

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 725**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2010 PCT/EP2010/053548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10106140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010 E 10712036 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2409154**

54 Título: **Método no invasivo para evaluar la progresión de la fibrosis hepática**

30 Prioridad:

19.03.2009 US 161474 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITE D'ANGERS (50.0%)
40, rue de Rennes
49000 Angers , FR y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
D'ANGERS (50.0%)**

72 Inventor/es:

CALES, PAUL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 644 725 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

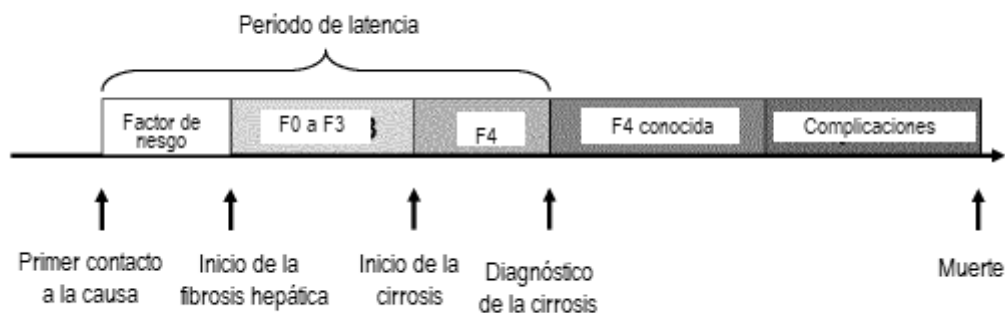
Método no invasivo para evaluar la progresión de la fibrosis hepática

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la hepatología y en particular a un método no invasivo para evaluar la progresión de la fibrosis hepática, especialmente en alcohol o enfermedad hepática crónica viral o metabólica.

Antecedentes de la invención

10 La fibrosis hepática se refiere a la acumulación de tejido cicatricial fibroso en el hígado. Con el fin de diagnosticar la fibrosis hepática, diversas técnicas se pueden utilizar. Una de estas técnicas es la biopsia hepática con aguja (LNB), que conduce a una clasificación basada en la observación de lesiones en el hígado, particularmente en el lóbulo hepático. De hecho, una de las clasificaciones más comúnmente utilizadas es la clasificación de Metavir, que clasifica la fibrosis hepática en cinco fases de F0 a F4. De acuerdo con la clasificación de Metavir, una fase $F \geq 2$ significa que la fibrosis es clínicamente significativa, mientras que una fase F4 corresponde a la fase final, a saber, la cirrosis.



15 Otras técnicas, tales como la medición de la presencia o la gravedad de la fibrosis en un individuo a través de una puntuación de la fibrosis (tal como por ejemplo Fibrometer™), una puntuación del área de fibrosis (AOF), así como el análisis cuantitativo de imágenes pueden también ser usados solos o en combinación con la clasificación de LNB o Metavir, con el fin de determinar con más exactitud la extensión de la fibrosis hepática en un individuo.

20 Sin embargo, si la detección de la presencia o la gravedad de la fibrosis hepática es de gran importancia, se observa que la tasa de progresión de la fibrosis difiere de un individuo a otro. De este modo, la evaluación de la progresión de la fibrosis hepática sería una herramienta muy importante y útil en la práctica clínica, tanto por razones de pronóstico como terapéuticas.

25 En primer lugar, teniendo en cuenta que la progresión de la fibrosis hepática depende de diversos factores genéticos y de huésped, puede ser útil determinar antes de tiempo si es razonable esperar que la fibrosis hepática avance hacia la cirrosis durante la vida del paciente y si lo hace, a qué velocidad ocurrirá esta progresión.

30 En segundo lugar, la evaluación de la tasa de progresión de la fibrosis hepática también puede ser útil con el fin de ayudar a los médicos a decidir si tratar o no a un paciente o con el fin de ayudarles a controlar pacientes que ya están siguiendo un régimen de tratamiento. Hasta ahora, los médicos se basaban principalmente en la clasificación de la fibrosis (ejemplo, fase Metavir $\geq F2$) con el fin de justificar un tratamiento antiviral para la hepatitis viral crónica. Sin embargo, sería muy útil saber desde el principio, tal como, por ejemplo, pero no limitado a los pacientes que muestran una fase F0 o F1, si su fibrosis hepática evolucionará rápidamente o no en fibrosis o cirrosis clínicamente significativa, para que los médicos anticipen el tratamiento.

35 Varios documentos han revelado técnicas desarrolladas con el fin de evaluar la progresión de la fibrosis hepática. Leroy et al. (J. Hepat. 2001, 35:120-6), describe un método para calcular la tasa de progresión de la fibrosis mediante la determinación de la fase METAVIR a partir de una biopsia con aguja hepática y la división por duración de la causa (infección). El documento WO 03/064687 describe un método para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollo y progresión de la cirrosis hepática, comprendiendo dicho método la etapa de determinar el genotipo o fenotipo del paciente para un factor de coagulación. El documento WO 2006/003654 describe métodos y kits para determinar la predisposición de un individuo afectado por la infección crónica por hepatitis C para desarrollar una
40 tasa de progresión rápida de fibrosis hepática. Este método consiste esencialmente en determinar la presencia o

ausencia, en el locus CYP2D6 del individuo, de al menos un genotipo asociado con fibrosis hepática de progresión rápida. El documento EP 1887362A1 describe un método de evaluación de la enfermedad hepática que comprende una etapa de cálculo de un índice que indica el grado de fibrosis hepática a partir de los datos de concentración de aminoácidos. Aunque los métodos mencionados anteriormente pueden evaluar la progresión de la fibrosis hepática, requieren un análisis biológico sofisticado que no es fácilmente disponible en la práctica clínica.

Por consiguiente, todavía existe la necesidad de un método de bajo coste y fácilmente disponible que pueda evaluar la progresión de la fibrosis, siendo dicho método no invasivo, no traumatizante, preciso y fiable, así como fácil de usar.

Descripción de la invención

Para el propósito de la presente invención, "puntuación" es una combinación de marcadores (o variables) dirigida a predecir un evento clínico o una lesión tal como grado de fibrosis. Normalmente, y especialmente cuando se usa la regresión logística binaria, la puntuación oscila desde 0 (riesgo 0%) a 1 (riesgo 100%), esto es, la probabilidad del objetivo de diagnóstico. Cuando la puntuación se basa en una regresión lineal múltiple, la puntuación produce un resultado en las mismas unidades que el objetivo de diagnóstico. En la presente invención, las puntuaciones principales se derivan de una regresión lineal múltiple y miden una tasa de progresión de la fibrosis, esto es, expresada como una unidad de fibrosis por unidad de tiempo.

"Progresión" significa la evolución del nivel de fibrosis a lo largo del tiempo.

"Regularmente" significa a intervalos regulares, tales como, por ejemplo, cada 10 días, cada mes o cada año, etc.

"Muestra" significa un fluido biológico de un individuo, tal como por ejemplo sangre, suero, plasma, orina o saliva de un individuo.

"No invasivo" significa que no se toma tejido del cuerpo de un individuo (la sangre no se considera como un tejido).

"Individuo" significa una mujer, un hombre o un animal, joven o viejo, sano o susceptible de ser afectado o claramente afectado por una patología hepática, tal como una fibrosis hepática de origen viral, de origen alcohólico, una esteatosis hepática crónica o por cualquier otra patología.

"Causa" significa el factor de riesgo que induce las lesiones y la patología resultante.

La "duración de la causa" es el tiempo entre la edad en la que se inició la causa ("edad de inicio") y la edad en la inclusión cuando se midió el nivel de fibrosis ("edad de inclusión").

El "nivel de fibrosis" se refleja mediante una puntuación de la fibrosis, AOF o dimensión fractal, preferiblemente un nivel de fibrosis es una puntuación de la fibrosis o una puntuación de AOF o una puntuación de dimensión fractal.

"Fibrometer" puede referirse a una puntuación de la fibrosis o a una puntuación de AOF.

La presente invención propone una solución a la cuestión técnica de evaluar la tasa de progresión de la fibrosis en todas y cualquier condición o enfermedad que implique fibrosis. Esta invención da como resultado un diagnóstico muy preciso de la progresión de la fibrosis y de la capacidad de distinguir los formadores de fibrosis lentos, medios y rápidos.

En una realización preferida, la afección o enfermedad es enfermedad hepática crónica (CLD) vírica o por alcohol. Según otra realización, con el fin de evaluar la tasa de progresión de la fibrosis, se evalúa la tasa de progresión del área de fibrosis (AOF).

De acuerdo con una primera realización de la invención, la progresión de la fibrosis hepática se evalúa calculando la proporción fibrosis nivel/duración de la causa. De acuerdo con la invención, el nivel de fibrosis se mide mediante un método no invasivo. Ventajosamente, el nivel de fibrosis es una puntuación de la fibrosis, preferiblemente Fibrometer™, o una puntuación de AOF.

De acuerdo con una segunda realización de la invención, la progresión de la fibrosis hepática se evalúa midiendo, a dos intervalos diferentes t_1 y t_2 , los niveles de fibrosis $FL(t_1)$ y $FL(t_2)$ y calculando la proporción $FL(t_2)-FL(t_1)$ a (t_2-t_1) .

De acuerdo con la invención, " t_1 ": es el momento en el que se realiza una primera medida en un individuo y se determina un primer nivel de fibrosis $FL(t_1)$; " t_2 ": es el momento en el que se realiza una segunda medida en el mismo individuo y se determina un segundo nivel de fibrosis $FL(t_2)$; " t_2-t_1 " es un periodo de tiempo de al menos 10 días; en una realización, t_2-t_1 es un periodo de 1 a 6 meses; en otra realización, t_2-t_1 es un periodo de 1 año.

Ventajosamente, el nivel de fibrosis es una puntuación de la fibrosis, o una puntuación de AOF.

- De acuerdo con esta invención, la "puntuación de fibrosis" es una puntuación obtenida midiendo en una muestra de un individuo y combinando en una función de regresión logística o lineal al menos tres, preferiblemente 6 a 8 marcadores seleccionados en el grupo que consiste en α -2 macroglobulina (A2M), ácido hialurónico (HA o hialuronato), apolipoproteína A1 (ApoA1), propéptido N-terminal de procolágeno tipo III (P3P), gamma glutamiltranspeptidasa (GGT), bilirrubina, gammaglobulinas (GLB), recuento de plaquetas (PLT), índice de protrombina (PI), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), urea, sodio (NA), glucemia (GLY), triglicéridos (TG), albúmina (ALB), alcalino fosfatasa (ALP), glucoproteína de cartílago humano 39 (YKL-40), inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP-1), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), ferritina, peso, edad y sexo.
- 5
- 10 Preferiblemente, la puntuación de fibrosis se mide combinando los niveles de al menos tres marcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia (GLY), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), ferritina, ácido hialurónico (HA), triglicéridos (TG), índice de protrombina (PI), gammaglobulinas (GLB), recuento de plaquetas (PLT), peso, edad y sexo.
- 15 Más preferiblemente, la puntuación de la fibrosis se establece combinando en una función de regresión lineal binaria, los niveles de cuatro a ocho marcadores, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en alfa 2 macroglobulina (A2M), ácido hialurónico o hialuronato (HA), índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), ASAT, urea, GGT, edad y sexo. De acuerdo con una realización preferida, la puntuación de la fibrosis es un Fibrometer™. De acuerdo con una realización específica, los marcadores de la puntuación se pueden seleccionar dependiendo del hecho de que la condición hepática es de origen vírica o alcohólica.
- 20 El "área de fibrosis" se puede determinar mediante un método no invasivo en el que se obtiene una puntuación mediante la medición en una muestra de dicho paciente y luego la combinación en una función de regresión logística o lineal, preferiblemente en una función de regresión lineal múltiple, al menos dos, preferiblemente 3, más preferiblemente 6 a 8 variables seleccionadas del grupo que consiste en α -2 macroglobulina (A2M), ácido hialurónico (HA o hialuronato), apolipoproteína A1 (ApoA1), propéptido N-terminal de procolágeno tipo III (P3P), gamma glutamiltranspeptidasa (GGT), bilirrubina, gammaglobulinas (GLB), recuento de plaquetas (PLT), índice de protrombina (PI), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), urea, sodio (NA), glucemia, triglicéridos, albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (ALP), glicoproteína 39 del cartílago humano (YKL-40), inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP-1), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), ferritina, edad, peso, índice de masa corporal.
- 25
- 30 De acuerdo con la invención, el nivel de fibrosis se selecciona de las puntuaciones establecidas en la siguiente tabla:

Fibrosis	FibroMeter					
	Virus		Alcohol		NAFLD	
	Puntuación	Área	Puntuación	Área	Puntuación	Área
Edad	x		x		x	
Sexo	x					
Peso corporal					x	
Alfa 2 macroglobulina	x	x	x	x		
Hialuronato	x	x	x	x		
Tasa de protrombina	x		x	x		x
Plaquetas	x	x		x	x	x
AST	x				x	x
Urea	x	x				
GGT	x	x				
Bilirrubina		x				

ALT					x	x
Ferritina					x	
Glicemia					x	x

De acuerdo con la invención, la puntuación de la fibrosis es una puntuación obtenida combinando en una función de regresión logística o lineal los siguientes marcadores:

- 5 - cuando la causa es la infección viral por hepatitis: edad, sexo, α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), urea y gamma glutamiltranspeptidasa (GGT);
- cuando la causa es alcohol: edad, α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA) e índice de protrombina (PI);
- cuando la causa es NAFLD: edad, peso corporal, plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), ferritina y glicemia.

10 De acuerdo con la invención, la puntuación del área de fibrosis es una puntuación obtenida combinando en una función de regresión logística o lineal los siguientes marcadores:

- cuando la causa es la infección viral por hepatitis: α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), plaquetas (PLT), urea, gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) y bilirrubina;
- 15 - cuando la causa es el alcohol: α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), índice de protrombina (PI) y plaquetas (PLT);
- cuando la causa es NAFLD: índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y glicemia.

20 Esta invención se refiere también a un método no invasivo para evaluar si o no un individuo es un formador rápido de fibrosis, incluyendo medir la progresión del hígado de dicho individuo usando un método no invasivo descrito anteriormente en este documento, preferiblemente calculando FL/duración de la causa y/o $FL(t_2)-FL(t_1)/t_2-t_1$, en el que FL es preferiblemente una puntuación de la fibrosis, una puntuación de AOF o una puntuación de dimensión fractal. De acuerdo con la invención, el formador rápido de fibrosis se identifica con referencia a datos estadísticos como teniendo un aumento de AOF, una edad de inclusión más joven y una edad de inicio mayor (o una duración de la causa que reemplaza las dos variables anteriores) mediante una regresión logística binaria por etapas. Según los

25 experimentos del solicitante, la exactitud diagnóstica parece ser del 100.0% por regresión logística binaria por etapas.

Esta invención también se refiere a un método no invasivo para evaluar si un individuo es un formador lento, medio o rápido de fibrosis usando análisis discriminantes con referencia a una población de formadores de fibrosis, clasificada de su tasa de progresión de la fibrosis en tres categorías, esto es, formadores de fibrosis lento, medio y rápido: en primer lugar, se implementa un método para evaluar la progresión de la fibrosis, preferiblemente mediante la progresión de AOF, como se ha descrito anteriormente, y el individuo se clasifica en categorías de formadores de fibrosis lentos, medios y rápidos determinadas por análisis estadístico. En el ejemplo 2 a continuación, los valores de corte fueron 0.58 y 1.36 %/año distinguiendo los formadores de fibrosis lentos (52.5%), medianos (34.5%) y rápidos (12.9%) en los que la progresión de AOF fue 0.42 ± 0.10 , 0.81 ± 0.21 y 2.43 ± 0.81 %/año ($p < 10^{-3}$), respectivamente.

