

El laboratorio en el estudio de la fibrosis hepática: de la biopsia a los marcadores séricos

I. Igualá, R. Deulofeu, M. Navasa

Resumen

La fibrosis hepática es el acúmulo excesivo de fibras de colágeno en la matriz extracelular en respuesta a un daño sostenido. Existe una clara evidencia de que la terapia antifibrótica mejora el pronóstico de los pacientes con hepatopatía. Por ello es necesaria una monitorización temprana y regular de la respuesta al tratamiento con marcadores no invasivos, y con resultados precisos, que permitan realizar controles más frecuentes que la biopsia hepática.

La fisiopatología de la fibrosis hepática consta de dos grandes estadios: el preinflamatorio y el de perpetuación. Existe un tercer estadio que se da en la recuperación de la fibrosis desde el daño hepático agudo: la resolución de la fibrosis, que podría darse por reversión de la activación de las células estrelladas hepáticas o por apoptosis.

Actualmente el método de referencia en la valoración de la fibrosis hepática es la biopsia hepática pese a su morbilidad, los errores asociados a la muestra y la variabilidad interobservacional. Existen estudios que cuestionan el valor de la biopsia hepática como método estándar de diagnóstico de fibrosis en favor de los marcadores séricos.

Además trabajos muy recientes demuestran que los índices con magnitudes séricas permiten establecer el grado de lesión hepática con una alta fiabilidad.

Palabras clave: Fibrosis hepática, marcadores bioquímicos, índices de fibrosis, biopsia hepática.

Summary: The laboratory in the study of liver fibrosis: from biopsy to serum markers

Hepatic fibrosis is the result of an excessive accumulation of collagen fibers in the extracellular matrix after a prolonged injury. Evidence clearly shows that anti-fibrotic therapy improves prognosis of fibrotic patients.

Therefore, early and periodical monitoring of the response to treatment is necessary by using precise, non-invasive markers that allow us to perform a more frequent control than liver biopsy.

Physiopathology of hepatic fibrosis comprises two main phases: pre-inflammatory and perpetuation. A third stage exists in the recovering from the acute hepatic injury; fibrosis reduction could occur by HSC inactivation or apoptosis.

Up to now, the gold standard method for assessing liver fibrosis is needle biopsy, despite its high morbidity, sampling error and high between-observer variation. Several studies suggest that serum markers could be better than liver biopsy as a diagnostic tool for fibrosis. Moreover, recent findings demonstrate that serum indices which include serum markers allow us to assess the degree of liver injury with high reliability.

Key words: Liver Fibrosis; Biological Markers; Fibrosis Indices Biopsy.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis hepática es el acúmulo excesivo de fibras de colágeno en la matriz extracelular que se produce, con función reparadora, en respuesta a un daño sostenido. El concepto de fibrosis hepática ha evolucionado en los últimos 20 años de ser una disciplina puramente de laboratorio a un área de gran relevancia en la práctica clínica de la hepatología. Esta evolución es el reflejo de un mayor conocimiento no sólo de los mecanismos moleculares de la fibrosis sino también de su historia natural y de los métodos de detección de la enfermedad hepática crónica. Estos avances han culminado en una clara evidencia de que, aunque una vez instaurada la cirrosis (fibrosis más transformación nodular del parénquima hepático que conllevan alteraciones vasculares importantes) es irreversible, la fibrosis hepática puede revertir (1) y que la terapia antifibrótica efectiva modificará significativamente el manejo y pronóstico de los pacientes con enfermedad hepática. En vista de este importante progreso, los clínicos pueden afrontar la fibrosis hepática bajo una perspectiva diferente, es decir, como un

problema clínico definido y susceptible de tener sus pruebas diagnósticas específicas y, muy importante también, un tratamiento, independientemente de su etiología.

Así pues, existe una urgente necesidad de marcadores específicos de fibrosis hepática no invasivos por razones importantes:

1. Mientras que millones de pacientes en el mundo están infectados por el virus de la hepatitis C (VHC), sólo una minoría desarrollan fibrosis importante o cirrosis. No hay ningún análisis sérico estándar, técnica de imagen o aná-

Abreviaturas no estandarizadas

VHC: virus de la hepatitis C
 VHB: virus de la hepatitis B
 HSC: células estrelladas hepáticas
 TGFβ: factor de crecimiento tumoral β
 PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
 MMP: metaloproteinasa de la matriz
 TIMP: inhibidor tisular de metaloproteinasas
 ALT: alanino aminotransferasa
 AST: aspartato aminotransferasa.
 GGT: gamma glutamil transpeptidasa
 Apo A: apolipoproteína A
 PICP: propéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I
 PIIINP: propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III
 FGF: factor de crecimiento fibroblástico
 ILGF: factor de crecimiento insulinoide

Servei de Bioquímica Clínica. CDB. Servei d'Hepatologia, IMDM.
 Hospital Clínic Universitari de Barcelona.

lisis microbiológico de rutina que pueda distinguir los pacientes que tienen mayor riesgo de fibrosis progresiva. Estos pacientes requerirán una valoración de la fibrosis, exponiéndoles al riesgo potencial, inconvenientes y coste de la biopsia hepática, además de las limitaciones en su interpretación y sus falsos negativos.

2. Si se desarrollara un método diagnóstico no invasivo que realmente excluyera la presencia y/o posibilidad de fibrosis importante, se podría racionalizar el uso de la terapia antiviral y, además, podría ser controlada fácil y regularmente para confirmar si hay o no progresión de la fibrosis.
3. Cada vez existen más evidencias de que la fibrosis avanzada puede ser reversible, igual que cada vez hay análisis, más sensibles y específicos, realizables con más frecuencia y que pueden tener una gran eficacia para determinar la evolución de la enfermedad durante la terapia.

El desarrollo de las terapias antifibróticas obliga a una monitorización temprana y regular de la respuesta al tratamiento para poder optimizar la dosis efectiva. La monitorización se tendría que realizar con una frecuencia elevada, lo que sería impensable con la biopsia hepática.

ASPECTOS GENERALES DE LA FIBROSIS Y LA CIRROSIS

La fibrosis y cirrosis representan las consecuencias de una respuesta, en principio reparadora, a un daño sostenido debido a una enfermedad hepática crónica de diferentes causas como los virus, procesos autoinmunes, fármacos, tóxicos, colestasis y alteraciones metabólicas. En la fase final de cirrosis existe desestructuración del tejido y se caracteriza por la formación de nódulos de regeneración y una función hepática muy disminuida.

