias en Fase por factores independientes de la esteatosis. La fibrosis y la inflamación modifican la cantidad de agua en el hígado y suponen por tanto un alargamiento del T1. Para evitar esta interferencia deben utilizarse parámetros de adquisición mínimamente ponderados en T1 reduciendo el ángulo de excitación (en inglés *flip angle*) de la secuencia y así, los efectos de saturación de la misma por utilizar tiempos de repetición muy cortos. Esta estrategia permite adquirir secuencias ponderadas en densidad protónica con poca influencia en las variaciones en los T1 del agua y de la grasa.

Una vez adquirida la señal es necesario hacer un análisis espectral de la misma para determinar el contenido de grasa y agua. Sin esta información no puede ajustarse de manera precisa la función matemática que permite separar la aportación de la grasa y del agua a la señal medida a lo largo de todos los TE. Este análisis puede realizarse utilizando diferentes métodos siendo los más conocidos IDEAL y Dixon [225-227]. Como resultado de este análisis se obtienen imágenes cuantitativas llamadas "mapas" de señal del agua y de la grasa, así como de la relación entre ambas denominada fracción grasa (Fracción grasa= señal grasa/ señal agua + señal grasa) [220, 225, 228-231].

La cuantificación por RM multiceco, que pretende subsanar esta interferencia grasa/hierro realizando una corrección T2*, se ha validado con el análisis histológico de la esteatosis [232] pero todavía no lo ha sido con determinaciones bioquímicas de grasa hepática en estudios comparativos con gran número de pacientes.

La resonancia magnética representa una técnica incruenta potencial para la evaluación de la esteatosis hepática en 3D [233], ya que se mide la proporción de la densidad de protones móvil del hígado que es atribuible a la grasa [232]. La evidencia científica al comparar con fantomas agua/grasa y/o análisis histológico semicuantitativo de la grasa hepática como estándar de referencia, sugiere que la RM puede representar un método exacto para determinar el contenido hepático de lípidos [232, 234]. Sin embargo, todavía se necesita investigación adicional para validar esta hipótesis y, sobre todo, para poner a prueba el potencial de la RM con una herramienta que nos permita determinar la concentración exacta de lípidos intrahepáticos (i.e., método bioquímico de Folch).

La capacidad de cuantificar la grasa hepática y su carácter incruento, hacen que las técnicas de imagen por RM y espectroscopia por RM sean de elección en los trabajos de investigación y en la práctica clínica, sobre todo en los estudios longitudinales de seguimiento en pacientes con NAFLD después de cualquier tratamiento [235-239].

F. Diagnóstico diferencial

Hay múltiples causas de esteatosis hepática que deberían ser consideradas en un paciente con sospecha de NAFLD y que incluyen la mayor parte de las enfermedades hepáticas crónicas [4]:

- Enfermedad hepática alcohólica.
- Hepatitis C (sobre todo genotipo 3).

- Hemocromatosis hereditaria.
- Enfermedad de Wilson.
- Déficit de α -1 antitripsina.
- Hepatitis autoinmune.
- Lipodistrofia.
- Abetalipoproteinemia.
- Medicación (amiodarona, metotrexate, tamoxifeno, glucocorticoides, valproato, agentes antiretrovirales para VIH).
- Síndrome de Reye.
- Esteatosis hepática aguda del embarazo.
- Síndrome HELLP (anemia hemolítica, elevación de enzimas hepáticas, trombopenia).
- Inanición.
- Nutrición parenteral prolongada.

Dentro del diagnóstico diferencial, la entidad más frecuente es la hepatitis alcohólica, que por su similitud histológica requiere la realización de un correcto y exhaustivo diagnóstico diferencial entre ambas. Como hemos dicho previamente, la principal diferencia entre ambas entidades estriba en la ingesta o no de alcohol en cantidad suficiente y de forma habitual. Por todo ello, se considera fundamental la confirmación o exclusión de ingesta alcohólica de forma objetiva.

G. Severidad de la enfermedad hepática

Es difícil predecir la severidad de la enfermedad hepática en función de características clínicas o de laboratorio [240], aunque hay evidencia de que un valor de ferritina sérica 1,5 veces el límite superior del valor normal en pacientes con NASH se asocia con mayor riesgo de fibrosis hepática avanzada [170]. Así, un método incruento que es potencialmente útil para la exclusión de fibrosis avanzada es la medición de la rigidez hepática mediante elastografía. El principal problema de este método es su escasa disponibilidad y uso infrecuente en pacientes con esteatosis simple y NASH.

Es importante identificar factores clínicos y serológicos que permitan predecir la presencia de fibrosis en pacientes con NAFLD. La edad superior a 45-50 años se ha revelado como un factor independiente de fibrosis en pacientes con

diagnóstico de NAFLD [241-243]. De forma similar, la presencia de obesidad es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de NAFLD y se considera también un factor predictor de fibrosis [241-243]. A la vista de los datos publicados, la presencia de enfermedades asociadas con NAFLD y que forman parte del síndrome metabólico pueden comportarse como un factor de riesgo independiente para fibrosis en pacientes con NAFLD tales como diabetes mellitus [241], hiperlipemia [242] e hipertensión arterial [106]. Por otra parte, diversos marcadores analíticos se consideran probables factores predictores de fibrosis, destacando la presencia de concentración de ALT ≥ 2 veces el valor normal [242], trombopenia e índice AST/ALT bajo [106, 243].

La presencia de grasa en el hígado es un factor de riesgo para desarrollar complicaciones después de resección hepática o trasplante [244-248]. Se acepta que la esteatosis hepática caracterizada por un porcentaje de grasa superior al 30% está relacionada directamente con incremento del riesgo de complicaciones tras la realización de cirugía hepática mayor o trasplante [245, 246].

8. Tratamiento

Los objetivos principales del tratamiento incluyen medidas de prevención y regresión de daño hepático y fibrosis [249]. No hay una terapia probada y eficaz para NAFLD, aunque es recomendable la modificación de factores de riesgo, como obesidad, hiperlipemia y diabetes.

A. Pérdida de peso y ejercicio físico

La pérdida de peso es el único tratamiento beneficioso con evidencia científica razonable [4]. La actividad física y la pérdida de peso producen mejoría en aminotransferasas hepáticas, histología, niveles séricos de insulina y calidad de vida en los pacientes con NASH [250-253], siendo la mejoría histológica más importante en los pacientes que pierden $\geq 7\%$ del peso inicial [252]. Recientemente, se ha demostrado que la mayor tasa de regresión de NASH y fibrosis ocurre en pacientes con una pérdida ponderal $\geq 10\%$ [254]. Igualmente, se ha objetivado una mejoría histológica de la inflamación y fibrosis en pacientes con pérdida de peso tras la realización de cirugía bariátrica [162, 163, 255]. Se ha demostrado que la pérdida de peso produce mejoría de los factores hepáticos implicados en la regulación de la inflamación, fibrogénesis [127] y resistencia periférica a la insulina que produce disminución de la concentración lipídica hepática [128]. La pérdida ponderal debe ser gradual, ya que la

reducción rápida se asocia a empeoramiento de la enfermedad y no debe exceder de 1,6 kg por semana [256]. El ejercicio físico sin reducción del peso también tiene un efecto beneficioso sobre la esteatosis produciendo disminución del contenido graso del hígado y mejoría de la resistencia periférica a la insulina [257-259].

B. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células. Se ha comprobado que su administración exógena (vitaminas C y E) disminuye el estrés oxidativo en los hepatocitos esteatósicos y las aminotransferasas de pacientes con NASH [260-262]. Como consecuencia de este efecto se produce mejoría histológica hepática tanto de la actividad necroinflamatoria como de la fibrosis.

Se ha comprobado que la administración diaria de vitamina E produce clara mejoría de la histología hepática en individuos con NASH no diabéticos y se puede considerar un tratamiento de primera línea en este grupo de pacientes [4]. La evidencia respecto a la eficacia de este tratamiento en el resto de pacientes con esteatosis simple y/o NASH es limitada. Por otra parte, existen datos controvertidos sobre el ligero incremento de la tasa de morbi-mortalidad en los pacientes que son tratados con altas dosis de vitamina E [263-267]. Por todo ello, no se recomienda su uso en los pacientes con esteatosis simple, NASH, NASH-cirrosis o cirrosis criptogenética [4].

C. Agentes hipoglucemiantes

Los agentes hipoglucemiantes reducen los niveles de glucosa en sangre por lo que se suelen utilizar en el tratamiento de la diabetes mellitus.

- *Biguanidas*: reducen la producción de glucosa por parte del hígado y aumentan su captación en los tejidos periféricos, incluyendo el músculo esquelético. La **metformina** se utiliza en pacientes con sobrepeso ya que reduce los niveles de glucosa, triglicéridos y LDL, ayudando a la pérdida de peso y a la prevención de enfermedades cardiovasculares asociadas a diabetes. En relación a NAFLD, se han demostrado diferentes efectos beneficiosos de la metformina tales como la mejoría de los niveles séricos de aminotransferasas, insulina y péptido C [268]. No hay evidencia que demuestre claro beneficio de la metformina sobre la histología hepática,

lo que no hace recomendable su uso en el grupo de pacientes con NAFLD [269].

- *Tiazolidinedionas*: son agentes que se unen a los receptores celulares actuando como agonistas selectivos de la insulina y están involucrados en la transcripción de genes que regulan el metabolismo de glucosa y grasas. Se han utilizado en el tratamiento de pacientes con NASH. La **pioglitazona** produce mejoría histológica de la esteatosis, inflamación y fibrosis en los pacientes con NASH [270], aunque dicha mejoría parece revertir tras la interrupción del tratamiento [271]. Así, es probable que sea necesario un tratamiento a largo plazo para conseguir beneficio clínicamente importante. Los principales efectos adversos asociados a este tratamiento son el riesgo de enfermedad cardíaca y el aumento de peso. Por todo ello, no se recomienda el uso de pioglitazona en pacientes con NAFLD. La **Rosiglitazona** produce mejoría de la esteatosis en pacientes con NASH [272]. Sin embargo, no se ha demostrado que el uso prolongado del tratamiento produzca beneficio adicional [273]. Cuando la rosiglitazona se asocia con otros tratamientos como la metformina se produce mejoría histológica de la esteatosis, inflamación hepatocelular y fibrosis [274].

D. Estatinas

Son fármacos usados para disminuir el colesterol en pacientes con hipercolesterolemia. Su acción la ejercen inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa con disminución del riesgo de aterosclerosis y de patología cardiovascular. La hepatotoxicidad secundaria de este fármaco en pacientes con NAFLD no parece estar aumentada en comparación con la población general, por lo que se pueden administrar estatinas en pacientes con diagnóstico de esteatosis hepática [275]. Así, la hipercolesterolemia asociada a NAFLD se puede tratar con estatinas, aunque no es recomendable su uso como tratamiento específico de la esteatohepatitis [4, 276].

Estudios realizados en roedores han demostrado que la atorvastatina parece producir efecto beneficioso sobre los niveles de aminotransferasas en animales con NAFLD [277, 278]. La combinación de atorvastatina con agentes antioxidantes en pacientes con NAFLD produce reducción significativa del riesgo de progresión histológica hepática durante un periodo largo de seguimiento [279].

E. Otros

Probucol

Se trata de un agente hipolipemiante con propiedades antioxidantes que produce una reducción significativa de aminotransferasas hepáticas en pacientes con NASH [280]. No se ha evaluado el efecto que produce sobre la histología hepática.

Betaína

Es un metabolito normal de la metionina. Estudios realizados en roedores han demostrado que la betaína tiene efecto protector contra la esteatosis. En humanos, ha demostrado mejoría de la esteatosis sin efecto significativo sobre los marcadores de inflamación hepática o el estrés oxidativo [281]. No es recomendable su uso en pacientes con NAFLD.

Ácido Ursodeoxicólico

Es un ácido biliar secundario que reduce la síntesis de colesterol en el hígado y la reabsorción del mismo por el intestino, disuelve el colesterol y la grasa a nivel intestinal y tiene un efecto inmunomodulador inhibiendo la producción de algunas citoquinas y la peroxidación lipídica en los hepatocitos. No ha demostrado mejoría histológica hepática en pacientes con NASH [282-284] por lo que su uso no es recomendable para el tratamiento específico de NAFLD [4].

Losartán

La Angiotensina II está implicada en la patogénesis de la fibrosis hepática y aumenta el depósito de hierro y la resistencia a la insulina en el hígado. El Losartán es un antagonista del receptor de la angiotensina II y su uso en pacientes con NASH parece producir beneficio mínimo con mejoría de los marcadores séricos de fibrosis y aminotransferasas hepáticas [285].

Pentoxifilina

Es un fármaco hemorreológico (efecto sobre el flujo sanguíneo) que además inhibe el TNF- α que puede participar en la patogenia de NASH. El TNF- α es un factor etiológico importante en la resistencia a la insulina y participa en la progresión de NAFLD. Se ha demostrado que la pentoxifilina produce mejoría de la esteatosis, inflamación y fibrosis en pacientes con NASH confirmada por biopsia hepática [286].

Orlistat

Se trata de un inhibidor de la lipasa gastrointestinal con uso clínico en el tratamiento de obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Se ha comprobado que el orlistat se asocia a pérdida de peso a corto plazo con mejoría de los niveles de AST, ALT e histología hepática [275, 287]. Por otra parte, se ha demostrado que cuando la pérdida de peso es del 5-9% del peso inicial mejora la resistencia periférica a la insulina y si ésta supera el 9%, la mejoría también se observa a nivel de la histología hepática en pacientes diagnosticados de NAFLD [288].

Ácidos grasos Omega-3

Son ácidos grasos esenciales poliinsaturados con múltiples efectos beneficiosos para la salud. Hay evidencia que demuestra mejoría de la esteatosis hepática en pacientes con NAFLD tratados con ácidos grasos omega-3 [289]. La recomendación de uso de los ácidos grasos omega-3 para el tratamiento específico de NAFLD es precipitada aunque si se pueden considerar agentes de primera línea para tratar la hipertrigliceridemia asociada en muchos casos de NAFLD [4].

Como se puede apreciar en la literatura hay pocos estudios que comparen la fracción grasa medida por RM con la cuantificación bioquímica de los triglicéridos hepáticos. Los estudios realizados en humanos comparan la fracción grasa por RM con el análisis histológico semicuantitativo de una biopsia hepática o con los resultados obtenidos con espectroscopia por H^1 RM, donde una técnica de resonancia se valida con otra RM.

Igualmente, hemos comprobado que son tres los métodos de medición de la grasa hepática más comúnmente utilizados: la fracción grasa obtenida por RM, la gradación histológica y la cuantificación bioquímica. Sin embargo, no existen estudios en humanos que hayan comparado los tres métodos de medición grasa.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido a la alta prevalencia de NAFLD en los países occidentales y el riesgo de progresión desde estadios histológicos precoces con presencia de esteatosis simple a fases tardías de la enfermedad con inflamación o fibrosis, el interés científico por esta enfermedad ha aumentado en los últimos años. Hay evidencia de que esta entidad clínico-patológica de amplio espectro se relaciona con la obesidad y con el síndrome metabólico. Así, los pacientes que cumplen criterios diagnósticos de síndrome metabólico y NAFLD tienen un riesgo cardiometabólico elevado. Aunque no existe un tratamiento específico, es recomendable regular la dieta y promover la actividad física, encaminada a conseguir pérdida de peso que se ha destacado como el único tratamiento beneficioso para la mejoría de NAFLD.

Todos estos datos indican la necesidad de realizar un correcto diagnóstico de dicha enfermedad. Los métodos diagnósticos utilizados suelen ser cualitativos o semicuantitativos, tomando como prueba de referencia el análisis histológico de una biopsia hepática. Frente a este método invasivo y poco preciso, parece interesante analizar algún método incruento que permita cuantificar la grasa hepática con exactitud y comparar dicho método con una prueba de referencia adecuada que aporte información precisa del depósito de grasa hepática, como puede ser el método bioquímico de Folch.

Así, nuestros resultados de un estudio piloto que realizamos en un modelo experimental de esteatosis en roedores [290] nos animó a plantearnos la siguiente **hipótesis** de trabajo:

“La RM con secuencia multieco puede permitir cuantificar el contenido de grasa del hígado y monitorizar la evolución de la esteatosis tras la pérdida de peso secundaria a cirugía bariátrica”.

Para demostrar dicha hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivos principales:

- I. Evaluar la determinación cuantitativa de la grasa hepática mediante la RM multieco respecto al método bioquímico (i.e., Folch) sobre biopsia hepática.
- II. Evaluar la capacidad de la RM para monitorizar la evolución de la esteatosis hepática en pacientes obesos con NAFLD sometidos a cirugía bariátrica.

Objetivo secundario:

- III. Evaluar la exactitud diagnóstica del método histológico respecto al método bioquímico para determinar la grasa hepática.

Con la finalidad de alcanzar dichos objetivos seguimos el siguiente planteamiento de investigación:

DERIVACIÓN DE LA REGLA DE PREDICCIÓN CLÍNICA (RPC)

1. Pacientes no obesos ($IMC < 35 \text{ Kg/m}^2$) [**No obesos 1**] \Rightarrow RM multieco \rightarrow Cirugía hepática + histología + cuantificación bioquímica.
2. Pacientes obesos ($IMC \geq 35 \text{ Kg/m}^2$) [**Obesos 1**] \Rightarrow RM multieco \rightarrow Cirugía bariátrica / hepática + histología + cuantificación bioquímica.
3. Análisis univariante (Histología / Bioquímica).
4. Análisis multivariante.



VALIDACIÓN

1. Pacientes no obesos ($IMC < 35 \text{ Kg/m}^2$) [**No obesos 2**] \Rightarrow RM multieco \rightarrow Cirugía hepática + histología + cuantificación bioquímica.
2. Pacientes obesos ($IMC \geq 35 \text{ Kg/m}^2$) [**Obesos 2**] \Rightarrow RM multieco \rightarrow Cirugía bariátrica / hepática + histología + cuantificación bioquímica.



MONITORIZACIÓN

- Pacientes obesos ($IMC \geq 35 \text{ Kg/m}^2$) [**Obesos 1 y 2**] \Rightarrow RM multieco 12 meses después de la cirugía.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de Pacientes y diseño del estudio

Hemos diseñado un estudio transversal descriptivo de prueba diagnóstica y prospectivo para la monitorización o seguimiento longitudinal de la esteatosis hepática en un solo hospital (desde mayo 2009 hasta enero 2014). Dicho estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Investigaciones Científicas (CEIC) del Hospital Universitario Donostia como se define por la legislación española y las directivas europeas. Se trata de un estudio de prueba diagnóstica para evaluar las características nosológicas de la RM en la cuantificación de la grasa hepática tomando como "gold standard" la determinación de grasa en tejido hepático mediante el método bioquímico de Folch.

Se incluyeron todos los pacientes consecutivos remitidos a nuestro hospital para realizar cirugía hepática por diferentes etiologías y sin enfermedad hepática subyacente durante 2009.

Criterios de inclusión: Índice de masa corporal (IMC) < 35 kilogramos por metro cuadrado y edad > 18 años (**No obesos 1**).

Criterios de exclusión: Ingesta de etanol > 20 gr/día, hepatopatía crónica subyacente (serología hepatitis B y C, VIH +) o contraindicaciones de RM (claustrofobia, dispositivos metálicos: marcapasos, implantes cocleares...).

Posteriormente, se incluyeron todos los pacientes obesos consecutivos remitidos a nuestro hospital para la realización de una técnica de cirugía bariátrica (tubulización gástrica o bypass gástrico) o de cirugía hepática por diferentes etiologías sin enfermedad hepática subyacente entre 2010 y 2013.

Criterios de inclusión: IMC \geq 35 kg/m² y edad > 18 años (**Obesos 1**).

Criterios de exclusión: Ingesta de etanol > 20 gr/día, hepatopatía crónica subyacente (serología hepatitis B y C, VIH +), contraindicaciones de RM (claustrofobia, dispositivos metálicos: marcapasos, implantes cocleares...) o perímetro abdominal > perímetro interno del tubo de la RM.

Los pacientes de este grupo fueron clasificados por el tipo de obesidad que presentaban según el IMC: clase II (IMC = 35-39.9 kg/m²) y clase III (IMC \geq 40 kg/m²) según la clasificación de la OMS [291]. Todos los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica tenían indicación quirúrgica (IMC \geq 40 o IMC = 35-39.9 con una morbilidad significativa asociada).

La resonancia magnética multieco se realizó en todos los pacientes del estudio el día antes de la cirugía y se obtuvo una biopsia hepática en el momento de la cirugía bariátrica o hepática. Es importante destacar que el período de tiempo transcurrido entre la realización de la RM y la toma de

biopsia fue menor de 24 horas en todos los pacientes. Las muestras hepáticas obtenidas se dividieron en dos partes iguales que se procesaron para el análisis histológico, así como para la cuantificación de la concentración de grasa hepática medida por el método bioquímico de Folch.

Los profesionales expertos que participaron en cada método de cuantificación (RM, histología y análisis bioquímico de lípidos) no conocían datos clínicos ni otros resultados de los pacientes cuando realizaron la estimación de la esteatosis hepática.

Un grupo de validación con 31 pacientes adicionales [24 obesos (IMC \geq 35 kg/m²) **[Obesos 2]** y 7 no obesos (IMC < 35 kg/m²) **[No obesos 2]**] fue analizado para confirmar la eficacia de la nueva fórmula diseñada para la predicción del valor bioquímico de la grasa hepática desde el valor obtenido con la RM multieco. Por lo tanto, en este grupo de validación se realizó una RM multieco antes de la cirugía y una biopsia hepática en el momento de la intervención, con la intención de poder comparar la concentración de triglicéridos hepática medida (por Folch en la biopsia hepática) y la estimada o predicha (por RM) aplicando nuestra fórmula.

Por último, todos los pacientes con criterios de obesidad mórbida (**Obesos 1 y 2**) que aceptaron, tanto los sometidos a una resección hepática como aquellos que se sometieron a una cirugía bariátrica, fueron monitorizados un año después de la intervención realizando una segunda RM multieco con el objetivo de cuantificar la esteatosis hepática y valorar con ello el efecto que producía la pérdida de peso sobre la cantidad de grasa hepática.

2. Consideraciones éticas

Este estudio conlleva realizar una biopsia hepática tanto en pacientes obesos como no obesos. El riesgo del procedimiento es menor que el de la biopsia cerrada percutánea ya que se realiza con visión directa del órgano. La realización de este estudio no supone un cambio en el manejo clínico ni en el plan terapéutico del paciente. El desarrollo de esta investigación implica la realización de exploraciones que habitualmente no se hacen en estos pacientes como la biopsia hepática del borde anterior del segmento III o la resonancia magnética preoperatoria. Ninguna prueba ha supuesto coste económico añadido a la práctica clínica habitual porque el estudio se ha financiado con proyectos de Investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI10/01984) y del Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco (2010111043).

El protocolo del estudio y las consideraciones aquí descritas se presentaron al Comité de Ética de Investigaciones Científicas (CEIC) del Hospital Universitario Donostia, que dio su aprobación en mayo del 2009

Anexo I: aprobación del CEIC.