35 Los formadores de fibrosis, preferiblemente definidos por la progresión de AOF, están de acuerdo con la progresión de la fibrosis: 0.09 ± 0.06 , 0.15 ± 0.06 y 0.43 ± 0.18 MU/año ($p < 10^{-3}$), respectivamente, formadores de fibrosis lentos, medios y rápidos. De acuerdo con una realización preferida, el método no invasivo descrito anteriormente en este documento es preferiblemente FL/duración de la causa o $FL(t_2) - FL(t_1)/t_2-t_1$, en donde FL es preferiblemente la puntuación de AOF.

40 De acuerdo con una realización particular, el método no invasivo de la invención incluye al menos dos puntuaciones de fibrosis, medidas a intervalos regulares, tales como, por ejemplo, cada 10 días, cada mes o cada año.

De acuerdo con la invención, el individuo puede correr el riesgo de sufrir o padece una afección seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad hepática crónica, una infección hepática viral, una hepatotoxicidad, un cáncer hepático, una enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), una enfermedad autoinmune, una

45 enfermedad hepática metabólica y una enfermedad con complicación secundaria del hígado.

- La infección viral por hepatitis puede ser causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis D. La hepatotoxicidad puede ser hepatotoxicidad inducida por alcohol y/o hepatotoxicidad inducida por fármacos (esto es, cualquier alcohol o fármaco xenobiótico). De acuerdo con la invención, la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en hepatitis autoinmune (AIH), cirrosis biliar primaria (PBC) y colangitis esclerosante primaria (PSC). La enfermedad hepática metabólica se puede seleccionar del grupo que consiste en hemocromatosis, enfermedad de Wilson y alfa 1 antitripsina. La complicación secundaria del hígado puede ser enfermedad celíaca o amiloidosis.
- Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán más evidentes a la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones preferidas de la misma, dada a modo de ejemplos con referencia a las figuras adjuntas.
- Breve descripción de las figuras
- Las figuras 1-7 se deben leer con respecto al ejemplo 1.
- La figura 1 es un gráfico que muestra la correlación de las tasas de progresión entre Metavir F y el área de fibrosis ($r_s = 0.77$, $r_p = 0.90$, $p < 10^{-4}$) como una función de fase de fibrosis Metavir (F). r_s es el coeficiente de correlación de Spearman; r_p es el coeficiente de correlación de Pearson.
- La figura 2 es un gráfico que muestra la tasa de progresión de la fibrosis en función de la fase Metavir F. La tasa de progresión de Metavir F (F) o área de fibrosis (AOF) se correlaciona con las fases Metavir F ($r_s = 0.58$, $p < 10^{-4}$, $r_s = 0.49$, $p < 10^{-4}$, respectivamente) y significativamente diferente como una función del grado Metavir F (ANOVA: $p < 10^{-4}$, $p = 0.001$, respectivamente).
- La figura 3 es un gráfico que muestra las tasas de progresión de fibrosis para Metavir F (3A) y AOF (3B) en enfermedad hepática crónica alcohólica y viral (CLD). Las líneas de transición se dibujan sólo para mostrar las diferencias entre los grupos de pacientes.
- La figura 4 es un gráfico que muestra la AOF como una función de la duración de la causa según la causa de CLD (alcohólica en negro y viral en gris) y en la fase Metavir F.
- La figura 5 es la tasa de progresión de AOF en función de la duración de la causa de acuerdo con la fase de fibrosis Metavir (F). La curva tiene una forma inversa ($1/x$) por definición.
- La figura 6 es la relación entre la tasa de progresión de la fibrosis, la fase de fibrosis de Metavir (6A) y AOF (6B) y la edad en el primer contacto. Las líneas son proporcionadas por regresión polinomial. El eje de la progresión de AOF se truncó a 3.
- La figura 7 es los efectos del tratamiento antifibrótico sobre el área de la fase fibrosis y Metavir F. Las gráficas de caja indican mediana, cuartiles y extremos.
- Las figuras 8-16 se deben leer con respecto al ejemplo 2.
- La figura 8 es un gráfico que muestra la correlación entre la progresión de la fase de fibrosis Metavir (F) y el área de progresión de la fibrosis (AOF) en las poblaciones 1 (panel a) y 2 (panel b) del ejemplo 2. Las líneas representan la regresión lineal.
- La figura 9 es un gráfico que muestra la relación entre la fase de fibrosis Metavir (F) (paneles de la izquierda) o el área de la progresión de la fibrosis (paneles de la derecha), durante la duración de la causa, en función de la fase de fibrosis Metavir (F) en la edad de inclusión en las poblaciones 1 (paneles superiores) y 2 (paneles inferiores).
- La figura 10 es un gráfico que muestra la correlación entre la fase de fibrosis Metavir (F) (paneles de la izquierda) o el área de la progresión de la fibrosis (AOF) (paneles de la derecha) y la progresión pronosticada respectiva en las poblaciones 1 (paneles superiores, CLD alcohólica solamente) y 2 (paneles inferiores, CLD viral).
- La figura 11 muestra la relación entre la fase de fibrosis Metavir (F) (paneles de la izquierda) o el área de fibrosis (AOF) (paneles de la derecha) y la duración de la causa en las poblaciones 1 (paneles superiores) y 2 (paneles inferiores). Las curvas representan la regresión de Lowess.
- La figura 12 muestra la relación entre la fase de la fibrosis Metavir (F) (paneles de la izquierda) o el área la progresión de la fibrosis (AOF) (paneles de la derecha) y la edad de inicio en las poblaciones 1 (paneles superiores) y 2 (paneles inferiores). Las curvas representan la regresión de Lowess.

La figura 13 muestra la relación entre la fase de fibrosis Metavir (F) (paneles de la izquierda) o el área de fibrosis (AOF) (paneles de la derecha) y la edad de inicio en las poblaciones 1 (paneles superiores) y 2 (paneles inferiores). Las curvas representan la regresión de Lowess.

5 La figura 14 muestra la relación entre la progresión de la fase de fibrosis Metavir (F) (paneles de la izquierda) o área de progresión de la fibrosis (paneles medios) o área de fibrosis (paneles de la derecha) y la edad de inclusión en las poblaciones 1 (paneles superiores) y 2 (paneles inferiores). Las curvas representan la regresión de Lowess.

La figura 15 muestra la relación entre las características de la fibrosis y la duración de la causa mostrando diferentes formadores de fibrosis en función de la progresión de la fibrosis en la población 2. Las curvas representan la regresión de Lowess.

10 La figura 16 muestra el impacto de subgrupos especiales de pacientes en las curvas de la fase de fibrosis Metavir (F) en función de diferentes tiempos en la población 2. El impacto se determinó de acuerdo con el método mostrado en la figura 11a.

Ejemplo 1

Métodos

15 1. Pacientes

Poblaciones

20 Todos los 201 pacientes incluidos en este estudio fueron admitidos en la unidad de hepatogastroenterología del hospital universitario de Angers, Francia. Se seleccionó una primera población de 185 pacientes (todos los cuales habían sido sometidos a una biopsia hepática) de acuerdo con la disponibilidad de una estimación de la fecha de contacto (o exposición) al factor de riesgo (o causa) del CLD. La diferencia entre la fecha de inclusión y la fecha de contacto se denomina en este documento "duración de la causa". Se seleccionó una segunda población de 16 pacientes (todos los cuales habían sido sometidos a dos biopsias hepáticas).

Población 1

25 Los 185 pacientes incluidos en esta población fueron admitidos por enfermedad hepática alcohólica o por hepatitis B o C viral crónica. Se incluyeron los pacientes que habían bebido al menos 50 g de alcohol por día durante los últimos cinco años o que eran positivos para el suero antígeno de superficie de la hepatitis B o anticuerpos C. Ninguno de los pacientes tenía evidencia clínica, biológica, ecográfica o histológica de otras causas de enfermedad hepática crónica (enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia de α 1-antitripsina, enfermedad biliar, hepatitis autoinmune, carcinoma hepatocelular). Se tomaron muestras de sangre a la entrada y se realizó una biopsia hepática transcostal (aguja de succión) o transyugular (aguja de corte) en una semana.

30 Estos pacientes pudieron haber tenido descompensación hepática y diferentes causas de CLD. De hecho, la duración de la causa se registró en sólo 179 pacientes, pero en los otros 6 pacientes con la fase Metavir 0, la tasa de progresión Metavir F se puede fijar a 0 por definición. Sin embargo, el área de fibrosis se pudo medir en sólo 153 pacientes debido a la fragmentación del espécimen en 26 pacientes, mientras que la tasa de progresión no se pudo fijar en los 6 pacientes con la fase Metavir 0 desde el área basal de la fibrosis no es nulo. La fecha de la primera exposición se estimó de acuerdo con el registro de la primera transfusión de sangre o abuso de fármacos en CLD viral y la primera fecha de consumo crónico de alcohol en exceso en CLD alcohólica. Esta población permitió calcular una tasa de progresión estimada de la fibrosis. Además, las variables explicativas de la progresión se registraron a posteriori.

40 Población 2

Estos 16 pacientes tenían dos biopsias de hígado, diferentes causas de CLD y 10 se sometieron a tratamiento antifibrótico putativo como interferón y sartan entre ambas biopsias. Esta población permitió medir una tasa de progresión observada de fibrosis. Además, las variables explicativas de la progresión se registraron a priori, siendo de este modo verdaderos factores predictivos.

45 2. Evaluación clínica

50 Se realizó un examen clínico completo por un médico de cabecera. Las variables registradas fueron: edad, edad en el primer contacto con la causa de la enfermedad hepática (disponible sólo para pacientes alcohólicos y en hepatitis C atribuida a la transfusión de sangre y abuso de fármacos), sexo, tamaño, peso corporal (antes de una posible paracentesis) el consumo medio de alcohol (g/d) antes de la abstinencia eventual, la duración del abuso de alcohol, la abstinencia de alcohol, la duración de la abstinencia de alcohol, la duración conocida de la enfermedad hepática (desde la primera anormalidad clínica o bioquímica sugestiva de CLD). La puntuación de Child-Pugh y otras

anormalidades clínicas. La población 1 se sometió también a una endoscopia gastrointestinal superior para evaluar signos de hipertensión portal y ultrasonografía Doppler hepática.

3. Análisis de sangre

5 Los análisis de muestras de sangre proporcionaron las siguientes mediciones: hemoglobina, volumen corpuscular medio, recuento de linfocitos, recuento de plaquetas, colesterol, urea, creatinina, sodio (NA), bilirrubina, γ -glutamiltanspeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), albúmina (ALB), α 1 y α 2-globulinas, β -globulinas, γ -globulinas, β -bloqueo, índice de protrombina (PI), apolipoproteína A1 (ApoA1). Algunos de ellos son marcadores sanguíneos indirectos de fibrosis (1).

10 Los marcadores sanguíneos directos de fibrosis usados en este estudio fueron los siguientes: α 2-macroglobulina (A2M), el péptido N-terminal del procolágeno tipo III (P3P), ácido hialurónico (HA), TGF β 1 y laminina. Los siguientes análisis de sangre fueron calculados: proporción AST/ALT, puntuación de PGA (2), puntuación de PGAA (3), APRI (4), FibroMeters diferentes (5), y Hepascore (6). Los sueros se mantuvieron a -80°C durante un máximo de 48 meses para el ensayo.

15 4. Evaluación histológica del hígado

Análisis microscópico

20 Las muestras de biopsia se fijaron en una solución de formalina-álcohol-acético y se embebieron en parafina; Las secciones de $5\ \mu\text{m}$ de espesor se tiñeron con solución de hematoxilina-eosina-azafrán y 0.1% de rojo de picosirius. La fibrosis fue clasificada por dos patólogos independientes de acuerdo con la clasificación de Metavir (7). La clasificación de Metavir también está bien adaptada a la evaluación semicuantitativa de la fibrosis en CLD alcohólica, ya que la fibrosis portoseptal es más frecuente y desarrollada que la fibrosis centrolobular (8). Los observadores fueron cegados para las características del paciente. Cuando los patólogos no estuvieron de acuerdo, las muestras se volvieron a examinar bajo un microscopio de doble cabeza para analizar discrepancias y llegar a un consenso. 25 Todas las muestras también fueron evaluadas de acuerdo con los siguientes grados: actividad Metavir (7), esteatosis y fibrosis centrolobular (CLF) como se describió anteriormente (9).

Análisis de imagen

La AOF se midió en las mismas secciones que el análisis microscópico usando un procesador de imagen Leica Quantimet Q570 como se describió anteriormente (9). La dimensión fractal de la fibrosis también se midió en la población 2 (10).

30 5. Observadores

En total había 2 patólogos con 1 experto senior y 1 experto júnior trabajando en un hospital académico. El análisis de imagen fue realizado por el experto en esta técnica.

6. Análisis estadístico

35 Las variables cuantitativas se expresaron como media \pm SD, a menos que se especifique lo contrario. El coeficiente de correlación de rango de Pearson (r_p) se utilizó para correlaciones entre variables continuas o coeficiente de correlación de Spearman (r_s) cuando era necesario. Para evaluar los predictores independientes, se utilizó la regresión lineal múltiple para variables cuantitativas dependientes y la regresión logística binaria para las variables cualitativas dependientes con la adición paso a paso de variables. El rendimiento predictivo de cada modelo se expresa por el coeficiente R^2 ajustado (aR^2) y por la precisión de diagnóstico, esto es, verdaderos positivos y 40 negativos, respectivamente. Se consideró que un riesgo $\alpha < 5\%$ para una prueba de dos caras era estadísticamente significativo. El software estadístico utilizado fue SPSS versión 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

7. Ejemplo de función matemática

La estimación de la tasa de progresión (PR) se proporciona por regresión lineal múltiple de acuerdo con la siguiente fórmula: $PR = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$, donde a_x es el coeficiente del marcador o variable X_x y a_0 es una constante.

45 Un ejemplo de fórmula para la PR del área de fibrosis es el modelo predictivo que incluye AST/ALT, duración de la causa, hígado firme, β -globulinas y FibroMeter™ donde los coeficientes son los siguientes:

Constante: -0.0978158087539 con límites de intervalo de confianza al 95%: 0.8363614252041 & -1.035103236918,

AST/ALT: 0.5412244415007 con límites de intervalo de confianza al 95%: 2.07804027617.e-006 & 0.3283727153579,

Duración de la causa: -0.07623687627859 con límites de intervalo de confianza al 95%: 5.016575306101.e-011 & -0.09671608407235,

Hígado firme: 0.7172332316927 con límites de intervalo de confianza al 95%: 0.006563850544752 & 0.2047931685256,

5 β -globulinas: 0.1594071294621 con límites de intervalo de confianza al 95%: 0.001915414369681 & 0.06022006972876,

FibroMeter™: 1.15299980586 con límites de intervalo de confianza al 95%: 0.002487655344947 & 0.4161078148282.

Resultados

10 1. Características generales

Las características generales de diferentes poblaciones se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Principales características de las poblaciones

	Población	
	1	2
n	185	16
Edad (y)	48.5 ± 12.3	44.5 ± 10.4
Sexo (% M)	67.6	62.5
Causa (% virus)	26.5	75.0
Metavir F (%):		
0	9.7	18.8
1	18.9	31.3
2	15.1	25.0
3	8.1	6.2
4	48.1	18.8
Complicación (%)	21.6	12.5

2. Principales características de la progresión de la fibrosis

15 Se calcularon en la población 1. La tasa de progresión, expresada en la unidad de Metavir (MU) por año, osciló desde 0 a 2.0 MU/año para Metavir F (media: 0.22 ± 0.29, mediana: 0.13) y desde 0.1 al 17.2%/año para el área de fibrosis (media: 1.8 ± 2.6, mediana: 1.0).