La evolución de hepatitis crónica a cirrosis está asociada a un proceso dinámico en el que existe un desequilibrio entre síntesis y degradación de fibra favorable al depósito de colágeno. Hoy día ha quedado bien demostrado por múltiples evidencias (2) que revertir la cirrosis es con frecuencia posible pero aún así, la detección precoz de la fibrosis hepática puede influir favorablemente en la elección y la eficacia del tratamiento. Las manifestaciones clínicas de cirrosis son ampliamente variadas, desde asintomática a fallo hepático, y están determinadas por la naturaleza y la gravedad de la enfermedad hepática, así como por la extensión de la fibrosis hepática. Más del 40% de los pacientes con cirrosis son asintomáticos y pueden permanecer así más de una década, pero el deterioro progresivo es inevitable una vez se desarrollan complicaciones como la ascitis, varices hemorrágicas o encefalopatía (3) y presentan un 50% de mortalidad a los 5 años. Sin embargo, en pacientes asintomáticos, la cirrosis puede ser el primer hallazgo de una exploración de rutina o incluso ser diagnosticada en la autopsia y, aunque la biopsia aún es requerida para establecer el diagnóstico definitivo, el desarrollo de las técnicas de imagen y de laboratorio, hacen prever que pronto este procedimiento diagnóstico tan agresivo no será necesario en muchos de los casos.

La cirrosis afecta a cientos de millones de pacientes en el mundo. En Estados Unidos es la causa de muerte no neoplásica más común, seguida de la enfermedad hepatobiliar y digestiva, con aproximadamente 30.000 muertes por año. De éstas, alrededor de 10.000 muertes son por cáncer hepático, la mayo-

ría de ellos desarrollados en hígados cirróticos, con una mortalidad constantemente en aumento (4,5).

La composición molecular del tejido fibroso en la cirrosis es similar, independientemente de la etiología, y la forman los componentes de la matriz extracelular, mayormente colágenos tipo I y III, proteoglicanos glicosaminoglicanos y glicoproteínas (6). Estos componentes de la matriz se van acumulando formando una red que va aumentando y destruye el estroma hepático sano.

ETIOLOGÍA DE LA FIBROSIS HEPÁTICA Y LA CIRROSIS

La fibrosis que evoluciona a cirrosis suele acompañarse de una hepatopatía crónica que se caracteriza por la presencia de alteración hepatobiliar o inflamación. La gran mayoría tiene hepatitis crónica vírica o esteatohepatitis asociada con alcohol u obesidad. Otras etiologías menos frecuentes que también pueden originar fibrosis son: infección parasitaria (como la esquistosomiasis), enfermedades autoinmunes que afectan a los hepatocitos o al epitelio biliar, enfermedad hepática neonatal, alteraciones metabólicas como la enfermedad de Wilson o la hemocromatosis, afectaciones inflamatorias crónicas (como la sarcoidosis), la toxicidad por fármacos (como el metotrexato o la hipervitaminosis A) y anomalías vasculares, tanto congénitas como adquiridas. De todas estas, la historia natural que mejor se ha estudiado es la del VHC, con alguna información del virus de la hepatitis B (VHB) y las enfermedades esteatóticas como la hepatopatía alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica. Los estudios sobre la progresión de la fibrosis en otras enfermedades es anecdótica, aunque existe un factor común en todas ellas y es que el desarrollo de la cirrosis requiere desde bastantes años a décadas, con dos notables excepciones: 1) la enfermedad hepática neonatal (niños con atresia biliar pueden presentar al nacimiento importante fibrosis y marcada alteración del parénquima); 2) un subgrupo de pacientes que tras el trasplante hepático por cirrosis por VHC (7) o VHB (8), desarrollan rápidamente una colestasis progresiva y cirrosis recurrente en meses, requiriendo trasplante. No hay una explicación clara para estos casos de fibrosis acelerada pero demuestran que la fibrosis no siempre es un proceso progresivo lento. Los mecanismos que provocan este rápido desarrollo de fibrosis son desconocidos pero podrían proporcionar importantes pistas sobre cómo controlar la fibrosis.

También existen casos de fibrosis sin evolución a cirrosis, como por ejemplo la fibrosis hepática congénita, púrpura trombocitopénica idiopática, metaplasia mieloide, diabetes y postrasplante renal.

FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBROSIS HEPÁTICA Y LA CIRROSIS

Los constantes estudios a nivel de investigación básica, que exploran los mecanismos de la fibrosis hepática, están proporcionando grandes avances en el conocimiento de su fisiopatología. El principal hallazgo ha sido la identificación de las células estrelladas hepáticas (HSC) y su evolución a miofibroblastos como clave en el origen de un conjunto de mediadores (citocinas entre ellos), colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular, proteasas y sus inhibidores, que forman parte de la respuesta del hígado ante un daño tisular.

Las características básicas del comportamiento de las células estrelladas hepáticas como son su activación, pérdida de retinoides, aumento de contractilidad, etc., y las citocinas dominantes en el daño hepático y fibrosis han sido enumeradas detalladamente en recientes revisiones (9,10,11). Incidiendo en el contexto de la activación de las células estrelladas encontramos tres áreas importantes de reciente progreso: el papel de las células inflamatorias, la contribución de la esteatosis en la fibrogénesis hepática y la regulación de la degradación de la matriz y su estrecha relación con la apoptosis de las células estrelladas en la resolución de la fibrosis.

Composición de la matriz en el hígado sano y fibrótico

El hígado sano tiene un componente epitelial (hepatocitos) y uno endotelial, macrófagos tisulares (células de Kupffer) y las células estrelladas perivasculares (antes llamadas células de Ito, lipocitos, células perisinusoidales, etc.); estas últimas son las células fundamentales en la fibrogénesis por su actividad de síntesis de colágeno.

En el sinusoides, el espacio subendotelial de Disse separa los hepatocitos del endotelio sinusoidal y contiene una fina capa de matriz extracelular, formada por un definido entramado de moléculas que proporcionan un soporte celular, al mismo tiempo que favorece el transporte de solutos y de factores de crecimiento. Esta capa de matriz extracelular también proporciona señales que mantienen la función diferenciada de las células circundantes. Durante el daño hepático la composición de la matriz extracelular se modifica y llega a ser como una cicatriz, deteriorándose la función hepatocelular por defectos de la comunicación celular. Se anticipa que si la terapia antifibrótica puede reconstituir el microambiente fisiológico del hígado, su función puede ser recuperada y, por tanto, desaparecer las manifestaciones clínicas.