Para la fase de monitorización consultamos con el CEIC sobre la idoneidad de una biopsia hepática percutánea. Tras valorar las características nosológicas de la RM y los riesgos inherentes de la biopsia, el CEIC desaconsejó la realización de una biopsia percutánea.

Un formulario de consentimiento informado aprobado por la junta de revisión institucional fue firmado por todos los pacientes antes de iniciar el estudio. Los pacientes incluidos en el estudio fueron sometidos a un mínimo riesgo añadido al de la propia intervención realizada

Anexo II: información al paciente. Anexo III: consentimiento informado.

3. Datos Clínicos

El sexo y la edad fueron considerados en todos los pacientes. Las medidas antropométricas incluyeron peso y talla en el momento de la biopsia hepática. El IMC se calculó en cada paciente a partir de estos valores antropométricos. La presencia de enfermedades asociadas como diabetes, hiperlipidemia y apnea obstructiva del sueño se comprobó en todos los pacientes. Además, también se consideró el tratamiento con fármacos tales como anticonceptivos orales, estatinas, inmunosupresores, antidepresivos, bloqueantes de los canales del calcio (tipo nifedipino), hormonas y paracetamol. Los datos biológicos para cada paciente incluyeron parámetros hematológicos, pruebas de función hepática y perfiles lipídicos.

A. Variables

1. Datos de filiación: nombre y apellidos, número de historia clínica, fecha de entrada en el estudio.
2. Características personales: edad, sexo, peso, talla, IMC, tipo y fecha de cirugía.
3. Enfermedades: diagnóstico previo de diabetes mellitus, dislipemia o SAOS.
4. Hábitos tóxicos: ingesta de alcohol semanal en gramos y otros tóxicos.
5. Tratamientos potencialmente hepatotóxicos recibidos en los últimos 12 meses.

6. Analítica: AST (U/L), ALT (U/L), GGT (U/L), FA (U/L), bilirrubina (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), colesterol (mg/dL).
7. Esteatosis: cuantificación por RM, gradación histológica (Grado 0, 1, 2 y 3), cuantificación bioquímica (mg TG/gr tejido hepático).

4. Análisis histológico hepático

Dos expertos patólogos realizaron un análisis histológico, a doble ciego, de las biopsias hepáticas obtenidas de cada paciente. Todas las biopsias se obtuvieron de una cuña hepática en el borde anterior del segmento III del lóbulo hepático izquierdo. Las muestras de tejido fueron fijadas en formalina al 10% e incluidas en parafina. Las secciones de 4 micras de espesor fueron teñidas de forma rutinaria con hematoxilina-eosina.

La esteatosis hepática se informó tras realizar una evaluación semicuantitativa del porcentaje de hepatocitos (0% -100%) que contiene grasa macrovesicular (i.e., gotas de lípidos igual o mayor que el tamaño del núcleo, a menudo desplazándolo) o grasa microvesicular (i.e., numerosas pequeñas gotas de grasa que rodean un núcleo situado en el centro).

Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de grasa en los hepatocitos y varió de 0 a 3 (i.e., **0**: < 5% de grasa, **1**: hasta 33% de grasa, **2**: 33-66% de grasa y **3**: > 66% de grasa) [182].

5. Análisis bioquímico de lípidos intrahepáticos

La concentración de lípidos del hígado se determinó según el método descrito por Folch *et al.* [190]. Este análisis bioquímico determinó la concentración de lípidos en las muestras de hígado (mg de lípidos / gr de tejido hepático) y se utilizó como método de referencia con el que se compararon los datos obtenidos por RM y por histología. Este método, bajo diversas modificaciones, continúa siendo considerado la técnica clásica y más fiable para la cuantificación bioquímica de lípidos, muy utilizada en la empresa agroalimentaria [292]. Así, nos referiremos en muchas ocasiones al valor de medición bioquímica de triglicéridos intrahepáticos como valor Folch.

Un farmacéutico y un nutricionista realizaron la cuantificación bioquímica de grasa intrahepática en cada biopsia obtenida, sin conocer ningún dato clínico ni los resultados histológicos o los obtenidos por RM.

A. Técnica

El tejido hepático se lava con solución salina para eliminar cualquier rastro de sangre, y posteriormente se homogeniza con solución de cloroformo/metanol (2:1). A continuación, las muestras se incuban a 50° C durante 30 minutos con 2 ml de cloruro potásico 0,1 M para acelerar el proceso de separación de fases; la mezcla obtenida se agita durante 1 minuto.

La muestra se mantiene durante 2 horas a 4° C, y luego se centrifuga a 2000-3000 rpm durante 20 minutos para facilitar la separación de la fase superior o acuosa (arrastra el metanol) y la fase inferior o clorofórmica que contiene los lípidos. La mayor parte de la fase acuosa se elimina, y la fase de cloroformo se ajusta a un volumen final conocido.

1 ml de la fase clorofórmica se transfiere a un tubo previamente pesado y la solución se evapora mediante secado utilizando una corriente de nitrógeno. El tubo se pesa de nuevo y se calcula la cantidad de grasa mediante el método gravimétrico por diferencia de pesada.

Por último, los lípidos se disuelven en isopropanol y los triglicéridos se miden por espectrofotometría utilizando un *kit* comercial de Spinreact (Sant Esteve de Bas, España).

6. Resonancia Magnética

Empleamos una nueva técnica de reconstrucción basada en una secuencia multieco en eco de gradiente que permite una separación completa de las señales de agua y grasa.

La técnica de adquisición por RM y el post-proceso para calcular la fracción grasa fueron ya previamente evaluados con muy buenos resultados en un modelo experimental en roedores por miembros del equipo investigador [290].

A. Secuencia de adquisición

Los parámetros de adquisición son los siguientes:

- 12 ecos diferentes.
- Primer TE = 0.944 ms.
- δ TE (Intervalo de Tiempo de Eco) = 0.68 ms.
- TE final = 25.14 ms.
- TR (Tiempo de Repetición) = 72 ms.

- Ángulo de excitación o *flip angle* = 5°.
- FOV (Campo de Visión) 375/328 mm.
- Resolución matriz 232/129.
- Número de cortes 10.
- Espesor 12 mm.
- Tiempo de adquisición 20 segundos.
- Máquina RM 1.5 Teslas (Achieva Philips Healthcare, Países Bajos).
- Antena de superficie de 16 canales en los pacientes con IMC<35 Kg/m².
- Sin antena de superficie, con la bobina de cuerpo integrada (*Q body*) en los pacientes con criterios de obesidad mórbida.

B. Postproceso

Las imágenes se consiguen por análisis espectral de la señal de RM para distinguir entre el contenido de grasa y agua en cada píxel (punto) de imagen.

Se realizó un análisis cuantitativo de las imágenes siguiendo una metodología previamente publicada [290]. Dicha metodología fue implementada en una herramienta PRIDE (*software* específico de cálculo) que se ejecuta en una estación de trabajo de RM (MR Extended Workspace, Philips Healthcare). El *software* genera automáticamente los mapas de intensidad de agua y grasa, corregidos por los decaimientos T2* de las mismas y el mapa de fracción grasa.

$$\text{Fracción grasa} = \frac{\text{Señal grasa}}{\text{Señal agua} + \text{Señal grasa}}$$

Los mapas de agua y grasa se analizan como un mapa paramétrico convencional haciendo medidas de intensidad en regiones de interés. Para calcular la fracción grasa final sobre estos mapas paramétricos, un radiólogo analiza tres áreas de interés en el segmento III hepático de forma manual, evitando incluir estructuras vasculares. Para evitar cualquier sesgo, el cálculo de la fracción grasa se realiza calculando la media de la medida de las tres áreas en cada uno de los mapas.

El radiólogo que realizó el postproceso no analizaba directamente las imágenes multieco originales, ni tenía conocimiento de otros resultados del estudio (histología, análisis bioquímico).

7. Recogida de los datos

Los datos antropométricos y clínicos iniciales para la inclusión de los pacientes se recogieron por parte de cada cirujano de la sección de Cirugía Bariátrica del servicio de Cirugía General y Digestiva de nuestro hospital en una hoja de recogida de datos.

Los datos posteriores, intervención quirúrgica, datos analíticos y evaluación de la esteatosis fueron recogidos por un solo investigador. Los datos fueron transcritos semanalmente mediante doble entrada a una base de datos especialmente diseñada para tal fin.

Al finalizar la recogida de datos, se procedió a eliminar los errores que pudiera contener. Se realizó depuración de la base de datos mediante comprobación de rangos lógicos y detección de códigos imposibles. Igualmente, se procedió a la corrección de los errores encontrados mediante cotejo con la historia clínica. Una vez depurada la base de datos, procedimos a su análisis estadístico.

8. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresan como media \pm desviación estándar (DE) o error estándar de la media (EEM) y las variables categóricas como frecuencias absolutas y relativas en porcentaje. El coeficiente de variación se estimó como medida de la dispersión de los datos continuos.

Se comparó la distribución de las variables entre los grupos mediante los tests estadísticos *t-Student* (2 grupos independientes) o ANOVA de 1 vía (más de 2 grupos) para variables continuas y prueba de X^2 o prueba exacta de Fisher para variables categóricas. Estas comparaciones se repitieron utilizando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney y Kruskal-Wallis).

La asociación de variables con el contenido de lípidos en el tejido hepático (análisis bioquímico e histológico) se llevó a cabo mediante regresión lineal simple y cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (r) en el caso de variables continuas, y mediante ANOVA de una vía para las variables categóricas (o test no paramétrico cuando fue necesario).

La cuantificación bioquímica de Folch se consideró la prueba de referencia para valorar el contenido de grasa en el hígado. La capacidad de la RM para

cuantificar el contenido graso hepático se midió utilizando un modelo de regresión lineal. Todas las variables que mostraron una relación con la determinación Folch en el análisis univariado con un valor de "p" inferior a 0.20 fueron seleccionadas para un modelo multivariado. Utilizando un modelo lineal de regresión se estimó su capacidad de contribuir a mejorar la predicción Folch sobre el modelo que solo contemplaba el valor obtenido en la RM.

Hemos diseñado una curva de calibración para la validación de los datos obtenidos y estudiamos la relación entre el valor de la cuantificación bioquímica de Folch medida en la biopsia hepática y el valor de Folch estimado por RM utilizando un modelo de regresión lineal.

Para evaluar el efecto de los parámetros clínicos en la mejoría de la grasa hepática medida por RM (diferencia entre el contenido inicial y el contenido final de grasa hepática estimados por RM), se utilizó un modelo de regresión lineal.

Por otra parte, se realizó un análisis multivariado (Folch estimado inicial, peso total, pérdida de peso, edad y sexo) de la fracción grasa calculada por RM multienco y el valor Folch estimado.

Hemos clasificado a los pacientes en 2 grupos atendiendo al resultado del examen histológico:

- Ausencia de esteatosis (grado histológico=0)
- Presencia de esteatosis (grado histológico \geq 1)

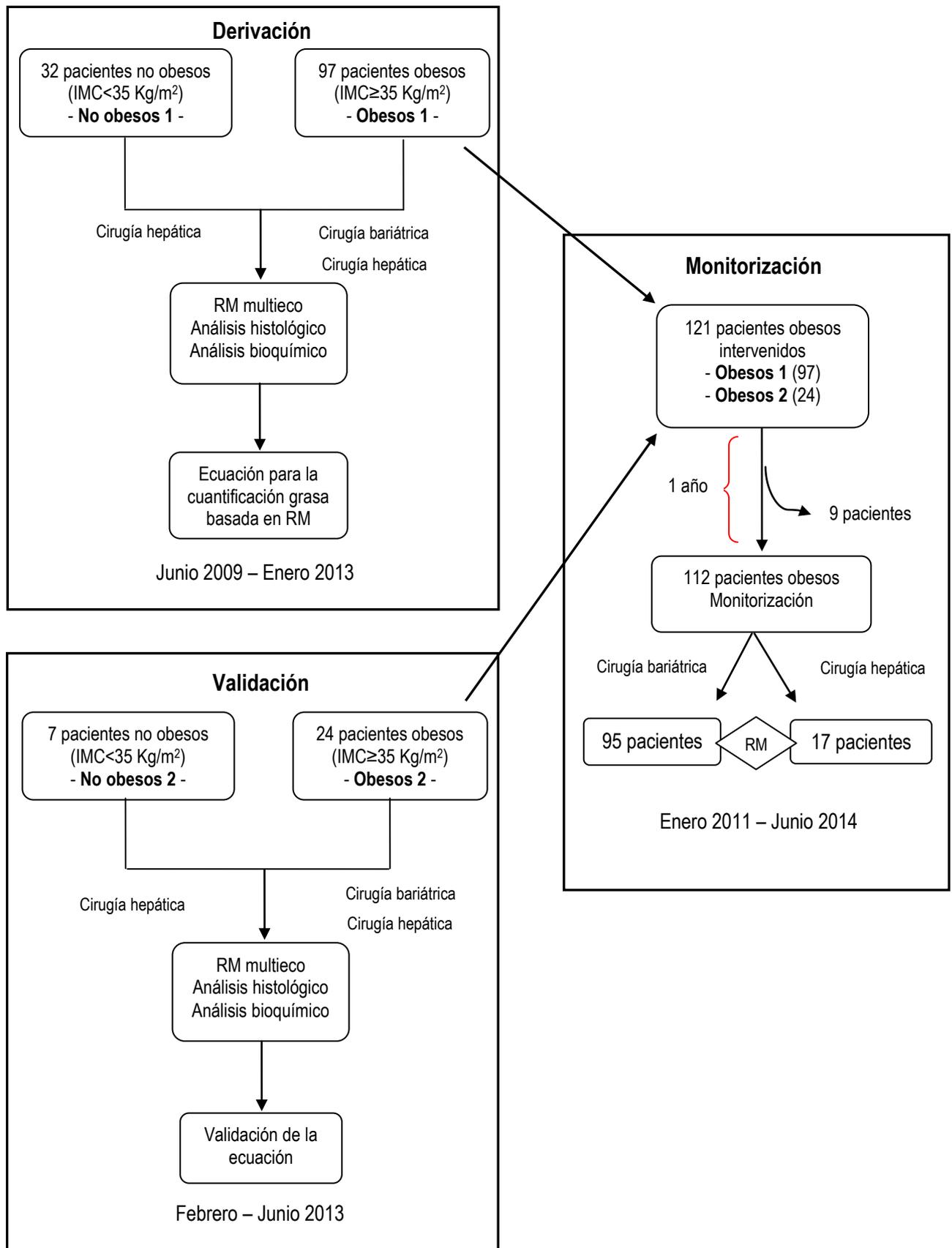
Describimos la capacidad nosológica de los diferentes valores de Folch estimado para la presencia o ausencia de esteatosis mediante una curva ROC con estimador no paramétrico. Una curva ROC resume gráficamente las características nosológicas de una prueba diagnóstica continua calculando los parámetros de sensibilidad y especificidad para los puntos de corte elegidos.

Una prueba será tanto mejor cuanto mayor sea el área bajo curva ROC (AUROC); el valor mínimo de este estadístico es 0.5 (la prueba diagnóstica no es mejor que el azar) y el máximo es de 1 (la prueba diagnóstica es perfecta, con una sensibilidad y especificidad de 1). Se considera que una prueba diagnóstica tiene interés clínico cuando su AUROC es mayor de 0.80. El análisis de la curva ROC se utiliza también para establecer el valor umbral diagnóstico de una prueba continua, que es aquél con mayor sensibilidad y especificidad.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con valores de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software STATA® SE v13 (StataCorp. LP, College Station Drive, Texas, EE.UU.).

RESULTADOS

1. Descripción de los pacientes del estudio: Diagrama de Flujo.



A. Datos clínicos y biológicos

Ciento veintinueve pacientes adultos (52 hombres y 77 mujeres) con una edad media de 50 años fueron incluidos de forma prospectiva en el estudio entre junio del 2009 y enero del 2013 (Tabla 2).

Los pacientes se dividieron en dos grupos:

- a) **No obesos 1**: pacientes sin criterios de obesidad mórbida ($IMC < 35$ Kg/m²) sometidos a cirugía hepática (n = 32).
- b) **Obesos 1**: pacientes con criterios de obesidad mórbida ($IMC \geq 35$ Kg/m²) sometidos a cirugía bariátrica (n = 83) o cirugía hepática (n = 14), [Total = 97].

Los pacientes sin criterios de obesidad (No obesos 1) fueron sometidos a resección parcial del hígado por diferentes etiologías que justificaron la intervención durante el año 2009: 22 metástasis, 3 hepatocarcinomas, 1 colangiocarcinoma, 3 adenomas y 3 hemangiomas.

Entre los pacientes obesos (Obesos 1), 83 se sometieron a cirugía bariátrica y 14 a resección parcial hepática entre 2010 y 2013.

El grupo de pacientes obesos presentó una edad media (46.7 ± 13.4 años) menor que la del grupo sin obesidad (60.9 ± 11.5 años) ($p < 0.0001$).

Por otro lado, tal y como se esperaba, el grupo de pacientes obesos mostró mayor peso corporal (120.7 ± 26.3 vs 71.9 ± 13.6 kg) e índice de masa corporal (IMC; 44.6 ± 7.9 vs 26 ± 4.5 kg/m²) en comparación con el grupo de pacientes no obesos ($p < 0.0001$ en ambas comparaciones), así como un aumento de la apnea obstructiva del sueño (33% vs 3.1%; $p < 0.001$), concentración de triglicéridos séricos (163.3 ± 154.8 vs 106.9 ± 54.1 mg / dl; $p < 0.01$) y contenido hepático de triglicéridos (94.5 ± 57.1 vs 33.3 ± 28.3 mg / gr; $p < 0.0001$).

Por último, se objetivó nivel más bajo de fosfatasa alcalina sérica en el grupo de pacientes obesos comparado con el valor del grupo sin obesidad (71.6 ± 22.4 vs 99.9 ± 48.5 U / l; $p < 0.01$).

	No obesos 1 (n=32)	Obesos 1 (n=97)	P	Total (n=129)
Características clínicas				
Sexo (mujeres)	10 (31.27%)	67 (69.1%)	<0.001	77 (59.69%)
Edad (años)	60.9±11.5	46.7±13.4	<0.0001	50.2±14.3
Peso (Kg)	71.9±13.6	120.7±26.3	<0.0001	108.7± 31.8
IMC (Kg/m ²)	26±4.5	44.6±7.9	<0.0001	40±10.8
Altura (cms)	166.2±8.1	164.2±9.3	NS	164.7±9
Enfermedades asociadas y tratamientos				
Diabetes	5 (15.63%)	28 (28.86%)	NS	33 (25.58%)
Dislipidemia	10 (31.25%)	36 (37.11%)	0.054	46 (35.66%)
SAOS	1 (3.1%)	32 (33%)	<0.001	33 (25.6%)
Anticonceptivos orales	1 (3.1%)	3 (3.1%)	NS	4 (3.1%)
Estatinas	3 (9.3%)	17 (17.5%)	NS	20 (15.5%)
Inmunosupresores	1 (3.1%)	5 (5.15%)	NS	6 (4.65%)
Antidepresivos	2 (6.2%)	11 (11.34%)	NS	13 (10.07%)
Nifedipino	0 (0%)	10 (10.3%)	NS	10 (7.75%)
Hormonas	1 (3.1%)	6 (6.18%)	NS	7 (5.42%)
Paracetamol	2 (6.2%)	7 (7.21%)	NS	9 (6.97%)
Datos analíticos				
AST (U/L)	26.8±12.9	24.7±12.9	NS	25.2±12.9
ALT (U/L)	31.8±20	32.7±21.8	NS	32.4±21.3
GGT (U/L)	53±46.4	35.6±29.3	NS	40.2±35.3
FA (U/L)	99.9±48.5	71.6±22.4	<0.01	79.7±34.3
Triglicéridos (mg/dl)	106.9±54.1	163.3±154.8	<0.01	148.5±137.8
Colesterol (mg/dl)	190.6±54.1	200.8±42.6	NS	198.2±45.9
Cuantificación bioquímica lípidos hepáticos – (mg/gr)	33.3±28.3	94.5±57.1	<0.0001	79.3±57.8

Tabla 2. Características clínicas de la población en estudio. Abreviaturas: FA, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; IMC, índice de masa corporal; GGT, gamma glutamil transpeptidasa. Variables continuas: valor medio ± DE, variables categóricas: frecuencia absoluta y porcentaje.

B. Estudio descriptivo de las variables según el valor bioquímico de Folch

El estudio de nuestra cohorte de pacientes en términos de valor bioquímico de Folch y el análisis de las variables categóricas indicaron que la cantidad de grasa hepática calculada mediante el método bioquímico es mayor en mujeres, en pacientes con dislipemia y con síndrome de apnea obstructiva del sueño (Tabla 3).

Variables categóricas		Número	Folch	DE	P
Sexo	Hombre	52	66.98	50.99	<0.05
	Mujer	77	87.68	60.98	
Diabetes	Si	33	89.36	59.02	NS
	No	96	75.87	57.36	
Dislipemia	Si	46	92.61	61.12	0.05
	No	83	71.96	54.97	
Anticonceptivos orales	Si	4	59.75	38.11	NS
	No	124	79.78	58.58	
Estatinas	Si	20	102.23	87	NS
	No	108	74.88	56.55	
Inmunosupresores	Si	5	117.5	75.00	NS
	No	123	77.6	56.12	
Antidepresivos	Si	12	113.02	85.78	NS
	No	116	75.65	53.72	
Nifedipino	Si	10	92.82	62.59	NS
	No	118	78	57.79	
Hormonas	Si	7	86.71	60.62	NS
	No	121	78.72	58.13	
Paracetamol	Si	9	91.55	78.82	NS
	No	119	78.22	56.51	
SAOS	Si	33	116.48	59.4	<0.0001
	No	96	66.55	51.75	

Tabla 3. Variables categóricas en relación con el valor bioquímico de Folch. Valor medio \pm DE.

Igualmente, el análisis de las variables continuas de nuestra cohorte de pacientes permitió apreciar diferencias del valor bioquímico de Folch según la edad, peso, índice de masa corporal, valor analítico de ALT, triglicéridos y colesterol (Tabla 4).

Variables continuas	Constante	Coefficiente	r²	P
Edad (años)	122.28	-0.85	0.04	<0.05
Peso (Kg)	-4.59	0.77	0.18	<0.0001
Altura (cms)	200.65	-0.74	0.01	NS
IMC (Kg/m²)	-27.24	2.66	0.25	<0.0001
AST (U/L)	67.79	0.44	0.01	NS
ALT (U/L)	60.33	0.57	0.04	<0.05
GGT (U/L)	84.74	-0.15	0.01	NS
FA (U/L)	92.32	-0.21	0.02	NS
Triglicéridos (mg/dL)	63.67	0.09	0.05	<0.05
Colesterol (mg/dL)	27.30	0.25	0.04	<0.05

Tabla 4. Variables continuas en relación con el valor bioquímico de Folch.

C. Estudio descriptivo de las variables según el grado histológico de esteatosis

A continuación, se analizaron las distintas variables en nuestra cohorte de pacientes en relación con el grado histológico de esteatosis.