20 Ambas tasas de progresión de la fibrosis estaban altamente correlacionadas (figura 1). La tasa de progresión de la fibrosis aumentó en función de la fase de la fibrosis F (figura 2). Luego probamos los otros factores relacionados con la progresión de la fibrosis.

3. Factores predictivos de la progresión de la fibrosis

Progresión Metavir F

25 Las correlaciones más marcadas de la progresión del Metavir F se observaron con la fase Metavir ($r = 0.33, p < 10^{-4}$), el área de fibrosis ($r = 0.28, p < 10^{-4}$), edad en el primer contacto ($r = 0.46$), duración de la causa ($r = -0.48, p < 10^{-4}$), P3P ($r = 0.26, p < 10^{-4}$), HA ($r = 0.27, p < 10^{-4}$), PI ($r = -0.22, p < 10^{-4}$), GGT ($r = 0.32, p < 10^{-4}$), AST/ALT ($r = 0.38, p < 10^{-4}$), FibroMeter™ ($r = 0.27, p < 10^{-4}$), puntuación de PGA ($r = 0.27, p < 10^{-4}$) y puntuación de PGAA ($r = 0.28, p < 10^{-4}$).

Los únicos enlaces significativos con las variables cualitativas se observaron con $\beta\gamma$ -bloque ($p = 0.03$) y sexo ($p = 0.001$).

- 5 Con regresión lineal, los predictores independientes de la progresión de Metavir F fueron: AST/ALT, duración de la causa, fase Metavir F y PI ($aR^2 = 0.605$). CLD causa no tuvo un papel independiente ($p = 0.63$). Si se eliminó la fase Metavir F, no hubo una variable patológica en el modelo predictivo: duración de la causa, AST/ALT, edad en el primer contacto y FibroMeter™ ($aR^2 = 0.488$). Cabe señalar que la "edad en el primer contacto" + "causa la duración" = edad, sin embargo, si los dos formadores fueron eliminados, este último no fue seleccionado, mientras que aR^2 disminuyó a 0.195 con AST/ALT y el sexo.

Área de progresión de la fibrosis

- 10 Las correlaciones más marcadas del área de progresión de fibrosis se observaron con la fase Metavir F ($r = 0.32$, $p < 10^{-4}$), el área de fibrosis ($r = 0.41$, $p < 10^{-4}$), edad en el primer contacto ($r = 0.43$), duración de la causa ($r = -0.43$, $p < 10^{-4}$), HA ($r = 0.34$, $p < 10^{-4}$), PI ($r = -0.24$, $p < 10^{-4}$), β -globulinas ($r = 0.32$, $p < 10^{-4}$), AST/ALT ($r = 0.51$, $p < 10^{-4}$), FibroMeter™ ($r = 0.29$, $p < 10^{-4}$), puntuación de PGA ($r = 0.29$, $p < 10^{-4}$) y puntuación de PGAA ($r = 0.30$, $p < 10^{-4}$). Se observaron varios enlaces significativos con variables cualitativas: $\beta\gamma$ -bloque ($p = 0.004$), sexo ($p = 0.004$), hígado firme ($p = 0.04$), esplenomegalia ($p = 0.02$), ascitis ($p = 0.001$) ($p = 0.04$), circulación colateral ($p = 0.001$) y la causa de CLD ($p = 0.03$).

- 20 Con la regresión lineal, los predictores independientes del área de progresión de la fibrosis fueron: AST/ALT, duración de la causa, área de fibrosis, y β -globulinas ($aR^2 = 0.716$). Cabe señalar que la esteatosis tuvo una significación límite ($p = 0.057$) pero no la actividad ($p = 0.53$) y la causa de CLD ($p = 0.39$). Si se eliminó el área de fibrosis, la fase Metavir F tomó su lugar en el modelo ($aR^2 = 0.689$) y si se eliminó la fase Metavir F, esto es, sin ninguna variable patológica, el modelo predictivo incluyó AST/ALT, duración de la causa, hígado firme, β -globulinas, y PI ($aR^2 = 0.643$). Si se eliminó la "duración de la causa", la "edad en el primer contacto" tomó su lugar en el modelo ($aR^2 = 0.643$) y si se eliminó la fase de "edad en el primer contacto", el modelo incluyó variables objetivas: AST/ALT, edad β -globulinas y A2M con $aR^2 = 0.509$.

- 25 4. Cinética de progresión de la fibrosis

Progresión estimada (población 1)

- 30 La figura 3 muestra un aumento progresivo pero irregular de la tasa de fibrosis en función de la fase Metavir F. Como era de esperar, la tasa de progresión de la fase Metavir F estuvo más unida a la fase F que el área de fibrosis, como también se reflejó por los coeficientes de correlación ($r_s = 0.58$ y 0.49 , respectivamente, $p < 10^{-4}$). La figura 3 muestra una tasa de progresión bastante estable del área de fibrosis de la fase F 0 a 3 y un aumento dramático en los pacientes con cirrosis, mientras que el aumento fue progresivo a través de todas las fases F para la tasa de progresión de la fase Metavir F.

- 35 La correlación entre el área de fibrosis y la duración de la causa fue débil ($r_p = 0.32$, $p < 10^{-4}$). De hecho, la figura 4 muestra que el área de fibrosis en función de la duración de la causa varía marcadamente entre los pacientes, por lo que los pacientes pueden desarrollar cirrosis en un período corto y otros después de un período prolongado. Sin embargo, todos los pacientes con la tasa más rápida, como se esperaba, y aquellos con el seguimiento más largo, como menos esperado, tenían cirrosis. Una corta duración de la causa fue sorprendente en la cirrosis, sin embargo, esto se observó principalmente en CLD alcohólica. Por otra parte, la edad del paciente fue significativamente menor cuando la duración de la causa fue < 15 años: 45.5 ± 8.9 vs 55.0 ± 10.2 años para ≥ 15 años ($p = 0.002$) 45.5 ± 8.9 vs 55.0 ± 10.2 años para ≥ 15 años ($p = 0.002$) en CLD alcohólica, mientras que las cifras fueron similares en CLD viral: 54.4 ± 14.4 vs 56.6 ± 15.2 años ($p = 0.81$), respectivamente. Esta cifra tampoco sugiere grupos particulares de pacientes según la tasa de progresión.

- 45 La gráfica de la progresión de AOF registrada con respecto a la duración de la causa (figura 5) muestra claramente que los pacientes individuales tenían diferentes patrones de tasa de progresión del área de fibrosis dentro de cada fase F. De hecho, los análisis multivariados anteriores indicaron que la "duración de la causa" o "edad en el primer contacto" era el principal predictor clínico independiente de Metavir F o área de progresión de la fibrosis. La figura 6 muestra que la progresión de F aumentó dramáticamente en 40 años en CLD viral y alcohólico. Sin embargo, la progresión de AOF mostró un aumento lineal sobre la edad en CLD alcohólica mientras que hubo una meseta seguida por un aumento lineal por 40 años en CLD viral.

- 50 Progresión observada (población 2)

El intervalo medio entre biopsias (duración de seguimiento) fue de 4.1 ± 2.6 años en el grupo completo y 4.8 ± 2.5 en los 6 pacientes sin tratamiento frente a 3.6 ± 2.6 ($p = 0.38$) en los 10 pacientes con tratamiento antifibrótico entre las 2 biopsias hepáticas. La tasa anual de progresión en pacientes no tratados fue para Metavir F: media: 0.17 ± 0.27 ,

mediana: 0.09 MU y para el área de fibrosis: media: 1.3 ± 3.4 , mediana: 1.2%. Estos valores no fueron significativamente diferentes de los estimados ($p = 0.66$ para F y $p = 0.72$ para AOF).

5 El AOF fue mucho más sensible que la fase Metavir F para detectar efectos del tratamiento antifibrótico: cambios de porcentaje en AOF: $p = 0.03$, tasa de progresión de AOF: $p = 0.09$; cambios de porcentaje en fase F: $p = 0.85$, tasa de progresión de la fase F: $p = 0.71$ (por la prueba de Mann-Whitney, figura 10) o proporción del incremento en la fase F: $p = 0.61$ (prueba χ^2 de McNemar).

Ejemplo 2

10 La progresión de la fibrosis se calculó como la proporción entre el nivel de fibrosis/duración de la causa, con el nivel de fibrosis que indica la fase o la cantidad de AOF. Así, este es un valor medio en función del tiempo. Como el objetivo principal fue describir con precisión la progresión de la fibrosis, a través de la cantidad de fibrosis reflejada por la AOF, se utilizó LB como referencia para la determinación del nivel de fibrosis y se eligió para el diagnóstico no invasivo un análisis de sangre que puede evaluar tanto la fibrosis clasificación como AOF (14). Para el registro del tiempo, se utilizaron dos descriptores de la progresión de la fibrosis: la tasa de progresión y el curso de progresión. La tasa de progresión es una media en función de la duración de la causa, siendo la duración de la causa entre la edad en que comenzó la causa ("edad de inicio") y la edad de inclusión cuando se midió la fibrosis ("edad de inclusión"). El curso de progresión es la tendencia en función del tiempo (aumento, estabilidad, disminución). De este modo, según los métodos usados para la determinación de la fibrosis (LB o prueba no invasiva) y el registro de la duración (retrospectiva/transversal o prospectiva/longitudinal), se distinguieron 4 métodos para calcular la progresión de la fibrosis. Sus características, ventajas y límites se detallan en la tabla 2. Debido a que la disponibilidad de estos métodos ha evolucionado marcadamente en función del tiempo, se compararon indirectamente recogiendo diferentes poblaciones en nuestra base de datos.

Pacientes

Objetivos de población (tabla 3)

25 Se utilizaron 5 poblaciones, incluyendo 1456 pacientes. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron admitidos en la unidad de hepatogastroenterología del hospital universitario de Angers, Francia, excepto en la población 3 que se describe en otra parte (15).

30 Las poblaciones 1 y 2 se seleccionaron de acuerdo con la disponibilidad de estimación de la edad cuando se inició la causa ("edad de inicio"). El período entre la edad de inicio y la edad de inclusión cuando se midió el nivel de fibrosis ("edad de inclusión") se denominó "duración de la causa". La población 1 proporcionó una comparación entre CLD alcohólica y viral. La población 2 con CLD viral tenía un número suficiente alto de pacientes para validar la subpoblación viral anterior y permitir el análisis de subgrupos. La población 3 era una población grande con CLD viral que proporcionaba una validación del efecto de la edad de inclusión. La población 4 permitió validar en pacientes con 2 LB la progresión previa estimada con 1 LB. Finalmente, se utilizó la población 5 para validar la progresión calculada con dos análisis de sangre.

35 Características de la población (tabla 4)

40 Población 1 - Incluyó 185 pacientes con CLD alcohólica o hepatitis B o C crónica entre 1994 y 1996. Esta población se detalla en otra parte (16). La fecha de exposición de la primera causa se estimó de acuerdo con la primera fecha de consumo crónico excesivo de alcohol para CLD alcohólicas y el registro de la primera transfusión de sangre o abuso de fármacos para CLD viral. Estos pacientes podrían tener descompensación hepática. De hecho, el inicio de la causa se registró en sólo 179 pacientes, pero en otros 6 pacientes con la fase Metavir 0, la tasa de progresión Metavir F se puede fijar a 0 por definición. Sin embargo, el AOF se pudo medir en sólo 153 pacientes debido a la fragmentación del espécimen en 26 pacientes, mientras que la progresión no pudo ser fijada en los 6 pacientes con la fase 0 de Metavir F, ya que el AOF basal no es nulo.

45 Población 2 - Incluyó 157 pacientes con hepatitis C crónica entre 1997 y 2002 detallados en otra parte (14). La edad media de inclusión fue de 43.4 ± 12.4 años y 59.4% de los pacientes eran hombres.

Población 3 - Incluyó 1056 pacientes con hepatitis C crónica, LB reclutados en 9 centros franceses entre 1997 y 2007 detallados en otra parte (15). La edad media fue de 45.4 ± 12.5 años en la inclusión y 59.6% de los pacientes eran hombres.

50 Población 4 - Se incluyeron 16 pacientes con diversas causas de CLD con dos LB entre 1997 y 2002 y diferentes causas de CLD.

Población 5 - Incluyó 42 pacientes con hepatitis C crónica entre 2004 y 2008. Los análisis de sangre se midieron anualmente durante 2.4 ± 0.5 años.

Evaluación clínica y análisis de sangre

- 5 Un médico de cabecera realizó un examen clínico completo. Las principales variables clínicas registradas fueron: edad de inclusión, edad de inicio, sexo y causa de CLD. Otras variables se describen en otra parte (14-16). Los análisis de muestras de sangre proporcionaron las variables habituales, así como marcadores sanguíneos directos de fibrosis para calcular las pruebas de fibrosis sanguínea. De este modo, los análisis de sangre se calcularon para estimar ya sea la fase de fibrosis o AOF (14).

Evaluación histológica del hígado (poblaciones 1, 2 y 4)

- 10 Análisis microscópico - Las muestras de biopsia se fijaron en una solución de formalina-alcohol-acético y se embebieron en parafina; Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con solución de hematoxilina-eosina-azafrán y 0.1% de rojo de picosirius. La fibrosis fue clasificada por dos patólogos independientes, cegados por las características del paciente, según la clasificación de Metavir (6). La clasificación de Metavir también está bien adaptada a la evaluación semicuantitativa de la fibrosis en CLD alcohólica (17). En caso de discrepancia, las muestras se volvieron a examinar bajo un microscopio de doble cabeza para llegar a un consenso.

- 15 Análisis de imagen - AOF se midió en las mismas secciones que el análisis microscópico utilizando ya sea un procesador de imagen Leica Quantimet Q570 como se describió anteriormente de 1996 a 2006 (10) o un procesador de imágenes escáner de portaobjetos digital Aperio (Scanscope® CS System, Aperio Technologies, Vista CA 92081, USA) que proporciona imágenes de alta calidad de 30,000 x 30,000 píxeles y una resolución de 0.5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ (ampliación x20) desde 2007. Se obtuvo una imagen binaria (blanco y negro) mediante una técnica de umbral automático utilizando un algoritmo desarrollado en nuestro laboratorio.

- 20 Observadores - En total había 2 patólogos con 1 experto senior y 1 experto júnior trabajando en un hospital académico. El análisis de imagen fue realizado por el patólogo experimentado experto en esta técnica (17) o por un ingeniero para el sistema totalmente automatizado.