La activación de las células estrelladas hepáticas es el proceso dominante en la fibrogénesis y los cambios progresivos en la función celular. Esta activación las transforma en células proliferativas, fibrogénicas y contráctiles (miofibroblastos), perdiendo su función de reserva de vitamina A.

Estos sucesos son el comienzo de la fibrosis y reciben el nombre de *estadio preinflamatorio*. La respuesta celular siguiente se llama *perpetuación* y consiste en procesos celulares que amplifican el fenotipo activado por medio de un aumento de la expresión de factores de crecimiento y de la sensibilidad a los mismos. La perpetuación es un proceso dinámico continuo (12,13).

Papel de la inflamación y la esteatosis en la activación de las células estrelladas hepáticas y la fibrosis

La fibrosis mediada por inflamación se atribuye a citocinas fibrogénicas liberadas por linfocitos, neutrófilos y células de Kupffer reclutadas en el hígado durante el daño hepático, debido a la estimulación paracrina y autocrina de las células estrelladas hepáticas. Esto incluye una serie de factores que regulan la función de las células estrelladas (14), como el factor de crecimiento tumoral β (TGF β), citoquinas, interleuquinas y ligandos del receptor tirosin-kinasa como el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estas moléculas pueden estimular la síntesis de matriz extracelular (sobre todo de colágeno), la proliferación celular y la liberación de retinoides por parte de las

células estrelladas. Al mismo tiempo, las células de Kupffer también producen óxido nítrico, el cual puede contrarrestar el efecto estimulador de las células estrelladas, reduciendo su proliferación y contractilidad.

La esteatosis es reconocida cada vez más como un determinante de la fibrosis hepática, tanto en hepatopatía alcohólica como en esteato-hepatitis no alcohólica y puede contribuir en la fibrogénesis, al menos de cuatro maneras distintas:

1. Estrés oxidativo mediado por citocromos (Cyp 2E1 y Cyp 4A), que es un estímulo fibrogénico directo.
2. Inflamación con liberación de citocinas y mediadores fibrogénicos (como ya hemos visto anteriormente).
3. Señal y actividad del receptor activador de proliferación del peroxisoma, se ha observado una relación indirecta entre este receptor y la fibrogénesis (15,16).
4. Disregulación de la leptina (17). Las células estrelladas producen leptina y su síntesis aumenta con la activación celular, produciéndose una importante liberación local de esta hormona (18). Además se ha visto que la leptina es fibrogénica mediante dos mecanismos, por un lado la estimulación de la producción de TGF β 1 por las células endoteliales sinusoidales (19,20) y por otro, por efecto autocrino sobre las propias células estrelladas.

Perpetuación de la activación de células estrelladas

El proceso de perpetuación incluye: pérdida de retinoides, proliferación, contractilidad, fibrogénesis, liberación de citocinas proinflamatorias, quimiotaxis y degradación de la matriz.

1. Fibrogénesis. La producción de matriz por las células estrelladas activadas está marcadamente aumentada por la acción de TGF β 1 (21) y, a su vez, son las más importantes productoras de TGF β 1 en la fibrosis hepática (22,23) aunque, también las células de Kupffer y las plaquetas secretan esta citocina. Por otro lado, el factor de crecimiento del tejido conectivo, que también es expresado por las células estrelladas durante la fibrosis hepática (24), es otro factor profibrogénico.
2. Contractilidad. Con su activación, se produce un marcado aumento de la contractilidad de las células estrelladas (25), produciéndose filamentos de actina nuevos y fibras de «stress». Esto lleva a un aumento de la resistencia portal por constricción de los sinusoides y por contracción del hígado cirrótico. La endotelina-1 es la clave del estímulo contráctil que actúa sobre las células estrelladas (26), y aunque estas células, igual que las de Kupffer y las células endoteliales, también producen óxido nítrico, que es el antagonista fisiológico de la endotelina-1 (27), en la hepatopatía crónica la balanza está inclinada a favor de esta última, aumentando la contractilidad neta (28,29), y con ello la presión intrahepática y portal.
3. Proliferación. El aumento del número de células estrelladas durante el daño hepático (30) es reflejo de la actividad de muchos factores pro-fibrogénicos y de su unión a receptores tirosin-kinasa (31). El PDGF es el estímulo proliferativo más potente sobre las células estrelladas (32,33), pero también han sido identificados como mitógenos la endotelina-1, la trombina, FGF, factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento similar a la insulina (32,9).
4. Liberación de citocinas. Las citocinas autocrinas juegan un papel vital en la regulación de las células estrelladas. Entre estas citocinas encontramos el TGF β 1, PDGF, FGF,

factor de crecimiento hepatocitario, el factor activador de plaquetas y la endotelina-1 (34), esta lista se va ampliando continuamente con nuevas citocinas que se van describiendo. Entre las citocinas antiinflamatorias producidas por las propias células estrelladas se ha identificado la IL-10 que se libera fundamentalmente durante las primeras fases de la activación de la HSC (35,36).

5. Quimiotaxis. Además de la proliferación local, las células estrelladas aumentan su número en la zona de la lesión por quimiotaxis o migración dirigida. Varias sustancias quimiotácticas han sido implicadas, como PDGF, IGF-I (37), endotelina-1 (38) y proteína quimiotáctica de los monocitos, siendo el PDGF el más potente (39).
6. Degradación de la matriz. Las metaloproteinasas son enzimas calcio-dependientes que degradan específicamente el colágeno y substratos no colágenos de la matriz extracelular (40). Las metaloproteinasas inactivas pueden ser activadas por medio de escisión proteolítica o ser inhibidas por unión a inhibidores específicos conocidos como TIMPs. Estos complejos proteicos se asocian en posiciones cuidadosamente definidas y la actividad colagenasa neta refleja la suma relativa de las metaloproteinasas activadas y sus inhibidores, especialmente los TIMPs. La razón principal por la que la fibrosis progresará a cirrosis es el fallo en la degradación de la matriz fibrosa acumulada. La metaloproteína de la matriz (MMP-1) es supuestamente la principal proteasa que degrada el colágeno tipo I. Alternativamente, es posible que otras enzimas como MT1-MMP y MMP-2 puedan tener también actividad colagenasa intersticial pero esta cuestión aún está sin resolver. Más importante es que el progreso de la fibrosis está asociado a aumentos importantes de TIMP-1 y TIMP-2, que lleva a un descenso neto de la actividad proteasa y, por lo tanto, mayor acúmulo de matriz. Las células estrelladas son las principales productoras de estos inhibidores (41). La expresión sostenida de TIMP-1 está surgiendo como la clave principal de la progresión de la fibrosis. El estudio de la regulación transcripcional del TIMP-1, ha demostrado que la activación del TIMP-1 que se produce en la fibrosis, es dependiente del JunD (42) y de la unión de una proteína de 30 kDa a un elemento promotor específico llamado UTE-1 (43).