El análisis de las variables categóricas, permitió apreciar diferencias en el grado de esteatosis en relación al sexo, ingesta de antidepresivos y presencia de SAOS (Tabla 5).

Variables categóricas		Grado de esteatosis				P
		0	1	2	3	
Sexo	Hombre	9 (32.1%)	26 (61.9%)	14 (32.6%)	3 (18.7%)	<0.05
	Mujer	19 (67.9%)	16 (38.1%)	29 (67.4%)	13 (81.3%)	
Diabetes	Si	5 (17.9%)	10 (23.8%)	12 (27.9%)	6 (37.5%)	NS
	No	23 (82.1%)	32 (76.2%)	31 (72.1%)	10 (62.5%)	
Dislipemia	Si	10 (35.7%)	14 (33.3%)	15 (34.9%)	7 (43.7%)	NS
	No	18 (64.3%)	28 (66.7%)	28 (65.1%)	9 (56.3%)	
Anticonceptivos	Si	1 (3.6%)	0 (0%)	3 (7%)	0 (0%)	NS
	No	27 (96.4%)	42 (100%)	40 (93%)	15 (100%)	
Estatinas	Si	3 (10.7%)	6 (14.3%)	7 (16.7%)	4 (26.7%)	NS
	No	25 (89.3%)	36 (85.7%)	36 (83.3%)	11 (73.3%)	
Inmunosupresores	Si	1 (3.6%)	2 (4.8%)	2 (4.7%)	0 (0%)	NS
	No	27 (96.4%)	40 (95.2%)	41 (95.3%)	15 (100%)	
Antidepresivos	Si	2 (7.1%)	1 (2.4%)	4 (9.3%)	5 (33.3%)	<0.05
	No	26 (92.9%)	41 (97.6%)	39 (90.7%)	10 (66.7%)	
Nifedipino	Si	2 (7.1%)	2 (4.8%)	5 (11.6%)	1 (6.7%)	NS
	No	26 (92.9%)	40 (95.2%)	38 (88.4%)	14 (92.3%)	
Hormonas	Si	1 (3.6%)	3 (7.1%)	2 (4.7%)	1 (6.7%)	NS
	No	27 (96.4%)	39 (92.9%)	41 (95.3%)	14 (92.3%)	
Paracetamol	Si	3 (10.7%)	1 (2.4%)	5 (11.6%)	0 (0%)	NS
	No	25 (89.3%)	41 (97.6%)	38 (88.4%)	15 (100%)	
SAOS	Si	1 (3.6%)	10 (23.8%)	14 (32.6%)	8 (50%)	<0.05
	No	27 (96.4%)	32 (76.2%)	29 (67.4%)	8 (50%)	

Tabla 5. Variables categóricas en relación con el grado histológico de esteatosis. Frecuencia absoluta y porcentaje.

Cuando tomamos en consideración las variables continuas, se pudieron comprobar diferencias en la gradación histológica en relación al peso, IMC, valor analítico de GGT, FA, cuantificación de la grasa hepática mediante el método bioquímico de Folch en biopsia hepática y valor Folch estimado y calculado con la fórmula utilizando RM multieco (Tabla 6).

Variables continuas	Grado de esteatosis				ANOVA
	0	1	2	3	
Edad (años)	52.21 (2.99)	53.60 (2.21)	46.53 (2.11)	48.06 (2.65)	NS
Peso (Kg)	82.04 (4.64)	109.21 (4.77)	120.79 (4.38)	121.31 (6.64)	<0.05 (0 vs 1, 2, 3)
Altura (cms)	162.89 (1.30)	166.90 (1.47)	164.58 (1.43)	162.25 (2.32)	NS
IMC (Kg/m²)	31.14 (1.85)	39.17 (1.50)	44.42 (1.40)	45.81 (2.36)	<0.05 (0 vs 1, 2, 3)
AST (U/L)	26.48 (2.72)	23.48 (1.08)	26.19 (2.72)	24.94 (1.58)	NS
ALT (U/L)	30.85 (4.03)	28.33 (1.98)	36.53 (4.39)	35.06 (3.57)	NS
GGT (U/L)	60.34 (10.95)	28.33 (4.04)	32.78 (3.42)	36.8 (8.26)	<0.05 (0 vs 1, 2)
FA (U/L)	95.62 (11.13)	79.08 (4.60)	71.31 (2.73)	72.25 (3.53)	<0.05 (0 vs 2)
Triglicéridos (mg/dL)	119.44 (12.82)	130.52 (13.49)	158.4 (29.54)	222.4 (44.68)	NS
Colesterol (mg/dL)	186.33 (9.5)	194.95 (6.36)	210.35 (7.05)	195.53 (13.84)	NS
Folch (mg/gr)	29.95 (5.20)	54.93 (6.56)	107.34 (6.39)	154.51 (13.30)	<0.05 (0 vs 1, 2, 3)
Folch estimado	26.48 (4.72)	57.68 (5.75)	109.78 (5.38)	146.23 (7.80)	<0.05 (0 vs 1, 2, 3)

Tabla 6. Variables continuas en relación con el grado histológico de esteatosis. Valor medio + EEM.

D. Estudio descriptivo de las variables según presencia/ausencia de esteatosis

Finalmente, analizamos las diferentes variables de nuestra cohorte de pacientes distribuidos en 2 grupos según presentaran o no esteatosis basándonos en la gradación histológica realizada por nuestros patólogos:

- *Ausencia de esteatosis* (Grado histológico=0)
- *Presencia de esteatosis* (Grado histológico \geq 1).

Al analizar las variables categóricas, no se apreciaron diferencias entre ambos grupos, salvo en el SAOS (Tabla 7).

Variables categóricas		Esteatosis		P
		No	Si	
Sexo	Hombre	9 (32.1%)	43 (42.6%)	NS
	Mujer	19 (67.9%)	58 (57.4%)	
Diabetes	Si	5 (17.9%)	28 (27.7%)	NS
	No	23 (82.1%)	73 (72.3%)	
Dislipemia	Si	10 (35.7%)	36 (35.7%)	NS
	No	18 (64.3%)	65 (64.3%)	
Anticonceptivos	Si	1 (3.6%)	3 (3%)	NS
	No	27 (96.4%)	97 (97%)	
Estatinas	Si	3 (10.7%)	17 (16.8%)	NS
	No	25 (89.3%)	83 (83.2%)	
Inmunosupresores	Si	1 (3.6%)	4 (4%)	NS
	No	27 (96.4%)	96 (96%)	
Antidepresivos	Si	2 (7.1%)	10 (10%)	NS
	No	26 (92.9%)	90 (90%)	
Nifedipino	Si	2 (7.1%)	8 (8%)	NS
	No	26 (92.9%)	92 (92%)	
Hormonas	Si	1 (3.6%)	6 (6%)	NS
	No	27 (96.4%)	94 (94%)	
Paracetamol	Si	3 (10.7%)	6 (6%)	NS
	No	25 (89.3%)	94 (94%)	
SAOS	Si	1 (3.6%)	32 (31.7%)	<0.05
	No	27 (96.4%)	69 (68.3%)	

Tabla 7. Variables categóricas en relación con la presencia/ausencia de esteatosis. Frecuencia absoluta y porcentaje.

Sin embargo, al analizar las variables continuas se observaron diferencias en relación al peso, IMC, valor analítico de GGT, FA y cuantificación de la grasa hepática mediante el método bioquímico de Folch en la biopsia hepática y el valor Folch estimado y calculado con la fórmula (Tabla 8).

Variables continuas	Esteatosis		T-student
	No	Si	
Edad (años)	52.21 (2.99)	49.71 (4.95)	NS
Peso (Kg)	82.04 (4.64)	116.06 (11.55)	<0.05
Altura (cms)	162.89 (1.30)	165.18 (0.94)	NS
IMC (Kg/m²)	31.14 (1.85)	42.46 (0.97)	<0.05
AST (U/L)	26.48 (2.72)	24.86 (1.26)	NS
ALT (U/L)	30.85 (4.03)	32.89 (2.14)	NS
GGT (U/L)	60.34 (10.95)	34.77 (2.55)	<0.05
FA (U/L)	95.62 (11.13)	74.87 (2.40)	<0.05
Triglicéridos (mg/dL)	119.44 (12.82)	156.77 (15.52)	NS
Colesterol (mg/dL)	186.33 (9.5)	201.53 (4.57)	NS
Folch (mg/gr)	29.95 (5.20)	93.02 (5.64)	<0.05
Folch estimado	26.48 (4.72)	93.89 (4.80)	<0.05

Tabla 8. Variables continuas en relación con la presencia/ausencia de esteatosis. Valor medio + EEM.

2. Estadística analítica

A. Análisis histológico

Los pacientes obesos mostraron aumento de la esteatosis hepática en relación al grupo de pacientes sin obesidad por examen histológico. Además, el análisis de la esteatosis por histología mostró diferentes grados de contenido graso en el hígado del grupo de obesos 1 y en el grupo de no obesos 1 (Figura 10 / Tabla 9).

[Grados de esteatosis ⇒ Grado 0 = No esteatosis (<5%), Grado 1 = Leve (5-33%), Grado 2 = Moderado (34-66%), Grado 3 = Grave (>66%)]

No obesos 1:	53.12% Grado 0	Obesos 1:	11.34% Grado 0
	34.38% Grado 1		31.96% Grado 1
	9.38% Grado 2		41.24% Grado 2
	3.12% Grado 3		15.46% Grado 3

En general, la prevalencia de la esteatosis hepática en este estudio fue de 78.29% (101 de 129 pacientes presentaban esteatosis macrovesicular \geq grado 1 en el análisis histológico). En el grupo de obesos, la prevalencia de esteatosis fue de 88.66% y por el contrario, en el grupo de pacientes no obesos más de la mitad no presentaron esteatosis.

Es importante destacar que en nuestra serie de pacientes no hubo ningún efecto adverso mencionable asociado a la biopsia hepática.

Grado esteatosis	No obesos 1	Obesos 1	Total
0	17 (53.12%)	11 (11.34%)	28 (21.71%)
1	11 (34.38 %)	31 (31.96%)	42 (32.56%)
2	3 (9.38%)	40 (41.24%)	43 (33.33%)
3	1 (3.12%)	15 (15.46%)	16 (12.40%)
Total	32	97	129

Tabla 9. Distribución de la esteatosis por grados histológicos. Los pacientes obesos mostraron mayor grado de esteatosis en comparación con los pacientes no obesos que se sometieron a cirugía hepática. La prevalencia total de esteatosis hepática en nuestro estudio fue 78.29%. Frecuencia absoluta y porcentaje.

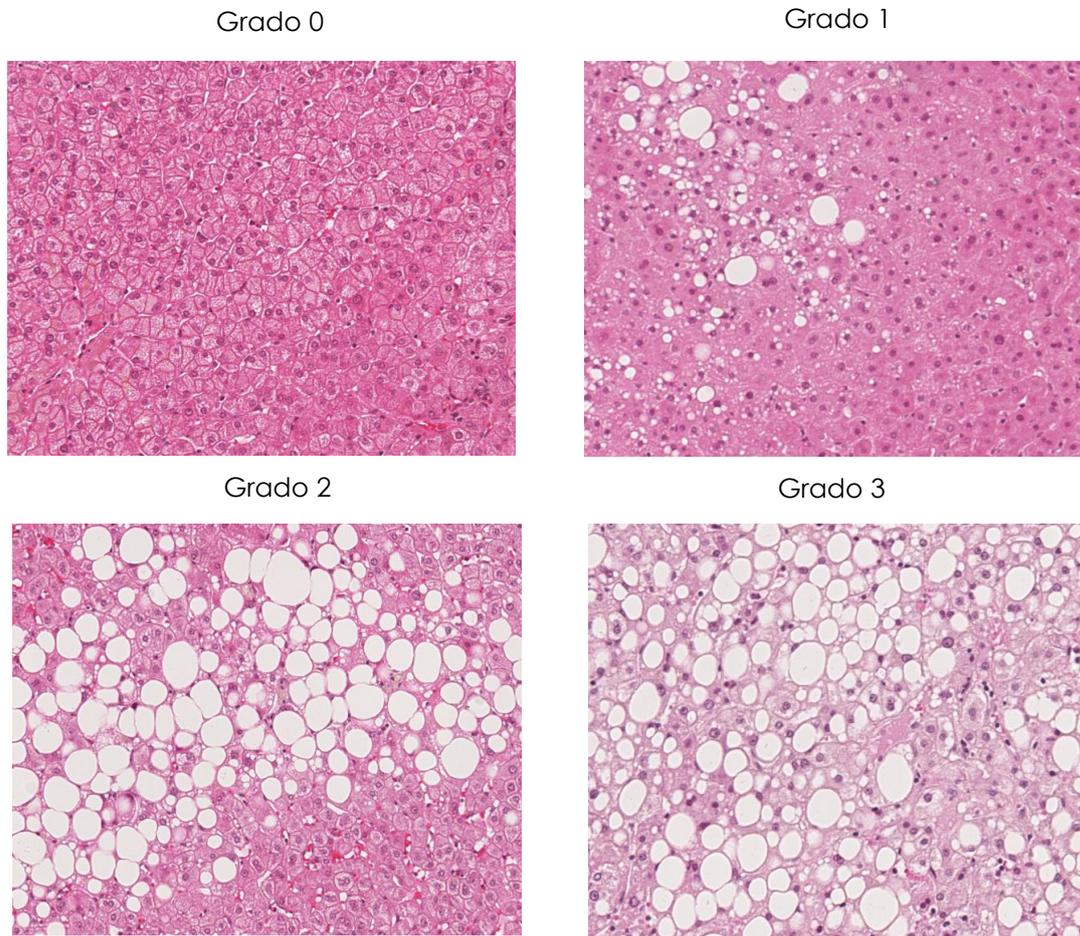


Figura 10. Grados histológicos de esteatosis hepática. Imágenes representativas con tinción de hematoxilina-eosina de pacientes con diferentes grados de esteatosis hepática (grados 0-3).

B. Correlación entre la RM multieco y la estimación histológica de la esteatosis hepática

En los 129 pacientes en estudio evaluamos la correlación entre la fracción grasa calculada por RM multieco y el análisis semicuantitativo histológico de la esteatosis hepática (Figuras 11, 12 y tabla 10).

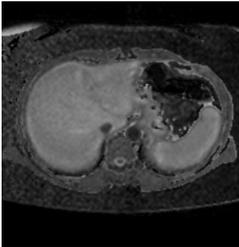
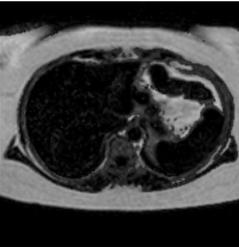
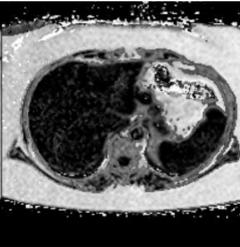
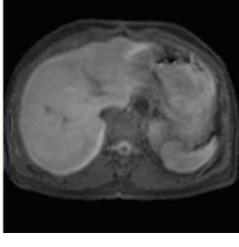
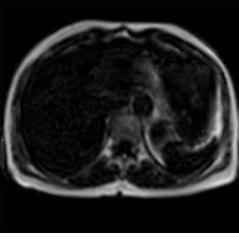
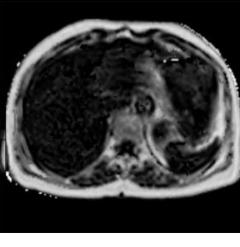
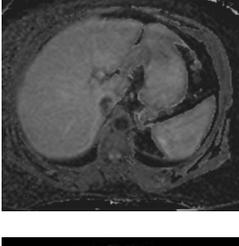
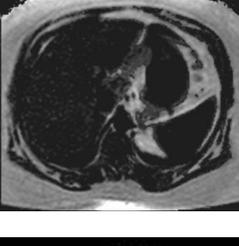
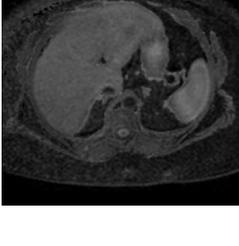
Pacientes	Señal agua	Señal grasa	Fracción grasa	Valor RM multi-eco
#1				0.009
#2				0.109
#3				0.244
#4				0.357

Figura 11. Mapas de intensidad de RM multieco. Imágenes representativas de RM multieco que muestran diferentes grados de intensidad de agua/grasa y la fracción grasa en diferentes pacientes.

Nuestros datos mostraron que los valores de fracción grasa calculada por RM multieco se correlacionan positivamente con el grado de esteatosis estimado por análisis histológico ($r = 0,77$, $r^2 = 0,60$; $p < 0,0001$) (Figura 13).

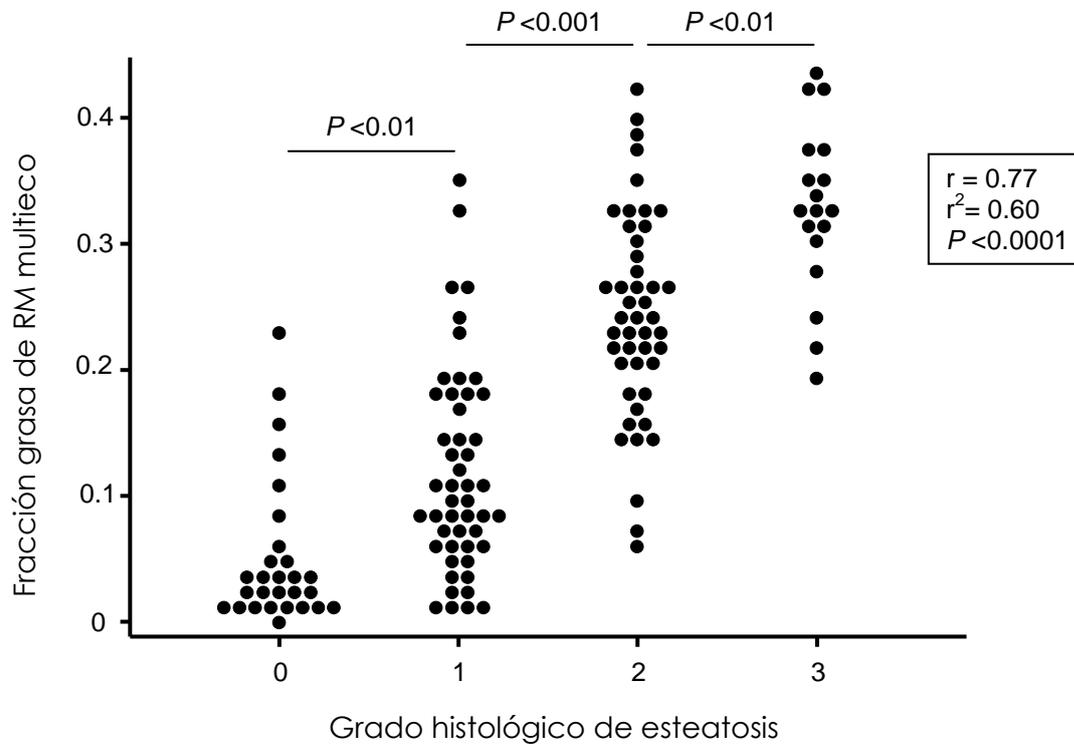


Figura 12. Distribución de las intensidades de señal por RM multieco según los grados histológicos de esteatosis. Diagrama de puntos. La intensidad de señal de la fracción grasa obtenida por RM multieco se correlaciona positivamente con el grado de esteatosis estimado por análisis semicuantitativo histológico ($n = 129$). Los puntos representan los valores de cada caso.

Sin embargo, aunque se encontraron diferencias significativas en los valores de fracción grasa hepática calculada con la RM entre todos los grupos de pacientes clasificados según el grado histológico de esteatosis, apreciamos una variabilidad inter-grupos en los valores de RM [coeficiente medio de variación (CV) = 70,6%, Tabla 10].

Es importante destacar que no se han informado eventos adversos asociados a la RM multieco en ningún paciente.

Grado de esteatosis	Valor medio de RM multieco	DE	Frecuencia	CV (%)
0	0.05	0.06	28	113.8
1	0.12	0.09	42	70.5
2	0.24	0.08	43	33.9
3	0.33	0.07	16	22.0
Media	0.17	0.12	129	70.6

Tabla 10. Fracción grasa según el grado histológico de esteatosis. Distribución de los valores medios de fracción grasa por RM multieco de cada grupo de gradación histológica de esteatosis (escala 0-3). CV, coeficiente de variación; DE, desviación estándar. Valor medio \pm DE.

C. Correlación entre el análisis histológico y el método bioquímico

En todos los pacientes de este estudio se analizó la correlación entre el análisis semicuantitativo de la esteatosis por histología y la cuantificación directa de la concentración hepática de lípidos (realizadas ambas sobre biopsia hepática recogida en el momento de la intervención quirúrgica) (Figura 13, Tabla 11).

Nuestros datos indicaron una correlación positiva entre los valores de cuantificación bioquímica de los lípidos hepáticos (Folch) y el grado de esteatosis estimado por histología ($r = 0.71$, $r^2 = 0.50$; $p < 0.05$), [Figura 13].

En este sentido, se apreciaron diferencias significativas en los valores de Folch entre los grados histológicos 1, 2 y 3, pero no entre los grados 0 y 1.

Por otra parte, destaca la gran variabilidad de los valores Folch entre los 4 grupos de esteatosis determinados histológicamente en una escala de 0-3 (CV = 72.9%, Tabla 11).

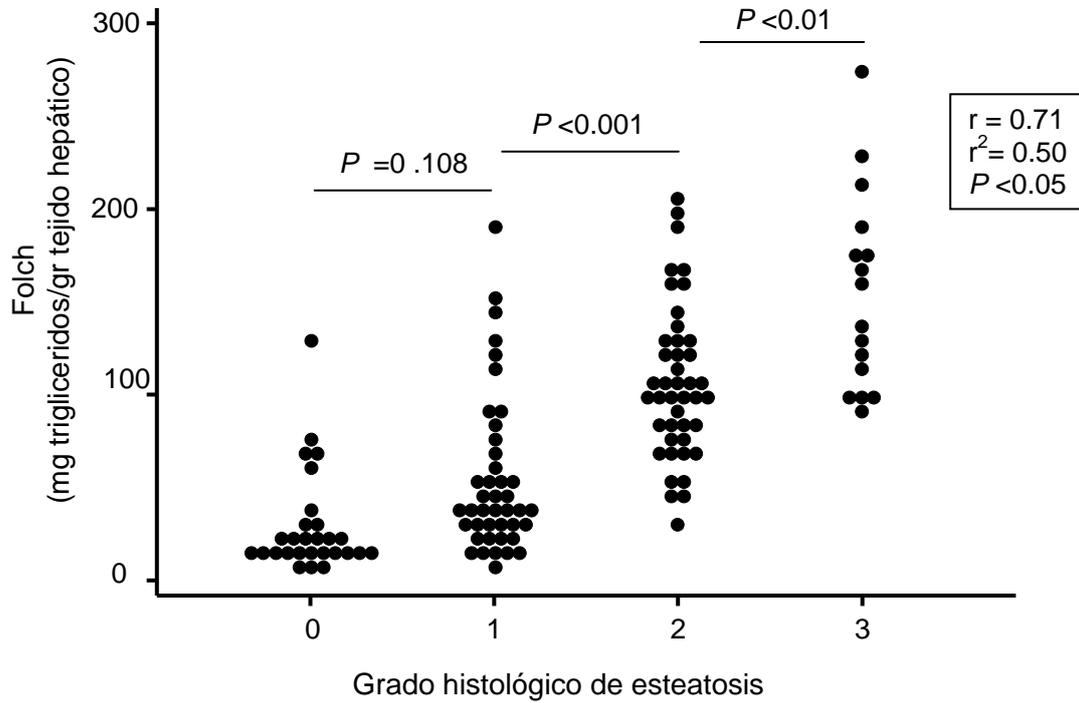


Figura 13. Distribución de los valores bioquímicos de Folch según los grados histológicos de esteatosis. Diagrama de puntos. Correlación positiva entre los valores de Folch y el grado de esteatosis estimado por análisis histológico en hígados humanos (n = 129). Los puntos representan los valores de cada caso.