Análisis estadístico

- 25 Las variables cuantitativas se expresaron como media \pm SD, a menos que se especifique lo contrario. El coeficiente de correlación de Pearson (r_p) se utilizó para correlaciones entre variables continuas o el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) cuando era necesario. La regresión Lowess por mínimos cuadrados ponderados se utilizó para determinar la tendencia promedio de las relaciones entre variables, principalmente el curso de progresión (18). La ruptura de línea observada en estas curvas se verificó mediante cortes determinados según el índice máximo de Youden y la precisión del diagnóstico (datos no mostrados). La forma de la curva se evaluó mediante el ensayo correspondiente, por ejemplo, prueba de tendencia cuadrática. Para evaluar los predictores independientes, la regresión lineal múltiple para las variables dependientes cuantitativas, la regresión logística binaria para las variables cualitativas dependientes y el análisis discriminante para las variables ordenadas se utilizaron con la adición paso a paso adelante de las variables. La predicción de cada modelo se expresa por el coeficiente R^2 ajustado (aR^2) y/o por la precisión de diagnóstico, esto es, verdaderos positivos y negativos, respectivamente. Se consideró estadísticamente significativo un riesgo $\alpha < 5\%$ para una prueba de dos caras. El software estadístico utilizado fue SPSS versión 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).
- 35

Resultados

Características generales

- 40 Las características generales de las poblaciones núcleo 1 y 2 se presentan en la tabla 4. En la población 1, las variables en la línea de base (inclusión) fueron significativamente diferentes entre las causas alcohólicas y virales, excepto para la edad de inicio. Las variables basales no fueron significativamente diferentes entre las poblaciones virales 1 y 2.

Cabe señalar que la edad de inicio fue similar entre las poblaciones, mientras que la edad de inclusión fue significativamente mayor en la CLD alcohólico que fue responsable de una exposición a causa más prolongada.

- 45 Descripción general de la progresión de la fibrosis

Medición retrospectiva

- 50 Población 1 - La progresión, expresada en la unidad de Metavir (MU) por año, osciló desde 0 a 2.0 MU/año para Metavir F (media: 0.22 ± 0.29 , mediana: 0.13) y desde 0.1 a 17.2 %/año para el AOF (media: 1.8 ± 2.6 , mediana: 1.0). Ambas progresiones de fibrosis estaban altamente correlacionadas ($r_p=0.90$, $p < 10^{-4}$, figura 8a). La progresión de la fibrosis aumentó en función de la fase de fibrosis F (figuras 9a y 9b). La progresión de AOF fue significativamente más rápida en CLD alcohólica que en CLD viral, pero no en Metavir F (tabla 4).

Población 2 - La tasa de progresión, expresada en la unidad de Metavir (MU) por año, osciló desde 0 a 0.8 MU/año para Metavir F (media: 0.16 ± 0.14 , mediana: 0.11) y desde 0.2 a 4.5 %/año para el AOF (media: 0.8 ± 0.7 , mediana: 0.6). Las progresiones de AOF y F también estaban bien correlacionados $r_p: 0.795$ ($p < 10^{-3}$) (figura 8b). Las progresiones de la fibrosis fueron significativamente diferentes según la fase F (ANOVA, $p < 10^{-3}$) (figuras 9c y 9d).
 5 Por comparación post hoc de Bonferroni, las progresiones fueron significativamente diferentes entre cada fase F para la progresión F (excepto entre F2 y F3), pero sólo en F4 vs F1 y F3 para la progresión de AOF.

Comparación en función del sexo (tabla 4) - En pacientes alcohólicos, F o AOF en la inclusión no fueron significativamente diferentes entre las mujeres y los hombres, pero la duración de la causa fue significativamente más corta en las mujeres que en los hombres. En consecuencia, la progresión de F o AOF fue significativamente
 10 más rápida en mujeres que en hombres con CLD alcohólica. F o AOF en la inclusión en la población 2 fueron significativamente mayores en los hombres que en las mujeres, pero la duración de la causa no fue significativamente diferente entre los hombres y las mujeres. En consecuencia, y a la inversa de CLD alcohólica, la progresión de F o AOF fue significativamente más rápida en hombres que en mujeres en CLD viral (significativa en población más numerosa 2).

15 Comparación en función de la causa (tabla 5) - Las progresiones de F y AOF se incrementaron de forma espectacular y significativa en CLD alcohólica en comparación con CLD viral sólo en mujeres.

Comparación entre poblaciones virales - La progresión de AOF fue significativamente mayor en la población 1 que en la población 2 (tabla 4); esto puede ser debido a la diferencia en la técnica de AOF ya que AOF fue significativamente diferente o en las poblaciones, ya que la progresión F tendía a ser diferente.

20 Medición prospectiva

Población 4 - El intervalo medio entre biopsias (duración del seguimiento) fue de 4.1 ± 2.6 años. La tasa anual de progresión fue para Metavir F: media: 0.17 ± 0.27 , mediana: 0.09 MU y para el área de fibrosis: media: 1.3 ± 3.4 , mediana: 1.2%. Estos valores no fueron significativamente diferentes de los estimados en la población 1 ($p = 0.481$ para F y $p = 0.567$ para AOF).

25 Curso de progresión de la fibrosis

Describimos las tendencias promedio en el curso de la progresión de la fibrosis, reflejadas por los registros de la regresión de Lowess, según tres variables unidas a los tiempos: duración de la causa, edad de inicio de la causa y edad de inclusión que es la suma de los dos formadores. La edad en el inicio de la causa se correlacionó con la duración de la causa en la población 1 ($r_p = -0.449$, $p < 10^{-4}$), debido a la CLD alcohólica, pero no en la población 2 ($r_p = -0.084$ $p = 0.319$). Las tendencias particulares en los extremos de los registros tienen que ser cautelosamente interpretadas, ya que esto podría deberse a una menor robustez asociada a un menor número de pacientes.

Duración de la causa: En la población 1, la duración de la causa se correlacionó débilmente con el nivel de fibrosis: fase F fase: $r_s = 0.357$, $p < 10^{-3}$ (figura 11a), AOF: $r_s = 0.316$, $p < 10^{-3}$ (figura 11b). En la población 2, la duración de la causa se correlacionó débilmente con la fase F ($r_s: 0.241$, $p = 0.004$) (figura 11c) o AOF ($r_s: 0.201$, $p = 0.018$) con el mismo curso en hombres y mujeres (figuras 11c y 11d). Todas estas cifras muestran una disminución inesperada en los primeros 15 años y posteriormente un aumento progresivo.

Edad de inicio - La figura 12a muestra que la progresión de F aumentó dramáticamente en 30-40 años de inicio en CLD alcohólica (≈ 40 años) y viral (≈ 30 años) (población 1). Esta última cifra se confirmó en la población 2, especialmente en los hombres (figura 12c). Esto resultó en un aumento progresivo de la fase F con la edad de inicio en CLD viral (figura 13c), pero esto no se observó en CLD alcohólica (figura 13a) o en pacientes jóvenes con CLD viral (explicación más adelante). Sin embargo, la progresión de AOF mostró un aumento casi lineal sobre la edad de inicio en CLD alcohólica, mientras que hubo una meseta seguida por un aumento lineal de ≈ 40 años de edad de inicio en CLD viral (población 1) (figura 12b). Esto se confirmó en la población 2, especialmente en los hombres (figura 12d). A nivel mundial, el AOF fue relativamente estable en función de la edad de inicio en la población 1 (figura 13b) y 2 (figura 13d). Sin embargo, hubo algunas peculiaridades: una disminución lenta en los primeros 20 años en hombres con CLD viral en fases F (figura 13c) o AOF (figura 13d), así como una disminución en 40 años de edad de inicio en mujeres (figura 13d).

Edad de inclusión - Considerando la progresión de F, en la CLD alcohólica hubo una progresión estable hasta 50 años (figura 14a), luego una disminución, mientras que en la CLD viral después de una disminución inicial por debajo de 35 años, especialmente en los hombres, en lo sucesivo hubo un aumento (figuras 14a y 14d). Considerando el nivel de F, el aumento fue lineal con la edad en CLD alcohólica y se produjo en 40-50 años en CLD viral (figura 15a). Las poblaciones 2 y 3 indicaron que este aumento se produjo a los 40 años en los hombres y 50 años en las mujeres en la CLD viral (figuras 15b y 15c). Hubo una disminución de F inicial de la CLD viral (figura 15a), especialmente en los hombres (figura 15b) que no se confirmó en la población 3 (figura 15c), pero hubo menos pacientes jóvenes en esta última población (como se refleja en una edad avanzada: $p = 0.06$).

La progresión de AOF no dependió de la edad de inclusión en CLD alcohólica (figura 14b), mientras que hubo un incremento tardío en CLD viral (figuras 14b y 14e). En consecuencia, el nivel de AOF aumentó linealmente con la edad en CLD alcohólica (figura 14c), mientras que esto ocurrió a los 50 años en CLD viral (figuras 14f).

5 Sexo – En este documento se establece la relación particular entre sexos y la causa de CLD ya que el efecto de sexo ya se ha mencionado en CLD viral. Mientras que hubo un paralelismo global entre los hombres y las mujeres en la CLD viral, las mujeres en CLD alcohólica tuvieron dos particularidades: una desaceleración entre 30-50 años y un aumento tardío en la progresión de la fibrosis y el nivel de 50 años de edad de inicio (los datos no se muestran). Las mismas diferencias se observaron para la edad de inclusión a la diferencia de que la desaceleración se observó más tarde entre 45-50 años, como se esperaba.

10 Tiempos para la cirrosis

En la población 1, el tiempo para la cirrosis fue de 24.7 ± 13.3 años en CLD alcohólica vs 22.1 ± 15.9 años en CLD viral ($p = 0.495$) y 28.0 ± 12.5 años en hombres vs 16.1 ± 11.4 años ($p = 0.001$) en mujeres en CLD alcohólica. En la población (viral) 2, fue de 17.0 ± 8.0 años en los hombres vs 24.0 ± 10.0 años ($p = 0.017$) en las mujeres.

Evaluación no invasiva

15 La progresión observada de FibroMeter™ ($\text{FibroMeter}^{\text{TM}} t_2 - \text{FibroMeter}^{\text{TM}} t_1 / (t_2 - t_1)$) fue 0.049 ± 0.058 /año en la población 5 mientras que la progresión estimada de FibroMeter™ ($\text{FibroMeter}^{\text{TM}} t_2 / \text{duración de la causa}$) fue de 0.038 ± 0.033 /año en la población 2 ($p = 0.217$).

Identificación de las categorías de formadores de fibrosis

20 En la población 2, fue posible distinguir tres categorías de formadores de fibrosis en función de la progresión AOF (figura 15b) en lugar de la progresión F (figura 15a). Los valores de corte fueron 0.58 y 1.36%/año distinguiendo los formadores de fibrosis lentos (52.5%), medianos (34.5%) y rápidos (12.9%) en los que la progresión de AOF fue de 0.42 ± 0.10 , 0.81 ± 0.21 y 2.43 ± 0.81 %/año ($p < 10^{-3}$), respectivamente. Los formadores de fibrosis, definidos por la progresión de AOF, estuvieron de acuerdo con la progresión de F: 0.09 ± 0.06 , 0.15 ± 0.06 y 0.43 ± 0.18 MU/año ($p < 10^{-3}$), respectivamente los formadores de fibrosis lentos, medianos y rápidos (figura 15c). La edad de inicio aumentó con el grado de formador de fibrosis: 25.2 ± 10.5 , 28.7 ± 10.8 y 33.0 ± 13.6 años, respectivamente ($p < 10^{-3}$). La proporción de hombres aumentó con el grado de formador de fibrosis: 53.4%, 66.7% y 77.8%, respectivamente ($p = 0.034$). Mediante el análisis discriminante por etapas, los formadores de fibrosis fueron pronosticados por Metavir F, AOF, progresión de F y duración de la causa (precisión de diagnóstico: 91.4%). Los formadores rápidos de fibrosis se pronosticaron por aumento de AOF, edad de inclusión más joven y edad de inicio mayor con precisión de diagnóstico: 100.0% por regresión logística binaria por etapas.

25

30

Tabla 2 - Evaluación de fibrosis

Evaluación de la fibrosis			Progresión de la fibrosis		
Método	Técnica	Cálculo ^a	Descripción	Ventajas	Límites
Medición de biopsia simple	1 biopsia	FL/duración de la causa	Medición transversal (retrospectiva)	Disponibilidad +	Estimación inicial de linealidad
Medición repetida de la biopsia	2 biopsias	$(FL_{t_2} - FL_{t_1}) / (t_2 - t_1)$	Medición longitudinal (prospectiva)	Precisión Referencia	Variabilidad Falta de disponibilidad Corta duración
Estimación de prueba única no invasiva	1 prueba ^b	FL/duración de la causa	Estimación transversal (retrospectiva)	Disponibilidad ++	Estimación inicial de linealidad
Estimación de la prueba no invasiva repetida	2 pruebas	$(FL_{t_2} - FL_{t_1}) / (t_2 - t_1)$	Estimación longitudinal (prospectiva)	Precisión Repetibilidad	

^a FL es el nivel de fibrosis y t es la fecha correspondiente

^b No invasivo (análisis de sangre en el presente estudio)

Tabla 3. Principales características de las diferentes poblaciones utilizadas en este estudio

Población	Causa	Pacientes (n)	Evaluación de fibrosis	Área de fibrosis ^a	Tiempo de duración de	Progresión de la fibrosis
1	Alcohol virus	185	1 LB, 1 prueba de sangre	Sí	Duración de la causa ^b	Medición retrospectiva + estimación
2	Virus	157	1 LB, 1 prueba de sangre	Sí	Duración de la causa ^b	Medición retrospectiva + estimación
3	Virus	1056	1 LB, 1 prueba de sangre	No	No	Medición retrospectiva + estimación ^c
4	Miscelaneoso	16	2 LB	Sí	Seguimiento	Medición prospectiva
5	Virus	42	0 LB, 2 pruebas de sangre	No	Seguimiento	Estimación prospectiva

a En LB;

b Duración de la causa = tiempo entre la edad de inclusión cuando se midió el nivel de fibrosis hepática y la edad al inicio de la enfermedad hepática;

c Limitado al nivel de fibrosis registrado vs edad.