Resolución de la fibrosis

Durante la recuperación de la fibrosis hepática desde el daño hepático agudo, tanto en pacientes como en modelos experimentales, el número de células estrelladas activadas disminuye conforme la integridad del tejido se va restableciendo. Al menos, se podrían dar dos posibilidades, la reversión de la activación de las células estrelladas o la eliminación selectiva de las células estrelladas activadas induciendo apoptosis:

- Reversión. No se sabe si una célula estrellada activada puede regresar al estado quiescente in vivo aunque sí que se ha observado en cultivo (44).
- La apoptosis de HSCs probablemente contribuye a la disminución del número de células estrelladas activadas durante la resolución de la fibrosis hepática (45). La apoptosis podría ser la forma de frenar la activación de HSCs en el hígado sano. Y, en el daño continuado, la apoptosis podría ser inhibida por factores solubles y componentes de la matriz que están presentes (46). De hecho, la apoptosis espontánea tiene lugar en los cultivos de HSCs (47). Ade-

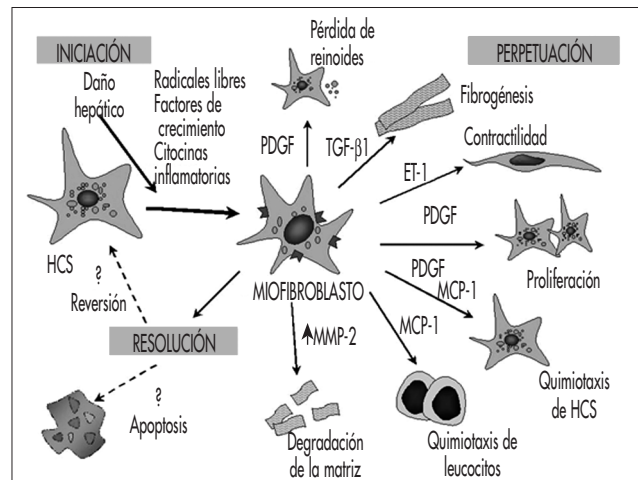


Figura 1 Fisiopatología de la fibrosis hepática mediada por las células estrelladas hepáticas (HCS)

más, las HSCs transdiferenciadas expresan la «muerte celular» por los receptores de membrana, Fas y su ligando, y la apoptosis se puede inducir con anticuerpos activadores del Fas (48). Otro receptor de muerte celular, el receptor del factor de crecimiento nervioso, se expresa también en las HSCs activadas y su estimulación por unión de su ligando conduce a la apoptosis (49).

Los factores de supervivencia también regulan la actividad neta de la apoptosis de las células estrelladas. Así el IGF-I y el TNF- α , facilitan la supervivencia de HSC mediante la vía de PI 3-K/c-Akt y la vía NF-kB, respectivamente. Y las moléculas que regulan la degradación de la matriz también aparecen estrechamente relacionadas con la supervivencia y la apoptosis. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de MMP-2 por TIMP-1 bloquea la apoptosis (50).

Las interacciones entre HSCs y la matriz circundante también influyen en su propensión hacia la apoptosis y esto podría, en parte, explicar la actividad anti-apoptótica del TIMP-1. Además, la matriz extracelular fibrótica envía importantes señales de supervivencia de las células estrelladas activadas (51). En modelos experimentales está visto que los animales que presentan un colágeno I mutante, resistente a la degradación, producen más fibrosis de manera sostenida y menor apoptosis de las células estrelladas, manteniendo el daño hepático. Más recientemente, este principio de acción ha generado un cierto interés por la importancia de la apoptosis durante la regresión de la fibrosis con el uso de gliotoxina (52), una toxina fúngica que induce la apoptosis en HSCs, posiblemente por inhibición de NF-kB. Así, se ha demostrado, en el modelo de ratas con fibrosis hepática por tetracloruro de carbono (CCl₄), que la gliotoxina disminuye el número de HSCs por inducción de la apoptosis (49). Estos datos apuntan a una inducción de apoptosis de las células estrelladas como una diana potencial de la terapia antifibrótica.

Todos estos mecanismos fisiopatológicos de la fibrosis hepática quedan esquematizados en la figura 1.

DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA Y LA CIRROSIS

El hallazgo de un exceso de tejido conectivo en la biopsia hepática ha sido considerado durante mucho tiempo el *están-*

dar de oro en la valoración de la anatomía patológica hepática y la fibrosis. Sin embargo, es un método diagnóstico caro y agresivo y, además, si añadimos el hecho de que se suele realizar en pacientes con un grado de afectación importante y con trastornos de coagulación inherentes, aumenta significativamente el riesgo y se complica la realización de la biopsia, requiriendo en muchos casos hospitalización.

Por otro lado, tiene importantes limitaciones pues sólo se obtienen unos pequeños cilindros de tejido de $20 \times 0,5$ mm de diámetro y la posibilidad del error asociado a la muestra es realmente importante. Este error aumenta cuando la afectación del tejido hepático no es difusa y la muestra obtenida sólo contiene uno o dos espacios porta o se aísla un nódulo de hepatocitos sin matriz circundante. Hay también una gran variabilidad interobservacional entre diferentes patólogos a la hora de catalogar el grado de fibrosis, de aproximadamente un 20% (53). Por otro lado la biopsia hepática proporciona datos de un momento puntual, no refleja hallazgos dinámicos del balance entre producción y degradación de la matriz extracelular y, por tanto, no es suficiente para revelar mecanismos patogénicos (54).

Actualmente las pruebas en las que se basan para valorar la fibrosis en la muestra de tejido son sistemas de puntuación como el *Metavir* o el *Ishak* (Knodell). El *metavir score* se compone de cinco estadios progresivos: F0, sano; F1, fibrosis portal; F2, pocos septos fibrosos; F3, numerosos septos y F4, cirrosis (55). El sistema de puntuación *Metavir* está bien validado, es reproducible y el uso de sólo cuatro grados de menor a mayor correlaciona con el método clásico de estadiaje en que se basan los patólogos mejor que el sistema *Ishak*. El *Ishak (Knodell) score* se compone de seis grados que incluyen la valoración tanto de fibrosis como de actividad inflamatoria (56). El mayor número de grados ayuda a discriminar mejor pero puede crear mayor discordancia con los patólogos.