Grado de esteatosis	Folch (Valor medio)	DE	Frecuencia	CV (%)
0	29.95	27.55	28	92.1
1	54.93	42.54	42	77.5
2	107.34	41.94	43	39.2
3	154.51	53.23	16	34.5
Total	79.33	57.86	129	72.9

Tabla 11. Valores bioquímicos de Folch según los grados histológicos. Distribución de los valores medios de Folch de cada grupo de gradación histológica de esteatosis (0-3 escala). CV, coeficiente de variación; DE, desviación estándar. Valor medio ± DE.

D. Características diagnósticas (RM multieco – gradación histológica de la esteatosis). Curva ROC y AUROC

Como hemos comentado previamente, procedimos a distribuir los pacientes de la serie en dos grandes grupos: *Ausencia de esteatosis* (Grado histológico = 0) y *Presencia de esteatosis* (Grado histológico ≥ 1).

La definición del término esteatosis tiene base histológica y por ello, la capacidad de la RM multieco para diagnosticar la grasa intrahepática se evaluó usando el método histológico en la comparación. Para analizar la precisión diagnóstica de la RM calculamos la curva ROC y el área bajo curva ROC (Figura 14).

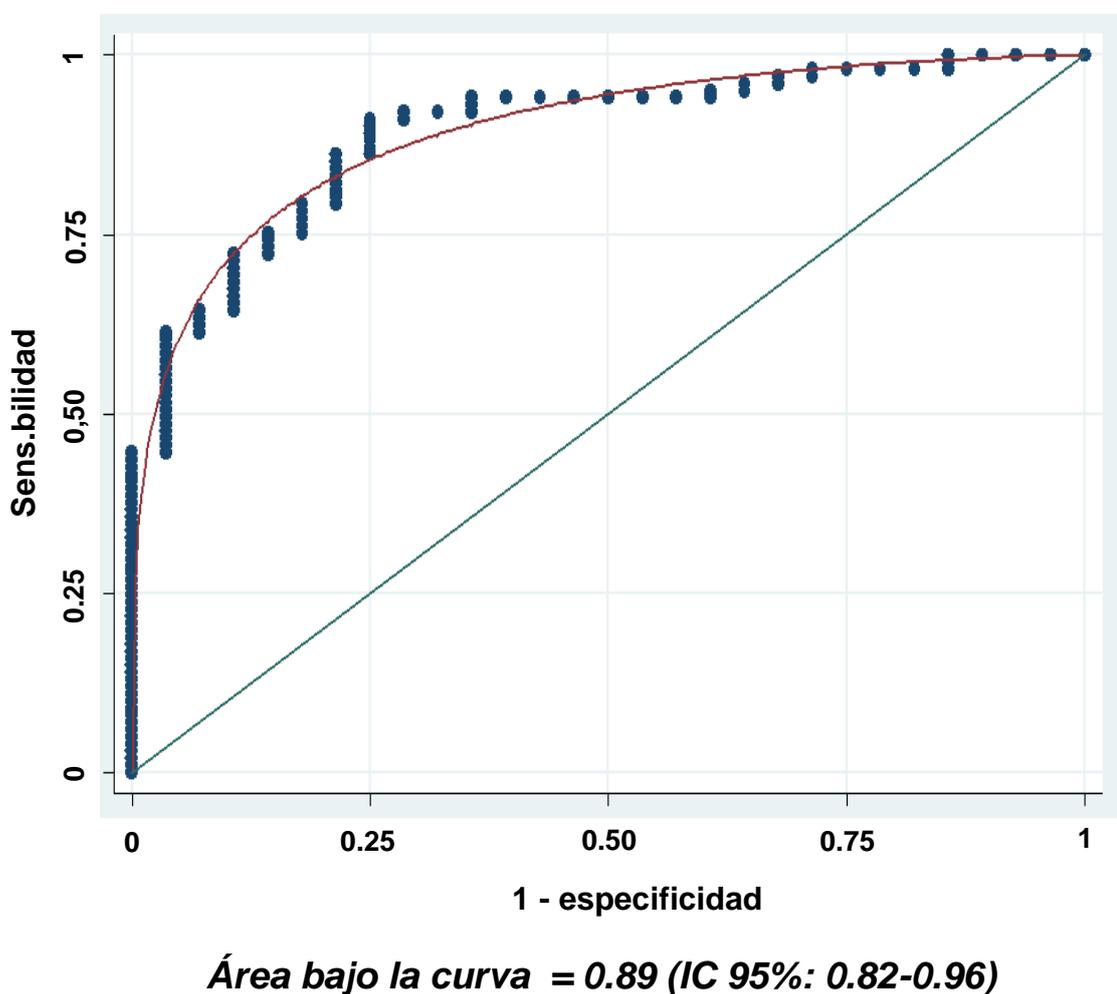


Figura 14. Curva ROC RM multieco – análisis histológico. Precisión diagnóstica de la RM multieco para cuantificar la esteatosis hepática utilizando el análisis histológico como prueba de referencia.

El mejor punto de corte del valor de fracción grasa calculada con RM multieco que nos permitía diferenciar entre los pacientes que presentaban o no esteatosis

hepática fue de **0.045 ppm**. La sensibilidad y especificidad en ese punto fue de **91.1%** y **71.4%**, respectivamente (VPP=92% / VPN=69%).

E. Correlación entre la RM multiéico y el método bioquímico

A continuación evaluamos la relación entre la fracción grasa calculada por RM multiéico comparada con la cuantificación directa de la esteatosis a través de la medición bioquímica (prueba de referencia) de la concentración hepática de triglicéridos (valor Folch) en los 129 pacientes del estudio, presentando una curva de calibración (Figura 15).

Nuestros resultados indicaron que la fracción grasa calculada con RM multiéico se correlaciona positivamente con la cuantificación bioquímica de los lípidos hepáticos ($r = 0.90$, r^2 ajustado = 0.81; $p < 0,0001$), dando lugar a la siguiente ecuación:

$$\text{Folch} = 5.082 + (432.104 * \text{fracción grasa RM multiéico})$$

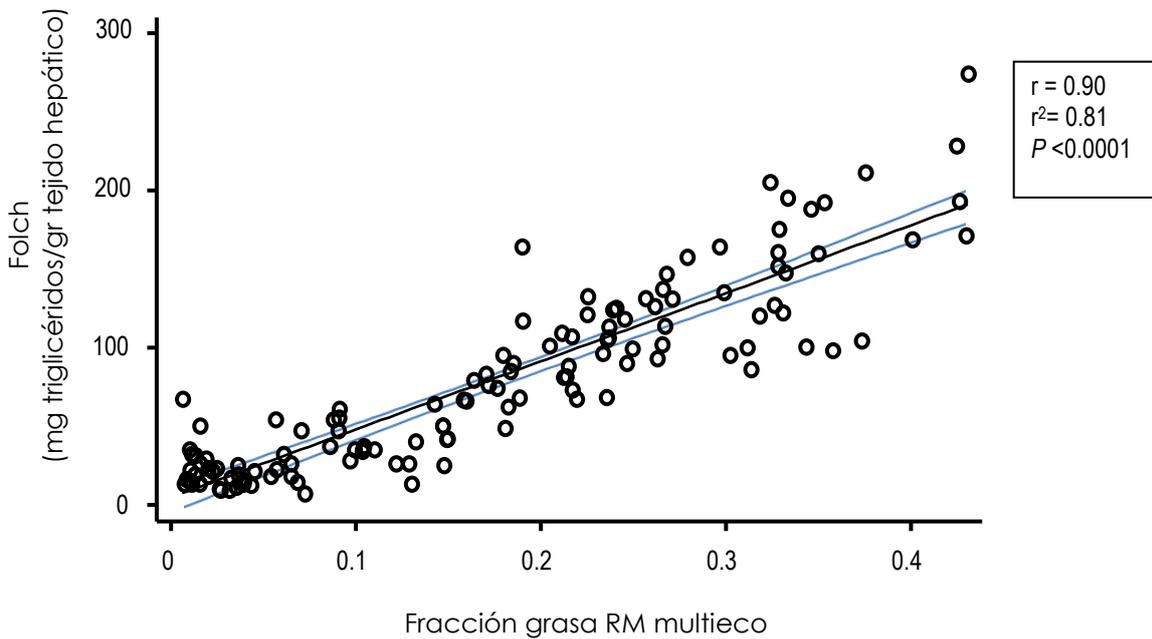


Figura 15. Curva de calibración RM multiéico – Folch. La fracción grasa obtenida por RM multiéico se correlaciona positivamente con la concentración hepática de triglicéridos ($r=0.90 / r^2=0.81$). Ecuación resultante que predice el valor Folch a partir de la fracción grasa derivada de RM multiéico. Los puntos representan los valores de cada caso.

F. Cálculo de la concentración grasa hepática a través de la fracción grasa calculada con RM multienco

La ecuación mencionada anteriormente fue validada con un nuevo grupo de 31 pacientes adultos adicionales [24 con criterios de obesidad mórbida (IMC \geq 35 kg/m², **Obesos 2**) y 7 controles (IMC<35 Kg/m², **No obesos 2**)].

Se realizó una RM multienco 12 horas antes de la intervención quirúrgica (cirugía bariátrica o cirugía hepática) y el valor de la fracción grasa obtenida en dicha RM se utilizó para predecir la concentración de grasa hepática (Folch) calculada con dicha fórmula.

A continuación, los valores Folch estimados se compararon con la medición bioquímica directa de la concentración de grasa hepática cuantificada en una biopsia hepática recogida durante la intervención quirúrgica.

Nuestros datos mostraron que la ecuación antes mencionada es capaz de predecir la concentración hepática de triglicéridos con fuerte correlación entre a) la medición bioquímica directa de los lípidos hepáticos (Folch en la biopsia hepática) y b) el valor Folch estimado obtenido con la fórmula usando los valores de fracción grasa por RM ($r^2 = 0,98$; $p < 0.0001$) (Figura 16).

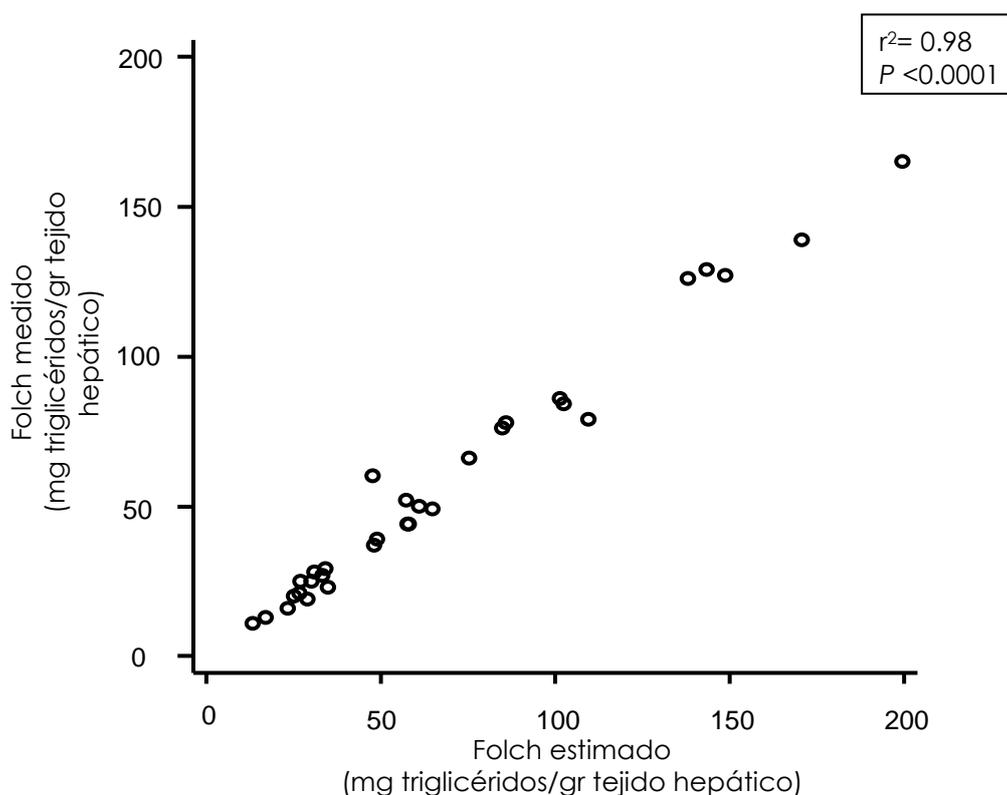


Figura 16. Curva de calibración entre los valores de Folch medido y estimado utilizando la fórmula de predicción. Los puntos representan los valores de cada caso.

G. Análisis univariado de la concentración de grasa hepática y evaluación multivariante de la predicción del valor Folch por RM multiéico

Se evaluó el papel de las diferentes variables analizadas en relación con la cuantificación bioquímica (Tablas 3 y 4).

El estudio univariante de las variables categóricas mostró que el valor bioquímico de Folch es más bajo en hombres que en mujeres, y mayor en los pacientes con apnea obstructiva del sueño ($p < 0.05$ y $p < 0.0001$, respectivamente, Tabla 3).

Además, los valores Folch se correlacionan negativamente con la edad ($p < 0.05$; Tabla 4), y positivamente con IMC, peso ($p < 0.0001$; Tabla 4), valor de ALT, triglicéridos y colesterol ($p < 0.05$; Tabla 4).

Por otro lado, el análisis multivariado indicó que estas variables no mejoran la capacidad predictiva del valor Folch obtenida por la fórmula mencionada anteriormente.

H. Monitorización de la esteatosis hepática con RM multiéico

Antes de analizar los datos obtenidos en la segunda RM realizada al año de la cirugía, queremos reflejar que en nuestra serie encontramos una clara diferencia en la prevalencia de esteatosis entre el grupo de pacientes obesos y el grupo sin obesidad. Así, el grupo de pacientes obesos (Obesos 1) presenta un aumento de la esteatosis hepática en comparación con el grupo de pacientes sin criterios de obesidad mórbida (No obesos 1) teniendo en cuenta la fracción grasa obtenida con RM multiéico y el valor Folch ($p < 0.0001$; figuras 17A, B, respectivamente).

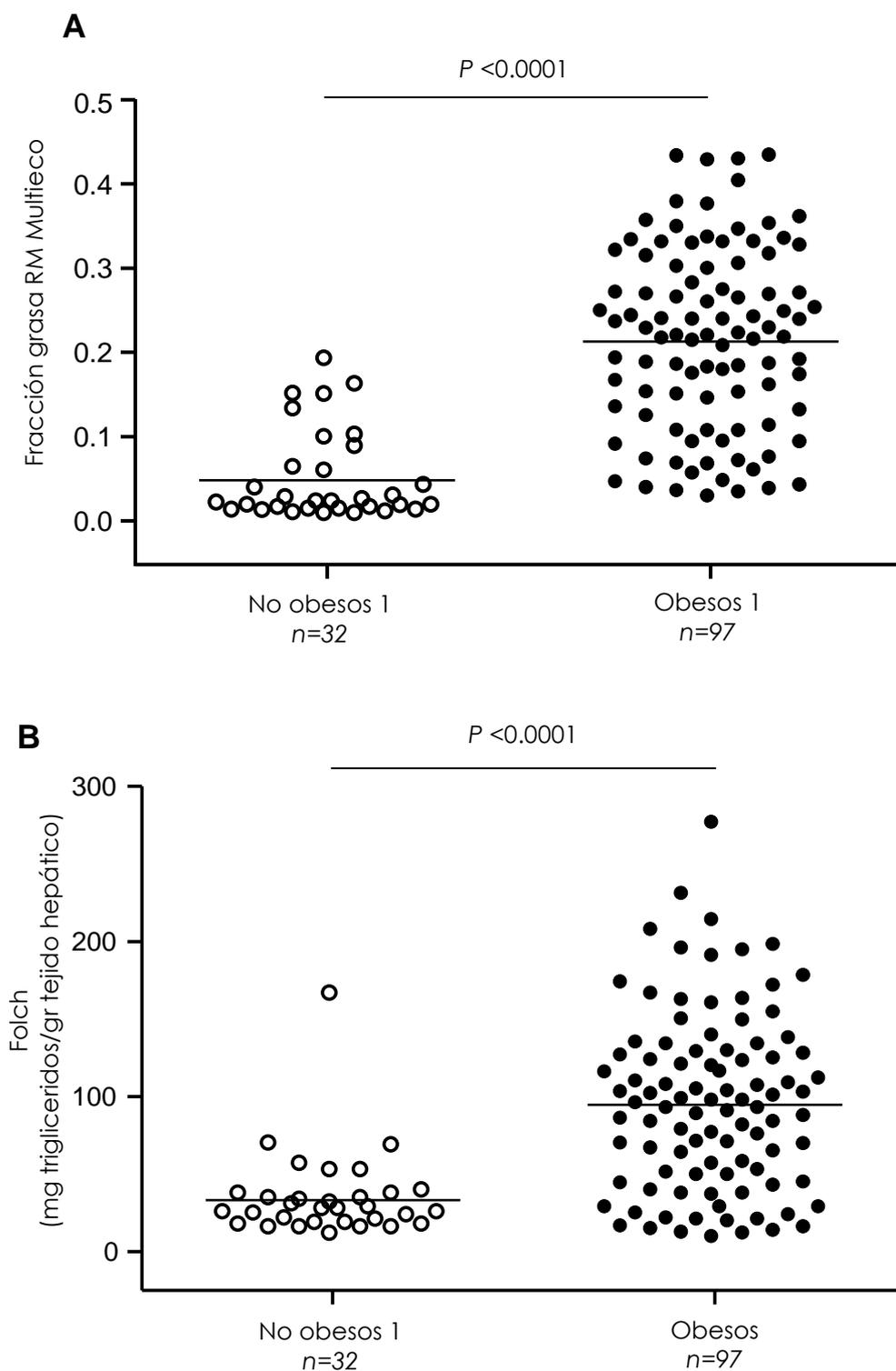


Figura 17. Aumento de la esteatosis hepática en los pacientes obesos.

A) Fracción grasa calculada por RM Multiéico.

B) Valor Folch.

A y B revelaron que los pacientes obesos tienen más esteatosis en comparación con los controles.

Los valores medios se indican mediante barras y los puntos representan los valores de cada caso.

Los pacientes con criterios de obesidad mórbida incluyendo el grupo de derivación y de validación, fueron en total 121 (97 del grupo **Obesos 1** y 24 del grupo **Obesos 2**).

Del total, 112 pacientes (92.56%) aceptaron realizarse una segunda RM multiécho al año de la intervención quirúrgica y fueron incluidos en el estudio con el objetivo de calcular la nueva fracción grasa obtenida por RM multiécho y el valor de Folch estimado mediante nuestra fórmula. Nuestros datos indican que en los pacientes que se sometieron a cirugía bariátrica disminuyó la intensidad de señal de fracción grasa de RM multiécho y el valor Folch estimado después de un año de la intervención ($p < 0.0001$; Figuras 18 A-C). Este efecto no se observó en los pacientes obesos que no fueron sometidos a cirugía bariátrica (Figuras 19 A-C).

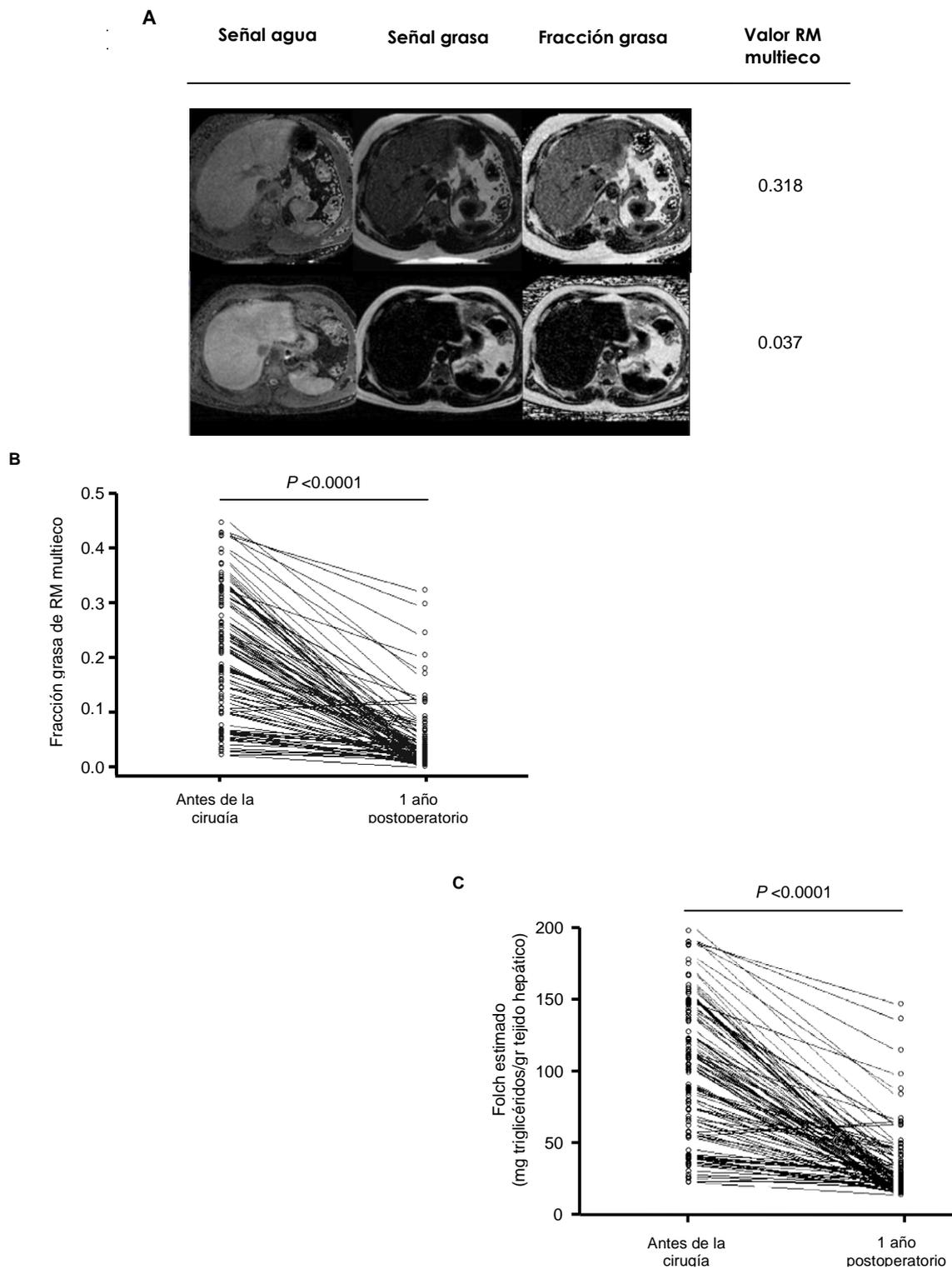


Figura 18. Monitorización de la esteatosis tras cirugía bariátrica.