Tabla 4. Características clínicas de las poblaciones 1 y 2

Causa	Población 1			Población 2		
	Alcohol	Virus	p ^a	Ambas	Virus	p ^b
N	136	49	-	185	157	-
Edad a la inclusión (años)	49.9 ± 11.2	44.2 ± 14.6	0.02	48.5 ± 12.3	43.4 ± 12.4	0.793
Edad a la causa inicio (año)	28.8 ± 9.5	28.2 ± 13.5	0.779	28.8 ± 10.8	27.4 ± 11.2	0.707
Duración de la causa (años)	21.3 ± 13.2	15.8 ± 10.7	0.006	19.8 ± 12.9	16.5 ± 7.3	0.604
Sexo (% M)	72.8	53.1	0.011	67.6	59.4	0.550
Causa (% virus)	-	-	-	26.5	100	-
Metavir F (%):			0.002			-
0	9.6	10.2		9.7	10.3	0.998
1	14.0	32.7		18.9	33.5	0.886
2	13.2	20.4		15.1	25.8	0.419
3	6.6	12.2		8.1	11.0	0.303
4	56.6	24.5		48.1	19.4	0.414
Área de fibrosis (%)	23.5 ± 14.7	13.6 ± 11.7	P<10 ⁻³	20.7 ± 14.6	10.7 ± 6.5	0.005
Complicación (%)	29.4	0	p<10 ⁻³	21.6	0	-

Tasa de progresión:						
Metavir F (MU/año)	0.23 ± 0.32	0.19 ± 0.21	0.424	0.22 ± 0.29	0.16 ± 0.14	0.120
Área de fibrosis (%/año)	2.0 ± 2.9	1.3 ± 1.4	0.027	1.8 ± 2.6	0.8 ± 0.7	0.017

^a alcohol vs virus; ^b vs población viral 1

NA: no disponible

Tabla 5. Fibrosis: datos de inclusión y evolución en función del sexo en las poblaciones 1 y 2

	HOMBRES	MUJERES	P ^A
POBLACIÓN 1			
EDAD EN EL INICIO DE LA CAUSA (AÑOS)			
ALCOHOL	26.9 ± 8.1	34.1 ± 11.0	0.001
VIRUS	27.5 ± 15.0	29.0 ± 11.7	0.337
P	0.354	0.160	-
AMBOS	27.0 ± 9.9	32.2 ± 11.5	0.001
EDAD EN LA INCLUSIÓN (AÑOS)			
ALCOHOL	50.6 ± 12.0	48.0 ± 8.4	0.358
VIRUS	42.2 ± 15.1	46.7 ± 13.6	0.400
P	0.001	0.680	-
AMBOS	48.8 ± 13.1	47.5 ± 10.7	0.623
DURACIÓN DE LA CAUSA (AÑOS)			
ALCOHOL	23.9 ± 13.1	14.2 ± 11.0	< 10 ⁻³
VIRUS	14.6 ± 9.3	17.2 ± 12.2	0.626
P	0.001	0.287	-
AMBOS	22.0 ± 12.9	15.3 ± 11.4	0.001
PUNTUACIÓN METAVIR F			
ALCOHOL	2.8 ± 1.5	2.9 ± 1.4	0.724
VIRUS	2.1 ± 1.3	2.1 ± 1.4	0.984
P	0.012	0.024	-
AMBOS	2.7 ± 1.5	2.6 ± 1.5	0.737
PROGRESIÓN F (MU/AÑOS)			
ALCOHOL	0.17 ± 0.23	0.41 ± 0.43	<10 ⁻³
VIRUS	0.20 ± 0.21	0.18 ± 0.22	0.609
P	0.685	0.019	-

ES 2 644 725 T3

AMBOS	0.17 ± 0.23	0.32 ± 0.38	0.011
ÁREA DE FIBROSIS (%)			
ALCOHOL	22.9 ± 14.7	25.0 ± 14.8	0.483
VIRUS	14.3 ± 11.9	12.2 ± 11.4	0.199
P	0.014	0.001	-
AMBOS	20.8 ± 14.5	20.2 ± 14.9	0.636
PROGRESIÓN A OF (%/AÑOS)			
ALCOHOL	1.4 ± 1.8	3.5 ± 4.2	0.001
VIRUS	1.4 ± 1.4	1.1 ± 1.4	0.146
P	0.762	0.001	-
AMBOS	1.4 ± 1.7	2.7 ± 3.6	0.106
POBLACIÓN 2			
EDAD EN EL INICIO DE LA CAUSA (AÑOS)	26.1 ± 10.9	29.4 ± 11.4	0.021
EDAD EN LA INCLUSIÓN (AÑOS)	41.8 ± 11.8	47.1 ± 13.1	0.015
DURACIÓN DE LA CAUSA (AÑOS)	15.7 ± 6.8	17.7 ± 8.0	0.195
PUNTUACIÓN METAVIR F	2.3 ± 1.2	1.9 ± 1.2	0.030
PROGRESIÓN F (MU/AÑOS)	0.18 ± 0.14	0.13 ± 0.13	0.004
ÁREA DE FIBROSIS (%)	11.4 ± 6.9	9.6 ± 5.8	0.018
PROGRESIÓN AOF (%/AÑOS)	0.91 ± 0.74	0.67 ± 0.67	0.004
COMPARACIÓN DE POBLACIONES VIRALES 1 Y 2 (P):			
EDAD EN EL INICIO DE LA CAUSA (AÑOS)	0.665	0.888	-
EDAD EN LA INCLUSIÓN (AÑOS)	0.903	0.903	-
DURACIÓN DE LA CAUSA (AÑOS)	0.516	0.830	-
PUNTUACIÓN METAVIR F	0.473	0.549	
PROGRESIÓN F (MU/AÑOS)	0.659	0.311	-
ÁREA DE FIBROSIS (%)	0.274	0.301	-
PROGRESIÓN AOF (%/AÑOS)	0.095	0.213	-

Prueba MannWhitney ^a

Referencias

Referencias del ejemplo 1

- 5 1. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology*, 1997; 113:1609-1616.

2. Poynard T, Aubert A, Bedossa P, Abella A, Naveau S, Paraf F, Chaput JC. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology* 1991; 100:1397-1402.
 3. Naveau S, Poynard T, Benattar C, Bedossa P, Chaput JC. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. *Diagnostic interest. Dig. Dis. Sci.* 1994; 39:2426-2432.
 - 5 4. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:518-526.
 5. Cales P, Boursier J, Oberti F, Hubert I, Gallois Y, Rousselet MC, Dib N, et al. FibroMeters™: a family of blood tests for liver fibrosis. *Gastroenterol Clin Biol.* 2008; 32:40-51.
 - 10 6. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem.* 2005; 51:1867-1873.
 7. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20:15-20.
 - 15 8. Michalak S, Rousselet MC, Bedossa P, Pilette C, Chappard D, Oberti F, Gallois Y, et al. Respective roles of porto-septal fibrosis and centrilobular fibrosis in alcoholic liver disease. *J. Pathol.* 2003; 201:55-62.
 9. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J. Hepatol.* 1998; 28:439-446.
 - 20 10. Moal F, Chappard D, Wang J, Vuillemin E, Michalak-Provost S, Rousselet MC, Oberti F, et al. Fractal dimension can distinguish models and pharmacologic changes in liver fibrosis in rats. *Hepatology*, 2002; 36:840-849.
- Referencias del ejemplo 2
1. Ascione A, Tartaglione T, Giuseppe Di Costanzo G. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis* 2007;39 Suppl 1:S4-7.
 2. Feld JJ, Liang TJ. Hepatitis C -- identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology* 2006;43:S194-206.
 - 25 3. Lawson A, Ryder SD. Progression of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C and the need for treatment in mild disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:343-347. a Mann Whitney test
 4. Rodriguez-Torres M, Rodriguez-Orengo JF, Rios-Bedoya CF, Fernandez-Carbia A, Marxuach-Cuetara AM, Lopez-Torres A, Jimenez-Rivera J. Effect of hepatitis C virus treatment in fibrosis progression rate (FPR) and time to cirrhosis (TTC) in patients co-infected with human immunodeficiency virus: a paired liver biopsy study. *J Hepatol* 2007;46:613-619.
 - 30 5. Albanis E, Friedman SL. Antifibrotic agents for liver disease. *Am J Transplant* 2006;6:12-19.
 6. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994;20:15-20.
 - 35 7. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
 8. Winkfield B, Aube C, Burtin P, Cales P. Inter-observer and intra-observer variability in hepatology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:959-966.
 9. Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis-a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2006;44:111-117.
 - 40 10. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol* 1998;28:439-446.
 11. Pol S, Carnot F, Nalpas B, Lagneau JL, Fontaine H, Serpaggi J, Serfaty L, et al. Reversibility of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hum Pathol* 2004;35:107-112.

12. Goodman ZD, Becker RL, Jr., Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* 2007;45:886-894.
13. Levine RA, Sanderson SO, Ploutz-Snyder R, Murray F, Kay E, Hegarty J, Nolan N, et al. Assessment of fibrosis progression in untreated Irish women with chronic hepatitis C contracted from immunoglobulin anti-D. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1271-1277.
14. Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, Gallois Y, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005;42:1373-1381.
15. Cales P, de Ledinghen V, Halfon P, Bacq Y, Leroy V, Boursier J, Foucher J, et al. Evaluating the accuracy and increasing the reliable diagnosis rate of blood tests for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2008;28:1352-1362.
16. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-1616.
17. Michalak S, Rousselet MC, Bedossa P, Pilette C, Chappard D, Oberti F, Gallois Y, et al. Respective roles of porto-septal fibrosis and centrilobular fibrosis in alcoholic liver disease. *J Pathol* 2003;201:55-62.
18. Hubert JB, Burgard M, Dussaix E, Tamalet C, Deveau C, Le Chenadec J, Chaix ML, et al. Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *Aids* 2000;14:123-131.
19. Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997;25:1028-1031.
20. Boursier J, Chaigneau J, Roullier V, Lainé F, Michalak S, Hubert I, Dib N, et al. Histological and non-invasive quantitation of liver steatosis. *J Hepatol* 2009;50:S357.
21. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003;38:257-265.
22. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol* 2001;34:730-739.
23. Deuffic-Burban S, Poynard T, Valleron AJ. Quantification of fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C using a Markov model. *J Viral Hepat* 2002;9:114-122.
24. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-832.
25. Sobesky R, Mathurin P, Charlotte F, Moussalli J, Olivi M, Vidaud M, Ratziu V, et al. Modeling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. The Multivirc Group. *Gastroenterology* 1999;116:378-386.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la progresión de la fibrosis hepática en un individuo, en el que dicho método es no invasivo, lo que significa que no se toma ningún tejido del cuerpo de dicho individuo y en el que la progresión de la fibrosis hepática se define como la evolución del nivel de fibrosis a lo largo del tiempo, comprendiendo dicho método las etapas de calcular la proporción entre el nivel de fibrosis y la duración de la causa, en la que la duración de la causa es el tiempo entre la edad en la que comenzó la causa y la edad de inclusión cuando se midió el nivel de fibrosis y la causa es la infección viral por hepatitis o enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) o alcohol, y en el que dicho nivel de fibrosis es una puntuación de la fibrosis o una puntuación del área de fibrosis (AOF), en el que:
- 5
- 10 la puntuación de la fibrosis es una puntuación obtenida combinando en una función de regresión logística o lineal los siguientes marcadores:
- cuando la causa es la infección viral por hepatitis: edad, sexo, α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), urea y gamma glutamiltranspeptidasa (GGT);
- 15
- cuando la causa es alcohol: edad, α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA) e índice de protrombina (PI);
 - cuando la causa es NAFLD: edad, peso corporal, plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), ferritina y glicemia;
- la puntuación del área de fibrosis es una puntuación obtenida combinando en una función de regresión logística o lineal los siguientes marcadores:
- 20
- cuando la causa es la infección viral por hepatitis: α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), plaquetas (PLT), urea, gamma glutamiltranspeptidasa (GGT) y bilirrubina;
 - cuando la causa es el alcohol: α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), índice de protrombina (PI) y plaquetas (PLT);
- 25
- cuando la causa es NAFLD: índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y glicemia.
2. Un método para evaluar la progresión de la fibrosis hepática en un individuo, en el que dicho método es no invasivo, lo que significa que no se toma ningún tejido del cuerpo de dicho individuo y en el que la progresión de fibrosis hepática se define como la evolución del nivel de fibrosis a lo largo del tiempo, comprendiendo dicho método las etapas de medir, en dos momentos diferentes t_1 y t_2 , los niveles de fibrosis $FL(t_1)$ y $FL(t_2)$ y calcular la proporción $FL(t_2)-FL(t_1)$ a (t_2-t_1) , en la que dicho nivel de fibrosis es una puntuación de la fibrosis o una puntuación del área de fibrosis (AOF), en la que:
- 30
- la puntuación de la fibrosis es una puntuación obtenida combinando en una función de regresión logística o lineal los siguientes marcadores:
- 35
- cuando la causa es la infección viral por hepatitis: edad, sexo, α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), urea y gamma glutamiltranspeptidasa (GGT);
 - cuando la causa es alcohol: edad, α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA) e índice de protrombina (PI);
 - cuando la causa es NAFLD: edad, peso corporal, plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), ferritina y glicemia;
- 40
- la puntuación del área de fibrosis es una puntuación obtenida combinando en una función de regresión logística o lineal los siguientes marcadores:
- cuando la causa es la infección viral por hepatitis: α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), plaquetas (PLT), urea, gamma glutamiltranspeptidasa (GGT) y bilirrubina;
 - cuando la causa es el alcohol: α -2 macroglobulina (A2M), hialuronato (HA), índice de protrombina (PI) y plaquetas (PLT);
 - cuando la causa es NAFLD: índice de protrombina (PI), plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y glicemia.
- 45

3. El método no invasivo de la reivindicación 2, en el que t_2-t_1 es un período de un año.
4. El método no invasivo de la reivindicación 2, en el que t_2-t_1 es un período de uno a seis meses.
5. Un método no invasivo para evaluar si un individuo es un formador de fibrosis lento, medio o rápido usando análisis discriminantes, en el que la progresión de fibrosis de dicho individuo se mide según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y el individuo se clasifica como un formadores de fibrosis lento, medio o rápido con referencia a una clasificación de pacientes determinada por análisis estadístico.

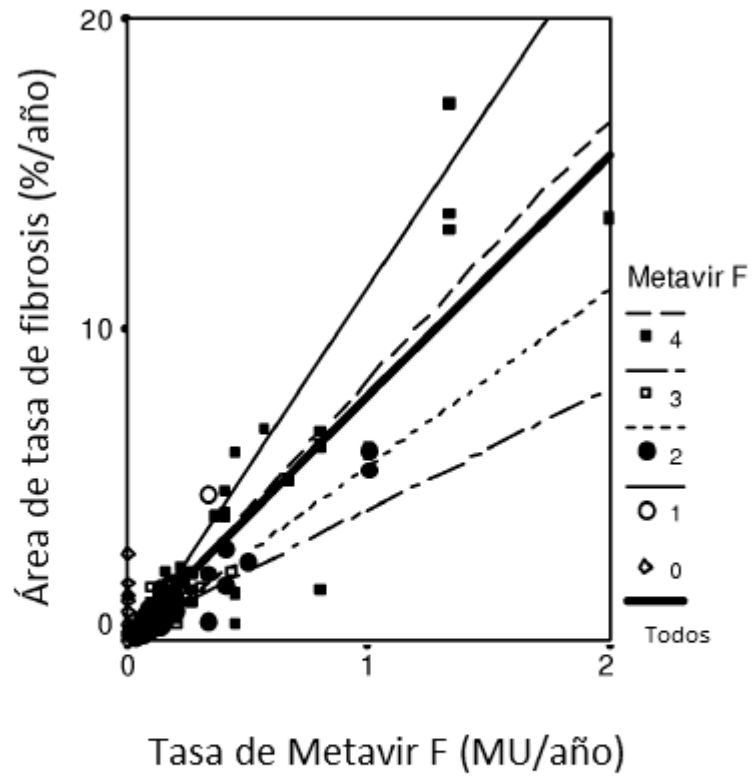


FIGURA 1

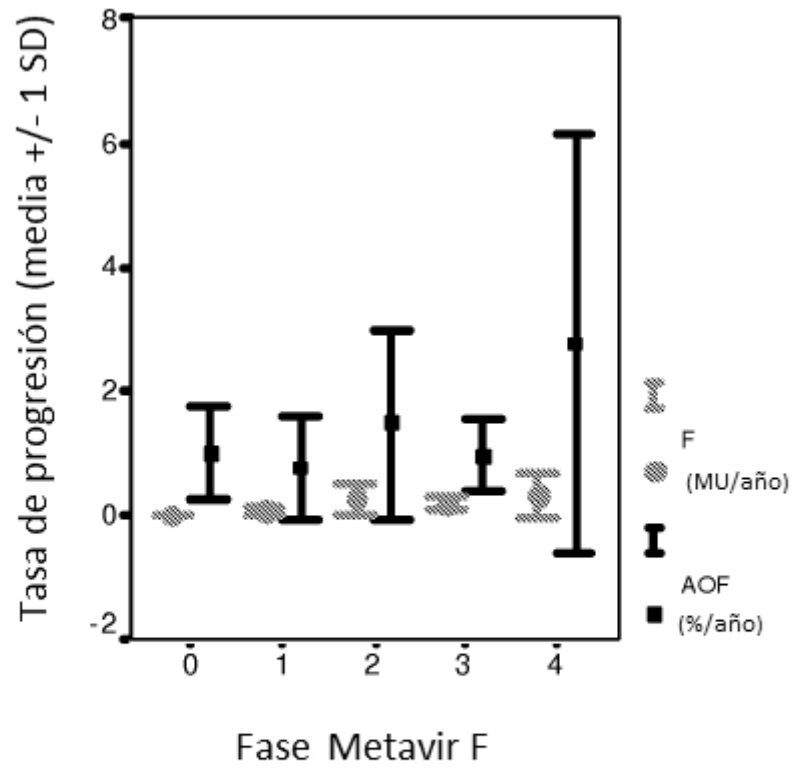


FIGURA 2

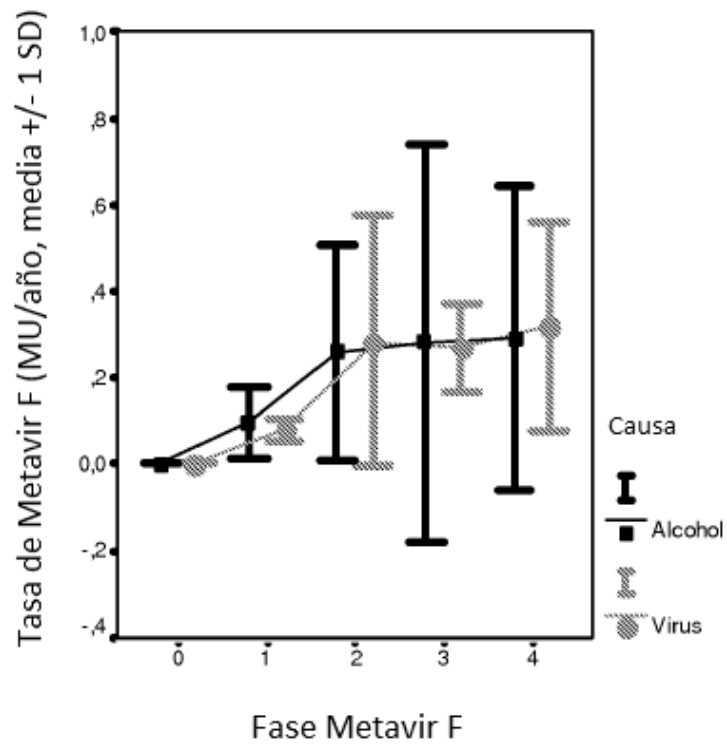


FIGURA 3A

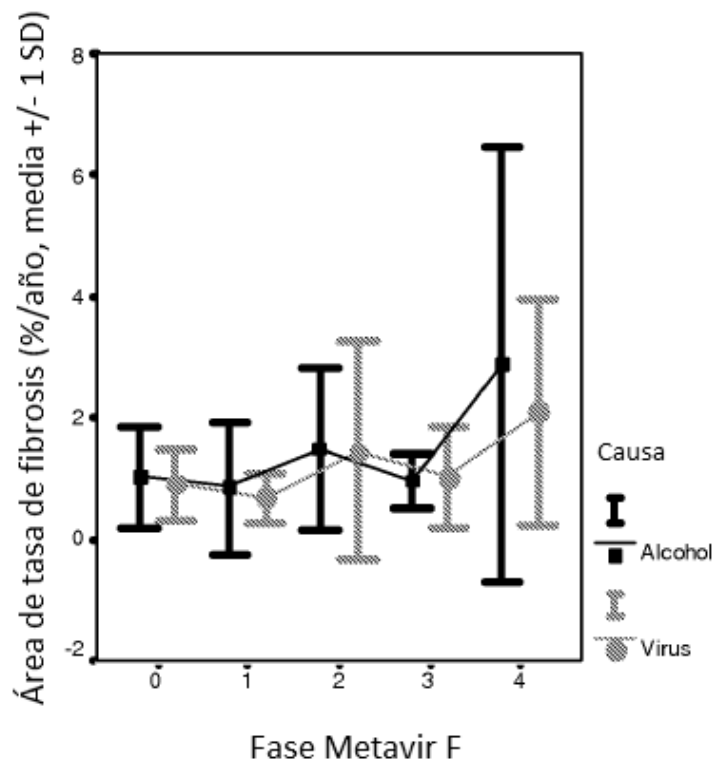


FIGURA 3B

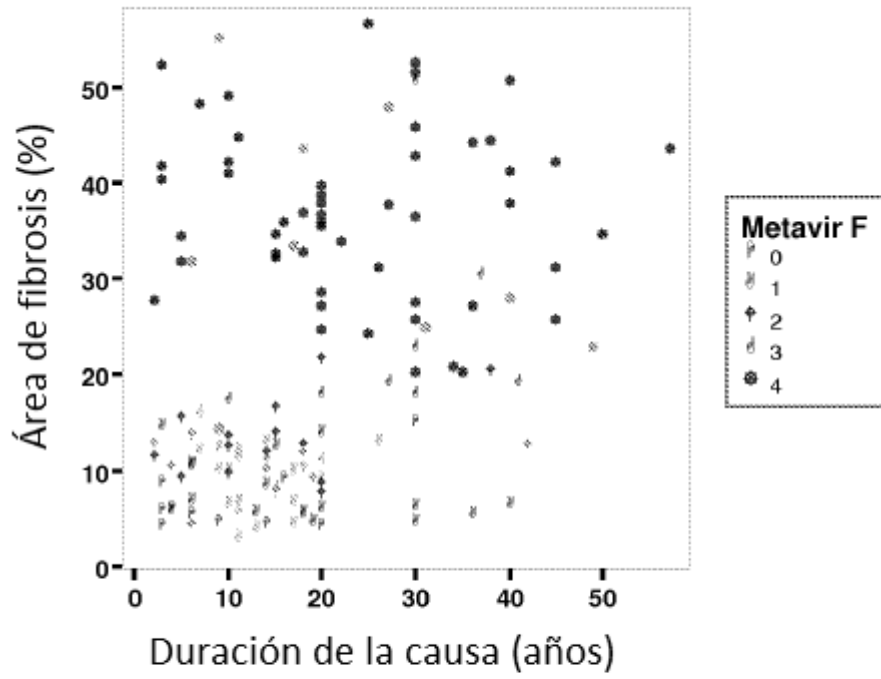


FIGURA 4

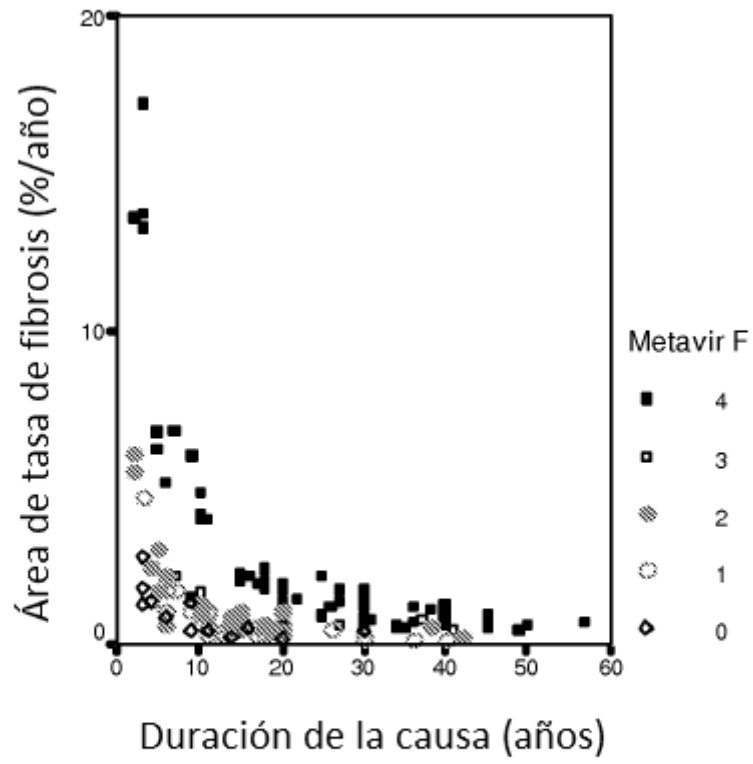


FIGURA 5

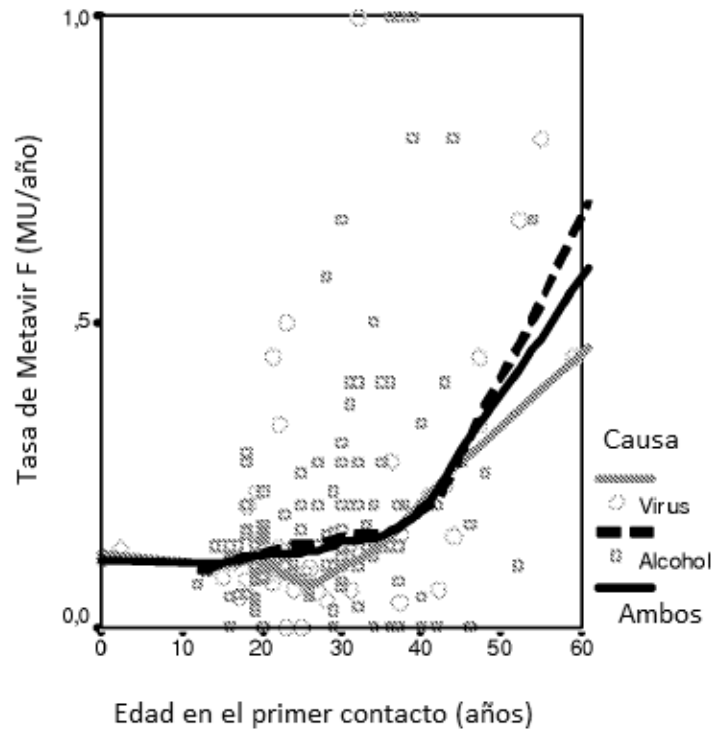


FIGURA 6A

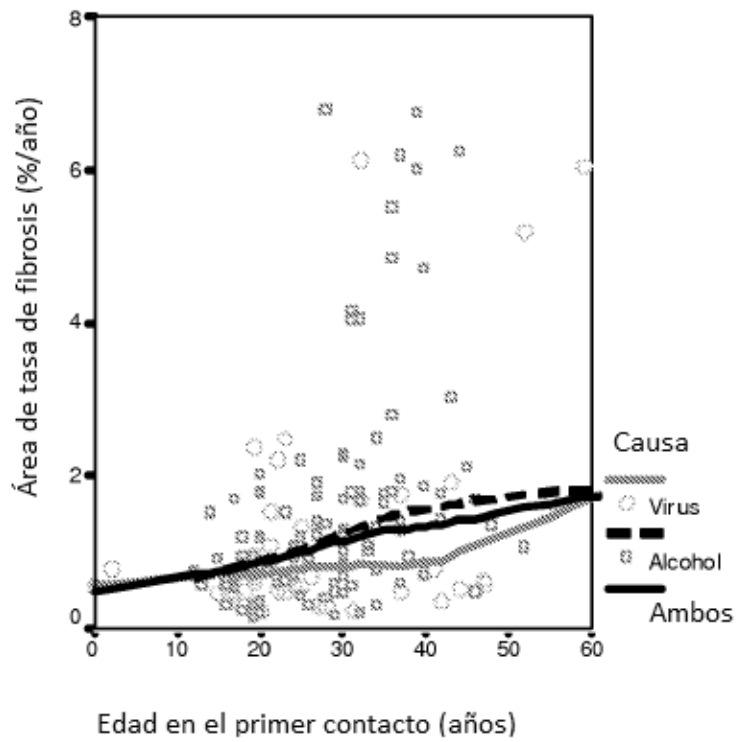


FIGURA 6B

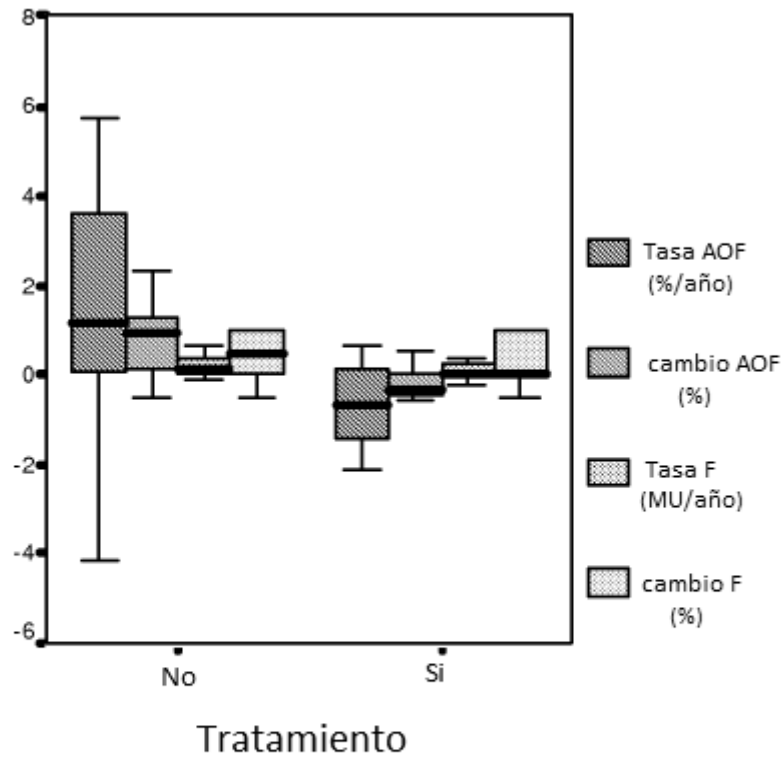


FIGURA 7

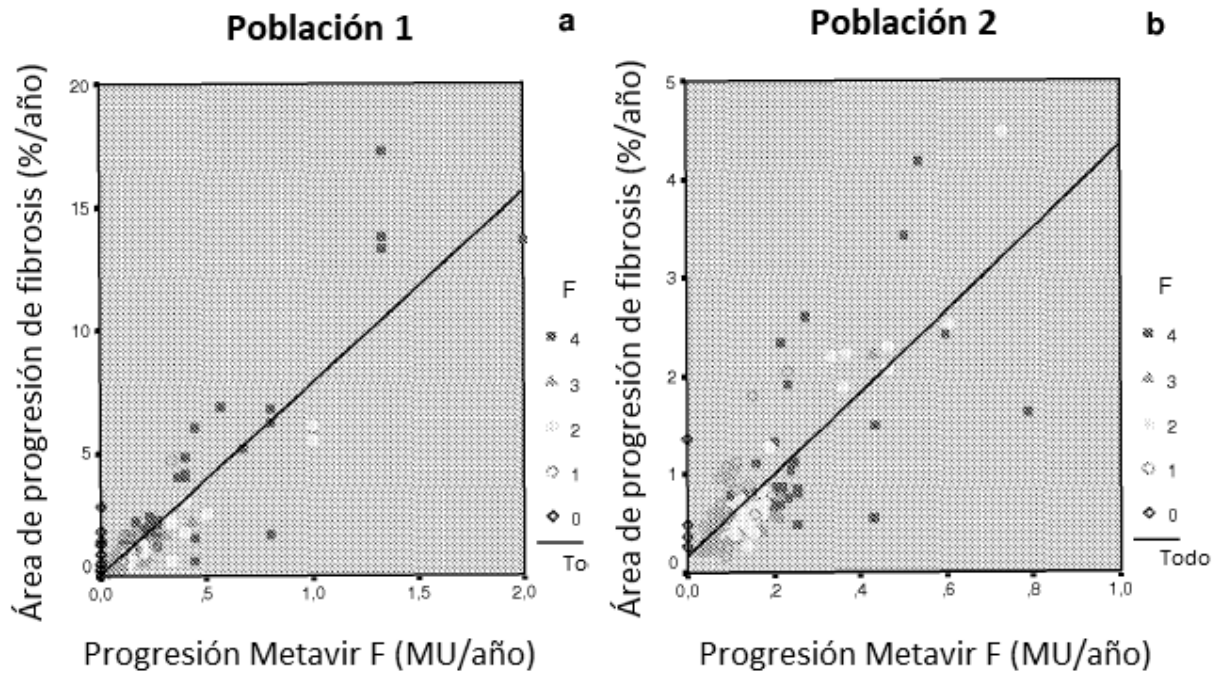


FIGURA 8

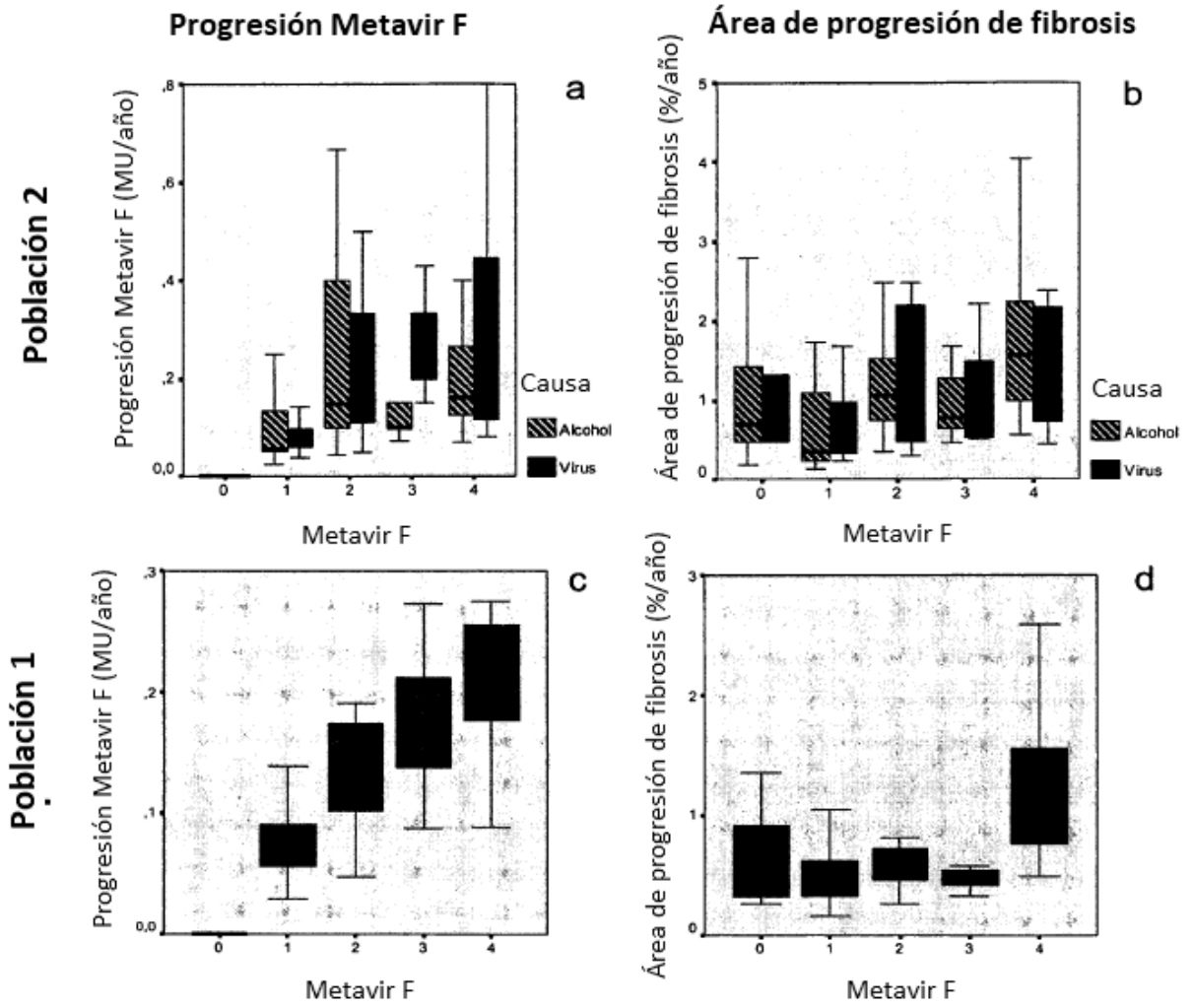


FIGURA 9

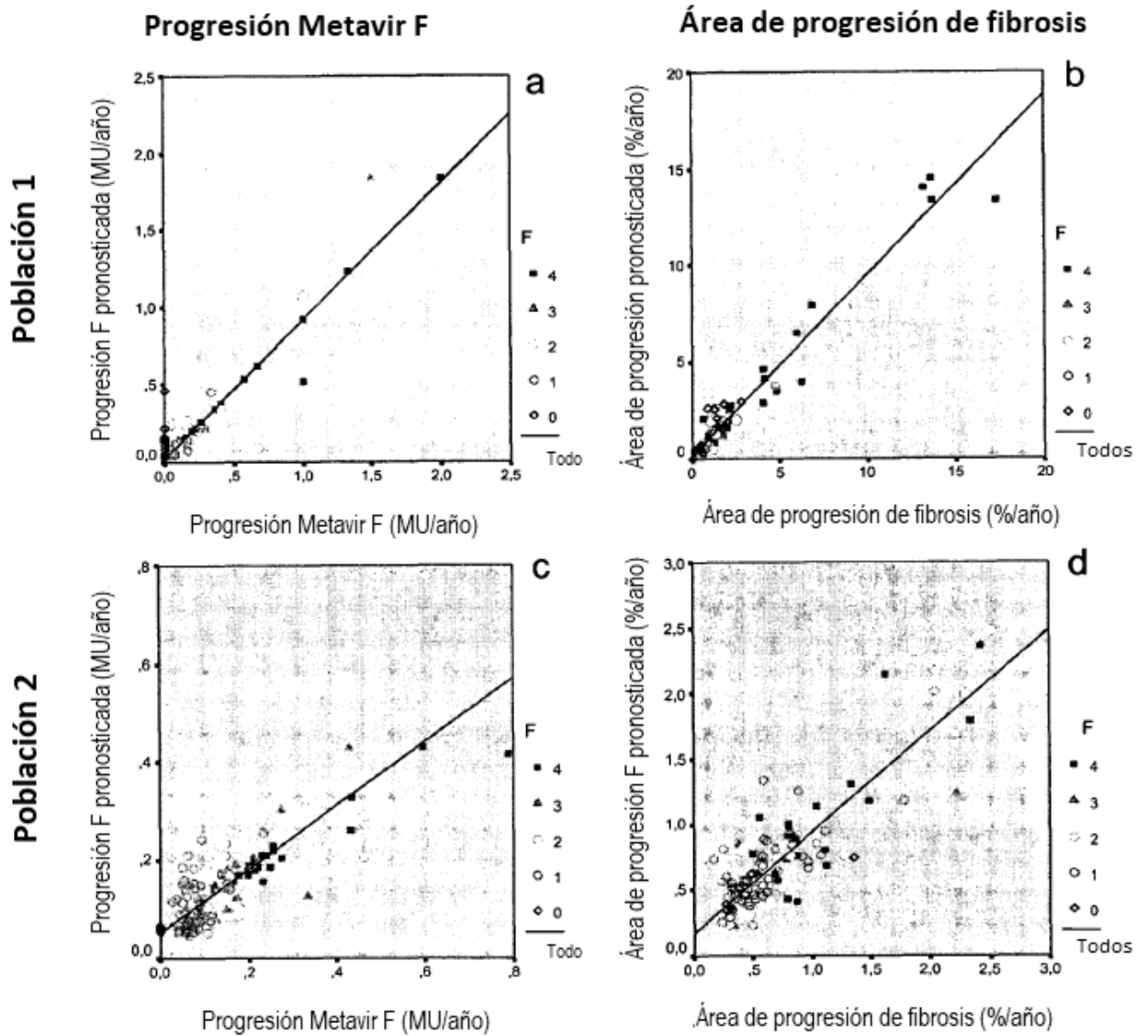


FIGURA 10

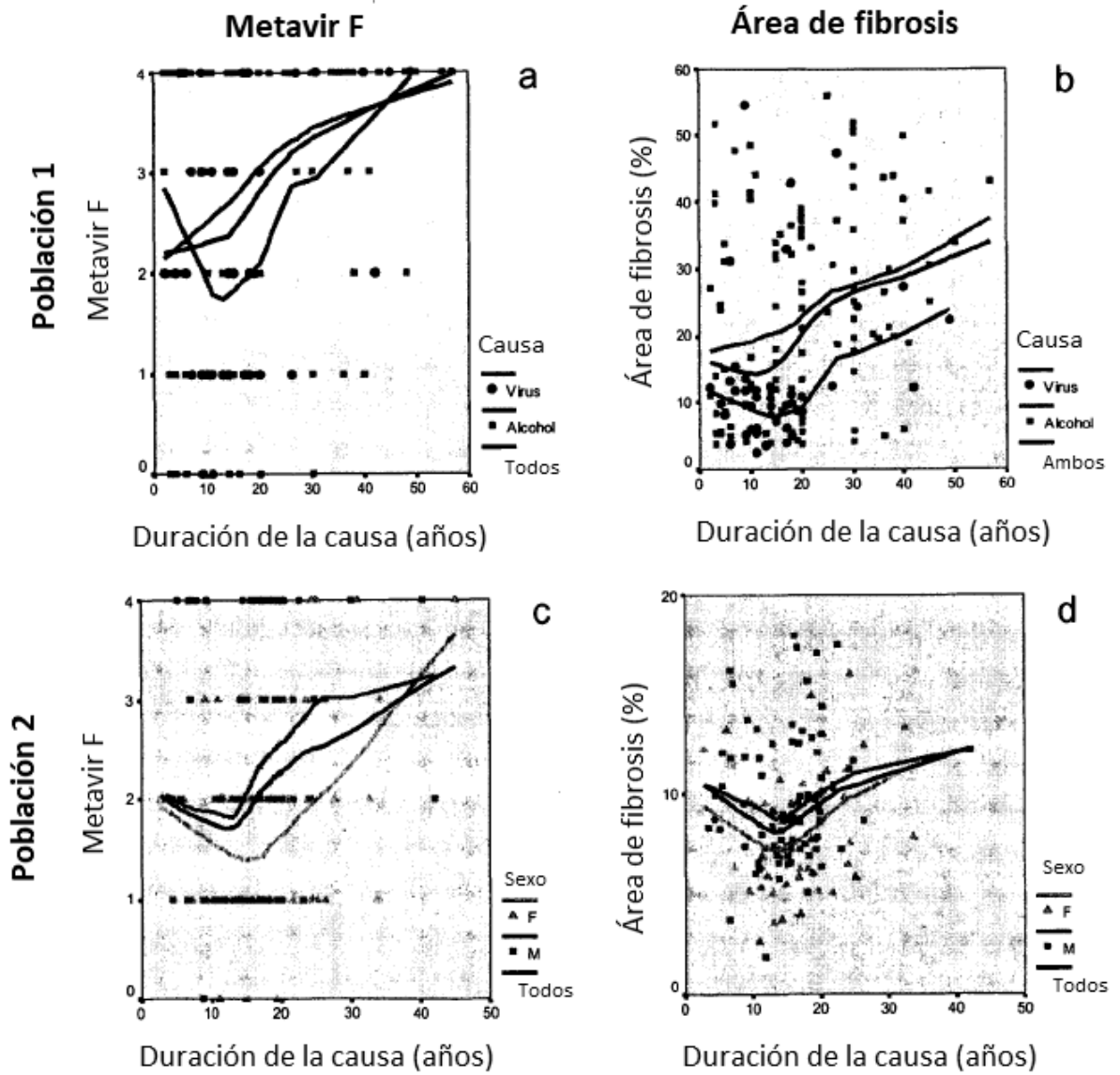


FIGURA 11

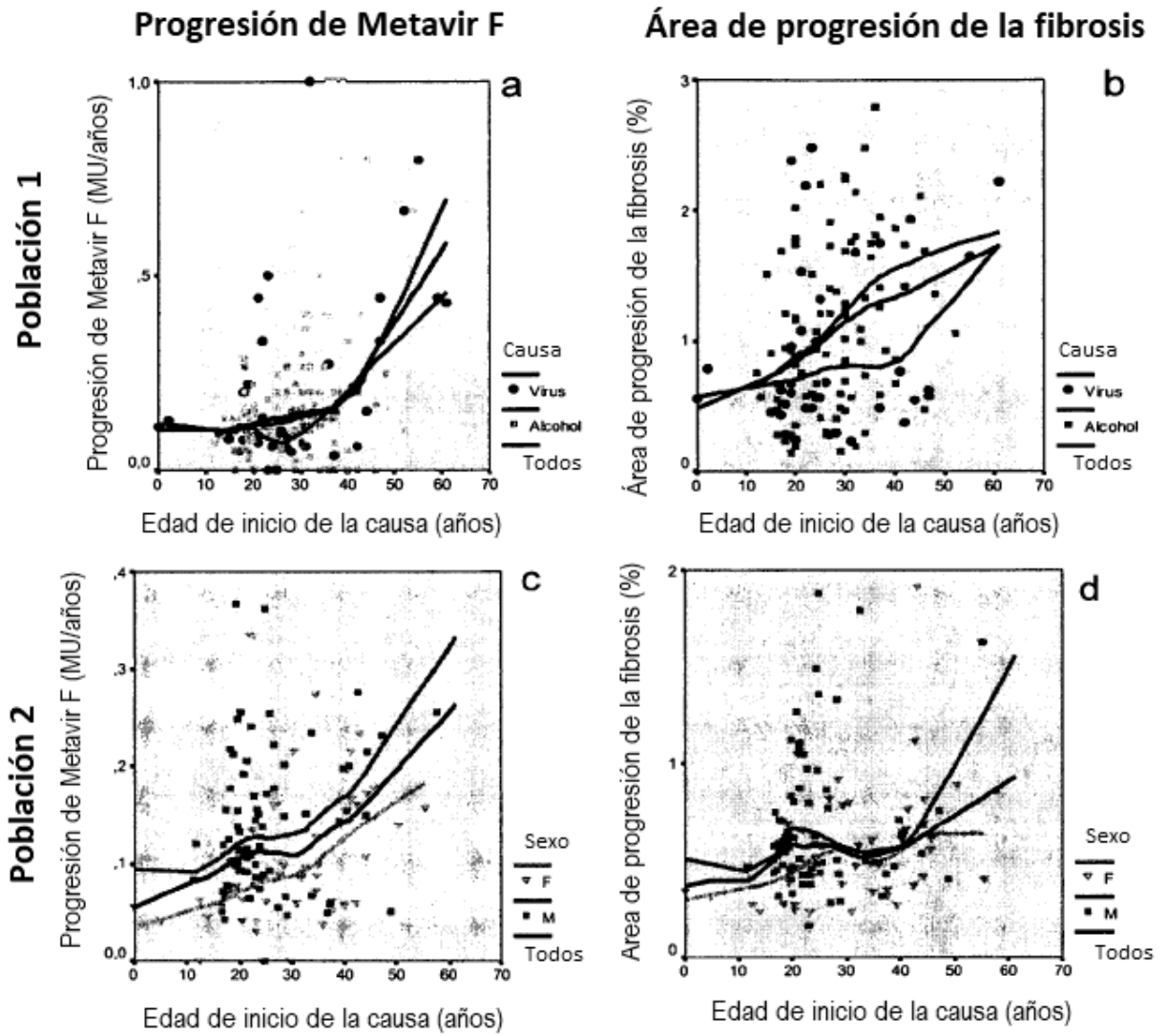


FIGURA 12

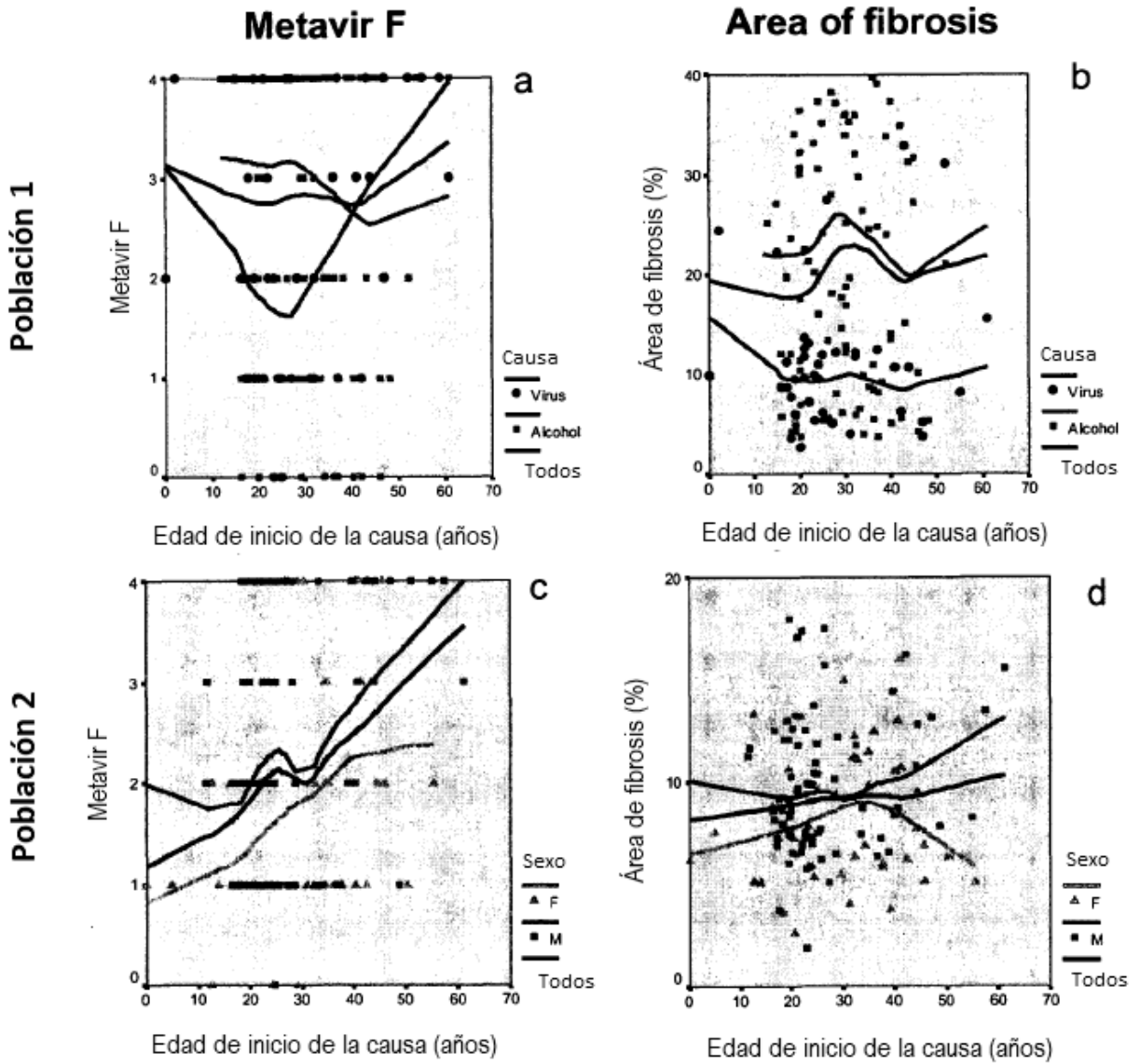
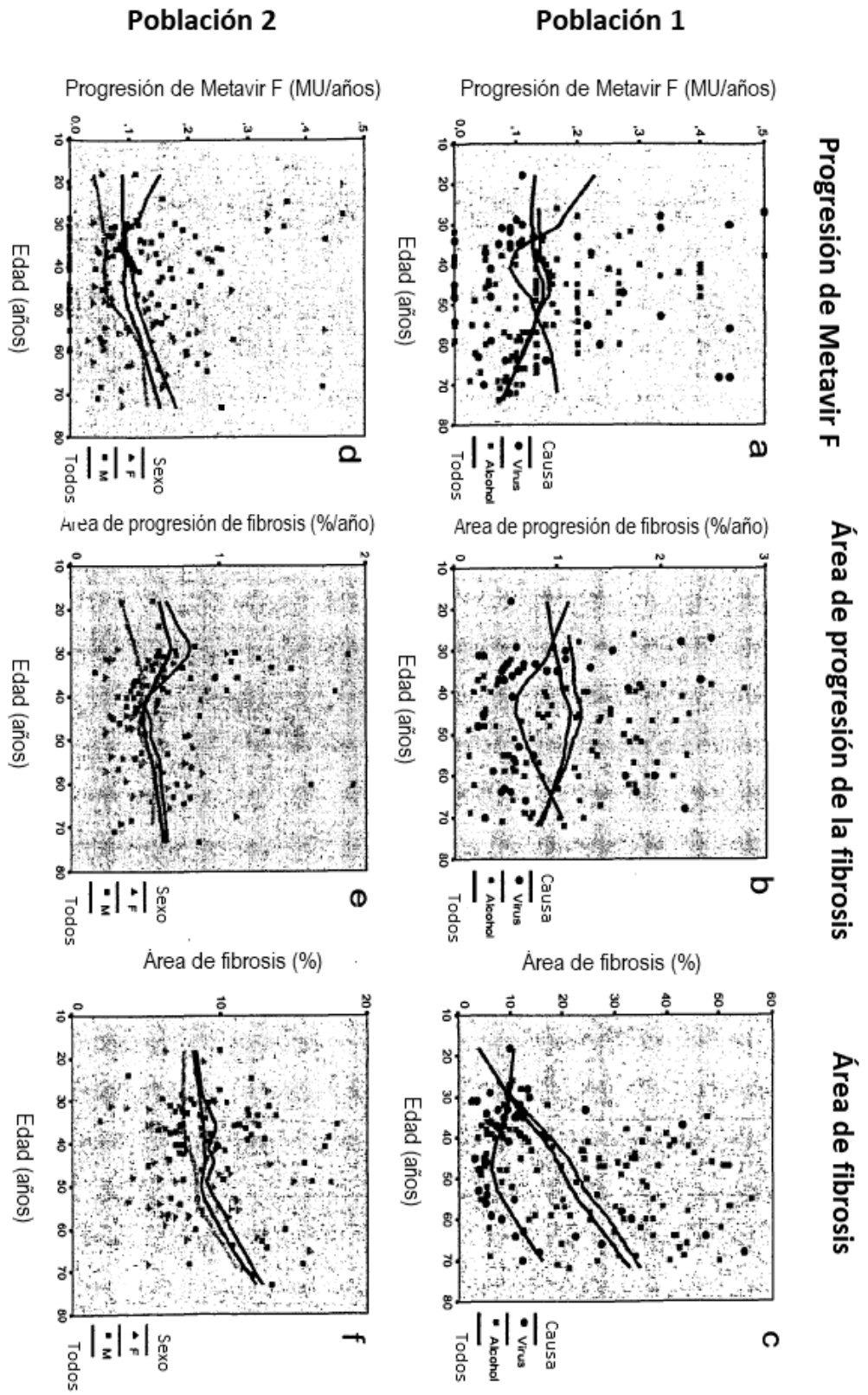


FIGURA 13



Progresión de Metavir F

Área de progresión de la fibrosis

Área de fibrosis

FIGURA 14

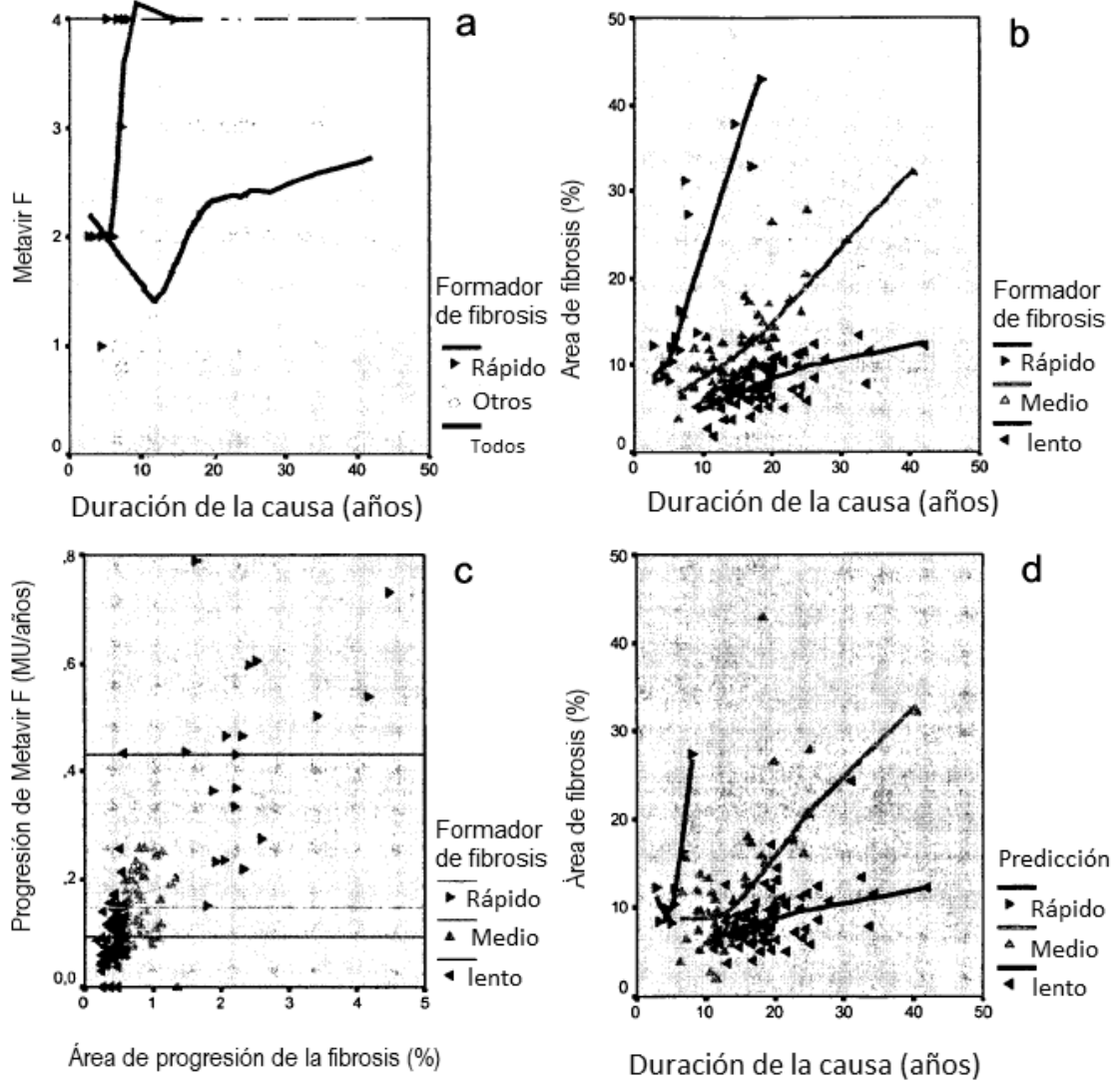


FIGURA 15

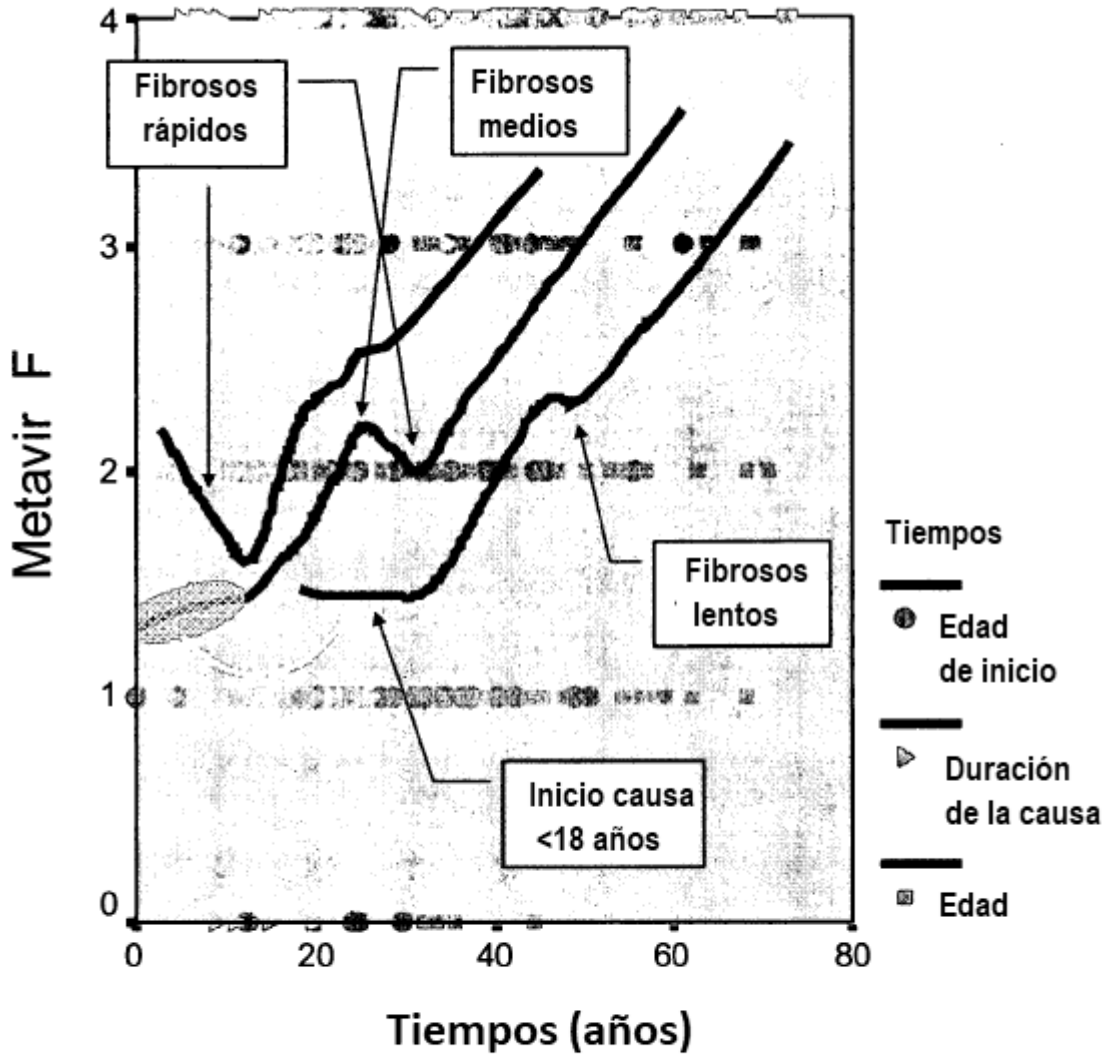


FIGURA 16