La morfometría computerizada puede usarse para análisis cuantitativos de biopsias con tinción de tejido conectivo, especialmente con rojo picrosirius. Aunque es fácilmente reproducible, la morfometría no valora la patogénesis de la fibrosis de forma dinámica y adolece de los mismos errores de muestreo, ya que se usa material de biopsia.

Por otra parte, los estudios por imágenes empiezan a tener cierto interés en cuanto a su uso en el diagnóstico, aunque requieren experiencia por parte de quien los realiza. Los avances tecnológicos están abriendo nuevas posibilidades en la detección de la enfermedad. El ultrasonido acompañado de estudio Doppler color brinda una medición adecuada de los cambios en el flujo sanguíneo e informa sobre la presencia de hipertensión portal. La tomografía axial computerizada también proporciona buena información, sobre todo en lesiones focales o en entidades como la hemocromatosis. Del mismo modo, la resonancia magnética nuclear se utiliza para evaluar lesiones más pequeñas como los nódulos de regeneración. La gammagrafía hepática con coloide tecnecio⁹⁹ aporta datos indirectos sobre el estado funcional del hígado. Destacar que últimamente se han publicado algunos estudios sobre el uso del FibroScan (57,58), un método de imagen basado en la medida de la rigidez del tejido hepático mediante ultrasonidos, que se está empezando a utilizar para valorar el grado de fibrosis y parece tener resultados prometedores, sobre todo cuando se combina con la determinación de índices de marcadores séricos (59). Otros estudios como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica tienen indicaciones específicas.

Tabla I. Características del marcador sérico ideal de fibrosis hepática

- Órgano-específico
- Específico de fibrosis
- Inalterable con cambios metabólicos y excreción
- Determinación fácil y rápida
- Reproducible en cualquier laboratorio
- Correlación directa con la composición de la matriz extracelular
- Directamente proporcional al grado de fibrosis
- Capacidad de discriminar el estadio de fibrosis

Los exámenes de laboratorio que se utilizan de forma rutinaria en la enfermedad hepática se realizan con el objeto de descubrir, en la medida de lo posible, la etiología de la enfermedad y establecer su severidad. Por ejemplo, la elevación de la cifra de aminotransferasas orienta hacia la presencia de inflamación y necrosis del hígado, mientras que la relación entre ellas da información sobre la etiología: en las infecciones víricas aumenta más la alanina aminotransferasa (ALT), con respecto a la aspartato-aminotransferasa (AST); lo contrario sucede en enfermedad hepática tóxica (por alcohol sobretodo). Es necesario indicar que tales pruebas pueden a menudo no ser patológicas y no dan información pronóstica. En cambio la determinación de marcadores de función hepática como la albúmina sérica y de tiempo de protrombina sí que indica la magnitud del daño y el pronóstico en casos de cirrosis.

Marcadores séricos de fibrosis hepática

En general, cuando hablamos de marcadores séricos nos referimos a la determinación de una o varias moléculas presentes en la sangre total o en el suero que son, directa o indirectamente, indicadores de fibrosis en el hígado. Las posibles aplicaciones de los marcadores no invasivos incluirían la valoración inicial y la monitorización de la terapia antiviral o antifibrótica y deberían, además, aportar nueva información de la historia natural de la progresión y de la regresión de la fibrosis.

Las características que debería tener el marcador sérico ideal (tabla I), incluyen: ser hígado-específico, no variar con las alteraciones metabólicas, fácil de determinar y que no se afecte por alteraciones en la excreción renal y/o biliar. Además, este marcador ideal debería reflejar la fibrosis sea cual sea el origen del daño hepático, debería correlacionar con la composición de la matriz extracelular y debería ser lo suficientemente sensible como para poder discriminar los diferentes estadios de fibrosis que existen entre la hepatitis crónica y la cirrosis. De este modo, sería también una herramienta muy útil para monitorizar la respuesta a la terapia antifibrótica.

De momento, los marcadores de los que disponemos aún no cumplen todos los criterios suficientes para su uso rutinario en la clínica. Sólo correlacionan con la fibrosis cuando se analizan en grandes grupos de pacientes pero no son capaces de discriminar suficientemente el grado de fibrosis en un solo individuo, especialmente en el seguimiento a lo largo del tiempo. Sin embargo, recientes esfuerzos realizados estudiando combinaciones de varios marcadores en una misma muestra sérica permiten acercarnos cada vez más a este marcador sérico ideal.

Los estudios más actuales están dirigidos por un lado, a estudiar la utilidad diagnóstica y pronóstica de índices (60) basados en marcadores séricos clásicos de función hepática

Tabla II. Clasificación de los principales marcadores séricos de fibrosis hepática

Clásicos		Específicos de fibrosis			
de función	de inflamación	colágenos	glicoprot / polisac	enzimas	citocinas
albúmina	haptoglobina	colágeno I	YKL-40	lisil-oxidasas	IL-10
AST / ALT	alfa-2-macro	colágeno IV	Acido Hialurónico	prolil-oxidasas	IFN- γ
GGT	Apolipoproteína A1	Colágeno VI	laminina	prolil-hidroxilasas	TNF- α
Bilirrubina Total/directa		PICP	tenascina	MMP-1 / TIMP-1	TGF- β
Colesterol / triglicéridos		PIIINP		MMP-2 / TIMP-2	
Fosfatasa alcalina					

Alanino aminotransferasa (ALT), Aspartato-aminotransferasa (AST), Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), Propéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (PICP), Propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III (PIIINP), Proteína mamífera miembro de la familia citinética (YKL-40), Metaloproteinasas de la matriz (MMP) y su Inhibidor tisular (TIMP), Interleuquina (IL), Interferón (IFN), Factor de necrosis tumoral (TNF), Factor de crecimiento tumoral (TGF)

Tabla III. Magnitudes incluidas en los índices usados como marcadores de fibrosis hepática