(A) Imágenes representativas de RM multiéico muestran una reducción de la señal grasa y de la fracción grasa en pacientes obesos después de cirugía bariátrica. En los pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica ($n = 95$) disminuyeron las intensidades de señal de fracción grasa por RM multiéico (B) y el valor de Folch estimado (C) después de transcurrido 1 año de la cirugía.

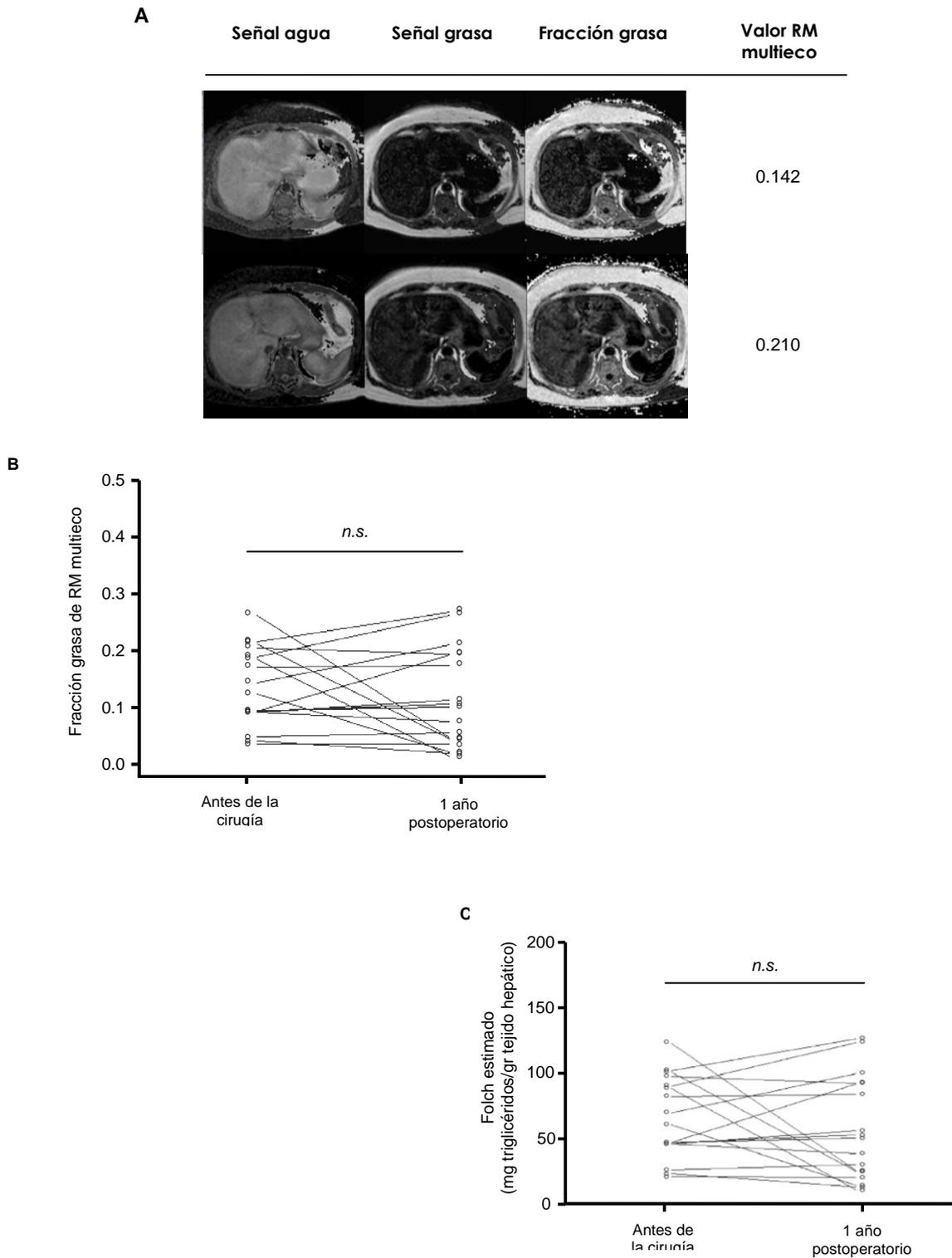


Figura 19. Monitorización de la esteatosis tras cirugía hepática.

(A) Imágenes representativas de RM multiéico que no muestran cambios de intensidad de la grasa y de la fracción grasa en pacientes obesos que no fueron sometidos a cirugía bariátrica. En los pacientes obesos que se sometieron a resección hepática (n=17) no se modificaron las intensidades de señal de fracción grasa por RM multiéico (B) ni el valor Folch estimado (C) después de 1 año.

I. Análisis multivariado de la mejoría de la esteatosis

El análisis multivariado indicó que tanto el **valor Folch estimado** antes de la cirugía bariátrica como la **pérdida de peso** mejoran el valor Folch estimado 12 meses después de la cirugía ($p < 0.0001$; Tabla 12). El peso inicial, el sexo y la edad no se correlacionaron con la mejoría de la esteatosis.

Mejora de la esteatosis	Coefficiente	DE	P
Folch estimado inicial	0.78	0.05	<0.0001
Perdida de peso	0.64	0.10	<0.0001
Constante	-34.77	5.70	<0.0001

$$r^2 = 0.76$$

Tabla 12. Análisis de regresión multivariante de la mejoría de la esteatosis. Análisis de regresión multivariante final para el contenido estimado de lípidos (Folch estimado) por RM después de un año de la cirugía.

DISCUSIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) puede presentarse de muchas formas clínicas. Sin embargo, pueden clasificarse en dos grandes grupos según su evolución: a) formas indolentes y b) formas con mayor daño hepático que pueden progresar al desarrollo de cirrosis en estadíos avanzados de la enfermedad. La creciente prevalencia de la obesidad, hipertensión arterial, dislipemia y diabetes mellitus (i.e., factores de riesgo para el desarrollo de NAFLD: síndrome metabólico) en los países industrializados ponen de manifiesto la necesidad de generar métodos no invasivos para el diagnóstico y monitorización de la enfermedad grasa hepática no alcohólica, así como de buscar nuevas dianas terapéuticas. El método diagnóstico tradicional es el análisis histológico. Se trata de un procedimiento invasivo que se basa en una estimación cualitativa o semicuantitativa de la proporción de grasa intrahepática en biopsia hepática, siendo considerado la prueba de referencia hasta la fecha [184]. Sin embargo, la determinación de la concentración hepática de lípidos tiene que ser una estimación precisa. En la actualidad, múltiples estudios tienen como principal objetivo el análisis de la capacidad nosológica de diferentes técnicas diagnósticas incruentas y cuantitativas para determinar la concentración grasa en NAFLD. Diversos estudios han mostrado la capacidad de ciertos biomarcadores serológicos de predecir la presencia de esteatosis hepática, aunque no de forma cuantitativa [196, 198]. En este sentido, la RM es considerada la prueba no invasiva más sensible para la cuantificación de la esteatosis hepática [216].

Datos recientes publicados por nuestro grupo [290] y por otros grupos de investigación [293-298] utilizando **modelo experimental** de esteatosis hepática en roedores han demostrado que la RM es un método capaz de determinar la concentración intrahepática de triglicéridos utilizando el método bioquímico de Folch como prueba de referencia. En nuestro caso, pudimos comprobar que existe una correlación muy positiva entre la fracción grasa calculada por RM multi-teco y la medición bioquímica de Folch [290]. El diseño del estudio nos permitió analizar la correlación en subpoblaciones con diferentes grados de depósito de grasa hepática, aportando robustez a los resultados obtenidos. Por el contrario, estos estudios también correlacionaron la fracción grasa por RM y la estimación histológica apreciando una mayor discrepancia entre los diferentes grupos de investigación [293-298]. Estos datos permitieron concluir que el método *gold standard* adecuado era el análisis bioquímico por su capacidad para poder realizar una estimación exacta de la grasa hepática [293, 295].

Por otro lado, tanto los modelos experimentales de esteatosis en roedores como las técnicas de RM utilizadas fueron diferentes entre los distintos trabajos de investigación. Así, se pudo comprobar que la técnica de imagen por RM

multiéico que se basa en el desplazamiento químico con corrección del sesgo T1 y T2* con posterior modelaje espectral de la grasa (método similar al nuestro) es capaz de cuantificar de forma precisa la grasa hepática en un modelo animal de roedores alimentados "ad libitum" [294]. De forma similar, se ha descrito una alta correlación entre la fracción grasa calculada mediante espectroscopia por RM con la medición bioquímica de triglicéridos intrahepáticos en ratas alimentadas con una dieta deficiente en metionina y colina [296]. Así, se ha demostrado que la espectroscopia por RM puede discriminar de forma precisa entre los diferentes grados histológicos y los valores bioquímicos de triglicéridos intrahepáticos.

Para corroborar los hallazgos obtenidos en el modelo animal y poder extrapolar las conclusiones obtenidas en el ser humano, iniciamos un estudio clínico con un planteamiento similar al estudio piloto experimental. El primer aspecto importante a destacar en nuestro trabajo es su **diseño**. Planteamos un estudio transversal de prueba diagnóstica y prospectivo para la monitorización de la evolución clínico-radiológica de la esteatosis hepática en humanos. Se trata de un estudio de prueba diagnóstica para evaluar las características nosológicas de la RM en la cuantificación de la grasa hepática tomando como método *gold standard* la determinación de grasa en el tejido hepático mediante la medición bioquímica de Folch.

En el diseño de este estudio, nos planteamos diferenciar tres fases claramente definidas en una secuencia cronológica determinada. En una primera fase, además de incluir la mayor parte de nuestra cohorte de pacientes, nos planteamos como principal objetivo evaluar la capacidad nosológica de la RM en la cuantificación de la grasa intrahepática y para ello, desarrollamos una regla de predicción clínica. La segunda fase se diseñó con la intención de validar los resultados obtenidos en la fase de derivación de la RPC, para lo cual, incluimos otra nueva cohorte de pacientes de características clínicas similares a la de la primera fase. Por último, desarrollamos una tercera fase en la que monitorizamos los cambios que acontecieron en la grasa intrahepática tras la realización de una cirugía hepática o bariátrica. En esta última fase, incluimos pacientes de las cohortes definidas en las dos primeras fases que cumplieran una serie de características determinadas ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$) en el momento de la intervención quirúrgica.

Los **objetivos** principales de nuestro estudio eran esclarecer la capacidad diagnóstica de la RM multiéico para cuantificar la grasa hepática respecto al método bioquímico de Folch en una biopsia hepática y monitorizar la evolución de la esteatosis en pacientes pertenecientes a un grupo de riesgo de NAFLD. En este sentido, consideramos que el diseño de nuestro estudio es apropiado ya

que incluye las fases más importantes en un estudio de prueba diagnóstica, tales como derivación de la RPC, validación y monitorización. Por el contrario, todos los trabajos que han analizado el valor nosológico de cualquier técnica de RM para la cuantificación de la grasa intrahepática han mostrado un diseño incompleto ya que en ningún estudio se ha desarrollado una fase de validación de los resultados obtenidos. Por otro lado, estudios previos que analizaron la capacidad de diferentes técnicas de RM para realizar un seguimiento longitudinal en pacientes con esteatosis hepática o NASH confirmada por biopsia han demostrado que estas técnicas permiten realizar una correcta monitorización de la evolución de la esteatosis tras diferentes factores que puedan modificarla, tales como el ejercicio físico o la dieta [237, 299].

Además, es importante destacar igualmente el **ámbito clínico** en el que se ha desarrollado nuestro estudio. Los pacientes fueron reclutados en un Hospital Universitario de tercer nivel y, previo a su inicio, el estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Investigaciones Científicas (CEIC) del hospital como se define por la legislación española y las directivas europeas.

Otro punto importante de nuestro trabajo es **el tamaño y tipo de la muestra** utilizada en el estudio que da robustez a los resultados obtenidos.

En una primera fase del estudio incluimos 129 pacientes adultos (32 con IMC < 35 kg/m² y 97 con IMC ≥ 35 kg/m²) y en la fase de validación 31 pacientes adicionales con una distribución similar a la primera cohorte (7 con IMC < 35 kg/m² y 24 con IMC ≥ 35 kg/m²). Estudios previos mostraron una correlación positiva entre la capacidad para cuantificar la grasa hepática mediante técnicas de RM y la medición bioquímica en una biopsia hepática en humanos aunque los resultados poseían escasa consistencia debido al bajo número de pacientes incluidos en sus series [300-303].

Para evaluar correctamente la capacidad nosológica de esta prueba consideramos que la distribución de la muestra debía incluir tanto pacientes con poco riesgo como con riesgo elevado de desarrollar la enfermedad en estudio y por ello, quisimos comprobar dicha capacidad en pacientes con concentraciones bajas y altas de triglicéridos intrahepáticos incluyendo individuos control que presentaban mínimo riesgo de NAFLD y otros que tenían riesgo elevado de desarrollar esteatosis debido a la obesidad.

Por el contrario, los estudios publicados hasta la fecha que han comparado los resultados obtenidos mediante alguna técnica de RM con la medición bioquímica de la grasa hepática en humanos no han incluido el tipo de muestra más apropiado para evaluar la capacidad nosológica de la RM en la cuantificación de la esteatosis ya que en ningún caso se incluyeron factores de

riesgo de NAFLD entre los criterios de selección de los pacientes [301-303]. Como ha quedado claro anteriormente, el tipo de muestra debe incluir un amplio espectro de pacientes que permita asegurar la ausencia y la presencia de NAFLD en sus diferentes grados histológicos.

Así, una distribución heterogénea de la muestra utilizada en cualquier estudio puede ser un factor importante que influya en la fragilidad de los resultados obtenidos. Por el contrario, nuestro grupo de pacientes presentó una distribución equitativa con presencia de individuos en cada grupo según el grado histológico y un gran tamaño muestral que dan robustez a los resultados.

A la hora de analizar la capacidad nosológica de la RM multiéscala para la cuantificación de la grasa hepática conviene utilizar una **prueba diagnóstica de referencia** adecuada (i.e., *gold standard*). Los datos aportados por el *gold standard* deben ser cercanos a la realidad y cuantitativos. En ausencia de pruebas diagnósticas cuantitativas de esteatosis hepática simple o NASH, la prueba de referencia con la que se han comparado otras técnicas diagnósticas ha sido el análisis histológico sobre una biopsia hepática [176]. Sin embargo, aunque en nuestro trabajo realizamos la gradación histológica semicuantitativa de la grasa intrahepática en todos los pacientes, consideramos que el método *gold standard* adecuado debía aportar información más objetiva y por ello nos decantamos por la cuantificación de la grasa intrahepática mediante el método bioquímico de Folch. Ambos métodos se realizaron sobre una biopsia hepática.

Se ha demostrado que el análisis histológico presenta limitaciones importantes tales como la variabilidad muestral [184] y entre observadores que suele resultar en una sobreestimación del contenido de grasa hepática [187, 233]. Hay evidencia que demuestra que la histología aporta una información subjetiva y semicuantitativa de la esteatosis alejada de la concentración exacta de lípidos intrahepáticos [182]. Así, se ha comprobado que los pacientes se pueden clasificar de forma errónea según el grado histológico debido a varias limitaciones inherentes del análisis histológico como son la variabilidad de muestreo y de interpretación [304]. Por todo ello, la estimación de la grasa hepática en secciones histológicas no es un método reproducible e incluso algunos autores consideran necesario modificar las guías actuales que describen el método histológico como *gold standard* adecuado [185]. Por otra parte, la biopsia hepática se trata de una prueba diagnóstica cruenta que la hace inadecuada para realizar un diagnóstico de *screening* de gran número de pacientes en riesgo o para el seguimiento longitudinal de pacientes con NAFLD sometidos a diferentes procedimientos terapéuticos [181].

Las técnicas de imagen por RM estiman la proporción de protones móviles contenidos en las moléculas grasas en una zona tridimensional del hígado [233] y el análisis histológico, por el contrario, estima únicamente la proporción de hepatocitos que contienen vesículas de grasa en una lámina de dos dimensiones [182, 183]. Así, los dos parámetros analizan aspectos diferentes de la esteatosis. Estudios previos han observado que la correlación entre los valores de cuantificación por RM y la estimación histológica son discretos en pacientes con esteatosis moderada-severa [1]. El cálculo del porcentaje de hepatocitos que muestran vesículas de grasa no permite calcular con precisión la cantidad de esteatosis [305].

El método diagnóstico utilizado como prueba *gold standard* para contrastar los resultados obtenidos con la RM debe aportar información objetiva. En este sentido se han propuesto algunas técnicas como la histomorfometría con cuantificación de vacuolas lipídicas hepatocitarias basada en un *software* [300], el análisis histológico computacional [188] o el método bioquímico. Los resultados obtenidos con estas técnicas diagnósticas no dependen de la variabilidad entre los observadores a la hora de realizar la estimación de la esteatosis hepática [185].

El método bioquímico descrito por Folch es considerado el más fiable para extraer y cuantificar los lípidos viscerales [292], ofreciendo una estimación tridimensional y exacta del contenido hepático de triglicéridos. Estas características hacen del método bioquímico una prueba de referencia más adecuada con la que poder comparar los resultados obtenidos con diferentes pruebas de imagen incruentas como la RM [233]. No se usa con frecuencia en la práctica clínica ya que destruye la biopsia hepática, no pudiendo utilizar dicha muestra para su análisis histológico estructural que nos da información valiosa sobre la presencia de inflamación, fibrosis o depósito de hierro [233].

Por todo ello, se considera el método más fiable para la cuantificación de los triglicéridos del hígado y por lo tanto, la prueba de referencia ideal para comparar y correlacionar con los resultados obtenidos por RM en estudios clínicos de diagnóstico.

Nuestros resultados muestran que la estimación histológica de la esteatosis se correlaciona positivamente con los resultados obtenidos por el método bioquímico, aunque este valor de correlación es modesto. Al analizar los datos, hemos observado una significativa variabilidad del valor bioquímico de triglicéridos en cada grado histológico de esteatosis, resultando en una baja capacidad discriminatoria de la estimación histológica según el valor bioquímico de triglicéridos intrahepáticos. Estos datos indican que el análisis histológico no es una prueba diagnóstica precisa que se deba utilizar como

prueba de referencia.

Estudios previos apoyan esta consideración. Así, en distintos estudios experimentales desarrollados en roedores se mostraron bajas correlaciones entre el análisis histológico y la cuantificación bioquímica de la grasa hepática [301, 303].

Tanto las **técnicas de imagen por RM** como la espectroscopia por RM tienen la capacidad de cuantificar la grasa hepática y sus datos se correlacionan bien con la cantidad real de grasa intrahepática. Esto es particularmente cierto en la RM multieco que se destaca por su rapidez y simplicidad, características que la hacen candidata ideal para su introducción en la práctica clínica [226, 231]. Por otro lado, la espectroscopia por ^1H RM requiere una secuencia de adquisición cara, con delicados ajustes y un análisis post-proceso complicado. Por ello, se considera más aplicable en estudios de investigación que en la práctica clínica [305]. Algunos autores consideran que la espectroscopia por ^1H RM se trata de la prueba incruenta de referencia con la que se pueden comparar los resultados de otras técnicas diagnósticas [175, 177, 221, 225, 301, 306-308]. Esta técnica se correlaciona positivamente tanto con el método histológico [220, 305, 309-313] como el bioquímico [300, 301, 303]. Además, la espectroscopia por ^1H RM tiene una aplicación clínica limitada ya que no está ampliamente disponible en todas las unidades de RM y el análisis post-proceso requiere la instalación de un software especial y la presencia de un físico [299].

En nuestro estudio consideramos que la técnica de imagen más adecuada para la cuantificación incruenta de la grasa hepática era la **RM con secuencia multieco**. Con esta secuencia de RM pretendíamos controlar el acortamiento de $T2^*$ secundario al hierro intrahepático que es capaz de distorsionar los campos magnéticos locales produciendo en última instancia una pérdida de intensidad de señal. Dada la alta prevalencia de hierro hepático asociado a la esteatosis y las considerables variaciones de $T2^*$ que produce su presencia con los errores consiguientes en la cuantificación de la esteatosis hepática, es recomendable controlar el sesgo $T2^*$. En este sentido, las secuencias de RM con más de dos ecos, entre ellas la secuencia multieco, pueden corregir fácilmente la modificación de $T2^*$ en presencia de hierro intrahepático y obtener resultados fiables en la cuantificación de la grasa hepática [222, 314]. Se ha demostrado que la RM multieco evita el efecto que produce el hierro sobre la intensidad de señal de la RM y por tanto, permite realizar una cuantificación adecuada de la grasa hepática [1, 232, 299, 302, 304, 305, 310, 315].

En nuestra serie de pacientes, la fracción grasa calculada con **RM multieco** se correlaciona positivamente con la **gradación histológica** aunque con

importante variabilidad de los valores de fracción grasa en los diferentes grupos según el grado histológico. Distintos estudios con RM multieco muestran resultados modestos similares cuando utilizan el método histológico como *gold standard* [1, 232, 299, 304, 315].

Sin embargo, nuestros datos mostraron una correlación positiva muy lineal entre la **fracción grasa** obtenida por RM multieco y la **cuantificación bioquímica** del contenido graso hepático. Este análisis de regresión lineal nos permitió diseñar una nueva ecuación para el cálculo del valor bioquímico de "Folch estimado" a partir del valor de la fracción grasa calculada por RM. La predicción del valor de Folch obtenida por resonancia magnética multieco no mejoró cuando se incluyeron otras variables en la ecuación.

$$\text{Folch estimado} = 5,082 + (432,104 * \text{fracción grasa por RM multieco}).$$

A la vista de los datos publicados, pocos grupos han utilizado el método bioquímico como prueba de referencia para la comparación con los resultados obtenidos por RM en la cuantificación de la grasa intrahepática en **humanos** [300-303]. Además, se han utilizado criterios de inclusión que no han tomado en consideración factores de riesgo de NAFLD y por ello, se ha comprobado que la ausencia de esteatosis hepática supera el 50% de los pacientes de la serie [301, 303]. Por el contrario, en nuestro trabajo hemos incluido tanto pacientes que presentan riesgo elevado de NAFLD (obesidad mórbida) como pacientes control sin factores de riesgo. Así, la prevalencia de esteatosis hepática en nuestra cohorte de pacientes alcanza el 78,29%.