FibroTest	ActiTest	Forns	APRI	Hepascore	HALT
- Haptoglobina	- Haptoglobina	- GGT	- AST	- Bilirrubina	- Plaquetas
- Alfa-2-macroglobulina	- Alfa-2-macroglobulina	- Colesterol	- Plaquetas	- GGT	- AST
- Bilirrubina total	- Bilirrubina total	- Plaquetas	- Edad	- Acido Hialurónico	- ALT
- Apolipoproteína A1	- Apolipoproteína A1	- Edad		- Alfa-2-macroglobulina	- INR
- GGT	- GGT			- Edad/sexo	
- Edad / sexo	- ALT				
	- Edad / sexo				

Alanino aminotransferasa (ALT), Aspartato-aminotransferasa (AST), Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), Cociente internacional normalizado del Tiempo de Protombina (INR)

(albúmina, AST, ALT, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), bilirrubina total y directa, colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina) y de inflamación (haptoglobina, α -2-macroglobulina, Apo-A1) y, por otro, a determinar constituyentes que forman parte de la matriz extracelular y las enzimas que regulan su formación o metabolismo, como son: a) los colágenos y sus precursores: propéptidos que se generan por el proceso de maduración de estas moléculas y su incorporación al tejido fibrótico, como los propéptidos del colágeno tipo I y III (61,62) y el colágeno tipo IV; b) glicoproteínas y polisacáridos como el YKL-40 (63), el ácido hialurónico (64,65,66), laminina y tenascina; c) enzimas implicadas en la síntesis de la matriz extracelular como lisil-oxidasas, prolil-hidroxilasas y lisil-hidroxilasas, y también en su degradación, como las metaloproteinasas (67) (MM-P1, MM-P2 (68)), sus inhibidores (TIMP-1, TIMP-2); d) citocinas relacionadas con la fibrosis hepática (69), como IL-10, IFN- γ , TNF- α y TGF- β (70) (tabla II).

Los dos índices en los que se centran la mayoría de los estudios son el **FibroTest** (71), que se basa en la asociación, determinada por regresión logística, de los valores séricos de 5 magnitudes bioquímicas, edad y sexo, con la fibrosis y, el **ActiTest**, que se basa en las mismas magnitudes pero añadiendo también la ALT (72,73,74). Ambos están comercializados. Existen además otras dos pruebas también utilizadas y más sencillas como el **Forns** (75), que utiliza la combinación de la edad y 3 magnitudes bioquímicas habituales en rutina (GGT, colesterol y recuento de plaquetas); el **APRI** (76), que utiliza un cálculo aún más sencillo que requiere únicamente dos magnitudes bioquímicas de rutina (AST y recuento de plaquetas); el **Hepascore** (77), cuyo cálculo se basa en la combinación de 4 magnitudes séricas (Bilirrubina, GGT, ácido hialurónico y α -2-macroglobulina) con la edad y el sexo y, por último una

fórmula proporcionada por el estudio **HALT** (78), que ofrece resultados interesantes y que es posible utilizar en la página web de dicho estudio (<http://www.haltctrial.org>) (tabla III). Pero hay controversias en las conclusiones de los diferentes estudios. A pesar de que la mayoría afirma que la utilización de estos índices puede reducir el número de biopsias, sobre todo en pacientes con riesgo y en los que está contraindicada (79), otros concluyen que no puede utilizarse en sustitución de la biopsia (80); en lo que sí que coinciden es en que estos índices son bastante predictivos de fibrosis en hepatopatía (81,82). Independientemente, a la hora de utilizar estas pruebas, siempre se debe tener en cuenta que su validez se debe valorar en las curvas ROC con un grupo de referencia y otro de validación. Además, su sensibilidad suele ser alta con valores extremos pero no tanto con valores intermedios.

Respecto al estudio de marcadores directamente relacionados con la composición y metabolismo de la matriz extracelular, los más estudiados son el colágeno tipo IV, el propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III (PIIINP), el ácido hialurónico, el YKL-40 y las metaloproteinasas con sus inhibidores. La mayor utilidad del ácido hialurónico puede ser su capacidad para excluir pacientes con fibrosis significativa y cirrosis (83). El YKL-40 es un marcador relativamente reciente que, en una comparación con las concentraciones séricas de PIIINP y ácido hialurónico en pacientes con hepatopatía, puede ser el mejor marcador para los estadios tempranos de fibrosis (84). Hay estudios comparativos que describen la superioridad del ácido hialurónico respecto al PIIINP para el diagnóstico de cirrosis (85,86,87). En un estudio que compara las concentraciones séricas de metaloproteinasas y sus inhibidores con el PIIINP y el ácido hialurónico en pacientes con VHC, obtienen como resultado, tras ajustar por las variables de confusión, que solamente el PIIINP y la MMP-1 están asociados

de forma independiente con la fibrosis (88). Además, muchos estudios muestran la disminución de varios de estos marcadores de fibrosis durante la terapia con interferón, incluyendo el ácido hialurónico, PIIINP, YKL-40 y TIMP-1 (89,90,91,92, 93,94). En Europa se está realizando un trabajo multicéntrico para desarrollar un panel de marcadores de fibrosis entre los que se incluyen PIIINP, propéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (PICP), colágeno VI, tenascina (una glicoproteína no colágena presumiblemente marcadora de fibrosis), undulina, colágeno XIV, laminina P1, ácido hialurónico, TIMP-1, MMP-2 y colágeno IV. Los resultados de la fase inicial de este estudio sugieren que la combinación de varias magnitudes puede distinguir muy bien entre estadios tempranos y tardíos de fibrosis disminuyendo su eficacia para los grados intermedios (95).

Pero todos estos trabajos de investigación utilizan como método estándar en la valoración de la fibrosis hepática la biopsia y en un estudio publicado recientemente por Poynard et al. se demuestra que, en un seguimiento prospectivo de un grupo de pacientes con hepatopatía crónica por virus C en los que existía discordancia entre los marcadores séricos y la biopsia, esta discordancia era atribuible a un fallo de la biopsia en un 18%, frente a un 2,4% de casos atribuible a un fallo de los marcadores (96). La cuestión que deberíamos plantearnos ahora es si los resultados de todos estos estudios que buscan marcadores séricos de fibrosis son realmente válidos, ya que en su gran mayoría se están valorando según los datos de la biopsia y, en este caso, ¿con qué «método estándar» deberíamos compararlos?