La **validación** de los resultados obtenidos es fundamental y para ello, en nuestro estudio incluimos una nueva cohorte de pacientes adicionales con características clínicas similares a los de la primera fase. Los resultados obtenidos durante la validación han demostrado una fuerte correlación del valor bioquímico de lípidos intrahepáticos medido en la biopsia ("Folch medido") con el valor "Folch estimado" por RM y calculado con la ecuación de regresión lineal de nuevo diseño, lo que da robustez a los resultados. Es importante destacar que ningún trabajo con el mismo objetivo ha incluido una validación correcta de los resultados obtenidos en la fase de derivación de la RPC.

El contenido de grasa hepática puede modificarse con el transcurso del tiempo [154]. Así, el **intervalo de tiempo RM-biopsia** se define como el tiempo transcurrido entre la realización de la RM y la biopsia hepática. En este sentido, el índice de correlación entre las dos pruebas es mayor cuando ambas se realizan en un período menor de 7 días, concluyendo que este índice es mejor y

más fiable cuanto más corto es este periodo [232]. En nuestro estudio el intervalo de tiempo RM-biopsia es menor de 24 horas, lo que permite hacer una interpretación robusta de los datos obtenidos en esta larga cohorte de pacientes. Algunos autores justifican un índice de correlación discreto entre la cuantificación por RM multieco y la estimación histológica por el amplio intervalo de tiempo transcurrido entre la realización de la RM preoperatoria y la toma de biopsia hepática [232]. Por el contrario, un intervalo corto de tiempo entre ambas pruebas permite realizar una interpretación consistente de los resultados obtenidos [1, 302].

Posteriormente quisimos analizar la distribución de la esteatosis en nuestra serie de pacientes y comprobamos que los que tenían criterios de obesidad mórbida presentaban aumento de la esteatosis en comparación con los controles utilizando tanto el valor bioquímico de Folch como el valor "Folch estimado" por RM multieco. En este sentido, se ha demostrado que la obesidad es un factor de riesgo de NAFLD [174] y que hasta el 90% de los pacientes con criterios de obesidad presentan NAFLD [137]; ambos datos coincidentes con lo observado en nuestra serie de pacientes. La cuantificación de grasa hepática está recibiendo cada vez más atención en la práctica clínica debido a la elevada prevalencia de la esteatosis asociada a la obesidad observada en los países desarrollados [2, 174]. Por otra parte, es necesario conocer la concentración de grasa hepática en el ámbito del trasplante, ya que en la actualidad la presencia de una concentración grasa mayor del 30% contraindica la donación de ese órgano [316].

Finalmente, quisimos analizar la influencia de la **cirugía bariátrica** sobre los niveles de esteatosis medidos por RM multieco.

En nuestra serie de pacientes, un año después de la cirugía bariátrica, se produjo una disminución en el contenido de grasa hepática analizada tanto por valores de fracción grasa por RM como mediante el cálculo del valor de "Folch estimado" por la nueva ecuación descrita anteriormente. Aunque el mejor método para comprobar la reducción de la esteatosis tras cirugía bariátrica sería la medición bioquímica de Folch, encontramos problemas éticos debido al inherente riesgo metodológico de la biopsia hepática cerrada.

Nuestros datos son consistentes con la idea de que la RM multieco es una técnica no invasiva que permite la estimación adecuada de la concentración de grasa hepática, y puede ser empleada para cuantificar y monitorizar la esteatosis hepática en humanos. Hay evidencias científicas que demuestran que el único tratamiento beneficioso para la mejoría de NAFLD es la pérdida

significativa de peso [253, 254, 288]. En este sentido, algunos estudios sugieren regresión y/o mejoría de esteatosis o NASH tras la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica [317-319]. Se ha descrito recientemente que diferentes técnicas de RM han permitido demostrar una reducción cuantitativa de la grasa hepática al introducir cambios en el estilo de vida de los pacientes, asociando ejercicio físico y una pérdida significativa de peso [235, 259, 320-322]. Se ha demostrado que la pérdida de peso corporal $\geq 5\%$ se relaciona con una reducción significativa de la esteatosis hepática [288, 322] y cuando esta pérdida supera el 9-10% se produce mejoría de NASH [253, 254, 288] y regresión de la fibrosis [254]. En nuestra serie, tras el análisis multivariado, hemos comprobado que el valor "Folch estimado" por RM previo a la intervención y la pérdida de peso en Kgs se correlacionan positivamente con la mejoría de la esteatosis tras cirugía bariátrica. Así, los pacientes con un valor Folch estimado preoperatorio mayor y los que han perdido más porcentaje de su peso corporal son los que presentan mayor mejoría de la concentración de grasa hepática.

Estos datos sugieren fuertemente que la RM es una herramienta valiosa de diagnóstico no sólo para cuantificar la concentración hepática de lípidos, sino también para monitorizar los cambios que acontecen en la esteatosis cuando se produce pérdida de peso tras la realización de cualquier técnica de cirugía bariátrica (figura 20). Una ventaja del software de la RM multieco utilizado en nuestro estudio es que puede generar automáticamente la fracción grasa y, mediante el uso de nuestra nueva fórmula, determinar la concentración de triglicéridos sin ningún sesgo entre observadores.

Otro aspecto importante es el **coste económico**. En este sentido, el coste de la RM multieco es menor que el de la medición bioquímica de Folch o al análisis histológico que incluyen los gastos de la biopsia hepática guiada por ecografía y la técnica histológica o bioquímica correspondiente [184]. La ecografía es una prueba diagnóstica muy extendida, fácilmente reproducible y económica, que la hace muy adecuada en el diagnóstico cualitativo de esteatosis hepática en pacientes asintomáticos con enzimas hepáticas elevadas y sospechosos de presentar NAFLD [206]. Así, cuando el objetivo es el diagnóstico cuantitativo de esteatosis, la RM multieco representa una prueba más fiable y económica.

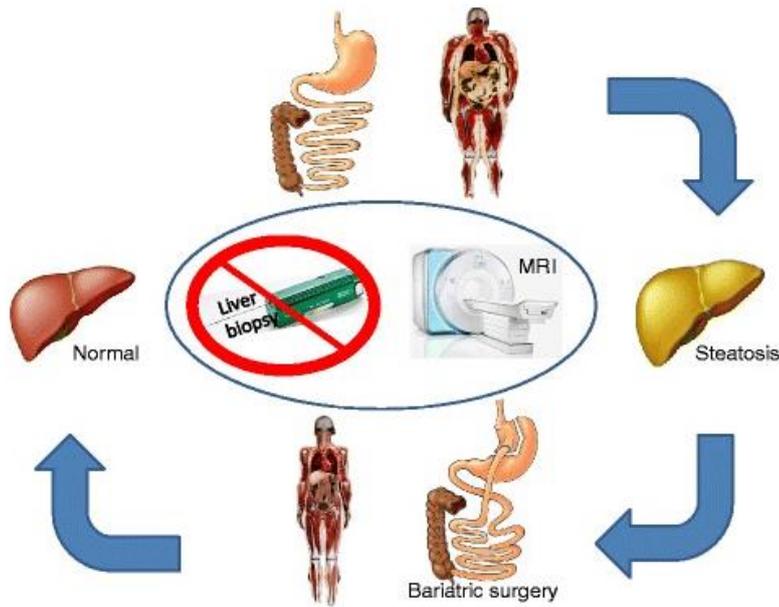


Figura 20. Monitorización de la esteatosis por RM. Efecto beneficioso sobre la esteatosis hepática tras pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica. Cuantificación grasa hepática por RM. Imagen obtenida de Betzel *et al.* [323]

Ciertos polimorfismos genéticos se han relacionado con mayor riesgo de desarrollar esteatosis y con peor pronóstico, aunque su utilidad clínica todavía no se ha establecido de forma generalizada. La predisposición genética causada por la variante frecuente p.I148M de la enzima adiponutrina (*PNPLA3*) es bien conocida, emergiendo como una causa genética importante en el desarrollo de NAFLD. La adiponutrina es una lipasa presente en los adipocitos que participa en la hidrólisis de los triglicéridos. Esta enzima parece estar unida a la membrana y puede estar implicada en el balance (consumo-almacenamiento) de energía en los adipocitos. Los portadores homocigotos de la variante p.I148M de *PNPLA3* tienen predisposición a desarrollar cirrosis. Igualmente, esta variante se ha relacionado con mayor daño hepático en pacientes con NAFLD y también con presencia de esteatosis y fibrosis en otras enfermedades hepáticas crónicas [160]. Así, un estudio meta-análisis concluyó que la variante *PNPLA3* p.I148M está asociada con riesgo de desarrollar esteatosis hepática simple, NASH y fibrosis [159]. La prevalencia de este alelo de riesgo entre la población europea es 40-50%, lo que hace recomendable incluir su uso en un paciente diagnosticado de NAFLD [161]. Por ello, el presente trabajo de investigación está siendo continuado con el estudio del papel de la variante *PNPLA3* p.I148M en la evolución de NAFLD tras cirugía bariátrica. Dicho trabajo está siendo llevado a cabo en colaboración con los Drs. Marcin Krawczyk y Frank Lammert (Universidad de Homburg, Homburg, Alemania).

Además, vamos a comenzar un proyecto con un planteamiento similar al presente trabajo pero considerando aspectos histológicos de inflamación y fibrosis de NAFLD. Así, se evaluará el papel de la RM para su diagnóstico, no olvidando el hierro como agente asociado de forma frecuente al depósito de grasa en el hígado.

CONCLUSIONES

- I. Los pacientes con criterios de obesidad presentan una prevalencia de esteatosis hepática mayor en comparación al grupo control no obeso.
- II. La cuantificación de la grasa intrahepática mediante RM multieco se correlaciona muy positivamente con la medición bioquímica de Folch en biopsia hepática.
- III. La estimación histológica de la esteatosis hepática presenta una correlación discreta tanto con la fracción grasa calculada por RM multieco como con el valor de Folch.
- IV. Los pacientes clasificados en función del grado histológico de esteatosis presentan variabilidad intragrupo en la fracción grasa calculada por RM multieco y en el valor Folch.
- V. La RM multieco permite cuantificar de forma precisa la grasa intrahepática.
- VI. Existe una correlación muy positiva entre el valor "Folch estimado" calculado con la fórmula de nuestro estudio y el valor "Folch medido" en biopsia hepática.
- VII. La pérdida de peso observada un año después de la cirugía bariátrica se asocia con mejoría de la esteatosis hepática medida por RM multieco.
- VIII. Los pacientes obesos sometidos a cirugía hepática sin posterior pérdida de peso no presentan mejoría de la esteatosis hepática al año de la intervención quirúrgica.
- IX. La RM multieco permite monitorizar la evolución de la esteatosis hepática en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Idilman IS, Aniktar H, Idilman R, Kabacam G, Savas B, Elhan A, Celik A, Bahar K, Karcaaltincaba M: **Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy.** *Radiology* 2013, **267**(3):767-775.
2. 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):274-285.
3. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM: **The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States.** *Am J Gastroenterol* 2003, **98**(5):960-967.
4. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ: **The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association.** *Hepatology* 2012, **55**(6):2005-2023.
5. Soderberg C, Stal P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, Hultcrantz R: **Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up.** *Hepatology* 2010, **51**(2):595-602.
6. Anstee QM TG, Day CP.: **Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, **10**(6):330-344.
7. Paredes AH TD, Harrison SA.: **Nonalcoholic fatty liver disease.** *Clin Liver Dis* 2012, **16**:397-419.
8. Adams LA HS, St Sauver JL, Charatcharoenwithaya P, Enders FB, Therneau T, Angulo P.: **Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study.** *Am J Gastroenterol* 2010, **105**:1567-1573.
9. Loomba R SA: **The global NAFLD epidemic.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, **10**:686-690.
10. Kleiner DE, Brunt EM: **Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research.** *Semin Liver Dis* 2012, **32**(1):3-13.
11. Kumar V AA, Fausto N, Aster J.: **Robbins and Cotran pathologic basis of disease.**, 8ª edición edn; 2009.
12. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ: **Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity.** *Gastroenterology* 1999, **116**(6):1413-1419.

13. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ: **Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease.** *Hepatology* 1999, **29**(3):664-669.
14. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P: **The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study.** *Gastroenterology* 2005, **129**(1):113-121.
15. Maheshwari A, Thuluvath PJ: **Cryptogenic cirrhosis and NAFLD: are they related?** *Am J Gastroenterol* 2006, **101**(3):664-668.
16. Targher G, Day CP, Bonora E: **Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *N Engl J Med* 2010, **363**(14):1341-1350.
17. Stepanova M, Rafiq N, Younossi ZM: **Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study.** *Gut* 2010, **59**(10):1410-1415.
18. Cuadrado A, Orive A, Garcia-Suarez C, Dominguez A, Fernandez-Escalante JC, Crespo J, Pons-Romero F: **Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma.** *Obes Surg* 2005, **15**(3):442-446.
19. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N *et al*: **Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome.** *Hepatology* 2003, **37**(4):917-923.
20. Day CP, Saksena S: **Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis.** *J Gastroenterol Hepatol* 2002, **17** Suppl 3:S377-384.
21. McCullough AJ: **Update on nonalcoholic fatty liver disease.** *J Clin Gastroenterol* 2002, **34**(3):255-262.
22. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM: **Non-alcoholic fatty liver disease: an overview.** *J Gastroenterol Hepatol* 2002, **17**(11):1136-1143.
23. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C *et al*: **NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome.** *Hepatology* 2002, **35**(2):373-379.
24. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M *et al*: **The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease.** *Ann Intern Med* 2005, **143**(10):722-728.
25. Day CP, James OF: **Steatohepatitis: a tale of two "hits"?** *Gastroenterology* 1998, **114**(4):842-845.

26. Tilg H, Moschen AR: **Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis.** *Hepatology* 2010, **52**(5):1836-1846.
27. Greenfield JR, Campbell LV: **Insulin resistance and obesity.** *Clin Dermatol* 2004, **22**(4):289-295.
28. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI: **The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes.** *Nature* 2014, **510**(7503):84-91.
29. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS: **Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **293**(1):G1-4.
30. Haque M, Sanyal AJ: **The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002, **16**(5):709-731.
31. Buque X, Aspichueta P, Ochoa B: **[Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis].** *Rev Esp Enferm Dig* 2008, **100**(9):565-578.
32. Oneta CM, Dufour JF: **Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations.** *Swiss Med Wkly* 2002, **132**(35-36):493-505.
33. Youssef WI, McCullough AJ: **Steatohepatitis in obese individuals.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002, **16**(5):733-747.
34. Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL: **Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver.** *Hepatology* 2000, **32**(1):3-10.
35. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, Dziura J, Lifton RP, Shulman GI: **Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease.** *N Engl J Med* 2010, **362**(12):1082-1089.
36. Carulli L, Canedi I, Rondinella S, Lombardini S, Ganazzi D, Fargion S, De Palma M, Lonardo A, Ricchi M, Bertolotti M *et al*: **Genetic polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease: interleukin-6-174G/C polymorphism is associated with non-alcoholic steatohepatitis.** *Dig Liver Dis* 2009, **41**(11):823-828.
37. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ: **The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2010, **52**(3):894-903.
38. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E *et al*: **Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects.** *Gastroenterology* 2007, **133**(2):496-506.

39. Kral JG, Lundholm K, Bjorntorp P, Sjoström L, Schersten T: **Hepatic lipid metabolism in severe human obesity.** *Metabolism* 1977, **26**(9):1025-1031.
40. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN: **Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.** *Gastroenterology* 2001, **120**(5):1183-1192.
41. van der Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG, London R, Peduto T, Chisholm DJ, George J: **Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease.** *Hepatology* 2008, **48**(2):449-457.
42. Ryan MW HS, Neuschwander-Tetri BA: **Digestive Disease Week and the 104th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. May 17-22, 2003. Orlando, Florida, USA. Abstracts (Serum amyloid A and C-reactive protein diminish after treatment of NASH with rosiglitazone).** *Gastroenterology* 2003, **124**(4 Suppl 1):A1-830, AA831-102.
43. Gastaldelli A, Harrison SA, Belfort-Aguilar R, Hardies LJ, Balas B, Schenker S, Cusi K: **Importance of changes in adipose tissue insulin resistance to histological response during thiazolidinedione treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2009, **50**(4):1087-1093.
44. Yki-Jarvinen H: **Thiazolidinediones.** *N Engl J Med* 2004, **351**(11):1106-1118.
45. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: **Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *J Clin Invest* 2005, **115**(5):1343-1351.
46. Graham TE, Kahn BB: **Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes.** *Horm Metab Res* 2007, **39**(10):717-721.
47. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM: **Regulation of acetyl-CoA carboxylase.** *Biochem Soc Trans* 2006, **34**(Pt 2):223-227.
48. Brea A PJ: **Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular.** *Clin Invest Arterioscl* 2010, **22**(6):259-271.
49. Messing B, Colombel JF, Heresbach D, Chazouilleres O, Galian A: **Chronic cholestasis and macronutrient excess in patients treated with prolonged parenteral nutrition.** *Nutrition* 1992, **8**(1):30-36.
50. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Faga E, Silli B, Pagano G: **Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2003, **37**(4):909-916.

51. Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D: **Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice.** *Hepatology* 2003, **38**(1):133-140.
52. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Kobayashi N *et al*: **Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis.** *Hepatology* 2009, **50**(3):772-780.
53. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM: **Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study.** *JAMA* 1999, **282**(17):1659-1664.
54. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ: **The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice.** *J Clin Invest* 2003, **112**(1):91-100.
55. Villanueva CJ, Monetti M, Shih M, Zhou P, Watkins SM, Bhanot S, Farese RV, Jr.: **Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids.** *Hepatology* 2009, **50**(2):434-442.
56. Bala S, Marcos M, Szabo G: **Emerging role of microRNAs in liver diseases.** *World J Gastroenterol* 2009, **15**(45):5633-5640.
57. Hand NJ, Master ZR, Le Lay J, Friedman JR: **Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs.** *Hepatology* 2009, **49**(2):618-626.
58. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, Flichman D, Mirshahi F, Sanyal AJ, Sookoian S: **Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis.** *Gut* 2015, **64**(5):800-812.
59. Jin X, Ye YF, Chen SH, Yu CH, Liu J, Li YM: **MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease.** *Dig Liver Dis* 2009, **41**(4):289-297.
60. Imai Y, Varela GM, Jackson MB, Graham MJ, Crooke RM, Ahima RS: **Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide.** *Gastroenterology* 2007, **132**(5):1947-1954.
61. 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.
62. Guerre-Millo M: **Adipose tissue and adipokines: for better or worse.** *Diabetes Metab* 2004, **30**(1):13-19.

63. Hotamisligil GS: **Inflammation and metabolic disorders.** *Nature* 2006, **444**(7121):860-867.
64. Angulo P: **Nonalcoholic fatty liver disease.** *N Engl J Med* 2002, **346**(16):1221-1231.
65. Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M: **Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2003, **38**(1):244-251.
66. Hruszkewycz AM: **Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation.** *Biochem Biophys Res Commun* 1988, **153**(1):191-197.
67. Chen J, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI: **Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1380**(3):336-344.
68. Reddy JK, Rao MS: **Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, **290**(5):G852-858.
69. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC: **Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **281**(5):G1135-1139.
70. Browning JD, Horton JD: **Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.** *J Clin Invest* 2004, **114**(2):147-152.
71. Rensen SS, Slaats Y, Driessen A, Peutz-Kootstra CJ, Nijhuis J, Steffensen R, Greve JW, Buurman WA: **Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2009, **50**(6):1809-1817.
72. Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A, Malle E, Greve JW, Buurman WA: **Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis.** *Am J Pathol* 2009, **175**(4):1473-1482.
73. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T: **Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009, **21**(6):673-680.
74. Sastre J, Pallardo FV, Llopis J, Furukawa T, Vina JR, Vina J: **Glutathione depletion by hyperphagia-induced obesity.** *Life Sci* 1989, **45**(2):183-187.
75. Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH: **Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents.** *J Pediatr* 2000, **136**(6):727-733.
76. Yu J, Chu ES, Wang R, Wang S, Wu CW, Wong VW, Chan HL, Farrell GC, Sung JJ: **Heme oxygenase-1 protects against steatohepatitis in both cultured hepatocytes and mice.** *Gastroenterology* 2010, **138**(2):694-704, 704 e691.

77. Baskol G, Baskol M, Kocer D: **Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis.** *Clin Biochem* 2007, **40**(11):776-780.
78. Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad AR, Ravi R, Li Z: **A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury.** *Hepatology* 2007, **46**(5):1519-1529.
79. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, Deugnier Y: **Insulin resistance-associated hepatic iron overload.** *Gastroenterology* 1999, **117**(5):1155-1163.
80. Vigano M, Vergani A, Trombini P, Paleari F, Piperno A: **Insulin resistance influence iron metabolism and hepatic steatosis in type II diabetes.** *Gastroenterology* 2000, **118**(5):986-987.
81. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviario G, Marchesini G *et al*: **HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology* 2010, **138**(3):905-912.
82. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW: **Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis.** *Gastroenterology* 1998, **114**(2):311-318.
83. Woods JR, Jr., Plessinger MA, Fantel A: **An introduction to reactive oxygen species and their possible roles in substance abuse.** *Obstet Gynecol Clin North Am* 1998, **25**(1):219-236.
84. Chitturi S, Weltman M, Farrell GC, McDonald D, Kench J, Liddle C, Samarasinghe D, Lin R, Abeygunasekera S, George J: **HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity.** *Hepatology* 2002, **36**(1):142-149.
85. Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, Matteoni CA, Boparai N, O'Neill R, McCullough AJ: **Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 1999, **30**(4):847-850.
86. Cohen B, Novick D, Rubinstein M: **Modulation of insulin activities by leptin.** *Science* 1996, **274**(5290):1185-1188.
87. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI *et al*: **Leptin-replacement therapy for lipodystrophy.** *N Engl J Med* 2002, **346**(8):570-578.
88. Savvidou S, Hytioglou P, Orfanou-Koumerkeridou H, Panderis A, Frantzoulis P, Goulis J: **Low serum adiponectin levels are predictive of advanced hepatic fibrosis in patients with NAFLD.** *J Clin Gastroenterol* 2009, **43**(8):765-772.

89. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A *et al*: **Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease.** *Hepatology* 2005, **42**(5):1175-1183.
90. Gastaldelli A, Harrison S, Belfort-Aguiar R, Hardies J, Balas B, Schenker S, Cusi K: **Pioglitazone in the treatment of NASH: the role of adiponectin.** *Aliment Pharmacol Ther* 2010, **32**(6):769-775.
91. Leclercq IA, Lebrun VA, Starkel P, Horsmans YJ: **Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone.** *Lab Invest* 2007, **87**(1):56-65.
92. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: **A central role for JNK in obesity and insulin resistance.** *Nature* 2002, **420**(6913):333-336.
93. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ: **Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance.** *Eur J Endocrinol* 2003, **149**(4):331-335.
94. Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM: **Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats.** *J Clin Invest* 2004, **114**(2):224-231.
95. Salaspuro M: **Bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications.** *Ann Med* 1996, **28**(3):195-200.
96. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D: **Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **292**(2):G518-525.
97. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Masciana R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G *et al*: **Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2009, **49**(6):1877-1887.
98. Enomoto N, Yamashina S, Kono H, Schemmer P, Rivera CA, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA, Thurman RG: **Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells.** *Hepatology* 1999, **29**(6):1680-1689.
99. Drenick EJ, Fisler J, Johnson D: **Hepatic steatosis after intestinal bypass--prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition.** *Gastroenterology* 1982, **82**(3):535-548.
100. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM: **Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2003, **37**(2):343-350.

101. Zamora-Valdes D, Mendez-Sanchez N: **Experimental evidence of obstructive sleep apnea syndrome as a second hit accomplice in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis.** *Ann Hepatol* 2007, **6**(4):281-283.
102. Aron-Wisnewsky J, Minville C, Tordjman J, Levy P, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Clement K, Pepin JL: **Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese.** *J Hepatol* 2012, **56**(1):225-233.
103. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lutjohann D, Kerksiek A, van Kruchten R, Maeda N, Staels B *et al*: **Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2008, **48**(2):474-486.
104. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, Dixon JB, Weltman MD, Tilg H, Moschen AR *et al*: **Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction.** *Gastroenterology* 2007, **133**(1):80-90.
105. Pais R CF, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, Ratziu V; LIDO Study Group.: **A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver.** *J Hepatol* 2013, **59**(3):550-556.
106. Singh S AA, 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* 2015, **13**:643-654.
107. Loomba R RF, Zhang L, Khandrika S, Ziegler MG, Brenner DA, O'Connor T.: **Genetic covariance between gamma-glutamyl transpeptidase and fatty liver risk factors: role of beta2-adrenergic receptor genetic variation in twins.** *Gastroenterology* 2010, **139**(3):836-845.
108. Wree A BL, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE.: **From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, **10**(11):627-636.
109. Stinton L LR: **Commentary: dissecting the PNPLA3 association with liver fat and stiffness, and interaction with diet.** *Aliment Pharmacol Ther* 2014, **39**(8):894-895.
110. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C: **Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy.** *Ann Intern Med* 2000, **132**(2):112-117.
111. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH: **Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity.** *Hepatology* 2004, **40**(6):1387-1395.

112. Ford ES, Giles WH, Dietz WH: **Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey.** *JAMA* 2002, **287**(3):356-359.
113. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA: **Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study.** *Gastroenterology* 2011, **140**(1):124-131.
114. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH: **Human fatty liver disease: old questions and new insights.** *Science* 2011, **332**(6037):1519-1523.
115. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H: **Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery.** *J Hepatol* 2006, **45**(4):600-606.
116. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F: **The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data.** *J Hepatol* 2013, **58**(3):593-608.
117. Prashanth M, Ganesh HK, Vima MV, John M, Bandgar T, Joshi SR, Shah SR, Rathi PM, Joshi AS, Thakkar H *et al*: **Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus.** *J Assoc Physicians India* 2009, **57**:205-210.
118. Assy N KK, Mymin D, Levy C, Roser B, Minuk G.: **Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients.** *Dig Dis Sci* 2000, **45**:1929-1934.
119. Vuppalanchi R CN: **Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their management.** *Hepatology* 2009, **49**:306-317.
120. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks.Overweight and obesity - summary of prevalence by region. Geneva.** In.: World Health Organization. ; 2009.
121. Papandreou D, Rousso I, Mavromichalis I: **Update on non-alcoholic fatty liver disease in children.** *Clin Nutr* 2007, **26**(4):409-415.
122. Patton HM, Sirlin C, Behling C, Middleton M, Schwimmer JB, Lavine JE: **Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a critical appraisal of current data and implications for future research.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006, **43**(4):413-427.
123. Baumeister SE, Volzke H, Marschall P, John U, Schmidt CO, Flessa S, Alte D: **Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population: a 5-year observation.** *Gastroenterology* 2008, **134**(1):85-94.
124. Lindsay RS, Howard BV: **Cardiovascular risk associated with the metabolic syndrome.** *Curr Diab Rep* 2004, **4**(1):63-68.

125. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr.: **Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity.** *Circulation* 2009, **120**(16):1640-1645.
126. Blackburn GL, Mun EC: **Effects of weight loss surgeries on liver disease.** *Semin Liver Dis* 2004, **24**(4):371-379.
127. Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC, Patterson B, Grant L, Feirt N, Seki E, Brenner D, Korenblat K, McCrea J: **Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology* 2006, **130**(6):1564-1572.
128. Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, Leteurtre E, Arnalsteen L, Hollebecque A, Louvet A, Dharancy S, Cocq P, Jany T *et al*: **The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance.** *Gastroenterology* 2006, **130**(6):1617-1624.
129. Powell EE, Cooksley WG, 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**(1):74-80.
130. Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC: **Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients.** *Dig Dis Sci* 1996, **41**(1):172-179.
131. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF *et al*: **Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.** *Lancet* 2014, **384**(9945):766-781.
132. **International Association for the study of obesity**
[<http://www.worldobesity.org>]
133. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB *et al*: **Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults.** *N Engl J Med* 2010, **363**(23):2211-2219.
134. Finkelstein EA, Trogdon JG, Cohen JW, Dietz W: **Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates.** *Health Aff (Millwood)* 2009, **28**(5):w822-831.

135. Muller-Riemenschneider F, Reinhold T, Berghofer A, Willich SN: **Health-economic burden of obesity in Europe.** *Eur J Epidemiol* 2008, **23**(8):499-509.
136. Wanless IR, Lentz JS: **Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors.** *Hepatology* 1990, **12**(5):1106-1110.
137. Garcia-Monzon C, Martin-Perez E, Iacono OL, Fernandez-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, Larranaga E, Moreno-Otero R: **Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity.** *J Hepatol* 2000, **33**(5):716-724.
138. Bardia A, Holtan SG, Slezak JM, Thompson WG: **Diagnosis of obesity by primary care physicians and impact on obesity management.** *Mayo Clin Proc* 2007, **82**(8):927-932.
139. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R: **Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies.** *Lancet* 2009, **373**(9669):1083-1096.
140. **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.** *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000, **894**:i-xii, 1-253.
141. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, Hu FB, Hubbard VS, Jakicic JM, Kushner RF *et al*: **2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society.** *Circulation* 2014, **129**(25 Suppl 2):S102-138.
142. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R: **Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk.** *Am J Clin Nutr* 2004, **79**(3):379-384.
143. Simpson JA, MacInnis RJ, Peeters A, Hopper JL, Giles GG, English DR: **A comparison of adiposity measures as predictors of all-cause mortality: the Melbourne Collaborative Cohort Study.** *Obesity (Silver Spring)* 2007, **15**(4):994-1003.
144. Koster A, Leitzmann MF, Schatzkin A, Mouw T, Adams KF, van Eijk JT, Hollenbeck AR, Harris TB: **Waist circumference and mortality.** *Am J Epidemiol* 2008, **167**(12):1465-1475.
145. Jacobs EJ, Newton CC, Wang Y, Patel AV, McCullough ML, Campbell PT, Thun MJ, Gapstur SM: **Waist circumference and all-cause mortality in a large US cohort.** *Arch Intern Med* 2010, **170**(15):1293-1301.
146. Bhala N, Angulo P, van der Poorten D, Lee E, Hui JM, Saracco G, Adams LA, Charatcharoenwitthaya P, Topping JH, Bugianesi E *et al*: **The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study.** *Hepatology* 2011, **54**(4):1208-1216.

147. Sanyal AJ, BC, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, et al.: **Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C.** *Hepatology* 2006, **42**:132-138.
148. Yatsuji S, Hashimoto E, Tobarai M, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K: **Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C.** *J Gastroenterol Hepatol* 2009, **24**(2):248-254.
149. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, Younossi ZM: **Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009, **7**(2):234-238.
150. Cusi K: **Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications.** *Gastroenterology* 2012, **142**(4):711-725 e716.
151. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, Ratzliff V, McCullough A: **Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2011, **54**(1):344-353.
152. Brunt EM: **Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology.** *Semin Liver Dis* 2001, **21**(1):3-16.
153. Brunt EM: **Pathology of fatty liver disease.** *Mod Pathol* 2007, **20 Suppl 1**:S40-48.
154. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P: **The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies.** *J Hepatol* 2005, **42**(1):132-138.
155. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S: **Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes.** *Hepatology* 2006, **44**(4):865-873.
156. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH: **Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis.** *J Hepatol* 2009, **51**(2):371-379.
157. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, Nader F, Srishord M, Rafiq N, Goodman Z, Younossi Z: **Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009, **7**(11):1224-1229, 1229 e1221-1222.
158. Petta S, Amato MC, Di Marco V, Camma C, Pizzolanti G, Barcellona MR, Cabibi D, Galluzzo A, Sinagra D, Giordano C et al: **Visceral adiposity index is associated with significant fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 2012, **35**(2):238-247.

159. Sookoian S, Pirola CJ: **Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2011, **53**(6):1883-1894.
160. Krawczyk M, Portincasa P, Lammert F: **PNPLA3-associated steatohepatitis: toward a gene-based classification of fatty liver disease.** *Semin Liver Dis* 2013, **33**(4):369-379.
161. Krawczyk M, Grunhage F, Zimmer V, Lammert F: **Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: non-invasive elastography-based study in chronic liver disease.** *J Hepatol* 2011, **55**(2):299-306.
162. Furuya CK, Jr., de Oliveira CP, de Mello ES, Faintuch J, Raskovski A, Matsuda M, Vezozzo DC, Halpern A, Garrido AB, Jr., Alves VA *et al*: **Effects of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: preliminary findings after 2 years.** *J Gastroenterol Hepatol* 2007, **22**(4):510-514.
163. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE: **Weight loss and non-alcoholic fatty liver disease: falls in gamma-glutamyl transferase concentrations are associated with histologic improvement.** *Obes Surg* 2006, **16**(10):1278-1286.
164. Galambos JT: **Natural history of alcoholic hepatitis. 3. Histological changes.** *Gastroenterology* 1972, **63**(6):1026-1035.
165. Marbet UA, Bianchi L, Meury U, Stalder GA: **Long-term histological evaluation of the natural history and prognostic factors of alcoholic liver disease.** *J Hepatol* 1987, **4**(3):364-372.
166. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M *et al*: **Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2002, **123**(1):134-140.
167. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS: **NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States.** *Hepatology* 2002, **36**(6):1349-1354.
168. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN: **The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2010, **51**(6):1972-1978.
169. Kim WR, Poterucha JJ, Porayko MK, Dickson ER, Steers JL, Wiesner RH: **Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation.** *Transplantation* 1996, **62**(12):1802-1805.
170. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, Sanyal AJ, Nelson JE: **Serum ferritin is an independent predictor of**

- histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2012, **55**(1):77-85.
171. Cohen JA, Kaplan MM: **The SGOT/SGPT ratio--an indicator of alcoholic liver disease.** *Dig Dis Sci* 1979, **24**(11):835-838.
172. Sorbi D, Boynton J, Lindor KD: **The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease.** *Am J Gastroenterol* 1999, **94**(4):1018-1022.
173. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, Shiffman ML, Stravitz RT, Sanyal AJ: **Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values.** *Hepatology* 2003, **37**(6):1286-1292.
174. Adams LA, Lindor KD: **Nonalcoholic fatty liver disease.** *Ann Epidemiol* 2007, **17**(11):863-869.
175. Kawamitsu H, Kaji Y, Ohara T, Sugimura K: **Feasibility of quantitative intrahepatic lipid imaging applied to the magnetic resonance dual gradient echo sequence.** *Magn Reson Med Sci* 2003, **2**(1):47-50.
176. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ: **The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology* 2002, **123**(3):745-750.
177. Mehta SR, Thomas EL, Bell JD, Johnston DG, Taylor-Robinson SD: **Non-invasive means of measuring hepatic fat content.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**(22):3476-3483.
178. Gilmore IT, Burroughs A, Murray-Lyon IM, Williams R, Jenkins D, Hopkins A: **Indications, methods, and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by the British Society of Gastroenterology and the Royal College of Physicians of London.** *Gut* 1995, **36**(3):437-441.
179. Poynard T RV, Bedossa P: **Apropriateness of liver biopsy.** *Can J Gastroenterol* 2000, **14**:543-548.
180. Cadranel JF RP, Degos F: **Practices of liver biopsy in France: Results of a prospective nationwide survey. For the group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF).** *Hepatology* 2000, **32**:477-481.
181. Lee SS, Park SH: **Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(23):7392-7402.
182. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR: **Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.** *Am J Gastroenterol* 1999, **94**(9):2467-2474.

183. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A *et al*: **Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2005, **41**(6):1313-1321.
184. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, Capron F, Poynard T: **Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology* 2005, **128**(7):1898-1906.
185. El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, Washington K, Paradis V, Rubbia-Brandt L, Puhan MA, Slankamenac K, Graf R, Clavien PA: **Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of a gold standard.** *Ann Surg* 2009, **250**(5):691-697.
186. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S: **Liver biopsy.** *N Engl J Med* 2001, **344**(7):495-500.
187. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, Rybicki L, McCullough AJ: **Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations.** *Mod Pathol* 1998, **11**(6):560-565.
188. Marsman H, Matsushita T, Dierkhising R, Kremers W, Rosen C, Burgart L, Nyberg SL: **Assessment of donor liver steatosis: pathologist or automated software?** *Hum Pathol* 2004, **35**(4):430-435.
189. Zaitoun AM, Al Mardini H, Awad S, Ukabam S, Makadisi S, Record CO: **Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C.** *J Clin Pathol* 2001, **54**(6):461-465.
190. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *J Biol Chem* 1957, **226**(1):497-509.
191. Poynard T I-BF, Munteanu M, Messous D, Myers RP, Thabut D, Ratziu V, Mercadier A, Benhamou Y, Hainque B.: **Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (Fibrotest, HCV Fibrosure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C.** *Comp Hepatol* 2004, **3**:8.
192. Myers RP TM, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di Martino V, Benhamou Y, Poynard T: **Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B.** *J Hepatol* 2003, **39**:222-230.
193. Callewaert N VVH, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J, Contreras R.: **Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics.** *Nature Med* 2004, **10**:1-6.
194. Naveau S RB, Ratziu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T.: **The diagnostic value**

- of biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005, **3**:167-174.
195. Ratziu V LCS, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Bonyhay L, Munteanu M, Poynard T.: **Diagnostic value of biochemical markers (Fibrotest) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2003, **38**:510A.
196. Poynard T RV, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, Capron D, Abella A, Massard J, Ngo Y, Munteanu M, Mercadier A, Manns M, Albrecht J.: **The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis.** *Comparative Hepatology* 2005, **4**:10.
197. Zelber-Sagi S, Webb M, Assy N, Blendis L, Yeshua H, Leshno M, Ratziu V, Halpern Z, Oren R, Santo E: **Comparison of fatty liver index with noninvasive methods for steatosis detection and quantification.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**(1):57-64.
198. Bedogni G, Kahn HS, Bellentani S, Tiribelli C: **A simple index of lipid overaccumulation is a good marker of liver steatosis.** *BMC Gastroenterol* 2010, **10**:98.
199. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, Lundbom N, Rissanen A, Ridderstrale M, Groop L *et al*: **Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors.** *Gastroenterology* 2009, **137**(3):865-872.
200. Barr J, Caballeria J, Martinez-Arranz I, Dominguez-Diez A, Alonso C, Muntane J, Perez-Cormenzana M, Garcia-Monzon C, Mayo R, Martin-Duce A *et al*: **Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression.** *J Proteome Res* 2012, **11**(4):2521-2532.
201. Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F: **Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance.** *J Hepatol* 2009, **51**(3):433-445.
202. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, Clark JM: **Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis.** *Hepatology* 2011, **54**(3):1082-1090.
203. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, Swarowsky AM, Toneto MG, Glock L, Repetto G: **The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients.** *Obes Surg* 2004, **14**(5):635-637.
204. de Moura Almeida A, Cotrim HP, Barbosa DB, de Athayde LG, Santos AS, Bitencourt AG, de Freitas LA, Rios A, Alves E: **Fatty liver disease in severe obese patients: diagnostic value of abdominal ultrasound.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**(9):1415-1418.

205. Ma X, Holalkere NS, Kambadakone RA, Mino-Kenudson M, Hahn PF, Sahani DV: **Imaging-based quantification of hepatic fat: methods and clinical applications.** *Radiographics* 2009, **29**(5):1253-1277.
206. Tarantino G, Finelli C: **What about non-alcoholic fatty liver disease as a new criterion to define metabolic syndrome?** *World J Gastroenterol* 2013, **19**(22):3375-3384.
207. Nascimbeni F, Pais R, Bellentani S, Day CP, Ratziu V, Loria P, Lonardo A: **From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines.** *J Hepatol* 2013, **59**(4):859-871.
208. Ghoshal G, Lavarello RJ, Kemmerer JP, Miller RJ, Oelze ML: **Ex vivo study of quantitative ultrasound parameters in fatty rabbit livers.** *Ultrasound Med Biol* 2012, **38**(12):2238-2248.
209. Zhang B, Ding F, Chen T, Xia LH, Qian J, Lv GY: **Ultrasound hepatic/renal ratio and hepatic attenuation rate for quantifying liver fat content.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(47):17985-17992.
210. Lin SC, Heba E, Wolfson T, Ang B, Gamst A, Han A, Erdman JW, Jr., O'Brien WD, Jr., Andre MP, Sirlin CB *et al*: **Noninvasive Diagnosis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Quantification of Liver Fat Using a New Quantitative Ultrasound Technique.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014.
211. Pickhardt PJ, Park SH, Hahn L, Lee SG, Bae KT, Yu ES: **Specificity of unenhanced CT for non-invasive diagnosis of hepatic steatosis: implications for the investigation of the natural history of incidental steatosis.** *Eur Radiol* 2012, **22**(5):1075-1082.
212. Park YS, Park SH, Lee SS, Kim DY, Shin YM, Lee W, Lee SG, Yu ES: **Biopsy-proven nonsteatotic liver in adults: estimation of reference range for difference in attenuation between the liver and the spleen at nonenhanced CT.** *Radiology* 2011, **258**(3):760-766.
213. Patrick D, White FE, Adams PC: **Long-term amiodarone therapy: a cause of increased hepatic attenuation on CT.** *Br J Radiol* 1984, **57**(679):573-576.
214. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP: **Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects.** *Am J Gastroenterol* 2007, **102**(2):399-408.
215. Rofsky NM, Fleishaker H: **CT and MRI of diffuse liver disease.** *Semin Ultrasound CT MR* 1995, **16**(1):16-33.
216. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J: **The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis.** *Eur Radiol* 2011, **21**(1):87-97.

217. House MJ, Gan EK, Adams LA, Ayonrinde OT, Bangma SJ, Bhathal PS, Olynyk JK, St Pierre TG: **Diagnostic performance of a rapid magnetic resonance imaging method of measuring hepatic steatosis.** *PLoS One* 2013, **8**(3):e59287.
218. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL: **Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, **288**(2):E462-468.
219. Springer F, Machann J, Claussen CD, Schick F, Schwenzler NF: **Liver fat content determined by magnetic resonance imaging and spectroscopy.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**(13):1560-1566.
220. Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, Ash S, Ali A, Osland EJ, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE, Galloway GJ: **Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis.** *J Magn Reson Imaging* 2008, **28**(4):937-945.
221. Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D, Hillon P, Krause D, Cercueil JP: **Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy.** *Radiology* 2009, **250**(1):95-102.
222. Yokoo T, Bydder M, Hamilton G, Middleton MS, Gamst AC, Wolfson T, Hassanein T, Patton HM, Lavine JE, Schwimmer JB *et al*: **Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and fat-grading accuracy of low-flip-angle multiecho gradient-recalled-echo MR imaging at 1.5 T.** *Radiology* 2009, **251**(1):67-76.
223. Westphalen AC, Qayyum A, Yeh BM, Merriman RB, Lee JA, Lamba A, Lu Y, Coakley FV: **Liver fat: effect of hepatic iron deposition on evaluation with opposed-phase MR imaging.** *Radiology* 2007, **242**(2):450-455.
224. Alustiza JM, Castiella A: **Liver fat and iron at in-phase and opposed-phase MR imaging.** *Radiology* 2008, **246**(2):641.
225. Meisamy S, Hines CD, Hamilton G, Sirlin CB, McKenzie CA, Yu H, Brittain JH, Reeder SB: **Quantification of hepatic steatosis with T1-independent, T2-corrected MR imaging with spectral modeling of fat: blinded comparison with MR spectroscopy.** *Radiology* 2011, **258**(3):767-775.
226. Reeder SB, Pineda AR, Wen Z, Shimakawa A, Yu H, Brittain JH, Gold GE, Beaulieu CH, Pelc NJ: **Iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation (IDEAL): application with fast spin-echo imaging.** *Magn Reson Med* 2005, **54**(3):636-644.
227. Reeder SB, McKenzie CA, Pineda AR, Yu H, Shimakawa A, Brau AC, Hargreaves BA, Gold GE, Brittain JH: **Water-fat separation with IDEAL gradient-echo imaging.** *J Magn Reson Imaging* 2007, **25**(3):644-652.