TRATAMIENTO

Actualmente hay inequívocas e importantes evidencias de que la cirrosis puede ser reversible y, como veremos a continuación, existen estudios que respaldan esta afirmación (97,98). El factor común para tratar los casos de cirrosis progresiva es la eliminación de la causa primaria de la enfermedad hepática: la erradicación del VHB (99) o el VHC (100), la descompresión de la obstrucción biliar en la pancreatitis crónica (101) o el tratamiento inmunosupresor en las enfermedades hepáticas autoinmunes (102). Por otra parte existe amplia evidencia de la reversibilidad de la fibrosis en modelos experimentales con animales que, además, proporcionan datos muy valiosos de los mecanismos de la hepatopatía (103).

Los primeros estudios demostraron que la fibrosis disminuía tras el tratamiento del VHC (104). Un estudio más reciente estableció que la fibrosis puede regresar con el tratamiento erradicador del VHC, consistente en la asociación de interferón α y ribavirina (100). En una gran cohorte de pacientes tratados con éxito con esta combinación, había 150 pacientes con cirrosis, la mitad de los cuales tuvieron una reducción en su grado de fibrosis de acuerdo al estadije medido por el Metavir, con regresión de dos o más grados (105).

Actualmente, en los estudios de tratamiento del VHC, no disponemos de métodos que nos permitan distinguir los pacientes que revertirán su cirrosis de los que no y tampoco sabemos si aquellos que no reducen su fibrosis en un seguimiento inicial, podrían beneficiarse de algún modo del tratamiento a más largo plazo. No obstante, los factores que potencialmente podrían influir en la reversibilidad de la fibrosis serían: 1) la duración de la cirrosis, que podría ser

reflejo de un largo período de recambio de colágeno, cuya interpretación sería que, con el tiempo, es más difícil la degradación por enzimas; 2) la cantidad total de colágeno y otras moléculas que forman parte de la fibra, que podrían formar una gran masa de cicatriz físicamente inaccesible a las enzimas; 3) disminución de la síntesis de enzimas que degraden la matriz o aumento sostenido de proteínas que inhiben su función. A pesar de todo, actualmente, los clínicos deben atender a los pacientes con hepatopatía crónica y cirrosis con la idea de que hay tratamientos que pueden revertir la fibrosis, ya sea dirigido a la enfermedad hepática primaria o reduciendo el acúmulo de fibra, y que está justificado aún cuando la enfermedad esté avanzada.

BIBLIOGRAFÍA

- Desmet VJ, Roskams T. Cirrosis reversal: a duel between dogma and Myth. *J Hepatology* 2004; 40: 860-7.
- Friedman SL, Arthur MJ. Reversing hepatic fibrosis. *Sci Med* 2002; 8: 194-205.
- Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112: 463-72.
- El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000; 160: 3227-30.
- Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002; 122: 1609-19.
- Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as modulator of stellate cell and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 351-72.
- Schiano TD, Kim-Schluger L, Gondolesi G, Miller CM. Adult living donor liver transplantation: the hepatologist's perspective. *Hepatology* 2001; 33: 3-9.
- Chen CH, Chen PJ, Chu JS, Yeh KH, Lai MY, Chen DS. Fibrosing cholestatic hepatitis in a hepatitis B surface antigen carrier after renal transplantation. *Gastroenterology* 1994; 107: 1514-8.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-50.
- Friedman SL, Maher JJ, Bissell DM. Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD Single Topic Basic Research Conference. *Hepatology* 2000; 32: 1403-8.
- Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and Function* 2003; 28: 105-12.
- Dooley S, Streckert M, Delvoux B, Gressner AM. Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 554-62.
- Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-106.
- Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 361-7.
- Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, et al. Ligands of peroxisome-proliferator activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 119(2): 466-78.
- Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee Jr. HF, Motomura K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 35715-22.
- Anania F. Leptin, liver and obese mice-fibrosis in the fat lane. *Hepatology* 2002; 36: 246-8.
- Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 178-82.
- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, et al. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288-97.
- Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, et al. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002; 36: 12-21.

21. Bachem MG, Riess U, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Transforming growth factors (TGF alpha and TGF beta 1) stimulate chondroitin sulfate and hyaluronate synthesis in culture rat liver fat storing cells. *FEBS Lett* 1989; 257: 134-7.
22. Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995; 22: 28-36.
23. Bissell DM, Wang SS, Jasnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96: 447-55.
24. Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30: 968-76.
25. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 337-50.
26. Racine-Samson L, Rockey DC, Bissell DM. The role of alpha 1 beta 1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J Biol Chem* 1997; 272: 30911-7.
27. Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995; 95: 1199-206.
28. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Grszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998; 28: 926-31.
29. Groszmann RJ. Nitric oxide and hemodynamic impairment. *Digestion* 1998; 59(suppl 2): 6-7.
30. Olaso E, Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; 29: 836-47.
31. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling during stellate cell activation. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416.
32. Pinzani M, Milani S, Grappone C, Weber FJ, Gentilini P, Abboud HE. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. *Hepatology* 1994; 19: 701-7.
33. Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest* 1994; 94: 1563-9.
34. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-40.
35. Wang SC, Tsukamoto H, Rippe RA, Schrum L, Ohata M. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-8.
36. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJP, et al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 1998; 28: 1518-24.
37. Gentilini A, Marra F, Gentilini P, Pinzani M. Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 32: 227-34.
38. Tangkijvanich P, Tam SP, Yee Jr Hf. Wound-induced migration of rat hepatic stellate cells is modulated by endothelin-1 through rho-kinase-mediated alterations in the acto-myosin cytoskeleton. *Hepatology* 2001; 33: 74-80.
39. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; 29: 1760-7.
40. Benyon D, Arthur MJP. Extracellular matrix degradation and the role of stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-84.
41. Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 43-54.
42. Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazzi M, Mann J, et al. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 24414-21.
43. Trim JE, Samra SK, Arthur MJ, Wright MC, McAulay M, Beri R, et al. Upstream tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30 kDa nuclear protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 6657-63.
44. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang L-H, Lin HC, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2 mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108(9): 1369-78.
45. Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-57.
46. Iredale JP. Stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 427-36.
47. Knittel T, Kobold D, Dudas J, Saile B, Ramadori G. Role of the Ets-1 transcription factor during activation of rat hepatic stellate cells in culture. *Am J Pathol* 1999; 155: 1841-8.
48. Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151: 1265-72.
49. Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1235-43.
50. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by TIMP-1 is mediated via effects on MMP inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 16161-7.
51. Iwamoto H, Sakai H, Tada S, Nakamuta M, Nawata H. Induction of apoptosis in rat hepatic stellate cells by disruption of integrin-mediated cell adhesion. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 83-9.
52. Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2001; 121: 685-98.
53. Fontana RJ, Lock AS. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: s57-s64.
54. Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatology* 2003; 38: S38-S53.
55. 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: 825-32.
56. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-5.
57. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12): 1705-13.
58. Colleta C, Smirne C, Fabris C, Toniutto P, Rapetti R, Minisini R, et al. Value to two non-invasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005; 42(4): 838-45.
59. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 343-50.
60. Fortunato G, Castaldo G, Oriani G, Cerini R, Intrieri M, Molinaro E, et al. Multivariate discriminant function based on six biochemical markers in blood can predict the cirrhotic evolution of chronic hepatitis. *Clin Chem* 2001; 47: 1696-1700.
61. Zachariae H, Heickendorff L, Sogaard H. The value of amino-terminal propeptide of type III procollagen in routine screening for methotrexate-induced liver fibrosis: a 10-year follow-up. *Br J Dermatol* 2001; 144(1): 100-3.
62. Torres-Salines M, Pares A, Caballeria J, Jiménez W, Heredia D, Bruguera M, et al. Serum procollagen type III peptide as a marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1986; 90: 1241-6.
63. Johansen JS, Müller S, Price PA, Bendtsen F, Junge J, Garbarsch C, et al. Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis?. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 582-90.
64. Pares A, Deulofeu R, Jiménez A, Caballeria L, Bruguera M, Caballeria J, et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996; 24: 1399-403.
65. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1998; 5: 187-92.
66. Pontinha N, Pessegueiro H, Barros H. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in asymptomatic chronic viral hepatitis B. *Scan J Clin Lab Invest* 1999; 59(5): 343-7.
67. Arthur MJ. Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol* 1995; 22: 43-8.
68. Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, et al. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997; 26: 1521-9.
69. Scott L, Friedman MD. Cytokines and fibrogenesis. *Seminars in liver disease*-vol.19, No.2. 1999.
70. Yamagami H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic human hepatocyte growth factor in patients with type C liver diseases. *Intervirol* 2001; 44(1): 36-42.

71. Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069-75.
72. Poinard T, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Chevret S, Jardel C, Moussali J, et al. Biochemical Markers of liver cirrhosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. The GERMED cyt-04 group. *J Viral Hepat* 2002; 9: 128-33.
73. Poinard T, McHutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J. Biochemical markers as surrogate markers of liver fibrosis and activity in patients infected by hepatitis C virus: an example in a randomized trial of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin combination (abstract). *Hepatology* 2002; 36: 351A.
74. Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F, Thibault V, Bochet M, Charlotte F, et al. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2002.
75. Forns X, Ampurdanés S, Llovet JM, Aponte J, Quintó LI, Martínez-Bauer E, et al. Identification of Chronic Hepatitis C Patients Without Hepatic Fibrosis by a Simple Predictive Model. *Hepatology* 2002; 36: 986-92.
76. Wai Ch-T, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A Simple Noninvasive Index Can Predict Both Significant Fibrosis and Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-26.
77. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, et al. Hepascore: an accurate validates predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005; 51(10): 1867-73.
78. Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, et al. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory test: results of the HALT-C cohort. *Hepatology* 2005; 42(2): 282-92.
79. Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F, Bochet M, Thibault V, Ratzu V, et al. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2003; 17: 721-5.
80. Rossi E, Adams L, Prins A, Bulsara M, De Boer B, Garas G, et al. Validation of the FibroTest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2003; 49(3): 450-4.
81. Myers RP, Ratzu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poinard T. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2419-25.
82. Myers RP, de Torres M, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Charlotte F, Poinard T. Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. A comparison with prothrombin time, platelet count and age-platelet index. *Digestive Diseases and sciences* 2003; 48: 146-53.
83. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 945-51.
84. Johansen JS, Christoffersen P, Müller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32: 911-20.
85. Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J et al. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996; 42: 558-63.
86. Guechot J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R et al. Relationship between procollagen III amino-terminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 20: 388-93.
87. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H. Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis B and Chronic hepatitis C: a comparative analysis. *J Hepatol* 1995; 23: 145-52.
88. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 271-9.
89. Leroy V, De Traversay C, Barnoud R, Hartmann JD, Baud M, Ouzan D et al. Changes in histological lesions and serum fibrogenesis markers in chronic hepatitis C patients non-responders to interferon alpha. *J Hepatol* 2001; 35: 120-6.
90. Ninomiya T, Yoon S, Hayashi Y, Sugano M, Kumon Y, Seo Y et al. Clinical significance of serum hyaluronic acid as a fibrosis marker in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha: histological evaluation by a modified histological activity index scoring system. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 68-74.
91. Nojgaard C, Johansen JS, Krarup HB, Holten-Andersen M, Moller A, Bendtsen F et al. Effect of antiviral therapy on markers of fibrogenesis in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 659-65.
92. Mitsuda A, Suou T, Ikuta Y, Kawasaki H. Changes in serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 after interferon alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 32: 666-72.
93. Abe S, Tabaru A, Ono M, Tai M, Narita R, Moriyama A et al. High-dose interferon-alpha therapy lowers the levels of serum fibrogenesis markers over 5 years in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2003; 25: 22-31.
94. Kojima H, Hongo Y, Harada H, Inoue T, Miyaji K, Kashiwagi M et al. Long-term histological prognosis and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C patients treated with interferon. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1015-21.
95. Rosenberg W, Burt A, Beca M, Voelker M, Arthur MJP. Automated assays of serum markers of liver fibrosis predict histologic hepatic fibrosis. *Hepatology* 2000; 32: 183A.
96. Poinard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004; 50: 1344-55.
97. Sohara N, Znoyko I, Levy MT, Trojanowska M, Reuben A. Reversal of activation of human myofibroblast-like substrate. *J Hepatol* 2002; 37: 214-21.
98. Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, et al. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000; 2: 545-51.
99. Quejón YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burkhardt E, et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 35: 749-55.
100. Poinard T, McHutchinson J, Manns M, Trepo C, Lindsey K, Goodman Z, et al. Impact of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 123: 1061-9.
101. Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, et al. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001; 21: 427-36.
102. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 427-36.
103. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-49.
104. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 517-24.
105. Arthur MJP. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. (Editorial). *Gastroenterology* 2002; 122(5): 1525-8.

Correspondencia:
Inmaculada L. Igualá Cholbi
Servei de Bioquímica Clínica. CDB (Esc. 7-5)
Hospital Clínic Universitari de Barcelona
c/ Villarroel, 170
08036 Barcelona
E-mail: liguala@clinic.ub.es;
deulofeu@clinic.ub.es