228. Bydder M, Yokoo T, Hamilton G, Middleton MS, Chavez AD, Schwimmer JB, Lavine JE, Sirlin CB: **Relaxation effects in the quantification of fat using gradient echo imaging.** *Magn Reson Imaging* 2008, **26**(3):347-359.
229. Hines CD, Yu H, Shimakawa A, McKenzie CA, Brittain JH, Reeder SB: **T1 independent, T2* corrected MRI with accurate spectral modeling for quantification of fat: validation in a fat-water-SPIO phantom.** *J Magn Reson Imaging* 2009, **30**(5):1215-1222.
230. Reeder SB, Robson PM, Yu H, Shimakawa A, Hines CD, McKenzie CA, Brittain JH: **Quantification of hepatic steatosis with MRI: the effects of accurate fat spectral modeling.** *J Magn Reson Imaging* 2009, **29**(6):1332-1339.
231. Yu H, Shimakawa A, McKenzie CA, Brodsky E, Brittain JH, Reeder SB: **Multiecho water-fat separation and simultaneous R2* estimation with multifrequency fat spectrum modeling.** *Magn Reson Med* 2008, **60**(5):1122-1134.
232. Tang A, Tan J, Sun M, Hamilton G, Bydder M, Wolfson T, Gamst AC, Middleton M, Brunt EM, Loomba R *et al*: **Nonalcoholic fatty liver disease: MR imaging of liver proton density fat fraction to assess hepatic steatosis.** *Radiology* 2013, **267**(2):422-431.
233. Reeder SB, Cruite I, Hamilton G, Sirlin CB: **Quantitative Assessment of Liver Fat with Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy.** *J Magn Reson Imaging* 2011, **34**(4):spcone.
234. O'Regan DP, Callaghan MF, Wylezinska-Arridge M, Fitzpatrick J, Naoumova RP, Hajnal JV, Schmitz SA: **Liver fat content and T2*: simultaneous measurement by using breath-hold multiecho MR imaging at 3.0 T--feasibility.** *Radiology* 2008, **247**(2):550-557.
235. Wong VW, Chan RS, Wong GL, Cheung BH, Chu WC, Yeung DK, Chim AM, Lai JW, Li LS, Sea MM *et al*: **Community-based lifestyle modification programme for non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial.** *J Hepatol* 2013, **59**(3):536-542.
236. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, O'Dea K, Desmond PV, Johnson NA, Wilson AM: **The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease.** *J Hepatol* 2013, **59**(1):138-143.
237. Nouredin M, Lam J, Peterson MR, Middleton M, Hamilton G, Le TA, Bettencourt R, Changchien C, Brenner DA, Sirlin C *et al*: **Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials.** *Hepatology* 2013, **58**(6):1930-1940.
238. Le TA, Chen J, Changchien C, Peterson MR, Kono Y, Patton H, Cohen BL, Brenner D, Sirlin C, Loomba R: **Effect of colesevelam on liver fat quantified by**

- magnetic resonance in nonalcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial.** *Hepatology* 2012, **56**(3):922-932.
239. Machann J, Thamer C, Stefan N, Schwenzer NF, Kantartzis K, Haring HU, Claussen CD, Fritsche A, Schick F: **Follow-up whole-body assessment of adipose tissue compartments during a lifestyle intervention in a large cohort at increased risk for type 2 diabetes.** *Radiology* 2010, **257**(2):353-363.
240. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM, Van Natta ML, Unalp-Arida A, Tonascia J, Zein CO, Brunt EM, Kleiner DE, McCullough AJ *et al*: **Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2010, **52**(3):913-924.
241. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD: **Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 1999, **30**(6):1356-1362.
242. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, Khalil L, Turpin G, Opolon P, Poynard T: **Liver fibrosis in overweight patients.** *Gastroenterology* 2000, **118**(6):1117-1123.
243. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP *et al*: **The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD.** *Hepatology* 2007, **45**(4):846-854.
244. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R: **Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation.** *N Engl J Med* 2007, **356**(15):1545-1559.
245. Vetelainen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM: **Steatosis as a risk factor in liver surgery.** *Ann Surg* 2007, **245**(1):20-30.
246. Clavien PA, Oberkofler CE, Raptis DA, Lehmann K, Rickenbacher A, El-Badry AM: **What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality?** *Hepatology* 2010, **52**(2):715-729.
247. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, Tzakis A, Starzl TE: **Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration.** *Transplantation* 1989, **47**(5):903-905.
248. Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Krom RA: **Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival.** *Transplantation* 1996, **62**(9):1246-1251.
249. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G: **A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference.** *J Hepatol* 2010, **53**(2):372-384.

250. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE: **Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life.** *Gut* 2004, **53**(3):413-419.
251. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE: **Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss.** *Hepatology* 2004, **39**(6):1647-1654.
252. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI: **Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2005, **54**(3):603-608.
253. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, Fava JL, Wing RR: **Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2010, **51**(1):121-129.
254. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, Friedman SL, Diago M, Romero-Gomez M: **Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis.** *Gastroenterology* 2015, **149**(2):367-378 e365.
255. Shalhub S, Parsee A, Gallagher SF, Haines KL, Willkomm C, Brantley SG, Pinkas H, Saff-Koche L, Murr MM: **The importance of routine liver biopsy in diagnosing nonalcoholic steatohepatitis in bariatric patients.** *Obes Surg* 2004, **14**(1):54-59.
256. Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P: **Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects.** *J Hepatol* 1991, **12**(2):224-229.
257. Shojaee-Moradie F, Baynes KC, Pentecost C, Bell JD, Thomas EL, Jackson NC, Stolinski M, Whyte M, Lovell D, Bowes SB *et al*: **Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose metabolism.** *Diabetologia* 2007, **50**(2):404-413.
258. van der Heijden GJ, Wang ZJ, Chu ZD, Sauer PJ, Haymond MW, Rodriguez LM, Sunehag AL: **A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese, Hispanic adolescents.** *Obesity (Silver Spring)* 2010, **18**(2):384-390.
259. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J: **Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss.** *Hepatology* 2009, **50**(4):1105-1112.
260. Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Clore J, Mills AS: **A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004, **2**(12):1107-1115.

261. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A *et al*: **Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis**. *N Engl J Med* 2010, **362**(18):1675-1685.
262. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S: **Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis**. *Am J Gastroenterol* 2003, **98**(11):2485-2490.
263. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E: **Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality**. *Ann Intern Med* 2005, **142**(1):37-46.
264. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C: **Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis**. *JAMA* 2007, **297**(8):842-857.
265. Berry D, Wathen JK, Newell M: **Bayesian model averaging in meta-analysis: vitamin E supplementation and mortality**. *Clin Trials* 2009, **6**(1):28-41.
266. Dietrich M, Jacques PF, Pencina MJ, Lanier K, Keyes MJ, Kaur G, Wolf PA, D'Agostino RB, Vasani RS: **Vitamin E supplement use and the incidence of cardiovascular disease and all-cause mortality in the Framingham Heart Study: Does the underlying health status play a role?** *Atherosclerosis* 2009, **205**(2):549-553.
267. Klein EA, Thompson IM, Jr., Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM *et al*: **Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)**. *JAMA* 2011, **306**(14):1549-1556.
268. Uygun A KA, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K.: **Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis**. *Aliment Pharmacol Ther* 2004, **19**:537-544.
269. Shyangdan D, Clar C, Ghouri N, Henderson R, Gurung T, Preiss D, Sattar N, Fraser A, Waugh N: **Insulin sensitizers in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review**. *Health Technol Assess* 2011, **15**(38):1-110.
270. Boettcher E, Csako G, Pucino F, Wesley R, Loomba R: **Meta-analysis: pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis**. *Aliment Pharmacol Ther* 2012, **35**(1):66-75.
271. Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, Promrat K, Heller T, Ghany M, Borg B, Loomba R, Liang TJ, Premkumar A *et al*: **The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis**. *Hepatology* 2007, **46**(2):424-429.
272. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, Podevin P, Lacorte JM, Bernhardt C, Bruckert E *et al*: **Rosiglitazone for**

- nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial.** *Gastroenterology* 2008, **135**(1):100-110.
273. Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T: **Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial.** *Hepatology* 2010, **51**(2):445-453.
274. Torres DM, Jones FJ, Shaw JC, Williams CD, Ward JA, Harrison SA: **Rosiglitazone versus rosiglitazone and metformin versus rosiglitazone and losartan in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis in humans: a 12-month randomized, prospective, open-label trial.** *Hepatology* 2011, **54**(5):1631-1639.
275. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G: **A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2010, **52**(1):79-104.
276. Athyros VG, Tziomalos K, Gossios TD, Griva T, Anagnostis P, Kargiotis K, Pagourelis ED, Theocharidou E, Karagiannis A, Mikhailidis DP: **Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients with coronary heart disease and abnormal liver tests in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) Study: a post-hoc analysis.** *Lancet* 2010, **376**(9756):1916-1922.
277. Hyogo H, Tazuma S, Arihiro K, Iwamoto K, Nabeshima Y, Inoue M, Ishitobi T, Nonaka M, Chayama K: **Efficacy of atorvastatin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with dyslipidemia.** *Metabolism* 2008, **57**(12):1711-1718.
278. Georgescu EF, Georgescu M: **Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study.** *J Gastrointest Liver Dis* 2007, **16**(1):39-46.
279. Foster T, Budoff MJ, Saab S, Ahmadi N, Gordon C, Guerci AD: **Atorvastatin and antioxidants for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: the St Francis Heart Study randomized clinical trial.** *Am J Gastroenterol* 2011, **106**(1):71-77.
280. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Sotoudeh M, Rakhshani N, Sohrabpour AA, Naserimoghadam S: **Probucol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study.** *J Hepatol* 2003, **38**(4):414-418.
281. Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J, Keach J, Cave M, Chen T, McClain CJ *et al*: **Betaine for nonalcoholic fatty liver**

- disease: results of a randomized placebo-controlled trial.** *Hepatology* 2009, **50**(6):1818-1826.
282. Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, Rakela J, McGill DB: **Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study.** *Hepatology* 1996, **23**(6):1464-1467.
283. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P: **Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial.** *Hepatology* 2004, **39**(3):770-778.
284. Leuschner UF, Lindenthal B, Herrmann G, Arnold JC, Rossle M, Cordes HJ, Zeuzem S, Hein J, Berg T: **High-dose ursodeoxycholic acid therapy for nonalcoholic steatohepatitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.** *Hepatology* 2010, **52**(2):472-479.
285. Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, Okamoto S, Okada M, Aso K, Hasegawa T, Tokusashi Y, Miyokawa N, Nakamura K: **Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2004, **40**(5):1222-1225.
286. Zein CO, Yerian LM, Gogate P, Lopez R, Kirwan JP, Feldstein AE, McCullough AJ: **Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial.** *Hepatology* 2011, **54**(5):1610-1619.
287. Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, Bugianesi E, Grieco A, Fargion S, Gasbarrini A, Loguercio C, Lonardo A, Marchesini G *et al*: **Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee.** *Dig Liver Dis* 2010, **42**(4):272-282.
288. Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA: **Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial.** *Hepatology* 2009, **49**(1):80-86.
289. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J: **Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis.** *J Hepatol* 2012, **56**(4):944-951.
290. Hijona E, Sanchez-Gonzalez J, Alustiza JM, Hijona L, Arenas J, Garcia E, Rojas N, Portillo MP, Jimenez R, Aldazabal P *et al*: **Accurate fat fraction quantification by multiecho gradient-recalled-echo magnetic resonance at 1.5T in rats with nonalcoholic fatty liver disease.** *Eur J Radiol* 2012, **81**(6):1122-1127.
291. Organization WH: **Obesity: preventing and managing the global epidemic.** Geneva: World Health Organization.; 2000.

292. Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH: **Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue.** *Lipids* 2001, **36**(11):1283-1287.
293. Raptis DA, Fischer MA, Graf R, Nanz D, Weber A, Moritz W, Tian Y, Oberkofler CE, Clavien PA: **MRI: the new reference standard in quantifying hepatic steatosis?** *Gut* 2012, **61**(1):117-127.
294. Hines CD, Yu H, Shimakawa A, McKenzie CA, Warner TF, Brittain JH, Reeder SB: **Quantification of hepatic steatosis with 3-T MR imaging: validation in ob/ob mice.** *Radiology* 2010, **254**(1):119-128.
295. Hines CD, Agni R, Roen C, Rowland I, Hernando D, Bultman E, Horng D, Yu H, Shimakawa A, Brittain JH *et al*: **Validation of MRI biomarkers of hepatic steatosis in the presence of iron overload in the ob/ob mouse.** *J Magn Reson Imaging* 2012, **35**(4):844-851.
296. Marsman HA, van Werven JR, Nederveen AJ, Ten Kate FJ, Heger M, Stoker J, van Gulik TM: **Noninvasive quantification of hepatic steatosis in rats using 3.0 T 1H-magnetic resonance spectroscopy.** *J Magn Reson Imaging* 2010, **32**(1):148-154.
297. Korkusuz H, Keese D, Raschidi BA, Hubner F, Namgaladze D, Hintereder G, Hammerstingl R, Korkusuz Y, Monch C, Vogl TJ: **Detection of a fatty liver after binge drinking: correlation of MR-spectroscopy, DECT, biochemistry and histology in a rat model.** *Acad Radiol* 2011, **18**(11):1349-1357.
298. Peng XG, Ju S, Qin Y, Fang F, Cui X, Liu G, Ni Y, Teng GJ: **Quantification of liver fat in mice: comparing dual-echo Dixon imaging, chemical shift imaging, and 1H-MR spectroscopy.** *J Lipid Res* 2011, **52**(10):1847-1855.
299. Idilman IS, Keskin O, Elhan AH, Idilman R, Karcaaltincaba M: **Impact of sequential proton density fat fraction for quantification of hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease.** *Scand J Gastroenterol* 2014, **49**(5):617-624.
300. Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L, Croce LS, Grigolato P, Paoletti S, de Bernard B *et al*: **Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis.** *J Magn Reson Imaging* 1995, **5**(3):281-285.
301. Roldan-Valadez E, Favila R, Martinez-Lopez M, Uribe M, Rios C, Mendez-Sanchez N: **In vivo 3T spectroscopic quantification of liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease: Correlation with biochemical method and morphometry.** *J Hepatol* 2010, **53**(4):732-737.
302. Wu CH, Ho MC, Jeng YM, Hsu CY, Liang PC, Hu RH, Lai HS, Shih TT: **Quantification of hepatic steatosis: a comparison of the accuracy among multiple magnetic resonance techniques.** *J Gastroenterol Hepatol* 2014, **29**(4):807-813.

303. Vuppalanchi R, Cummings OW, Saxena R, Ulbright TM, Martis N, Jones DR, Bansal N, Chalasani N: **Relationship among histologic, radiologic, and biochemical assessments of hepatic steatosis: a study of human liver samples.** *J Clin Gastroenterol* 2007, **41**(2):206-210.
304. Tang A, Desai A, Hamilton G, Wolfson T, Gamst A, Lam J, Clark L, Hooker J, Chavez T, Ang BD *et al*: **Accuracy of MR imaging-estimated proton density fat fraction for classification of dichotomized histologic steatosis grades in nonalcoholic fatty liver disease.** *Radiology* 2015, **274**(2):416-425.
305. Cesbron-Metivier E RV, Boursier J, Cavarro-Menard C, Lebigot J, Michalak S, Cales P, Aube C.: **Noninvasive liver steatosis quantification using MRI techniques combined with blood markers.** *Eur J Gastroenterol Hepatology* 2010, **22**(8):973-982.
306. van Werven JR, Hoogduin JM, Nederveen AJ, van Vliet AA, Wajs E, Vandenberk P, Stroes ES, Stoker J: **Reproducibility of 3.0 Tesla magnetic resonance spectroscopy for measuring hepatic fat content.** *J Magn Reson Imaging* 2009, **30**(2):444-448.
307. Martin-Rodriguez JL, Arrebola JP, Jimenez-Moleon JJ, Olea N, Gonzalez-Calvin JL: **Sonographic quantification of a hepato-renal index for the assessment of hepatic steatosis in comparison with 3T proton magnetic resonance spectroscopy.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014, **26**(1):88-94.
308. Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, Thompson CH, Smith K, Ruell PA, Stannard SR, George J: **Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: Advancing understanding and management of fatty liver disorders.** *Hepatology* 2008, **47**(5):1513-1523.
309. Parente DB, Rodrigues RS, Paiva FF, Oliveira Neto JA, Machado-Silva L, Lanzoni V, Campos CF, Eiras-Araujo AL, do Brasil PE, Garteiser P *et al*: **Is MR spectroscopy really the best MR-based method for the evaluation of fatty liver in diabetic patients in clinical practice?** *PLoS One* 2014, **9**(11):e112574.
310. Guaraldi G BG, Stentarelli C, Zona S, Nocetti L, Loria P, Ballestri S, Losi L, Torricelli P, Ligabue G: **Magnetic resonance for quantitative assessment of liver steatosis: a new potential tool to monitor antiretroviral-drug related toxicities.** *Antivir Ther* 2012, **17**(6):119-127.
311. van Werven JR, Marsman HA, Nederveen AJ, Smits NJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, Stoker J: **Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and point-resolved 1H MR spectroscopy.** *Radiology* 2010, **256**(1):159-168.
312. McPherson S, Jonsson JR, Cowin GJ, O'Rourke P, Clouston AD, Volp A, Horsfall L, Jothimani D, Fawcett J, Galloway GJ *et al*: **Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered.** *J Hepatol* 2009, **51**(2):389-397.

313. Friedrich-Rust M, Muller C, Winckler A, Kriener S, Herrmann E, Holtmeier J, Poynard T, Vogl TJ, Zeuzem S, Hammerstingl R *et al*: **Assessment of liver fibrosis and steatosis in PBC with FibroScan, MRI, MR-spectroscopy, and serum markers.** *J Clin Gastroenterol* 2010, **44**(1):58-65.
314. Guiu B PJ, Loffroy R, Aho S, Ben Salem D, Masson D, Robin I, Verges B, Hillon P, Cercueil JP, Krausé D: **Liver methylene fraction by dual- and triple-echo gradient-echo imaging at 3.0T: Correlation with proton MR spectroscopy and estimation of robustness after SPIO administration.** *J Magn Reson Imaging* 2011, **33**(1):119-127.
315. Permutt Z LT, Peterson MR, Seki E, Brenner DA, Sirlin C, Loomba R: **Correlation between liver histology and novel magnetic resonance imaging in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease - MRI accurately quantifies hepatic steatosis in NAFLD.** *Aliment Pharmacol Ther* 2012, **36**(1):22-29.
316. Kim SH LJ, Han JK, Lee JY, Lee KH, Han CJ, Jo JY, Yi NJ, Suh KS, Shin KS, Jo SY, Choi BI: **Hepatic macrosteatosis: predicting appropriateness of liver donation by using MR imaging--correlation with histopathologic findings.** *Radiology* 2006, **240**(1):116-129.
317. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, Pigeyre M, Verkindt H, Dharancy S, Louvet A *et al*: **Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease.** *Gastroenterology* 2009, **137**(2):532-540.
318. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK: **Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008, **6**(12):1396-1402.
319. Ferrer-Marquez M C-PC, Velasco-Albendea J, Rico-Morales MM, Casado-Martin M, Belda-Lozano R, Ferrer-Ayza M. : **Influencia de la cirugía bariátrica en esteatosis hepática no alcohólica. Evaluación histológica.** *Cir Esp* 2009, **86**(2):94-100.
320. Lazo M, Solga SF, Horska A, Bonekamp S, Diehl AM, Brancati FL, Wagenknecht LE, Pi-Sunyer FX, Kahn SE, Clark JM: **Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2010, **33**(10):2156-2163.
321. Browning JD, Baker JA, Rogers T, Davis J, Satapati S, Burgess SC: **Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction.** *Am J Clin Nutr* 2011, **93**(5):1048-1052.
322. Patel NS, Doycheva I, Peterson MR, Hooker J, Kisselva T, Schnabl B, Seki E, Sirlin CB, Loomba R: **Effect of weight loss on magnetic resonance imaging**

- estimation of liver fat and volume in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015, **13**(3):561-568 e561.**
323. **Betzel B, Drenth JP: A new noninvasive technique for estimating hepatic triglyceride: will liver biopsy become redundant in diagnosing non-alcoholic fatty liver disease? *BMC Med* 2014, **12**:152.**

ANEXOS

Anexo I



**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
DEL ÁREA SANITARIA DE GIPUZKOA**

D. JOSÉ IGNACIO EMPARANZA KNÖRR, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa,

CERTIFICA

Que este Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa ha recibido el siguiente Proyecto de Investigación:

“Método incruento para la determinación de la grasa hepática (midegrasa)”

Y resuelve aprobar dicho Proyecto de Investigación, según consta en Acta nº 5/09

Lo que firmo en San Sebastián, a 19 de Mayo de 2009



Fdo.: Jose Ignacio Emparanza

Presidente del CEIC del
Hospital Donostia

Anexo II

Hoja de Información al Paciente

Proyecto de Investigación: **“Estudio sobre la exactitud diagnóstica de la resonancia magnética MULTI-ECO para cuantificar la esteatosis hepática”**

Responsables clínicos del Proyecto:

Raúl Jiménez Agüero

Adolfo Beguiristain Gómez

Luis Bujanda Fernández de Piérola

FINALIDAD DEL ESTUDIO

Como parte de las intervenciones y pruebas que le están realizando, se le va a extraer una muestra biológica de sangre y otra de tejido hepático, parte de la cuál serán conservadas para su análisis por el Servicio de Cirugía General.

Estas muestras son un valioso instrumento con destino a la investigación de la enfermedad que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

Solicitamos su consentimiento para que la sangre y el tejido que le han sido retirados sean destinados a esta línea de investigación.

BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA

La cesión de la muestra para la investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad, y el saber que ha colaborado en este proceso.

La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro.

No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población aunque no de forma individual en el donante.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria: Si Vd. decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con los equipos médicos que le atiendan no se verá afectada.

La participación de este estudio no tendrá ningún coste para Vd.

RIESGOS Y MOLESTIAS

La única molestia y riesgo de participar en este estudio están relacionados con la toma de muestra de sangre de su brazo, que se realizará siguiendo el procedimiento habitual y de tejido hepático, que se realizará durante la intervención quirúrgica a la que va a ser sometido. Le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve infección que desaparece en unos días.

DESTINO DE LA MUESTRA

La muestra hepática obtenida será utilizada en la realización de técnicas histopatológicas y bioquímicas que nos permitan tener conocimiento del grado de esteatosis de cada paciente. Las muestras de sangre se utilizarán para determinaciones serológicas y genéticas.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

En cualquier momento podrá Vd. revocar el consentimiento para utilizar las muestras obtenidas, pudiendo solicitar la destrucción o la anonimización de las mismas. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma.

DERECHOS Y GARANTÍAS

Los datos que se obtengan del estudio sólo le serán comunicados, en el caso que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para su salud y de que exista una posibilidad real de mejorar esa condición de salud. Sin embargo, en el caso de estar interesado, Vd. tiene derecho a solicitarlos.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Se le garantiza la absoluta

confidencialidad en la información obtenida en este estudio máxime en lo concerniente al envío y manejo de los datos a terceros según la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica que garantiza el respeto a la calidad de los proyectos de investigación biomédica y el respeto a la dignidad de las personas durante su consecución.

Si Vd. precisa mayor información sobre el estudio (acceso, rectificación, cancelación y oposición) puede contactar con el investigador responsable del grupo clínico: Dr. Raúl Jiménez Agüero del Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Donostia.

Anexo III

CONSENTIMIENTO PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y PARA LA CESIÓN DE MUESTRAS

Proyecto de Investigación: **“Estudio sobre la exactitud diagnóstica de la resonancia magnética MULTI-ECO para cuantificar la esteatosis hepática”**

Responsable clínico del proyecto: **Raúl Jiménez Agüero**

Yo.....con DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la “Hoja de Información al Paciente” sobre el estudio y acepto participar en este estudio.

Se me ha entregado una copia de la “Hoja de Información al paciente”. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán las muestras de sangre con un número codificado.

Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada.

Entiendo la finalidad del estudio y que los resultados del mismo sólo se comunicarán, en el caso de que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para la salud de los participantes y que exista una posibilidad real de mejorar esa condición de salud.

Yo doy mi consentimiento para que se utilicen mis muestras como parte del estudio de esta investigación. Consiento en participar voluntariamente y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por mi participación en el ensayo y/o por haber donado la muestra biológica.

Yo **DOY** mi consentimiento

Yo **NO DOY** mi consentimiento

Para que se conserven mis muestras en las instalaciones del Hospital Donostia para su utilización, e incluso que en **futuras investigaciones** las muestras puedan ser **cedidas a otros centros de investigación** para realizar estudios con una finalidad diferente a la que en un inicio se plantea, tras la aprobación del Comité Ético de Investigación del Hospital.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la finalidad de la conservación, el lugar de conservación y garantías de cumplimiento de la legalidad vigente que me proporciona el centro encargado de conservar y, en su caso, ceder a terceros las muestras a los fines indicados a tal efecto.

Fecha..... Firma del paciente.....

Constato que he explicado las características del proyecto de investigación y las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Fecha..... Firma.....

(Médico/Investigador) Nombre:.....

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información: