



Utilidad de las queratinas séricas en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas

Tesis doctoral

Cristina Macía Rodríguez

Director: Arturo González Quintela

Declaración de la autora de la tesis

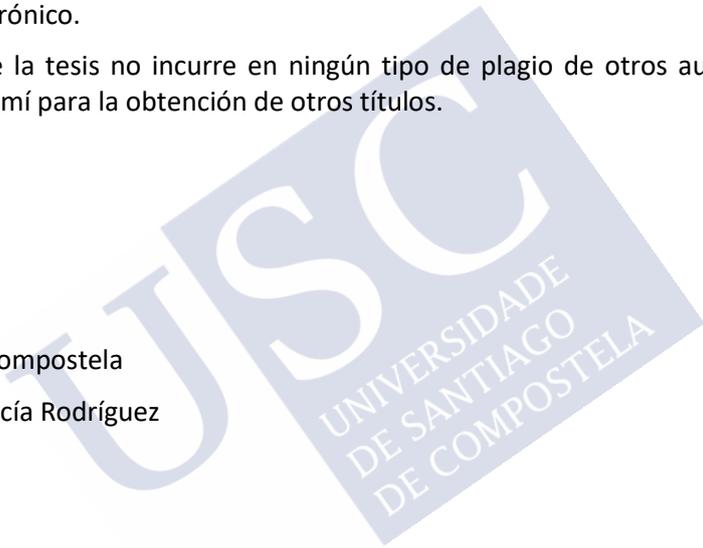
D^a Cristina Macía Rodríguez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento de la USC a estos efectos y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela

Fdo.: Cristina Macía Rodríguez



Autorización del director de la tesis

D. Arturo González Quintela

En condición de tutor de la doctoranda y director de la Tesis

Título de la Tesis: *Utilidad de las queratinas séricas en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas*

INFORMA:

Que la presente Tesis se corresponde con el trabajo realizado por D^a Cristina Macía Rodríguez bajo mi dirección y tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC y que como tutor y director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 12 de diciembre de 2020.

Fdo.: Arturo González Quintela

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible que haya llegado hasta aquí como la persona y la internista que soy.

Quería empezar agradeciendo a Arturo Quintela, por enseñarme tanto en sus clases, por haberme hecho entrar el gusanillo de ser internista, por apoyarme en sus años como jefe y ahora por dirigirme con paciencia este trabajo.

Vorrei inoltre ringraziare a tutte quelle persone che hanno fatto che quella timida bambina sia diventata la donna che sono ora. A tutti i docenti delle scuole elementare e media di Massagno e del Liceo Lugano 2, per insegnarmi a pensare invece che a studiare. A la Sezione Scout Tre Pini di Massagno per insegnarmi a collaborare con gli altri, a liderare e a prendere responsabilità. Ai miei amici (Anna, Fulvia e soprattutto a Maya) per essermi accanto malgrado il tempo e la distanza.

A los internistas del Hospital de Verín (Antonio, Elvira, Eliseo, Juan, Eugenio y Javier) por enseñarme lo que significa ser internista y empujarme a elegir esta especialidad.

Al servicio de Medicina Interna del CHUS, con especial mención a José Antonio, Nacho y Esteban, por enseñarme a ser internista y a superar la residencia sin quedarme en el camino. A Vane, porque sin ella aguantar esos 5 años no hubiese sido posible. A Lourdes, por enseñarme a luchar siempre con la sonrisa en la cara. A mis Co-R por hacer la vida en el hospital más llevadera. A mis R pequeños por empujarme con sus dudas y preguntas a mejorar día a día. A mis hermanitos, Emilio y Alba, por estar siempre a mi lado y ayudarme en todo lo que necesito.

Al servicio de Medicina Interna y HADO de POVISA, por hacerme sentir parte del grupo desde el primer momento y por enseñarme y hacerme mejorar todos los días. A Javier, por confiar y apostar en mí y por animarme y presionarme a acabar la tesis. Al servicio de Oncología de POVISA, por recibirme con los brazos abiertos a pesar de ser de otra especialidad, con especial agradecimiento a Lucía, por recordarme todas las semanas que tenía acabar este trabajo.

Al grupo de Formación de la Sociedad Española de Medicina Interna, por trasmitirme las ganas y la ilusión de empezar siempre algún proyecto nuevo.

Aos meus amigos Rocio, Tania, Jenny, aos “USC Rules” e aos “Equipo Actime!”, por alegrarme os días e apoiarme cando o necesito (tranquilos, invitareivos á exposición só se hai pinchos).

A mi familia política en especial a mis suegros, por tratarme desde el primer momento como si fuese su hija.

Á miña familia, sobre todo á Manolo, Manola, Stefano, Alba e Fulgencio por ser o soporte cando o necesito e estar en todos os momentos importantes.

A meus pais, por ensinarme que con esforzo se pode conseguir todo o que un se propoña.

Ao meu pequecho, Eric, por conseguir sacarme sempre un sorriso e apoyarme e axudarme en todo momento.

A Dani, por querer compartir a súa vida conmigo e emprender xuntos esta aventura. Á nosa pequechiña, por acompañarme coas súas patadiñas nestos últimos 9 meses de escritura.

Graciñas a todos. Sen vós a Cris que coñecedes non existiría e non tería sido posible presentar esta tesis doutoral.

*Camminando si apprende la vita
Camminando si conoscono cose
Camminando si sanano le ferite del giorno prima
Cammina guardando una stella, ascoltando una voce, seguendo le orme di altri passi
Cammina cercando la vida, curando le ferite lasciate dai dolori
Niete può cancellare il ricordo del cammino percoso*

(Lema del Campo Pascuale Pio, Cuneo 2004; adaptación de “Caminando” de Rubén Blades)



Aspectos éticos

Como se especifica en cada uno de los subestudios, estos han sido realizados de acuerdo con la normativa legal y las directrices de la Declaración de Helsinki vigente en cada momento y cumpliendo los requisitos establecidos en autorizaciones sucesivas del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia para la línea de investigación mencionada. Las autorizaciones que se citan se han añadido como Anexos al final de esta Tesis:

La recopilación de datos para estos trabajos comenzó con el estudio *“Niveles de TPS (antígeno polipeptídico tisular específico) en pacientes con hepatopatía alcohólica. Comparación con otras hepatopatías y con neoplasias epiteliales. Relación con la alteración en los niveles de otras citoqueratinas”* (código CEIC de Galicia número 2005-079, investigador principal Arturo González Quintela) que posteriormente se expandió con el titulado *“Elevación del TPS sérico (antígeno polipeptídico tisular específico, queratina-18) en el diagnóstico de enfermedades hepáticas, especialmente las asociadas al consumo de alcohol”* (código CEIC de Galicia número 2007-109, investigador principal Arturo González Quintela). Para algunos aspectos del estudio se solicitaron anexos específicos, como el titulado *“Valor de la queratina-18 en el diagnóstico diferencial de las hepatopatías post-trasplante hepático”* (código CEIC de Galicia número 2008-272, investigador principal Santiago Tomé, colaborador en todos estos trabajos). El estudio de las queratinas séricas estaba incluido en los proyectos previos, pero para ellas se solicitó en su día un estudio más extenso, que también incluía el análisis dichas queratinas: *“Estudio descriptivo de las hepatopatías autoinmunes en el área sanitaria de Santiago”* (código CEIC de Galicia número 2018-506, investigador principal Arturo González Quintela).

Declaración de conflictos de interés

La autora y director de este trabajo están de acuerdo en presentar los resultados en la presente tesis y declaran que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

Financiación

Parte de los estudios fueron financiados con fondos de la Xunta de Galicia (Consellería de Sanidade, código de proyecto PS 08/69) y con fondos propios del grupo de investigación.

Preámbulo: Estructura general de la tesis y rol de la doctoranda

La presente memoria se estructura en 5 subestudios independientes entre sí, con el nexo común que da título a la Tesis: “*Utilidad de las queratinas séricas en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas*”. Los trabajos investigan aspectos diagnósticos y pronósticos de esos fragmentos de queratina, especialmente de la queratina-18, en los grupos de enfermedades más relevantes en nuestro medio en el adulto: hepatopatía por virus hepatitis C, hepatopatía alcohólica, hígado graso no alcohólico, hepatopatías autoinmunes y trasplante hepático.

Tras una **Introducción General** al problema, se desarrollan esos cinco subestudios, que se corresponden con los **Objetivos** de la Tesis, como se enumeran de modo conjunto en el apartado correspondiente. Los subestudios se han presentado separadamente porque sus métodos tienen elementos diferenciales y específicos, especialmente en lo que respecta a los pacientes a estudio, que son distintos en cada uno de los subestudios, así como algunos elementos de la instrumentación, las determinaciones y el análisis. Los **cinco subestudios**, de esta manera, podrían corresponder, con las modificaciones oportunas, a sendos artículos que se envíen a publicar. De hecho, algunos de ellos han sido presentados en congresos y alguno se encuentra ya en proceso de publicación. Para cada subestudio se ha incluido una breve *Introducción específica* (intentando no entrar en redundancia con la Introducción General), el *Objetivo* al que responden de la lista general, los *Pacientes y Métodos* específicos, sus *Resultados*, una breve *Discusión* y sus *Conclusiones* específicas. A continuación, se realiza una **Discusión general** del conjunto de los subestudios, incluyendo sus limitaciones y fortalezas y las conclusiones comentadas con los hallazgos fundamentales que las soportan. Finalmente, se enumeran las **Conclusiones** de la Tesis y se detalla la **Bibliografía** conjunta de todos los subestudios y de la Introducción.

Los trabajos forman parte de una línea de investigación del director de la Tesis y el grupo de investigación. **La doctoranda ha sido la responsable directa de** todos los subestudios que se presentan: En todos ellos ha sido la responsable del análisis de los datos, de su integración y de su presentación estructurada. En los subestudios 2, 3, y 5, la doctoranda ha hecho uso de bases de datos creadas a efectos de investigación en las patologías correspondientes, de modo previo a su inscripción en el programa de doctorado. En los subestudios 1 y 4, la doctoranda ha sido, además, responsable de crear las bases de datos necesarias para estos estudios, bases que, además, servirán al grupo para nuevos estudios futuros.

Resumen

Antecedentes: Las queratinas son proteínas que forman parte del citoesqueleto de las células epiteliales, siendo la queratina-18 (K18) la principal en los hepatocitos y la K19 en los ductos biliares. Durante la muerte celular son liberadas al torrente sanguíneo; en caso de necrosis, de forma íntegra y en caso de apoptosis, tras sufrir la digestión por las caspasas, como fragmentos. Debido a esto, los fragmentos de K18 séricos pueden ser un dato indirecto del grado de apoptosis o de necrosis de los hepatocitos, aunque este aspecto diagnóstico ha sido poco estudiado hasta la fecha. La determinación del denominado *Tissue Polypeptide Specific antigen* (TPS, que se corresponde con los residuos 322-340 de la K18) existe de modo comercial, aunque en el pasado fue utilizado como marcador tumoral epitelial.

Objetivo general: Estudiar la utilidad de la determinación de los fragmentos de K18 (TPS) en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con las principales enfermedades hepáticas del adulto.

Métodos: La Tesis se compone de 5 subestudios observacionales en sendos grupos de trastornos:

1. *Evolución de las concentraciones séricas de K18 (TPS) y de la fibrosis hepática tras el tratamiento con antivirales de acción directa en pacientes con **hepatopatía por Virus de la Hepatitis C (VHC)***: estudio transversal con seguimiento longitudinal (retrospectivo) en una cohorte de 149 pacientes.
2. *Concentración sérica de K18 (TPS) en pacientes con **hepatopatía alcohólica** y su relación con citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α)*: estudio transversal, de pruebas diagnósticas, en 138 pacientes.
3. *Utilidad de las concentraciones séricas de K18 (TPS) en diagnóstico y seguimiento de pacientes con **hígado graso no alcohólico***: estudio de base transversal, con seguimiento longitudinal retrospectivo en una cohorte de 40 pacientes.
4. *Utilidad de la K18 (TPS) en el diagnóstico de las **hepatopatías autoinmunes***: estudio transversal, de pruebas diagnósticas, en 142 pacientes.
5. *Variación de las concentraciones séricas de la queratina-18 tras el **trasplante hepático**: comparación con la queratina-19*: estudio longitudinal, descriptivo, con seguimiento prospectivo en una cohorte de 11 pacientes.

En todos los subestudios se determinaron las concentraciones séricas de K18 mediante TPS comercial. En el subestudio 5 se determinaron, además, las concentraciones de K19 y de M30, un neoantígeno generado específicamente durante la apoptosis de la K18. Se analizaron y se compararon, en cada caso, los marcadores habituales séricos de daño hepático.

Resultados principales:

En los **pacientes con hepatopatía por VHC**, la concentración de K18 (TPS) sérica fue útil para estimar el grado de fibrosis hepática. Tanto la fibrosis como los niveles de K18 (TPS) mejoraron tras el tratamiento con antivirales de acción directa. La no mejoría de K18 (TPS) tras el tratamiento puede indicar la coexistencia de otras causas de hepatopatía o complicaciones.

En los **pacientes con abuso de alcohol**, la elevación de K18 (TPS) sérica, fue frecuente y, en muchos casos, marcada. Se asoció con la elevación de marcadores de hepatitis alcohólica, con posible utilidad como marcador de la misma. La K18 (TPS) sérica se correlacionó con la elevación de citoquinas proinflamatorias.

En los **pacientes con hígado graso no alcohólico**, el valor de la K18 (TPS) sérica fue significativamente mayor que en controles sanos y mayor, pero sin alcanzar la significación estadística, en pacientes con NASH con respecto a los pacientes con hígado graso simple. Los valores de K18 (TPS) se correlacionaron con los principales marcadores de citolisis hepática, pero no hemos encontrado relación con el daño hepático observado en las biopsias (esteatosis, necrosis o fibrosis).

En los **pacientes con hepatopatías autoinmunes** las concentraciones séricas de K18 (TPS) sérica se encontraron frecuentemente elevadas, especialmente en los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome *overlap*. Las concentraciones de K18 (TPS) frecuentemente alcanzaron niveles muy altos en los casos presentados como hepatitis aguda. Las concentraciones de K18 (TPS) sérica se correlacionaron con los marcadores de citolisis y ofrecen valor para discriminar a los pacientes con CBP pura de los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome *overlap*.

En los **pacientes con trasplante hepático**, se observó que los cambios en el tiempo en las concentraciones de K18 son diferentes a los de K19. La elevación de los niveles séricos de los fragmentos de K18 (TPS y M30) en las primeras horas postrasplante indican que el daño por isquemia-reperfusión es debido a necrosis y apoptosis de los hepatocitos, con predominio de la necrosis en las primeras horas postrasplante y de la apoptosis en los siguientes días. Las concentraciones de K19 descienden paulatinamente tras el trasplante, salvo complicaciones.

Conclusión general: La determinación de queratinas séricas, concretamente K18 (TPS) añade información, clínica y fisiopatológica, a los marcadores habituales de daño hepático, concretamente a los marcadores de citólisis hepática.



Índice

Declaración de la autora de la tesis	I
Autorización del director de la tesis	II
Agradecimientos	III
Declaración de conflictos de interés	V
Aspectos éticos y legales	V
Financiación	V
Preámbulo: estructura general de la tesis y rol de la doctoranda	VI
Resumen	VII
Introducción general	1
1. Generalidades de las queratinas	2
2. Muerte celular y su relación con las enfermedades hepáticas	3
3. Métodos para detectar la apoptosis o necrosis de las células hepáticas	9
4. Utilidad de los niveles séricos de queratinas en las enfermedades hepáticas	10
Objetivos e hipótesis	18
Subestudio 1: Evolución de las concentraciones séricas de queratina-18 (TPS) y de la fibrosis hepática tras el tratamiento con antivirales de acción directa en pacientes con hepatopatía por Virus de la Hepatitis C	21
1. Introducción específica	22
2. Objetivos	22
3. Pacientes, material y métodos	22
4. Resultados	24
5. Discusión	31
6. Conclusiones	33
Subestudio 2: Concentración sérica queratina-18 (TPS) en pacientes con hepatopatía alcohólica y su relación con citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF-α)	34
1. Introducción específica	35
2. Objetivos	35
3. Pacientes, material y métodos	35
4. Resultados	37
5. Discusión	41
6. Conclusiones	43
Subestudio 3: Utilidad de las concentraciones séricas de queratina-18 (TPS) en diagnóstico y seguimiento de pacientes con hígado graso no alcohólico	44
1. Introducción específica	45
2. Objetivos	45
3. Pacientes, material y métodos	45
4. Resultados	46
5. Discusión	48
6. Conclusiones	49

Subestudio 4: Utilidad de la queratina-18 (TPS) en el diagnóstico de las hepatopatías autoinmunes	51
1. Introducción específica	52
2. Objetivos	52
3. Pacientes, material y métodos	53
4. Resultados	53
5. Discusión	56
6. Conclusiones	58
Subestudio 5: Variación de las concentraciones séricas de la queratina-18 tras el trasplante hepático: comparación con la queratina-19	59
1. Introducción específica	60
2. Objetivos	60
3. Pacientes, material y métodos	61
4. Resultados	62
5. Discusión	69
6. Conclusiones	71
Corolario: Ejemplo de valor predictivo negativo: normalidad de la queratina 18 (TPS) sérica para descartar enfermedad hepática en una paciente con miopatía y elevación persistente de transaminasas	72
Discusión general	76
1. Limitaciones y fortalezas	77
2. Conclusiones comentadas	79
Conclusiones	83
Bibliografía	86
Anexos	103
Anexo I. Listado de abreviaturas	104
Anexo II. Autorizaciones del Comité de Ética	105
Anexo III. Publicaciones derivadas de la presente tesis	109
Anexo IV. Lista de verificación STROBE	110

Introducción general



1. Generalidades de las queratinas

El citoesqueleto está formado por tres diferentes tipos de filamentos: los filamentos intermedios, los filamentos de actina (*actin-containing microfilaments*) y los microtúbulos (1).

Los filamentos intermedios se denominan así pues su tamaño de 10 nm es intermedio al de los filamentos de actina (6 nm) y el de los microtúbulos (23 nm). Estos se subdividen en 5 grupos: queratinas (K) tipo I o relativamente ácidas (queratinas epiteliales de K9 a K28 y queratinas del pelo de K31 a K40), K tipo II o básicas (queratinas epiteliales de K1 a K8 y de K71 a K80 y queratinas del pelo de K81 a K86), filamentos intermedios tipo III (proteína glial ácida, periferina, vimentina, sincoilina y desmina), los tipo IV (neurofilamentos, sinemina, paranemina, nestina e internexina) y los tipo V (lamininas) (2–7).

Los filamentos intermedios poseen una estructura formada por un tetrámero. En el caso de las queratinas los heterodímeros se unen mediante enlaces no covalentes, formando una estructura con un α -hélice central con un dominio N-terminal y C-terminal no helicoidal, llamado protofilamento. La unión de dos protofilamentos va a formar una protofibrina y la unión de cuatro de estas forman el filamento intermedio (4,8) (Figura I.1).

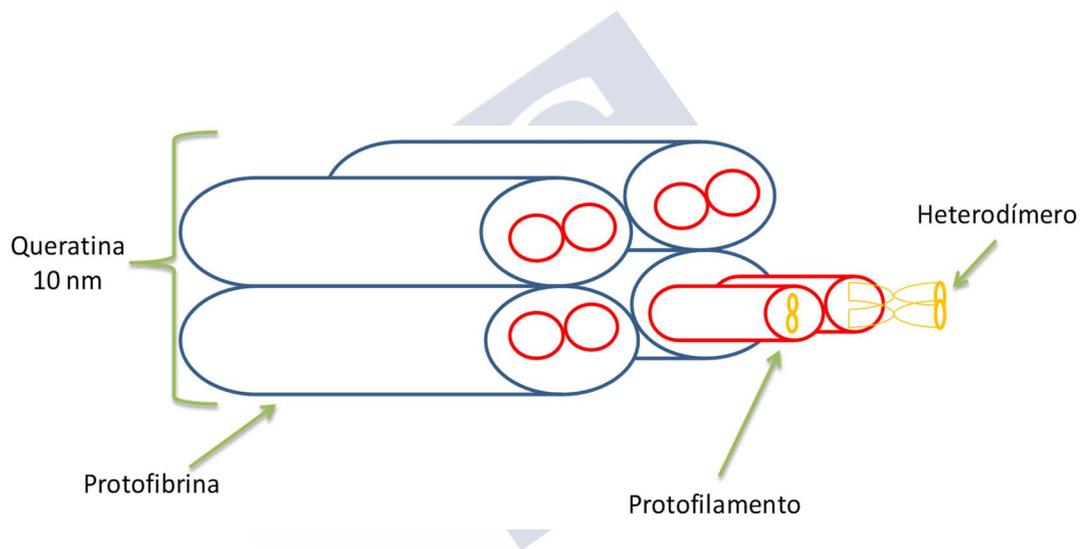


Figura I.1: Estructura de las queratinas. Dibujo de la autora, basado en: *Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease*, Fuchs et al., 1994 (4), y en: *Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength*, Fuch, 1994 (2).

Los dominios terminales del protofilamento son los que sufren procesos de glicosilación y fosforilación que provocan un cambio en la estructura tridimensional del filamento permitiendo así la realización de las diferentes funciones (4,6,8).

Las queratinas forman parte de la matriz de filamentos que se extiende desde el núcleo a la membrana celular. Poseen funciones mecánicas, como mantener la integridad celular ante cambios hemodinámicos, y no mecánicas, como participar en los procesos de señalización intracelular, en el funcionamiento de las organelas (sobre todo mitocondrias) y en la protección frente a la apoptosis y el estrés oxidativo (actuando como *esponjas* de fosfatos) (1,4,5,7,8).

Todas las células epiteliales expresan por lo menos una queratina del tipo I y una del tipo II (2). Los epitelios simples como el hígado, el páncreas exocrino y el intestino expresan primariamente el heterodímero K8/K18 (4,9). En el hígado los hepatocitos adultos expresan K8/K18, mientras que

los colangiocitos de los ductos biliares y la vesícula expresan K7/K8/K18/K19; en los hepatoblastos embrionarios sí observamos la expresión de K8/K18/K19 (3,5,9,10). Tanto mutaciones como algunas variantes de las K8 y K18 se han relacionado con aparición de enfermedad hepática y cirrosis (5,7,8,11,12).

Las queratinas actúan también de forma fundamental en determinadas situaciones patológicas. Por ejemplo, la K8 y la K18 son los principales componentes de los cuerpos de Mallory-Denk (13). Los cuerpos de Mallory-Denk fueron descritos por primera vez por Frank Mallory en 1911. Son inclusiones hialinas irregulares citoplasmáticas, sobre todo perinucleares, que se tiñen con eosina. Están formada por K8/18 fosforiladas, p62, ubiquitinas y chaperonas (7,8,12). Su formación es debida a un desbalance entre K8 y K18 ($K8 > K18$), asociada a una hiperfosforilación del heterodímero y la aparición de enlaces cruzados entre queratinas y otras proteínas por transamidación, además de una sobreexpresión de p62 (7,8,12). Normalmente estas proteínas alteradas son reparadas por las chaperonas o eliminadas por los proteosomas, pero ante la presencia de alcohol o estímulos hepatotóxicos, se produce una inhibición de las chaperonas condicionado una precipitación de estas proteínas a nivel citoplasmático. De esta manera podemos observar la aparición de los cuerpos de Mallory-Denk en diferentes patologías hepáticas como la hepatopatía alcohólica, la esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Wilson, colangitis biliar primaria o en el hepatocarcinoma (7,8). Se cree que, además de indicarnos lesión a nivel del hepatocito, los cuerpos de Mallory-Denk pueden tener un papel como activación de la reacción inmune, pues suelen verse rodeado de infiltrados inflamatorios (sobre todo neutrófilos) (8). Las queratinas juegan, además, un papel importante en las hepatitis autoinmunes. En efecto los anticuerpos anti-SLA se unen específicamente a K8 y K18 (9,12). Finalmente, como desarrollaremos en el próximo capítulo, las queratinas son degradadas por las caspasas durante la apoptosis, siendo este proceso fundamental dentro de la fisiopatología de muchas de las enfermedades hepáticas (1,14,15).

2. Muerte celular y su relación con las enfermedades hepáticas

Existen dos principales mecanismos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. Durante la necrosis es frecuente observar la muerte de muchos hepatocitos contiguos mientras durante la apoptosis se produce la muerte de una sola célula rodeada de células sanas. La necrosis se produce cuando el hepatocito es sometido a una perturbación metabólica aguda que conlleva a una depleción importante de ATP (16). Durante la primera fase de la necrosis se produce una depleción de ATP que conlleva a la alteración del citoesqueleto produciendo una balonización celular y la aparición de vesículas o *blebs* a nivel de la membrana celular. Tras esto se produce una despolarización mitocondrial, una disfunción lisosomal y la apertura de canales de membrana que permiten la salida de cationes. Todas estas alteraciones conllevan una mayor balonización celular y mayor producción de vesículas de membrana hasta producirse la ruptura de una vesícula y la liberación de contenido citoplasmático al espacio extracelular. Este contenido citoplasmático liberado produce una importante respuesta inflamatoria (16). La necrosis es la responsable del daños hepático sobre todo en dos situaciones: en la lesión por isquemia/reperfusión y en el daño hepático agudo inducido por fármacos (16).

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada mediante la organización del núcleo y la fragmentación de la célula, con la obtención al final de los cuerpos apoptóticos (conocidos, cuando se producen en el parénquima hepático, como cuerpos de Councilman). Estos cuerpos son finalmente fagocitados por los macrófagos (células de Kupffer en el hígado) (17,18). Al contrario que en la necrosis, es un proceso ATP-dependiente y conlleva una mínima liberación de

componentes intracelulares al espacio extracelular y de citoquinas proinflamatorias provocando así una escasa respuesta inmune (16,19).

De forma resumida, existen dos vías principales para la activación de la cascada apoptótica, a través de los receptores de muerte (vía extrínseca) o de la disfunción mitocondrial (vía intrínseca) (17,19). Dentro de los receptores de muerte los más estudiados son TNF-1 (TNF-R1), Fas (CD95/APO-1), TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (*Tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 y 2*). Estos receptores, tras ser activados por sus ligandos (habitualmente secretados por células del sistema inmune), activan un complejo intracelular de muerte formado por procaspasas y proteínas, que a su vez activan las caspasas apicales (caspasa-8 y caspasa-10). Dichas caspasas son las encargadas de activar las caspasas efectoras (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) que son las encargadas de digerir las diferentes proteínas celulares (16,17) (Figura I.2).

Por otro lado, el estrés celular (estrés oxidativo, daño en el ADN, toxinas, estrés a nivel del retículo endoplasmático o radiaciones ultravioleta) provoca cambios a nivel de la permeabilidad de la membrana mitocondrial que provoca la liberación del Citocromo C (20,21). El Citocromo C se une al Apaf-1 provocando la activación de la caspasa-9 (la unión de estas tres proteínas se conoce como apoptosoma) que a su vez activa las caspasas efectoras (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) (17,22) (Figura I.2). Dicho proceso es regulado por una serie de proteínas celulares, siendo las principales la familia del Bcl-2, cuyo balance entre los miembros proapoptóticos (Bak, Bax, Bok, Bid, Bim, Noxa, Puma, Bmf, Hrk y Bad) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 y Mcl-1) va a condicionar que el estímulo cause o no la apoptosis celular (17,21).

La vía intrínseca y la extrínseca de la apoptosis no se encuentran completamente separadas, en efecto, la activación de TRAIL-R y TNF-R provocan el aumento de proteínas proapoptóticas de la familia del Bcl-2 (Bid y Bim) provocando un cambio de permeabilidad mitocondrial y la activación de la vía intrínseca (21,23). Además, la vía intrínseca puede ser activada tras la activación lisosomal, que se puede dar de forma extrínseca (por activación de los receptores de muerte, sobre todo TNFR y TRAILR) o intrínseca (presencia de ácidos grasos libres o especies reactivas de oxígeno). La activación lisosomal provoca la liberación de cathepsina B que estimula un aumento de la liberación de citocromo C por parte de la mitocondria (21,22).

El retículo endoplasmático también juega un papel importante en la activación de la apoptosis. El estrés o perturbaciones celulares como la acumulación de ácidos grasos libres pueden condicionar una alteración de la síntesis proteica llevando la aparición de proteínas anómalas. Esto provoca una inhibición del ciclo celular, una atenuación de la síntesis proteica y activación de las chaperonas que se encargan de la degradación de estas proteínas. Si este proceso falla, se produce una activación de la apoptosis: las proteínas de la membrana del retículo endoplasmático detectan las proteínas anómalas y activan JNK que a su vez activa BAX provocando una disfunción mitocondrial y la activación de la vía intrínseca (24). Además el retículo endoplasmático puede activar directamente la caspasa-12 que activa a su vez las caspasas efectoras (25).

La activación de las caspasas efectoras condiciona la degradación de los diferentes componentes celulares, entre los cuales se encuentran los filamentos intermedios del citoplasma. Uno de los principales filamentos que sufren esta digestión es la K18. El primer cambio que sufre, al inicio de la apoptosis, es una fosforilación a nivel de la serina-53 (14). Tras esto es digerida por las caspasas-3, -6 y -7 siendo cortada en dos puntos (Asp 238 y Asp 396), obteniendo 3 fragmentos que permanecen unidos formando un heterodímero con la queratina-8 (1,14,15,26,27). Dichos fragmentos son insolubles y precipitan. Hay que destacar que la queratina-8 no se ve afectada por la digestión de las caspasas efectoras, quedando íntegra tras la apoptosis (14).

apoptóticos van a activar las células estrelladas (células mesenquimales, normalmente localizadas en el espacio presinusoidal). Al activarse se convierten en miofibroblastos que secretan TGF- β y colágeno tipo I a la matriz extracelular. Este es el principal responsable del desarrollo de la fibrosis hepática. Además el propio colágeno tipo I y el TGF- β secretado producen la activación permanente de los miofibroblastos y por lo tanto la progresión de la fibrosis (19–21,23,31–33)(Figura 1.3). Al desaparecer el estímulo nocivo a nivel hepático, se observa una disminución exponencial de los miofibroblastos, explicando la mejoría de la fibrosis al desaparecer el estímulo apoptótico (23,31).

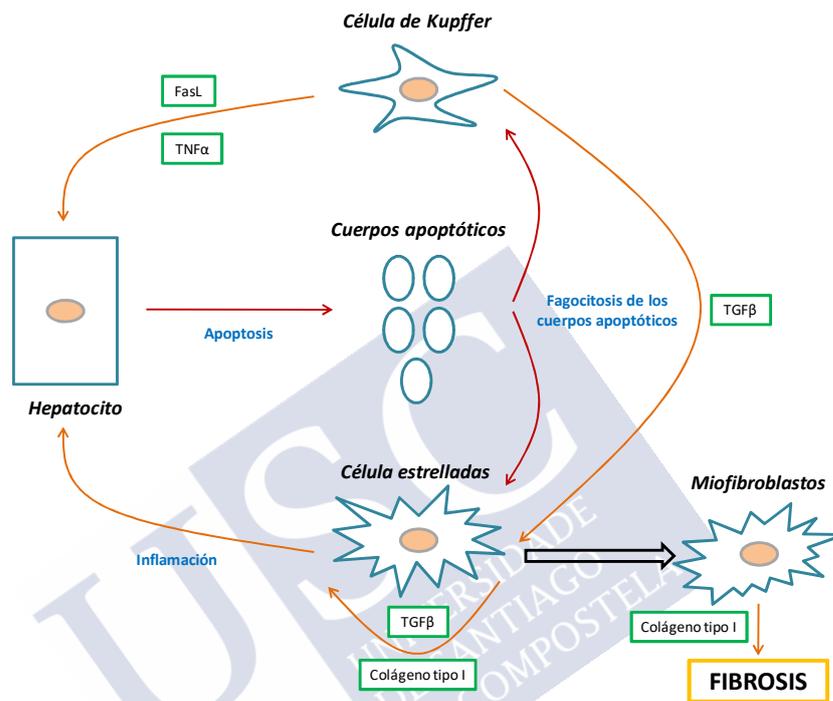


Figura 1.3: Representación del nexo existente entre la apoptosis y el desarrollo de fibrosis hepática. Dibujo de la autora, basado en *Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis*, Canbay et al., 2004 (31).

a) Muerte celular en el daño hepático producido por los virus de las hepatitis virales

En las hepatitis virales el daño hepático es debido sobre todo a una apoptosis de los hepatocitos, de hecho en las muestras histológicas de pacientes con hepatitis virales se observan hepatocitos apoptóticos y un aumento de los niveles de caspasa 3, caspasa 7, citocromo C, Fas y fragmentos de K18 (34–40). En el caso de las hepatitis virales se cree que la apoptosis es mediada por linfocitos T citotóxicos que detectan proteínas virales en los hepatocitos y activan el receptor Fas activando la cascada de caspasas (19,23). Los linfocitos T secretan además gránulos que contienen granzima B y perforina que provocan poros en la membrana celular (17). Además, se cree que el VHC actúa como ligando del dominio celular del TNF-R1 activando así la cascada de caspasas (41). Se está investigando el uso de inhibidores de la apoptosis y necrosis celular para intentar reducir el daño hepático producido por el virus (36).

b) Muerte celular en el daño hepático producido por el alcohol

El daño hepático producido por el alcohol es debido mayoritariamente a apoptosis celular, de hecho, se han observado hepatocitos apoptóticos en las muestras histológicas de estos pacientes (27,42). Se cree que el alcohol induce estrés oxidativo con la producción de reactivos intermedios del oxígeno y peróxidos lipídicos por la activación del citocromo p450 2E1 (CYP2E1)(43). Dichos radicales provocan disfunción mitocondrial, daño en el ADN y en las proteínas celulares y un aumento de la expresión de Fas-ligando, provocando así la activación de la cascada de las caspasas (17,19,20,23). Además el etanol aumenta la permeabilidad intestinal y con ello la cantidad de las endotoxinas circulantes (44–46). Esto estimula las células de Kupffer que secretan citoquinas proinflamatorias, TNF- α , IL-6 y TGF- β favoreciendo así la apoptosis celular por la vía extrínseca (21,47–50). Finalmente, en estos pacientes, se ha observado un aumento de la producción de TGF- β 1 por parte de las células estrelladas hepáticas que promueve la fibrogénesis y la apoptosis de los hepatocitos (17).

c) Muerte celular en el daño hepático en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica

El daño hepático en los paciente con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es debido, principalmente a apoptosis de los hepatocitos, de hecho en sus biopsias se observan hepatocitos apoptóticos y el grado de apoptosis se relaciona con la fibrosis y el posterior desarrollo de cirrosis (51). Se cree que la resistencia a insulina juega un papel fundamental en el acumulo de ácidos grasos a nivel hepático, pues la hiperinsulinemia va a alterar la síntesis y degradación de los ácidos grasos en los hepatocitos provocando así la liberación de ácidos grasos libres al torrente circulatorio (43). Estos últimos pasan la membrana celular del hepatocito a través del su transportador de membrana (FATPs)(24) y provocan un aumento del estrés oxidativo, aumentando así la permeabilidad de la membrana mitocondrial que provoca a su vez la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas por la vía intrínseca (21). Además también se produce la activación de la vía extrínseca mediante el aumento de expresión de Fas, TNF-R1 y TRAIL-R2 (19,21,23,52), pero son necesarios más estudios para explicar el nexo entre esto último y la secreción de ácidos grasos libres (43). El uso de inhibidores del TNF- α , inhibidores de la catepsina- β , paninhibidores de la apoptosis (IDN-6556) o paninhibidores de caspasas (VX-166) han demostrado reducir la apoptosis de los hepatocitos en ratas con NASH y en algunos casos una mejora de la fibrosis hepática (24).

d) Muerte celular en el daño hepático en las enfermedades colestásicas

En las enfermedades colestásicas como la colangitis biliar primaria (CBP) o en las secundarias a la oclusión de la vía biliar (colecistolitiasis o tumorales) se produce una toxicidad directa de los ácidos biliares (como el glucodeoxicolato)(53). Por un lado, éstos producen la activación de Fas y con esto la activación de la cascada de caspasas y, por otro, producen una disfunción mitocondrial con la liberación de citocromo C y una activación de la protein-quinasa C que provoca un aumento de magnesio intracelular, el cual provoca un aumento de la actividad endonucleasa y de la degradación del DNA(17,21). En efecto, Yagmur *et al.*(54) han evidenciado un aumento de los fragmentos de K18 en los pacientes con colestasis severa. Fickert *et al.*(55) observaron además que los pacientes con colestasis crónica presentaban una fosforilación y ubiquinación anormal de la K18 con un mayor depósito de cuerpos de Mallory, sobre todo en la zona acinar. Si administramos ácido ursodexocólico a estos pacientes se observa una disminución de la apoptosis de los hepatocitos, debido a que este actúa disminuyendo la permeabilidad

mitocondrial; este es el principal mecanismo por el cual dicho tratamiento es útil en las enfermedades colestáticas (16,17).

e) Muerte celular en el daño hepático por isquemia/reperfusión

El daño por isquemia/reperfusión se produce en dos fases. Tras una disminución del flujo sanguíneo hepático se observa una necrosis de los hepatocitos centrolobulillares; la doble circulación del hígado permite la supervivencia inicial de los hepatocitos periportales. Esta necrosis se debe a una depleción de ATP durante el tiempo de isquemia (16). Tras la reperfusión se produce una restauración brusca del pH celular (que había disminuido durante el periodo de isquemia), provocando la aparición de reactivos del oxígeno, que provocan un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial seguido de una balonización celular y ruptura de la membrana citoplasmática (16,20). Además durante este proceso se produce la activación de las células de Kupffer que liberan citoquinas y radicales libres provocando la activación del sistema inmune innato (sobre todo neutrófilos y linfocitos T CD4+), que inducen tanto apoptosis como necrosis de los hepatocitos (16).

f) Muerte celular en el daño hepático por paracetamol

En dosis terapéuticas, el paracetamol es metabolizado sobre todo mediante la conjugación con sulfato o glucorónico y excretado. Menos del 5% se metaboliza a través de la oxidación por el citocromo p450 obteniendo como metabolito N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), que es excretado tras conjugarse con glutatión. En caso de sobredosis se produce una saturación de la vía de la conjugación y una dosis importante del paracetamol se oxida a través del citocromo obteniendo mayores cantidades de N-acetil-p-benzoquinonaimina (20,21). Este metabolito provoca una depleción de glutatión provocando un aumento de estrés oxidativo mitocondrial que induce necrosis celular (sobre todo) y apoptosis de los hepatocitos (16,56). A pesar que la necrosis es el patrón predominante en la intoxicación por paracetamol, se ha observado un aumento de Fas, TNF- α , TNFR y M30 en pacientes con hepatitis fulminante tras intoxicación por paracetamol, datos indirectos de apoptosis celular (21). La N-acetil-cisteína y sus radicales sulfidrilos emplazan al glutatión, promoviendo la conjugación del N-acetil-p-benzoquinonaimina y su excreción, motivo por el cual se utiliza como antídoto en la intoxicación por paracetamol durante las primeras 16 h desde la toma del medicamento (20,21).

g) Muerte celular y hepatocarcinoma

Se cree que el desarrollo de hepatocarcinoma es debido a un defecto en la apoptosis y un aumento de la proliferación celular. En efecto, las células tumorales suelen presentar mutaciones en genes supresores de tumores, reparadores de ADN, reguladores del ciclo celular o relacionados con la apoptosis (19,22). Además, el daño hepático de forma mantenida provoca la migración a este nivel de células del sistema inmune innato, que provocan una importante liberación de citoquinas proinflamatorias y radicales libres. Este microambiente inflamatorio va a hacer que los hepatocitos desarrollen mecanismos de evasión a la apoptosis, provocando que estos acumulen daño celular favoreciendo la aparición del hepatocarcinoma (23). De hecho, en los hepatocarcinomas se observa una disminución en la expresión de Fas y de TRAIL-R (23); además, los niveles de expresión de Fas se han relacionado tanto con el grado de diferenciación del tumor y con la supervivencia de los pacientes (19).

3. Métodos para detectar la apoptosis o necrosis de las células hepáticas

Cómo hemos explicado anteriormente, durante la apoptosis se produce una fragmentación tanto de la K18 como de la K19 y su liberación al suero. Dichos fragmentos pueden ser detectados mediante inmunohistoquímica en las células apoptóticas y en el suero.

Los fragmentos de K18 pueden detectarse con tres determinaciones diferentes: TPS (57,58), M30 (59) y M65 (60) (Figura 1.4); mientras que aquellos de K19 se pueden detectar mediante la determinación del CYFRA 21-1 (61).

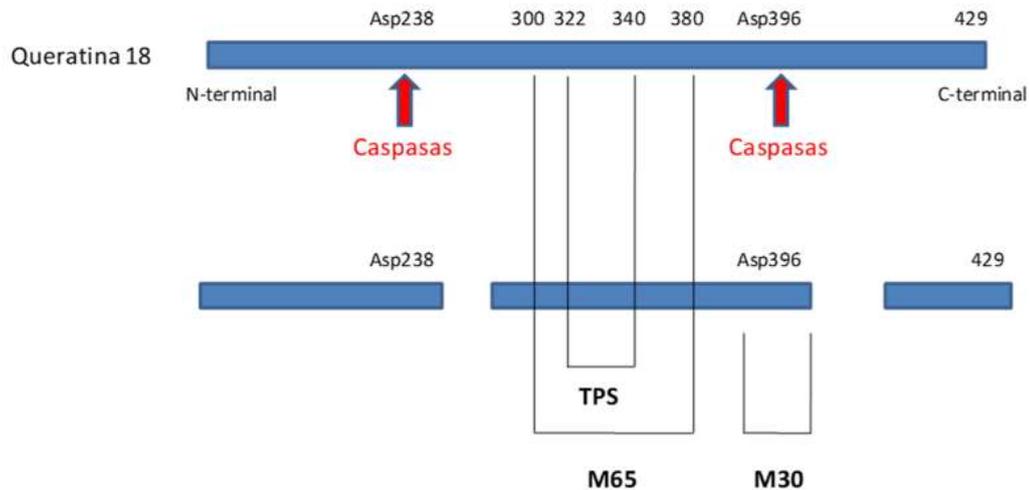


Figura 1.4: Representación de los epitopos que son detectados por los anticuerpos utilizados para medir TPS (M3), M30 y M65 (dibujo de la autora).

a) TPS (Tissue Polypeptide Specific Antigen)

El TPS (*Tissue Polypeptide Specific Antigen*) se determina mediante un inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Immulite-TPS; Siemens Medical Solution Diagnostics, Gwynedd, UK). Utiliza un anticuerpo monoclonal M3 que identifica un epitopo de la queratina-18 localizado en la región 322-240 (Figura 4) (57,58,62). Debido que este epitopo está presente tanto en la queratina intacta como en los fragmentos obtenidos tras la degradación de las caspasas, el TPS puede ser utilizado para detectar tanto células necróticas como apoptóticas.

Los antígenos detectados por el TPS se expresan en la mayoría de tumores epiteliales, encontrándose sus valores séricos elevados en pacientes con cáncer de mama, ginecológico (63), prostático (60,64), gastrointestinal (65) o pulmonar (66,67). Por dicho motivo, en un primer momento, se utilizó como marcador tumoral, llegándose a plantear su utilidad para el seguimiento y valoración de la respuesta al tratamiento de estos pacientes (1,68,69).

Tras esto, se inició a investigar su utilidad en las diferentes enfermedades hepáticas. Los niveles de TPS se relacionan con los niveles de transaminasas (sobre todo AST) y con el grado de daño hepático medido con el índice de Knodell (70). Cabe destacar que en un 30% de los paciente se observó un valor alterado de TPS siendo normales los valores de transaminasas, pudiéndonos indicar que dicha determinación podría ser más sensible y precoz como marcador de enfermedad hepática (71). Además, el TPS se eleva en pacientes con consumo de riesgo de alcohol (>20g/día en mujeres y >30 g/día en varones) incluso sin hepatopatía y en pacientes con sobrepeso y

obesidad. Los valores de TPS se encuentran más elevados en varones que en mujeres y aumentan con la edad (72).

b) Fragmento M30

El anticuerpo M30 detecta un neoepitopo formado tras la degradación de la K18 en la apoptosis, el Asp396 (M30), que está presente en uno de los fragmentos resultantes pero no en la K18 intacta (1,59) (Figura 4). Para detectarlo en suero se utilizando un ELISA kit comercial, M30-Apoptosense (PEVIVA AB, Bromma, Sweden). Además el M30 se puede utilizar también para identificar las células apoptóticas en los tejidos, pues este epitopo no se expresa ni en las células normales ni en aquellas necróticas (1,59). Es interesante destacar que al realizar una inmunohistoquímica para M30 en un tejido hepático no sólo se marcan aquellas células con datos morfológicos de apoptosis (balonización de la membrana, contracción celular y condensación de la cromatina) si no también aquellas células en estadios precoces del proceso apoptótico (27). De tal manera que con esta tinción aumentamos la sensibilidad para la detección de apoptosis en la biopsias hepáticas (27,73). En efecto, dichos fragmentos están presentes en suero únicamente en caso de apoptosis, pues cuando se produce necrosis celular lo que se detecta es la K18 intacta (1). Hay que destacar que, además, en pacientes con patología hepática los niveles de M30 se encuentran elevados en pacientes con hiperglucemia, hipertrigliceridemia, IMC elevado o aumento del perímetro abdominal (74).

c) Fragmento M65

El fragmento M65 se mide también comercialmente utilizando una técnica de ELISA (M65-ELISA assay, PEVIVA AB, Bromma, Sweden) que utiliza dos anticuerpos monoclonales que detectan los residuos 300 y 380 de la K18. Debido a esta características es capaz de detectar tanto los fragmentos como la proteína intacta (1,60) (Figura 4). De esta manera, con la determinación de M65, podemos detectar tanto la apoptosis celular como la necrosis. Los niveles de M65 se han relacionado con el grado de fibrosis en paciente con enfermedades hepáticas de diferentes causas (75).

d) Fragmento CYFRA 21-1

Los niveles de CYFRA 21-1 se miden utilizando una técnica de inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Elecsys CYFRA 21-1; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). El test utiliza la combinación de dos anticuerpos monoclonales (Ks 19,1 y BM 19,21) específicos para los fragmentos de K19. El anticuerpo Ks 19,1 reconoce los residuos 311-335 y BM 19,21 los residuos 346-365 (61). El CYFRA 21-1 se encuentra elevado en diferentes tumores de estirpe epitelial, sobre todo pulmonar (61). Por el momento, se ha estudiado poco su utilidad en las enfermedades hepáticas, habiéndose realizado estudios únicamente en pacientes con hepatopatía alcohólica (76).

4. Utilidad de los niveles séricos de queratinas en las enfermedades hepáticas

a) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos en pacientes con hepatitis crónica por virus de la hepatitis C (VHC)

Los valores de K18, identificados mediante TPS (77) o mediante M30 (28,38,78–80), se encuentran más elevados en los pacientes infectados por VHC que en aquellos no infectados. Dichos valores se relacionan significativamente con los niveles de transaminasas (AST y ALT), con el grado de inflamación o de fibrosis en la biopsia hepática y con el índice apoptótico (número de

hepatocitos con inclusiones reactivas para M30 por 50 campos aleatorios a 40x) (34,38,77–79,81–85). En algunos estudios se han relacionado también con el grado de viremia (86), pero dicho resultado no se ha podido confirmar en otros estudios (38). Cabe destacar que entre un 25% y un 56% de los pacientes infectados por VHC presentaba un valor de TPS (77) o M30 (38,83) elevado siendo normales las transaminasas.

Se ha valorado la evolución de la K18 tras tratamiento con interferón y ribavirina en cuatro estudios (71,78,86,87), observándose un descenso de los niveles de K18 en aquellos pacientes que recibieron tratamiento. Además, se ha observado que aquellos paciente con menores niveles basales de M30 presentaban mayores tasas de respuesta viral sostenida al tratamiento con interferón y ribavirina (87); un valor de M30 de 254 U/l nos puede predecir con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 82% qué pacientes van a responder a ese tratamiento (86).

Tras realizar una tinción de inmunohistoquímica para M30 en las muestras biopsias hepáticas, se observó que la tinción fue positiva sólo en pacientes infectados y que sus concentraciones se relacionaban con el grado de actividad inflamatoria que se observa en la biopsia (38). Con la realización de la inmunohistoquímica para M30 se puede calcular el índice apoptótico, siendo este es más sensible que la detección de cambios morfológicos con hematoxilina-eosina (29).

En resumen, los niveles séricos de TPS y M30 pueden tener valor diagnóstico en la hepatopatía por VHC y se relacionan tanto con el valor de transaminasas como con el grado de inflamación y de fibrosis hepática. Hay que destacar que los niveles de K18 y sus fragmentos pueden estar elevados en pacientes con transaminasas normales, siendo por lo tanto más sensibles en la detección de daño hepático. Finalmente, las concentraciones basales pueden tener un valor pronóstico, prediciendo la respuesta a tratamiento con interferón y ribavirina y se ha observado una disminución de los mismos tras el tratamiento.

b) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos en pacientes con hepatopatía por virus de la hepatitis B (VHB)

Entre los pacientes con hepatopatía por VHB, los niveles de M30 fueron mayores en aquellos pacientes con hepatitis crónica por VHB HBeAg+, seguido de aquellos con hepatitis crónica por VHB HBeAg- (HBeAg-, DNA VHB >20000Ui/ml), seguidos de aquellos con VHB inactivo (HBeAg-, DNA VHB indetectable y ALT normal) (88). Los niveles séricos de M30 pueden ser, además, útiles para diferenciar entre aquellos pacientes con VHB inactivo de aquellos con infección crónica por VHB HBeAg- (89,90).

Aquellos pacientes que desarrollaron un fallo hepático agudo por VHB presentaron valores mayores de M30 y M65 que aquellos con hepatitis crónica por VHB estable (91,92). El ratio M30/M65 fue menor en aquellos pacientes con fallo hepático, donde también se observó una mayor presencia de necrosis en los tejidos biopsiados. Este ratio tiene además un valor pronóstico: a menor ratio, mayor probabilidad de fallecimiento o necesidad de trasplante hepático (91,92).

Tanto los valores de M30 como de M65 se redujeron tras iniciar tratamiento antirretroviral para VHB con entecavir o lamivudina (92). Los niveles de M30, como en otras patologías hepáticas, se relacionan con el valor de transaminasas, albúmina y el grado de inflamación en la biopsia (88). Sólo en un estudio se observó una relación con el grado de fibrosis hepática (93), pero este resultado no se confirmó en el resto de estudio (88–90).

En resumen, los valores de M30 pueden ser útiles para diferenciar los pacientes con una hepatitis crónica de VHB de aquellos con una infección por VHB inactiva, independientemente del HBeAg

y del valor de transaminasas. Los valores de M30 se relacionan con los valores de transaminasas y el grado de inflamación, pero no se ha confirmado su relación con el grado de fibrosis. Tanto M30 como M65 tienen valor pronóstico en caso de fallo hepático y sus valores se reducen tras recibir tratamiento antiviral.

c) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos en pacientes con hepatopatía alcohólica

Los niveles de TPS sérico son mayores en aquellos pacientes con consumo elevado de alcohol (>20 g/día en mujeres y >30 g/día en varones)(72), con un descenso de los mismos tras un periodo de abstinencia (94). En estos estudios, se observa además que los niveles de TPS se relacionaron con los de ALT, AST, GGT y bilirrubina.

En pacientes con hepatopatía alcohólica los niveles de M30 y M65 se relacionaron con el daño histológico existente en las biopsias (95). Además aquellos pacientes con hepatitis aguda presentaban valores más elevados de TPS séricos que aquellos con esteatosis hepática alcohólica (94,96) y valores más elevados de M30 y M65 que aquellos pacientes con cirrosis hepática (97,98). En efecto, un TPS > 235 U/l tiene una sensibilidad del 91% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de hepatitis alcohólica histológica (94). Cabe destacar que los niveles de M65 son mayores a los de M30 en aquellos pacientes de hepatitis aguda alcohólica, indicándonos un importante papel de la necrosis celular en su patogénesis (97).

La inmunohistoquímica con CAM 5.2 MAb (clone CAM 5.2, Becton Dickinson Mountainview, CA, que detecta K8 y K18) en pacientes con hepatopatía alcohólica, demuestra un número mayor de hepatocitos teñidos en aquellos pacientes con hepatitis alcohólica que los que no la tienen, y esto se relaciona con el número de hepatocitos que presentan cuerpos de Mallory-Denk, siendo habitualmente ambas tinciones superponibles (73,96,99). Jeanette *et al.* (100) han observado que los niveles de K18 y sus fragmentos se relacionan con el grado de fibrosis existente; sin embargo dicho hallazgo no se ha confirmado en otros estudios (94,101).

Finalmente, los valores séricos de M30 y M65 son mayores en aquellos pacientes con hepatopatía alcohólica que fallecen en un plazo de 30, 90 días y 5 años, observando además un ratio M30/M65 menor (95,97,102).

Los niveles de CYFRA 21-1 fueron similares en aquellos pacientes con consumo alcohólico que en los sanos, siendo prácticamente normal la tinción realizada para K19 en las biopsias de los pacientes alcohólicos (103).

En resumen, TPS y M30 son útiles para el diagnóstico de consumo alcohólico, así como de hepatitis aguda alcohólica. Como en otras patologías, se relacionan con los niveles de transaminasas y de GGT, pero sólo en un estudio se ha observado una relación significativa del grado de fibrosis. Además, dichos niveles, asociados a los de M65, tienen valor pronóstico en el caso de la hepatitis aguda alcohólica y de hepatopatía alcohólica. Los valores de CYFRA 21-1 parecen poco útiles en esta patología.

d) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos en pacientes con hígado graso no alcohólico (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD)

Los pacientes con NAFLD presentan valores de TPS, M30 y M65 mayores que aquellos sanos (84,104–110) y, entre ellos, aquellos con esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) presentan valores mayores que aquellos con hígado graso simple (75,84,92,104,105,111–132). He *et al.* (133) realizaron un metaanálisis en el cual valoraron el

valor de predicción de NASH de los fragmentos de queratinas; obteniendo un área bajo la curva ROC de 0,82 (IC 95%: 0,79-0,85) para M30 y de 0,80 (IC 95%: 0,76-0,83) para M65. En otro metaanálisis realizado por Chen *et al.* (134), se observó que M30 es muy sensible para diagnosticar NASH en aquellos pacientes con mayor IMC, pudiendo ser útil para el diagnóstico en esta población donde el uso de la elastografía (Fibroscan®) y de la ecografía abdominal presenta importantes limitaciones (135).

Como en las enfermedades hepáticas descritas previamente, los niveles de M30 y M65 se relacionan con los valores de transaminasas (105,112,118,130,136,137), con el IMC, con los valores de triglicéridos y de HbA1c (105,106).

Los valores de TPS, M30 y de M65 se relacionan de forma significativa con el índice de actividad en la biopsia, con el grado de inflamación, balonización, el grado de esteatosis hepática y con los niveles de fibrosis (84,92,109,111,113,115,121,123,126,128,130,131,136,138–145). Hay estudios que parecen indicar que los valores de M65 son más sensibles y específicos que los de M30 para determinar esteatosis y fibrosis en esta patología (75,136,146).

Wu *et al.* (108) observaron que los niveles de M30 y M65 pueden tener valores pronósticos: los pacientes con niveles basales de M65 más elevados presentaron mayor desarrollo de esteatosis en el seguimiento y aquellos con valores menores de M30 presentaron mayores tasas de remisión de esteatosis en el seguimiento. Además los cambios en los valores de M30 también se relacionaron con los cambios histológicos durante el seguimiento: un aumento de M30 se relacionó con un aumento del grado de NAS score en las biopsias y un descenso de M30 con un descenso del score (145).

Hay estudios que han valorado el efecto del tratamiento sobre los valores de K18. Se ha observado una disminución de los niveles de TPS y M30 en aquellos pacientes realizaron dieta y ejercicio (139,147–149). En los pacientes sometidos a cirugía bariátrica también se ha observado un descenso de los valores de M30, siendo este descenso mayor en aquellos pacientes con diagnóstico de NASH previo (113). Vuppalanchi *et al.* (150) valoraron el impacto del tratamiento con pioglitazona o vitamina E en adultos y del tratamiento con metformina o vitamina E en niños. Observaron en ambos casos una reducción de los valores de M30 tras los tres tratamientos y este descenso se relacionó de forma significativa con la mejoría histología en las biopsias hepáticas de los pacientes (grado de fibrosis, esteatosis, inflamación y balonización).

Finalmente, Liang *et al.* (151) observaron que en los pacientes con hepatopatía por VHB aquellos que presentaban NASH asociado tenían niveles más elevados de M30, considerando que podría ser útil para diferenciar ambas patologías.

En resumen, TPS, M30 y M65 pueden ser útiles para diferenciar un paciente con NAFLD de uno sano y un paciente con NASH de uno con esteatosis simple. Además, los niveles de los tres parámetros se han relacionado con el daño histológico (grado de esteatosis, inflamación, balonización y fibrosis hepática) y con los valores de transaminasas. Hay estudios que parecen indicar que M65 es mejor que M30 tanto para el diagnóstico de NASH como con la valoración del daño hepático. Además, parece que tanto los niveles de M30 como de M65 pueden tener valor pronóstico. Finalmente, tanto TPS como M30 mejoran tras la reducción de peso con dieta, ejercicio o cirugía bariátrica o el uso de fármacos como metformina, pioglitazona o vitamina E.

e) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos en pacientes con colangitis biliar primaria y otras enfermedades colestásicas

Yagmur *et al.*(54) observaron que los niveles de M30 se encontraban muy elevados en pacientes con colestasis severa e inflamación ductal. Posteriormente, Sekiguchi *et al.*(152) estudiaron los niveles de M30 y M65 en pacientes con colangitis biliar primaria (CBP), observando que los valores de M30 y M65 eran significativamente más elevados en pacientes con CBP, comparándolos con los controles sanos. Además, los valores de M65 se han relacionado con el grado de fibrosis hepática existente y tienen un valor pronóstico en el seguimiento a 8 años: los pacientes con M65 más elevado presentaban mayor mortalidad y mayor tasa de complicaciones (descompensación hidrópica, hepatocarcinoma y sangrado por varices).

Denk *et al.*(153) también han estudiado los niveles de M30 y M65 en pacientes con CBP y colangitis esclerosante primaria, observando que estos eran mayores que en controles sanos. Además, los valores de M30 y M65 se han relacionado con el grado de actividad y gravedad de la colangitis esclerosante primaria.

Simopoulos *et al.*(154) han analizado los niveles de M30 y M65 en pacientes con colecistitis crónica litiásica. No observaron diferencias en los valores de M30 y M65 séricos o biliares entre aquellos pacientes con colecistitis crónica activa y aquellos con inactiva.

En resumen, los valores de M30 y M65 pueden ser útiles para diferenciar aquellos pacientes con enfermedades colestásicas (CBP o colangitis esclerosante primaria) de aquellos sanos y los valores de M65 pueden tener valor pronóstico prediciendo fibrosis hepática y mortalidad de los pacientes con CBP.

f) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos tras el trasplante hepático

Tras estudiar los cambios de M65 y M30 tras el trasplante hepático, se ha observado que M65 alcanza su nivel máximo justo tras la cirugía mientras que M30 lo alcanza a las 48h; ambas determinaciones se normalizan a los 7 días del trasplante (155,156).

Comparando los niveles entre aquellos receptores de hígado de donantes vivos con aquellos de donante de cadáver, se han observado unos valores mayores tanto de M30 como de M65 en los casos de donante de cadáver. Se cree que esto es debido a un menor daño por isquemia/reperfusión en los hígados de donantes vivos (menos tiempo de isquemia, donantes más jóvenes)(156).

En caso de complicaciones tras el trasplante como infecciones o alteraciones en la reperfusión del órgano (trombosis de la arteria hepática, de la venas suprahepáticas o un sangrado mayor) se ha observado un aumento de M65 y M30 (155). Por lo que cambios en los valores de los fragmentos de la queratina-18 nos pueden indicar una complicación post-trasplante.

En resumen, el pico de M65 es más precoz que M30 en aquellos pacientes que han recibido trasplante hepático; esto nos indica un predominio de daño por necrosis en las primeras horas del daño por isquemia/reperfusión seguido de un daño por apoptosis de los hepatocitos. Un nuevo aumento de M30 o M65 en el post-trasplante, nos puede indicar complicaciones como infecciones o daño por reperfusión del órgano.

Tabla I.1: Resumen de los resultados encontrados en los estudios que valoraron la utilidad del uso de la queratina-18 y sus fragmentos en las principales hepatopatías.

Enfermedad hepática	Diagnóstico	Inflamación -daño hepático	Fibrosis hepática	Mejoría tras tratamiento	Comentarios
Hepatopatía por VHC TPS M30 M65	Sí Sí NE	Sí Sí NE	Sí Sí NE	Sí Sí NE	
Hepatopatía por VHB TPS M30 M65	NE Sí Sí	NE Sí NE	NE Sí/No NE	NE Sí Sí	La ratio M30/M65 tiene valor pronóstico (a menor ratio, peor)
Hepatopatía alcohólica TPS M30 M65	Sí Sí Sí	Sí Sí Sí	No Sí/No NE	Sí No Sí	La ratio M30/M65 tiene valor pronóstico (a menor ratio, peor)
Esteatohepatitis no alcohólica (NASH) TPS M30 M65	Sí Sí Sí	Sí Sí Sí	Sí Sí Sí	Sí Sí NE	
Colangitis biliar primaria TPS M30 M65	NE Sí Sí	NE NE NE	NE NE Sí	NE NE NE	Valores mayores de M65 se relacionaron con mayor mortalidad

NE: no estudiado; Si: la mayoría de estudios realizados evidenciaron su utilidad; No: la mayoría de estudios realizados evidenciaron su no utilidad; Sí/No: hay estudios que evidenciaron su utilidad y otros que no (referencias en el texto de apartados previos).

g) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos pacientes con fallo hepático fulminante y hepatitis tóxicas

Bechmann *et al.*(157) observaron que los pacientes con fallo hepático fulminante presentaban valores elevados de M30 y M65, destacando que aquellos que no sobrevivieron presentaban valores mayores de M65. Valoraron sustituir la bilirrubina por el valor de M65 en la fórmula MELD, observando una mayor sensibilidad y especificidad para predecir aquellos pacientes que se iban a morir.

Además, Volkman *et al.*(158) han observado que los pacientes con mayores niveles de M30, IL-6 y TNF- α presentaban mayores tasas de recuperación espontánea, mientras que aquellos con valores más elevados de M65 presentaban mayores tasas de mortalidad y de necesidad de trasplante hepático. Chong *et al.* (159) también han observado valores mayores de M30 en pacientes con mayores tasas de recuperación espontánea, pero sin confirmar el resto de

resultados. Estos resultados no se han confirmado en el estudio de Rutherford *et al.* (160) donde los pacientes que no han sobrevivido presentaban mayores valores de M30.

Adebayo *et al.* (161) han observado que aquellos pacientes con un fallo hepático fulminante sobre una enfermedad hepática crónica presentan mayores niveles de M30 pero menores de M65 que aquellos con un fallo hepático agudo no relacionado con una intoxicación por paracetamol, con un ratio M30/65 (índice apoptótico) mayor en estos pacientes. Este dato podría explicar que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte de los hepatocitos en pacientes con fallo hepático fulminante sobre hepatopatía crónica previa.

Varios estudios evidenciaron que aquellos pacientes con intoxicación por paracetamol presentaban valores elevados de M65 (162) y que estos fueron mayores a los observados en otras intoxicaciones (158,163). Sin embargo, no hubo importantes variaciones en los niveles de M30 (158,163). Los niveles de M65 y M30 fueron mayores en aquellos pacientes con transaminasas elevadas que en aquellos con consumo tóxico de paracetamol pero con transaminasas normales (164). A pesar de que se ha encontrado relación entre los valores de M65 y el resultado del King's College Criteria (los criterios utilizados para valorar mortalidad en pacientes con fallo hepático agudo) (163,164), no se ha observado diferencias ni en M30 ni en M65 entre aquellos pacientes con recuperación espontánea y aquellos que necesitaron trasplante o fallecieron (158,164,165).

Thulin *et al.* (166) han estudiado las variaciones de M30 y M65 en pacientes que habían recibido tratamiento antituberculoso con elevación de transaminasas y en voluntarios que habían recibido paracetamol (4 g/día). Las concentraciones séricas de M30 y M65 se encontraron aumentadas durante la primera semana de tratamiento antituberculoso, de forma similar a ALT. En aquellos pacientes que recibieron paracetamol, el aumento se observó a partir del 7^º-8^º día de tratamiento, mientras que la ALT alcanzó su máximo en el día 8.

En resumen, las concentraciones séricas de M30 y M65 pueden ser útiles para diagnosticar un fallo hepático fulminante. Hay estudios que parecen indicar que el valor de fragmentos de K18 puede tener valor pronóstico, con mayor probabilidad de recuperación en aquellos pacientes con mayor M30 y menor en aquellos con mayor M65, siendo éstos un dato indirecto de un peor pronóstico en aquellos pacientes con mayor necrosis hepática. En las hepatopatías por intoxicación por paracetamol, se han observado niveles más elevados de M65 que en el resto de intoxicaciones, sin que estos tengan valor pronóstico.

h) Determinación de los niveles de queratinas y sus fragmentos pacientes con otras enfermedades hepáticas

Macdonald *et al.* (167) han estudiado los niveles de M30 y M65 en pacientes con cirrosis hepática con descompensaciones de su enfermedad (descompensación hidrópica, sangrado gastrointestinal, encefalopatía hepática o infección bacteriana). Han encontrado que los pacientes con una descompensación aguda presentaban valores más elevados de M30 y M65 que aquellos cirróticos compensados y que controles sanos. Además, los valores de M30 y M65 son factores independientes de mala evolución y predictores de mortalidad a 90 días. Los niveles de M30 y M65 se han visto relacionados con los valores de leucocitos, bilirrubina y ALT.

Denk *et al.* (153) han estudiado los valores de M30 y M65 en enfermedades hepáticas de origen autoinmune observando que los pacientes con hepatitis autoinmunes tenían valores más elevados con respecto a controles sanos. En un estudio previo de nuestro grupo (70), observamos que las concentraciones de TPS sérico se encontraban elevadas en la mayoría (63%) de 22 pacientes con hepatitis autoinmune entre un conjunto de pacientes estudiados en una consulta de Hepatología. Recientemente, Derben *et al.* (168) han observado que los fragmentos M30 y M65 mejoran la predicción de recaída de la hepatitis autoinmune con remisión bioquímica.

Lorente *et al.*(169,170) han estudiado los valores de M30 en pacientes ingresados por una sepsis grave, observando que aquellos pacientes que no sobrevivieron presentaban valores más elevados de M30 tanto al ingreso como durante la primera semana. Encontraron relación entre los valores de M30 y el grado de disfunción hepática o renal. Estos hallazgos se observaron también en el estudio de Hofer *et al.*(171), pero no en el de Roth *et al.*(172).

Weemhoff *et al.* (173) han estudiado la variación de M30 y M65 séricos en pacientes con hepatitis isquémica, observando que los niveles de M30 y M65 se relacionaron en todo momento con los valores de transaminasas de los pacientes. Además, hay que destacar que los niveles de M65 fueron mayores que los de M30 a lo largo de toda la evolución, evidenciando la importancia de la necrosis de los hepatocitos en la patogenia de la enfermedad.

Luft *et al.* (174) y Waterhouse *et al.* (175) han estudiado los valores de M30 en pacientes con enfermedad por injerto contra huésped hepática o intestinal trasplantados de médula ósea. Observaron que los niveles de M30 aumentan en aquellos pacientes que desarrollaron enfermedad por injerto contra huésped, incluso antes de la aparición de la clínica, y que estos valores mejoran con el tratamiento. Los valores de M30 no se alteraron en caso de hepatopatía por toxicidad farmacológica o por enfermedad veno-oclusiva, siendo útiles para diferenciar ambos cuadros.



Objetivos e hipótesis



De los resultados recogidos en la Introducción General se puede resumir que las concentraciones séricas de fragmentos de queratinas, especialmente K18, de las cuales el TPS (*Tissue Polypeptide Specific Antigen*), cuya determinación existe de modo comercial, se encuentran elevados en algunas hepatopatías, en posible relación con necrosis/apoptosis hepatocitaria. Sin embargo, existen aspectos por aclarar en las principales causas de hepatopatía en nuestro medio (hepatitis C, alcohol, hígado graso no alcohólico, hepatitis autoinmunes o trasplante hepático). De acuerdo con ello, los **Objetivos e Hipótesis** de los diferentes subestudios de esta tesis son los siguientes:

En los pacientes con hepatitis crónica por virus hepatitis C (VHC):

El objetivo principal del subestudio es (1) valorar si existen cambios en los niveles de TPS (K18) y en el grado de fibrosis de los pacientes que reciben tratamiento con antivirales de acción directa para el VHC. Los objetivos secundarios son valorar la relación entre los valores de TPS (K18) y (2) el resto de parámetros analíticos y el grado de fibrosis hepática de los pacientes, así como (3) valorar si la persistencia de (K18) sérico elevado tras el tratamiento puede predecir la existencia de complicaciones o de otras hepatopatías asociadas.

Hipótesis: Las concentraciones de TPS (K18) séricas se relacionan con el grado de fibrosis hepática y ayudan a predecir la misma. Las concentraciones de TPS (K18) se correlacionan con las de los marcadores de daño hepático y descienden con el tratamiento antivírico. La persistencia de TPS (K18) elevado tras el tratamiento puede indicar la ausencia de respuesta o la presencia de otras hepatopatías asociadas.

En los pacientes con abuso de alcohol:

Los objetivos del subestudio son valorar (1) el grado de elevación del TPS sérico (K18) en pacientes con complicaciones del consumo de alcohol que ingresan en el hospital, especialmente en los pacientes con datos de hepatitis alcohólica y (2) la posible relación existente entre sus concentraciones y las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, TNF-alfa), así como con las de las moléculas implicadas en el reconocimiento de endotoxina (LBP y la fracción soluble de CD14 [sCD14]).

Hipótesis: El TPS sérico (K18) se encuentra elevado en los pacientes con abuso de alcohol que ingresan en el hospital y sobre todo en aquellos casos con rasgos bioquímicos de hepatitis alcohólica. Los niveles séricos de TPS (K18) se correlacionan con los de citoquinas proinflamatorias que intervienen en la promoción de la apoptosis celular.

En los pacientes con hígado graso no alcohólico (NAFLD):

Los objetivos del subestudio son (1) valorar la posible elevación del TPS sérico (K18) en pacientes con diferentes formas de NAFLD con respecto a controles sanos y (2) comprobar si los valores de TPS (K18) presentan valor pronóstico (en términos de fallecimiento o desarrollo de complicaciones como cirrosis, hepatocarcinoma, o necesidad de trasplante hepático) en estos pacientes.

Hipótesis: El TPS (K18) sérico se encuentra elevado en paciente con NAFLD respecto a sujetos control sin la enfermedad. Las concentraciones de TPS (K18) podrían tener valor pronóstico en estos pacientes.

En los pacientes con hepatopatías autoinmunes:

Los objetivos del subestudio son (1) comparar las concentraciones de TPS (K18) séricas en pacientes con hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria y síndrome de solapamiento (*overlap*) entre ambas, con la finalidad de investigar si son capaces de distinguir entre esas tres entidades y (2) analizar la correlación entre las concentraciones de TPS (K18) séricas y los marcadores habituales de daño hepático en estos pacientes.

Hipótesis: El TPS (K18) sérico se encuentra elevado en los pacientes con hepatitis autoinmune respecto a los pacientes con colangitis biliar primaria. Los pacientes con síndrome *overlap* presentan mayores concentraciones de TPS (K18) que los pacientes con colangitis biliar primaria. Las concentraciones de TPS (K18) se correlacionan con las de los marcadores habituales de daño hepático, especialmente con las que indican citólisis hepática.

En los pacientes con trasplante hepático:

Los objetivos del subestudio son (1) describir las variaciones normales en las concentraciones de los fragmentos de K18 (TPS y M30) y K19 (CYFRA 21-1) tras el trasplante hepático, a corto y medio plazo, y (2) valorar, en casos individuales, sus cambios en relación con la aparición de complicaciones durante el postrasplante.

Hipótesis: El objetivo fundamental del subestudio es descriptivo, para el que no procede hipótesis a priori. Se compararán las variaciones en las concentraciones séricas de TPS, así como de otros fragmentos de K18 más relacionados con la apoptosis (M30) y de otras queratinas (K19) séricas y su relación con los marcadores habituales de daño hepático en estos pacientes.

Subestudio 1:

Evolución de las concentraciones séricas de queratina-18 (TPS) y de la fibrosis hepática tras el tratamiento con antivirales de acción directa en pacientes con hepatopatía por Virus de la Hepatitis C

1. Introducción específica

La infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de hepatopatía, afectando entre el 1,5 y 2,3% de la población mundial (176,177). La aparición de los antivirales de acción directa supuso un vuelco en el manejo de la enfermedad permitiendo la curación de la mayor parte de los pacientes (178–183).

En este momento, la evaluación de la fibrosis hepática previa al inicio de tratamiento y al final del mismo es esencial para valorar el riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma, determinando así cuál debe ser el seguimiento de estos pacientes, que ha de ser más intensivo en aquellos pacientes con fibrosis avanzada. De hecho, en estudios previos, se ha observado una mejoría del grado de fibrosis tras el tratamiento con estos fármacos (184–189) y por lo tanto una reducción del riesgo posterior de complicaciones, como hepatocarcinoma. Los métodos no invasivos como la elastografía hepática (190) y las escalas de biomarcadores séricos (*AST-to-Platelets Ratio Index* [APRI] e *Índice de FIBrosis con 4 parámetros* [FIB-4]) (191,192) permiten una cierta estimación de la fibrosis hepática sin necesidad de realizar una biopsia hepática con este fin.

Se cree que la apoptosis de los hepatocitos juega un papel importante en el curso de la hepatopatía por VHC y en desarrollo de la fibrosis (35,36). La K18, una de las principales proteínas del citoesqueleto (3), es fragmentada durante la apoptosis y sus fragmentos son liberados al suero (1). Los fragmentos de K18 pueden ser detectados a través de tres anticuerpos: TPS (*Tissue Polypeptide Specific Antigen*) (57), M30 (1) y M65 (60). Tanto los valores de TPS como los de M30 se encuentran en los pacientes con infección por VHC que en los no infectados (28,34,77,80,83,193) y se han relacionado tanto con el grado de fibrosis hepática (38,77,80,81,83,193) como con los niveles de transaminasas (77,80,82) Además en algunos estudios se ha observado una reducción de los niveles de TPS (70) o M30 (78,87) tras la curación viral.

Las posibles variaciones en las concentraciones séricas de los fragmentos de K18, su valor en la evaluación de fibrosis hepática y en la detección de complicaciones no se ha estudiado suficientemente en los pacientes con hepatopatía por VHC tratados con antivirales de acción directa.

2. Objetivos

El objetivo principal del estudio es valorar si existen cambios en los niveles de K18 (TPS) y en el grado de fibrosis de los pacientes que recibieron tratamiento con antivirales de acción directa para el VHC.

Los objetivos secundarios son (1) valorar la relación entre los valores de K18 (TPS) y (2) el resto de parámetros analíticos y el grado de fibrosis hepática de los pacientes, así como (3) valorar si la persistencia de K18 (TPS) sérico elevado tras el tratamiento puede predecir la existencia de complicaciones o de otras hepatopatías asociadas.

3. Pacientes, material y métodos

a) Diseño del estudio y participantes

Se realizó un estudio observacional de prevalencia inicial para prueba diagnóstica, con seguimiento posterior longitudinal (cohorte retrospectiva) en el que se incluyeron aquellos pacientes monoinfectados por VHC que recibieron tratamiento con antivirales de acción directa a lo largo de 12 meses (entre el 1 de febrero de 2015 y el 1 de febrero de 2016).

Se obtuvo el listado de aquellos pacientes tratados en dicho periodo en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela a través del Servicio de Farmacia Hospitalaria. Se incluyeron aquellos pacientes mayores de 18 años tratados por el Servicio de Medicina Interna.

Los criterios de exclusión fueron: ser tratados por un servicio diferente a Medicina Interna, ser menor de 18 años, presentar coinfección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y no disponer de valor TPS previo al tratamiento.

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes y se recogieron las siguientes variables: edad, sexo, genotipo viral, carga viral al inicio del tratamiento, consumo de alcohol, coinfección por Virus de la Hepatitis B (VHB), presencia de otras enfermedades hepáticas (hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, hemocromatosis, esteatohepatitis no alcohólica), tratamiento para el VHC recibidos previamente, motivo de indicación del tratamiento, tratamiento utilizado y duración del mismo, respuesta al tratamiento al final del tratamiento y a las 12 semanas del mismo, niveles de transaminasas y TPS previos, al final de tratamiento y a las 12 semanas de finalizar el mismo, el grado de fibrosis al inicio y a las 12 semanas de finalizar el tratamiento.

b) Determinación del grado de fibrosis hepática

El grado de fibrosis al inicio del tratamiento y a los 3 meses de finalizar el tratamiento se determinó mediante biopsia hepática o elastografía hepática (Fibroscan® 402, Echosens).

En el caso de disponer de estudio histológico se determinó el grado de fibrosis utilizando la escala METAVIR: F0 si no fibrosis, F1 si observa fibrosis portal sin septos, F2 si se observa fibrosis portal con la presencia de algún septo, F3 si se observan numerosos septos, pero sin cirrosis y F4 si cirrosis.

En el caso del Fibroscan®, se consideró como valor la media de las mediciones realizadas, considerando como valor válido la realización de al menos 10 mediciones con una proporción de éxito del 60%. Se consideró fibrosis grado 1 (F1) valores de Fibroscan® menores a 7,5 KPa, fibrosis grado 2 (F2) valores entre 7,5 y 9,5 KPa, fibrosis grado 3 (F3) valores entre 9,5 y 12,5 KPa y fibrosis grado 4 (F4) valores superiores a 12,5 KPa.

Además, se consideraron como F4 aquellos pacientes que presentaban datos ecográficos compatibles con cirrosis hepática (aumento de la ecogenicidad hepática con borde irregular de aspecto nodular y datos de hipertensión portal como aumento del calibre portal, repermeabilización de la vena umbilical o esplenomegalia).

Se consideró que padecían fibrosis grave o avanzada aquellos pacientes con F3 o F4 con los criterios expuestos.

Al inicio del tratamiento se determinó la fibrosis hepática mediante biopsia en 12 pacientes, mediante Fibroscan® en 111 pacientes y mediante estimación indirecta por datos ecográficos en 20 pacientes. A los 3 meses de finalizar el tratamiento se estimó la fibrosis mediante Fibroscan® en 65 pacientes y mediante estimación indirecta por datos ecográficos en 27 pacientes.

Se calcularon dos escalas de estimación de fibrosis, el APRI y el FIB-4, al inicio del tratamiento y a los 3 meses de haber finalizado el mismo. Para el cálculo del APRI se utilizó la fórmula:

$$AST (U/l) \div Plaquetas (x10^9/\mu l) \times 100$$

Para el cálculo de FIB-4 se utilizó la fórmula:

$$\frac{Edad (años) \times AST (U/l)}{Plaquetas (x10^9/\mu l) \times ALT (U/l)}$$

c) Determinaciones serológicas

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) se determinaron con un inmunoensayo quimio-luminescente comercial (Immulite-TPS; Siemens Medical Solution Diagnostics, Gwynedd, UK) a través de una plataforma automatizada (Immulite-2000, Siemens). Las determinaciones se realizaron como parte de la práctica clínica habitual, que en la unidad asistencial mencionada incluye rutinariamente la determinación de K18 (TPS) como marcador de daño hepático. El test emplea el anticuerpo monoclonal M3, que es específico frente a los residuos 322-340 de la K18 (62)(57). El límite de detección de este método es de 15 U/l y se considera como límite superior de la normalidad 80 U/l.

d) Análisis estadísticos

El tamaño muestral inicial de 130 se estimó para obtener, en la fase inicial de prevalencia para prueba diagnóstica, con un riesgo alfa del 5% y beta del 20% una precisión del 9% para una variable de máxima dispersión ($p=q=0,5$). El mismo tamaño muestral sería más que suficiente, con los mismos riesgos alfa y beta, para detectar en el estudio longitudinal, cambios en la K18 (TPS) hacia la normalización en el 85% de los casos y hacia valores anormales en el 15%. Con esos presupuestos, se incluyeron los 149 pacientes que cumplían los criterios de inclusión.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables mencionadas (medidas habituales de tendencia central y de dispersión para las variables continuas; porcentajes e intervalos de confianza [cuando fue preciso] para variables cualitativas).

La estadística analítica incluyó el test de Mann-Whitney para la comparación de variables numéricas entre grupos, el test de Spearman para analizar la correlación existente entre las variables numéricas y un test de Wilcoxon de datos apareados para analizar los cambios existentes en las variables numéricas tras el tratamiento. Las pérdidas en el seguimiento fueron excluidas de esos análisis. Se obtuvieron curvas ROC para valorar la precisión diagnóstica de la K18 (TPS) en la predicción de fibrosis avanzada. Para calcular el punto óptimo de corte se aplicó el criterio de Youden. Para el análisis multivariante de los factores asociados a fibrosis avanzada se emplearon modelos de regresión logística binaria. A efectos de cálculos estadísticos, los valores de TPS por debajo del límite de detección se consideraron como cero. Todos los contrastes fueron bilaterales. En los casos oportunos se presentaron los intervalos de confianza al 95% para las estimaciones. Consideramos estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

e) Consideraciones éticas

El estudio fue realizado con el consentimiento de los pacientes, autorización de Comité Ético y dentro de las directrices de la Declaración de Helsinki.

4. Resultados

a) Características generales

En los 149 pacientes la mediana de edad era de 53 años (RIC: 46-58 años), siendo el 68,5% varones.

Un 31,5% de los pacientes refería un consumo al menos moderado de alcohol y un 8,1 % (12 pacientes) había recibido un trasplante alogénico hepático.

La mayoría de los pacientes, un 98,0%, presentaron respuesta viral sostenida a las 12 semanas de la finalización del tratamiento. Tres pacientes no acudieron al seguimiento y dos pacientes presentaron reactivación viral tras las 12 semanas (ambos Genotipo 1 con fibrosis grado 4, uno tratado con sofosbuvir, ledipasvir y ribavirina durante 12 semanas y el segundo con sofosbuvir y

daclatasvir durante 24 semanas). Las características generales de la población de estudio se describen en la Tabla 1.1 y Tabla 1.2.

Un 86,6% (129 pacientes) presentaban un TPS>80 U/l previo al tratamiento, con una media de 356 U/l. El valor de TPS fue mayor en aquellos pacientes con consumo de alcohol: TPS medio en los consumidores 458 U/l vs 310 U/l en los no consumidores. Antes del tratamiento, 22 pacientes tenían ambas transaminasas (AST y ALT) normales, observando un TPS elevado un 40,9% de estos.

Tabla 1.1: Características generales basales de los pacientes.

Característica	Número (%)
Sexo	
Varones	102 (68,5)
Mujeres	47 (31,5)
Trasplante hepático previo	
Sí	12 (8,1)
No	137 (91,9)
Consumo de alcohol	
Sí	47 (31,5)
No	102 (68,5)
Manifestaciones extrahepáticas	
Crioglobulinemia	1 (0,7)
Porfiria cutánea tarda	2 (1,4)
Púrpura trombocitopénica idiopática	1 (0,7)
Genotipo del VHC	
Genotipo 1	99 (66,4)
Genotipo 2	2 (1,3)
Genotipo 3	23 (15,4)
Genotipo 4	22 (14,8)
No disponible	3 (2,0)
Grado de fibrosis	
Grado 1	8 (5,4)
Grado 2	38 (25,5)
Grado 3	25 (16,8)
Grado 4 o cirrosis	72 (48,3)
No disponible	6 (4,0)

Tabla 1.2: Tratamiento recibido y la respuesta al mismo.

Característica	Número (%)
Motivo del tratamiento	
Grado de fibrosis	129 (86,7)
Trasplante hepático	12 (8,1)
Manifestación extrahepática	3 (2,0)
Deseo de embarazo	2 (1,3)
Otros	3 (2,0)
Tratamiento recibido	
Sofosbuvir+Ledipasvir	54 (36,2)
Ombitasvir+Paritaprevir+Ritonavir+Dasabivir	39 (26,2)
Sofosbuvir+Daclatasvir	31 (20,8)
Sofosbuvir+Simeprevir	13 (8,7)
Ombitasvir+Paritaprevir+Ritonavir	5 (3,4)
Sofosbuvir+Interferón	3 (2,0)
Sofosbuvir	2 (1,3)
Simeprevir+Interferón	2 (1,3)
Asociación con Ribavirina	
Sí	59 (39,6)
No	90 (60,4)
Duración del tratamiento	
12 semanas	101 (67,8)
24 semanas	48 (32,2)
Respuesta al final del tratamiento	
Sí	146 (98,0)
No	0 (0,0)
No acudieron al seguimiento	3 (2,0)
Respuesta a las 12 semanas del tratamiento	
Sí	144 (96,6)
No	2 (1,3)
No acudieron al seguimiento	3 (2,0)

b) Relación del TPS con el resto de parámetros analíticos y el grado de fibrosis

El TPS al inicio del tratamiento se correlacionó de forma estadísticamente significativa con el valor de ALT (ρ 0,64, $p < 0,001$), el de AST (ρ 0,72, $p < 0,001$), el de GGT (ρ 0,41, $p < 0,001$), el de fosfatasa alcalina (ρ 0,25, $p = 0,003$) y el de INR (ρ 0,35, $p < 0,001$). No observamos relación con la viremia previa al tratamiento (datos no mostrados).

Además, el TPS previo al tratamiento se correlacionó de forma significativa con el grado de fibrosis medido con Fibroscan® (ρ 0,47, $p < 0,001$; Tabla 1.3) siendo pues mayor en aquellos pacientes con más fibrosis. Los pacientes con fibrosis grado 1 presentaron una mediana de TPS de 115 U/l (RIC: 65-232 U/l), aquellos con fibrosis grado 2 una mediana de TPS de 136 U/l (RIC: 85-257 U/l), aquellos con fibrosis grado 3 una mediana de TPS de 212 U/l (RIC: 132-277 U/l) y aquellos con fibrosis grado 4 una mediana de 318 U/l (IQR: 200-642 U/l) (Figura 1.1).

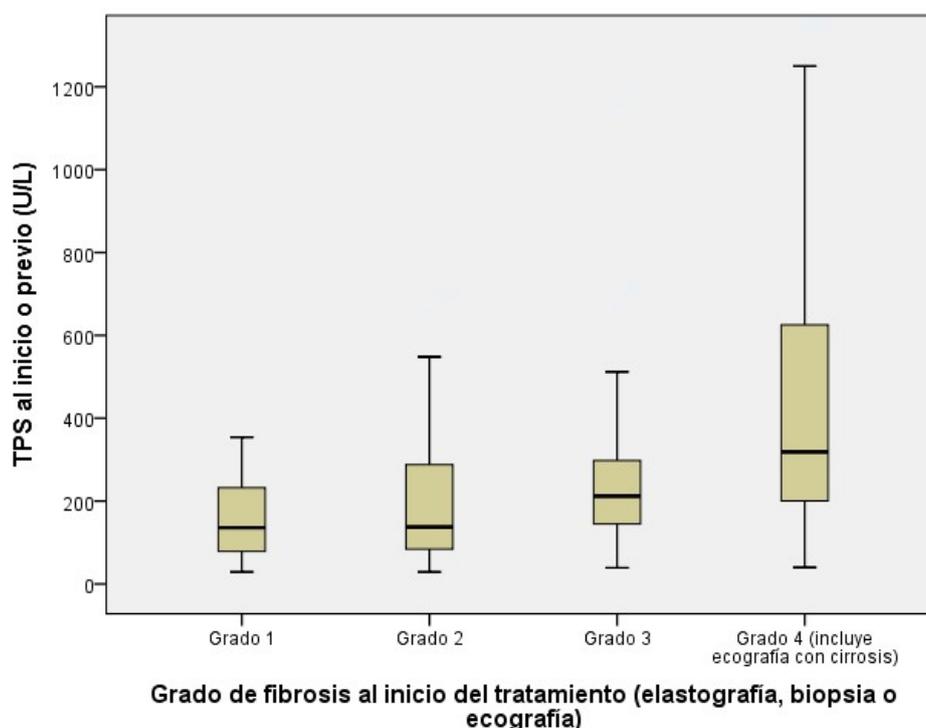


Figura 1.1: Relación entre el valor de TPS y los diferentes grados de fibrosis. El valor de TPS se correlaciona con el grado de fibrosis hepática, siendo mayores las concentraciones de TPS en aquellos pacientes con mayor fibrosis ($p < 0,001$).

Tabla 1.3: Grado de correlación entre las distintas determinaciones analíticas, scores de fibrosis y el valor de fibrosis medidas por Fibroscan®.

	Coeficiente de correlación (ρ)	Valor de p
TPS (U/l)	0,47	< 0,001
ALT (U/l)	0,29	0,02
AST (U/l)	0,48	< 0,001
GGT (U/l)	0,46	< 0,001
Fosfatasa alcalina (U/l)	0,36	< 0,001
Bilirrubina total (mg/dl)	0,26	0,01
INR-protrombina	0,43	< 0,001
Índice APRI	0,56	< 0,001
Índice FIB-4	0,54	< 0,001

Entre las correlaciones del resto de parámetros analíticos con el valor de fibrosis medida por Fibroscan®, la AST, GGT y INR mostraron el mayor coeficiente (Tabla 1.3). Ambos scores de

predicción de fibrosis (APRI y FIB-4) demostraron un coeficiente de correlación mayor a 0,5 (Tabla 1.3).

En las curvas ROC para analizar el valor del TPS y los scores habituales de fibrosis (APRI y FIB-4) en el diagnóstico de fibrosis hepática avanzada se observa que el valor del TPS como parámetro aislado es sólo ligeramente inferior al de dichos scores combinativos (Figura 1.2).

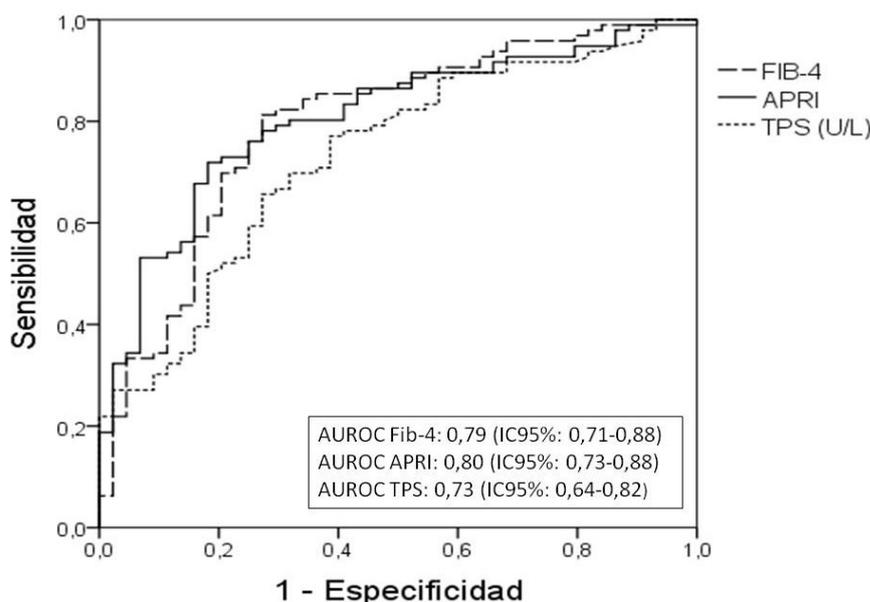


Figura 1.2: Curva ROC (receiver-operating characteristics) en el que se representa el grado de predicción de fibrosis realizado por el valor de TPS y los scores habituales de fibrosis (APRI y Fib-4). AUROC, área bajo la curva ROC.

Para el cálculo de los parámetros de precisión diagnóstica de los scores habituales (APRI y FIB-4) de forma dicotómica (alto vs no alto) se tomaron los valores de referencia habituales de 1,5 y 3,25 respectivamente (191,192). Para el TPS se estableció el punto de corte de 160 U/l con el criterio de Youden. Los datos de precisión diagnóstica se representan en la Tabla 1.4. Tanto APRI como FIB-4 predicen una fibrosis avanzada (fibrosis igual o mayor a 3) con una buena especificidad pero con escasa sensibilidad. Sin embargo, el valor de TPS ≥ 160 U/l presenta mejor sensibilidad pero en detrimento de la especificidad.

Tabla 1.4: Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud positiva de los scores (APRI y FIB-4) y el TPS para predecir fibrosis avanzada.

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VP positivo (%)	VP negativo (%)	LR positiva
APRI $\geq 1,5$	50,0 (39,6-60,4)	93,2 (81,3-98,6)	94,1 (84,1-98,0)	46,1 (40,8-51,4)	7,33 (2,42-22,5)
FIB-4 $\geq 3,25$	49,0 (38,6-59,4)	84,1 (69,9-93,4)	87,0 (76,8-93,2)	43,0 (37,4-48,9)	3,08 (1,51-6,26)
TPS ≥ 160 U/L	77,3 (67,7-85,2)	60,9 (45,4-74,9)	80,7 (74,1-85,9)	56,0 (45,2-66,3)	1,98 (1,36-2,88)

VP: valor predictivo, LR: razón de verosimilitud. Los datos son estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (entre paréntesis).

En los modelos predictivos mediante regresión logística para fibrosis avanzada (Tabla 1.5) se observa que tanto el APRI, el FIB-4 y el TPS tienen individualmente un valor predictivo significativo. En modelos multivariantes se observa como el TPS no aporta información significativa al APRI en la predicción de fibrosis grave (Tabla 1.5). Sin embargo, el TPS sí que aporta una cierta información complementaria significativa al FIB-4 para el diagnóstico de dicha fibrosis.

Tabla 1.5: Modelos predictivos para fibrosis grave (F \geq 3). Regresión logística.

Modelos univariantes		
Variable	OR (IC 95%)	P
APRI	5,41 (2,50-11,7)	<0,001
FIB-4	1,61 (1,24-2,08)	<0,001
TPS (U/L)	1,00 (1,00-1,01)	0,001
Modelo multivariante con APRI y TPS		
APRI	4,32 (1,86-10,0)	0,001
TPS (U/L)	1,00 (0,99-1,00)	0,319
Modelo multivariante con FIB-4 y TPS		
FIB-4	1,41 (1,01-1,83)	0,007
TPS (U/L)	1,00 (1,00-1,00)	0,019

OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza.

c) Cambios en el grado de fibrosis y en los parámetros analíticos tras el tratamiento

Tras el tratamiento se observó una disminución de los niveles de TPS, ALT, AST y GGT además de una mejoría de la fibrosis medida por Fibroscan® y los scores de fibrosis (Tabla 1.6 y Figura 1.3).

Tabla 1.6: Cambio de los parámetros analíticos a las 12 semanas de finalizado el tratamiento.

	Pre-tratamiento		A las 12 semanas del fin del tratamiento		Valor de P
	Mediana	RIC	Mediana	RIC	
Fibrosis (KPa)	11,6	8,6-18,0	7,9	5,7-13,4	<0,001
TPS (U/l)	242,0	129,5-434,0	68,0	31,5-114,5	<0,001
ALT (UI/l)	72,0	44,2-118,0	21,0	20,0-32,0	<0,001
AST (UI/l)	62,0	39,0-115,2	23,0	20,0-32,0	<0,001
GGT (UI/l)	67,5	38,0-115,2	25,0	18,0-44,0	<0,001
F. alcalina(UI/l)	184,0	141,0-225,0	166,0	133,5-200,5	< 0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,7	0,5-1,0	0,6	0,5-0,8	0,12
INR-protrombina	1,0	0,9-1,0	1,0	0,9-1,0	0,17
APRI	1,1	0,5-1,8	0,3	0,2-0,6	<0,001
FIB-4	2,5	1,5-4,6	1,6	1,2-2,7	<0,001

RIC: rango intercuartílico.

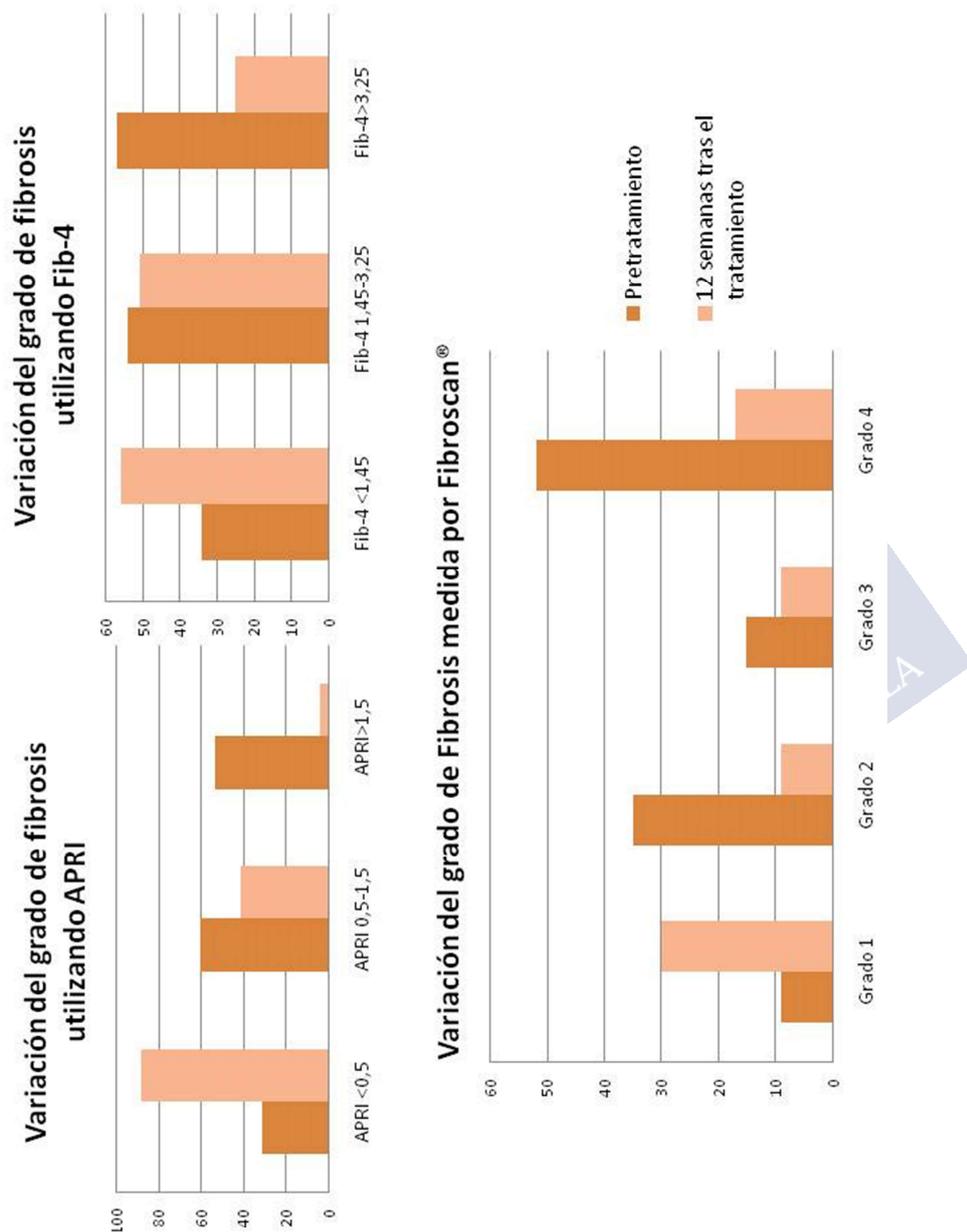


Figura 1.3: Variación del grado de fibrosis tras el tratamiento. Estos gráficos representan la variación del número de pacientes en cada grado de fibrosis calculado por el valor del Fibroscan o por el resultado de los scores de fibrosis tras recibir el tratamiento. Podemos observar que se ha reducido el número de pacientes con fibrosis severa (APRI > 1,5, Fib-4 > 3,25 o Grado 3 y 4 medidos por Fibroscan) y ha aumentado el número de pacientes con fibrosis leve (APRI < 0,5, Fib-4 < 1,45 y Grado 1 y 2 medidos por Fibroscan).

Si consideramos únicamente los 72 pacientes que tenían fibrosis grado 4 por elastografía o cirrosis evaluada por otros métodos al inicio del tratamiento, se observó que a las 12 semanas de finalizar el tratamiento un 25,0% presentó una mejoría del grado de fibrosis (13,9% pasó a fibrosis grado 1, un 4,2% grado 2 y un 6,9% a grado 3) (Figura 1.4).

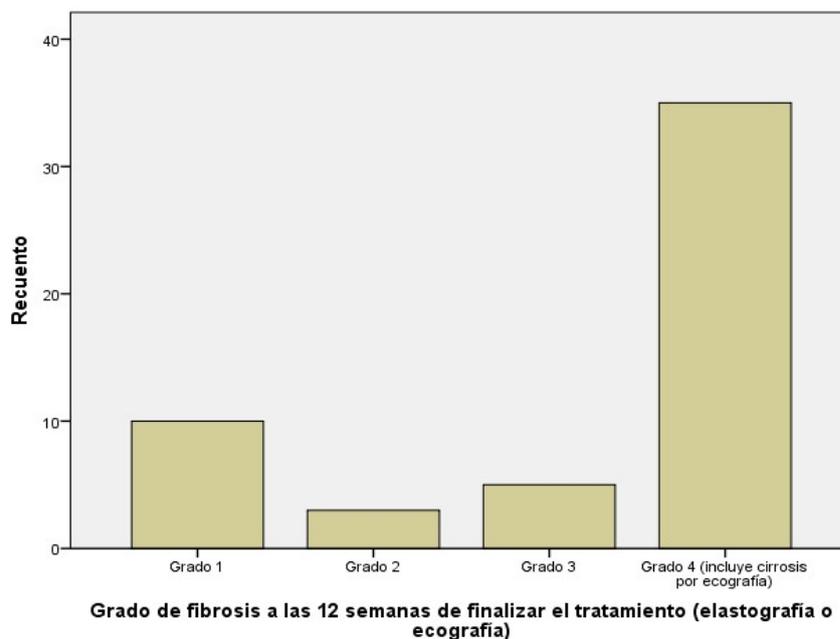


Figura 1.4: Grado de fibrosis a las 12 semanas de haber finalizado el tratamiento de aquellos pacientes con fibrosis grado 4 al inicio del tratamiento. Podemos observar que 5 pacientes mejoraron 1 punto, 3 pacientes 2 puntos y 10 pacientes 3 puntos.

d) Variación del TPS los meses posteriores a la finalización del tratamiento

A las 12 semanas del tratamiento se midió el TPS en 125 pacientes; se normalizó en 72 pacientes (57,6%), permaneciendo >80 U/l en 53 (42,4%). En un total de 35 pacientes (66,0 %) de los que permanecían con TPS elevado existía otra causa que justificaba este resultado: 13 tenía un síndrome metabólico con diabetes u obesidad, 11 pacientes consumían alcohol, 2 desarrollaron un hepatocarcinoma, 4 desarrollaron otro tumor, 3 una hepatotoxicidad farmacológica, 1 paciente presentó recidiva de VHC y otro una hepatitis autoinmune asociada. A los nueve meses de finalizar el tratamiento el TPS permaneció elevado en 19 pacientes, de los cuales 15 (78,4%) presentaban otra causa de elevación de TPS.

5. Discusión

En nuestro estudio observamos que los antivirales de acción directa consiguieron una respuesta viral sostenida en un 98% de los casos con una mejoría tanto de la fibrosis como del valor de K18 (TPS) tras el tratamiento. El valor de K18 (TPS) es útil para estimar el grado de fibrosis hepática pre-tratamiento. La no mejoría del mismo tras el tratamiento puede indicar la coexistencia de otras causas de hepatopatía o complicaciones.

En primer lugar, es de destacar que observamos una óptima tasa de respuesta al tratamiento con los antivirales de acción directa, confirmando así los resultados de los ensayos clínicos (178–183) en su aplicación a la vida real.

La mayoría de pacientes presenta niveles basales elevados de K18 (TPS) y un 40,9% de los pacientes con transaminasas normales presentaron una K18 (TPS) elevado. Estos datos son concordantes con estudios previos (38,77) y nos indican un alto nivel de apoptosis y destrucción celular debida a la infección. Se sabe que el propio virus actúa como estímulo para el inicio de la cascada apoptótica; el *core* viral se une al dominio citoplasmático del TNF-R1 provocando su activación (17). Se considera este un mecanismo de defensa del huésped para intentar interrumpir la replicación viral y eliminar así los hepatocitos infectados (36), pero es a su vez uno de los principales mecanismos de producción del daño hepático (35).

Los valores de K18 (TPS) se relacionan con los de ALT, AST, fosfatasa alcalina, INR y con el grado de fibrosis hepática. Esto concuerda con lo descrito previamente (77) y con los estudios realizados con M30 (34,37,81,82,193). De hecho, la K18 (TPS) predice una fibrosis avanzada con un área bajo la curva ROC mayor a 0,70, obteniendo resultados similares al de *scores* más complejos FIB-4 o de APRI; un valor de K18 (TPS) de 160 U/l predice fibrosis avanzada con mejor sensibilidad, pero con peor especificidad que los *scores* APRI y FIB-4. Añadir el valor del K18 (TPS) a la fórmula de FIB-4 aportaría cierta información complementaria; sin embargo, no lo haría para la fórmula de APRI. De tal manera, la medición de K18 (TPS) podría ser un método útil, sencillo y complementario a los *scores* habituales para la estimación de fibrosis en aquellos pacientes con dificultades para la realización de elastografía hepática o en aquellos centros donde no se encuentra disponible.

Tras el tratamiento observamos una franca reducción de los niveles de K18 (TPS). Sgier *et al.* (87) obtuvieron resultados similares al estudiar la variación de M30 tras el tratamiento con interferón y ribavirina. Probablemente, dichos resultados evidencian una reducción de la apoptosis de los hepatocitos tras eliminar el estímulo nocivo del virus. Cabe destacar que, a pesar de la curación de la infección viral, la K18 (TPS) permaneció elevada en casi un 36% de los pacientes. Se sabe que otros factores como el consumo alcohólico o el síndrome metabólico pueden ser causa de elevación del TPS (72) y del M30 (74). Tras analizar la existencia de estos factores, la presencia de patología tumoral u otra causa de daño hepático (toxicidad farmacológica o hepatitis autoinmune), observamos que un 66% presentan alguna otra causa de elevación de K18 (TPS). Dicho dato es importante, pues la persistencia de la elevación de este valor analítico nos puede indicar la existencia de otra patología concomitante que puede hacer perdurar el daño hepático y que es necesario tener en cuenta.

Finalmente, cómo se ya se ha descrito anteriormente (184–189), tras el tratamiento observamos una mejoría de la fibrosis hepática medida tanto por elastografía hepática como a través de las escalas de estimación de fibrosis (APRI y FIB-4). Se sabe que la apoptosis celular juega un importante papel en el desarrollo de la fibrosis hepática. Las células de Kupffer, tras la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, secretan TGF- β que activan las células estrelladas. Al activarse, se convierten en miofibroblastos y secretan colágeno tipo I a la matriz hepática (194). Este último es el principal responsable del desarrollo de la fibrosis hepática. Tras la desaparición del estímulo nocivo se ha observado una disminución de los miofibroblastos explicando así la mejoría del grado de fibrosis hepática (31).

La principal limitación del estudio es que se trata de un estudio observacional donde los médicos responsables de los pacientes son los que decidieron la frecuencia de las determinaciones analíticas y de la realización de Fibroscan®. Esto conlleva a que no todos los pacientes presenten el valor de K18 (TPS) o del Fibroscan® tras la finalización del tratamiento. Sin embargo, consideramos que el número de pacientes con todos los valores es suficiente para poder sacar conclusiones adecuadas y que ello no condiciona un significativo sesgo de selección.

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que valora la utilización de la K18 para el seguimiento en pacientes tratados con antivirales de acción directa.

6. Conclusiones

La concentración de K18 (TPS) sérico es útil para estimar el grado de fibrosis hepática pre-tratamiento en los pacientes con hepatopatía crónica por VHC. Tanto el grado de fibrosis como los niveles de K18 (TPS) mejoran tras el tratamiento con antivirales de acción directa. La no mejoría de K18 (TPS) tras el tratamiento puede indicar la coexistencia de otras causas de hepatopatía o complicaciones.



Subestudio 2:

Concentración sérica queratina-18 (TPS) en pacientes con hepatopatía alcohólica y su relación con citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α)

1. Introducción específica

El consumo alcohólico es una de las principales causas de hepatopatía siendo la primera causa de trasplante hepático en Europa y la segunda en Estados Unidos (195). El daño hepático inducido por alcohol va desde una esteatosis simple a esteatohepatitis, fibrosis hepática progresiva, cirrosis hasta el desarrollo de hepatocarcinoma. La hepatitis aguda alcohólica es una complicación grave que puede ocurrir a lo largo de la hepatopatía alcohólica y que se asocia a fallo hepático y tiene una mortalidad de hasta un 40% (195).

El alcohol produce la acumulación de acetaldehído, peróxidos lipídicos y otros reactivos intermedios del oxígeno; esto provoca un aumento del estrés oxidativo intracelular, provocando una disfunción mitocondrial y la activación de la vía intrínseca de las caspasas (43). Además, el alcohol aumenta la permeabilidad intestinal (45) y reduce de la capacidad inmune del sistema retículo endoplasmático hepático. Todo esto provoca un aumento de endotoxinas circulantes (44,46) que estimulan las células de Kupffer que aumentan la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, IL-8) (47,49,196). Esto contribuye a la reacción inflamatoria característica de las hepatitis alcohólicas y a la activación de la vía extrínseca de las caspasas (25). La acción de las endotoxinas sobre los hepatocitos está mediada por dos proteínas: la proteína *ligadora* de lipopolisacárido (endotoxina; LBP) y la molécula CD14 (197). El complejo LBP-endotoxina se une al CD14, receptor de membrana de las células de Kupffer (del que existe una fracción soluble, sCD14), provocando la liberación de citoquinas proinflamatorias. La activación de las caspasas va a producir la apoptosis celular con liberación al suero de las proteínas celulares degradadas, entre las cuales se encuentra la K18 (14). Esta proteína puede ser detectada mediante anticuerpos dirigidos frente a diferentes epítomos de la misma, disponibles de forma comercial, denominados M30, M65 y TPS (*Tissue Polypeptide Specific Antigen*, que se encuentra además implementado en plataformas de uso clínico)(57). De hecho, el TPS sérico es mayor en consumidores de alcohol (94,198) y los valores de TPS, M30 y M65 se relacionan con el grado de daño hepático existente (73,76,95,96,100). No existen, en nuestro conocimiento, estudios que valoren la posible relación de la elevación K18 (TPS) en bebedores excesivos con los elementos de la cascada inflamatoria que inician la apoptosis.

2. Objetivos

Los objetivos del estudio son valorar (1) el grado de elevación de K18 (TPS) sérico en pacientes con complicaciones del consumo de alcohol que ingresan en el hospital, especialmente en los pacientes con datos de hepatitis alcohólica y (2) la posible relación existente entre sus concentraciones y las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, TNF-alfa), así como con las de las moléculas implicadas en el reconocimiento de endotoxina (LBP y la fracción soluble de CD14 [sCD14]).

3. Pacientes, material y métodos

a) Diseño del estudio y participantes

Se realizó un estudio observacional de prevalencia (al analizar por grupos se transforma en realidad en un estudio de casos y controles) en el que se incluyeron los pacientes ingresados con consumo de riesgo de alcohol y controles sanos sin consumo de riesgo de alcohol, provenientes de dos estudios previos (72,197). Ambos estudios fueron diseñados para investigar las alteraciones inmunológicas asociadas al consumo de alcohol.

Como casos, se incluyeron pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela a lo largo de dos años (febrero 2002 y febrero 2004). A lo largo de este periodo hubo un total de 4767 ingresos en este servicio, de los cuales 145 eran consumidores crónicos de alcohol, de estos 138 aceptaron participar en el estudio (197). El tamaño muestral vino por lo tanto fijado por la disponibilidad y estudio previo de esa muestra. Su tamaño, en un estudio de correlación (relación entre las variables cuantitativas que son los marcadores de inflamación) permitiría detectar un índice de 0.250 con un riesgo alfa del 5% y beta del 20%. A la semana del ingreso los participantes firmaron el consentimiento informado, completaron un cuestionario sobre el consumo alcohólico y se le realizó una analítica. Dos médicos del servicio realizaron un cuestionario estructurado a los participantes sobre el consumo de alcohol: duración del consumo (años), cantidad de alcohol consumido diariamente durante al menos 1 mes siguiendo el sistema de unidades estándares de alcohol (un vaso de vino=10 g, una cerveza=10 g, una unidad de licor=10 g) (199) y patrón de consumo alcohólico (regular-bebedores constantes de una cantidad de alcohol diaria-e irregulares-bebedores de una cantidad de alcohol variable a lo largo de la semana o días, habitualmente mayor durante el fin de semana).

Como controles se utilizaron sujetos provenientes de un estudio previo realizado en el municipio de la Estrada (72). Brevemente, se obtuvo una muestra estratificada (n=720) por edad de los adultos (>18 años) de los habitantes del municipio de la Estrada a partir del registro de Sergas (que incluye un 95% de la población). De estos, 469 aceptaron participar en el estudio. Se realizó un cuestionario a todos los participantes sobre la cantidad de consumo de alcohol en unidades estándares de alcohol. Para este estudio, incluimos 142 sujetos de similar rango de edad de los pacientes, con un consumo de alcohol menor a 30 g por semana.

b) Determinaciones serológicas

Los test serológicos habituales de daño hepático y de marcadores de función hepática se determinaron con un analizador Advia 1650 (Bayer Diagnostics, Leverkusen, Germany); el tiempo de protrombina se calculó con el método de Quick y fue expresado en porcentaje. Estos análisis se realizaron en muestras de suero o plasma (según corresponda) recién extraídas, dentro de los estudios-fuente que se han mencionado.

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) en los pacientes con abuso de alcohol ingresados en el hospital se realizaron también dentro de la rutina habitual en nuestra unidad mediante un inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Immulate-TPS; Siemens Medical Solution Diagnostics, Gwynedd, UK) a través de una plataforma automatizada (Immulate-2000, Siemens). El test emplea el anticuerpo monoclonal M3, que es específico frente a los residuos 322-340 de la queratina-18 (57)(62). El límite de detección de este método es de 15 U/l y se considera como límite superior de la normalidad 80 U/l.

Las concentraciones séricas de LBP, TNF- α , IL-8 e IL-6 se determinaron en muestras que habían sido congeladas a -80°C midieron con un inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Immulate, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA), como se ha descrito en los estudios previos realizados en estos pacientes (197,200,201). Para LBP se consideraron como límite superior de la normalidad concentraciones de 15 $\mu\text{g/ml}$. Para TNF- α el mínimo valor detectable con este método es de 4 pg/ml , para IL-8 es de 5 pg/ml y para IL-6 de 2 pg/ml ; para este estudio, se consideraron valores especialmente elevados de TNF- α , IL-8 e IL-6 aquellos valores mayores a 10

pg/ml que corresponden al percentil 95 de la población general no consumidora de alcohol. Las concentraciones serológicas de sCD14 se midieron con un enzimo-inmunoensayo (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN), como se ha descrito en el estudio previo realizado en estos pacientes (202). Se considera como límite superior de la normalidad 3,2 µg/ml.

c) Análisis estadísticos

Se realizó un análisis descriptivo de las variables mencionadas (medidas habituales de tendencia central y de dispersión para las variables continuas; porcentajes para las variables cualitativas). La estadística analítica incluyó el test de Mann-Whitney para la comparación de variables numéricas entre grupos y el test Spearman para analizar la correlación existente entre las variables numéricas. Para la comparación de variables numéricas entre grupos ordinales (con tendencia) se empleó el test de Jonkheere-Terpstra. Los casos con valores indetectables se consideraron como cero a efectos estadísticos. Todos los contrastes fueron bilaterales. Consideramos estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

d) Consideraciones éticas

El estudio fue realizado con el consentimiento de los pacientes, autorización de Comité Ético y dentro de las directrices de la Declaración de Helsinki.

4. Resultados

a) Características generales

Se incluyeron en el estudio 138 pacientes, con una mediana de edad de 47 años (RIC: 39-57 años), siendo el 74,6% varones. Las causas de ingreso fueron síndrome de abstinencia alcohólica en 67 pacientes, complicaciones de la cirrosis en 35 pacientes (32 ascitis y 3 encefalopatía hepáticas), hepatitis aguda alcohólica en 20 pacientes y otras causas en 16 pacientes (7 neumonía, 6 pancreatitis aguda, 3 otras causas). Además de los 7 pacientes con neumonía, otros 15 presentaron procesos infecciosos durante el ingreso (previos a la extracción sanguínea): 4 neumonía nosocomial, 5 infección del tracto respiratorio superior, 2 peritonitis bacterianas espontáneas, 1 tuberculosis pleural y peritoneal, 1 infección asociada a catéter, 1 amigdalitis y 1 sinusitis. El consumo de alcohol mediando era 120 g/día (RIC: 100-192 g/día). El resto de parámetros generales se presentan en la tabla 2.1. Además, se incluyeron 142 controles de la procedencia mencionada con un consumo de alcohol menor a 30 g por semana con una mediana de edad de 54 años (RIC: 40-56 años), siendo el 30,3% varones.

b) Valores de TPS sérico y su relación con el consumo de alcohol

El valor de TPS sérico en los pacientes consumidores de alcohol fue significativamente mayor que en los controles: mediana 382 U/L (RIC: 165-879 U/l) vs mediana 60 U/L (RIC: 32-110 U/l, $p < 0,001$). La gran mayoría de los 138 alcohólicos presentaba valores de TPS por encima de 100 U/L (114 casos, 82,6%) y muchos (32 casos, 23,2%) presentaban valores > 1000 U/l, es decir más de 10 veces por encima del valor superior de normalidad.

Si comparamos los valores de TPS entre los controles y los alcohólicos estratificados por los principales grupos diagnósticos, destaca la elevación especial de TPS en los pacientes con hepatitis alcohólica (Figura 2.1). Los pacientes alcohólicos presentaron mayores concentraciones de TPS que los controles, tanto si los alcohólicos se consideran en conjunto ($p < 0,001$) como cuando se compara cada una de las categorías de alcohólicos respecto a los sujetos control ($p < 0,001$ en cada caso). Dentro de los pacientes alcohólicos, los mayores niveles se observaron en los pacientes con hepatitis alcohólica aguda, que presentaron concentraciones

significativamente mayores que los pacientes con síndrome de abstinencia alcohólica ($p=0,001$) y los pacientes con miscelánea de causas ($p=0,006$) (Figura 2.1).

Tabla 2.1: Características generales y parámetros analíticos de los pacientes.

Parámetro sérico	Mediana (RIC)
AST (U/l)	63,9 (32,0-82,2)
ALT (U/l)	32,0 (23,0-50,0)
GGT (U/l)	179 (85,5-394,2)
Fosfatasa alcalina (U/l)	150 (122-227)
Bilirrubina total (mg/dl)	1,2 (0,7-2,1)
Albúmina (g/dl)	3,6 (3,0-4,0)
Índice de Quick (%)	86 (63-97)
TNF- α (pg/ml)	6,6 (5,4-9,1)
IL-6 (pg/ml)	5,4 (2,6-10,9)
IL-8 (pg/ml)	17,8 (8,9-62,0)
sCD14 (pg/ml)	6,5 (5,6-8,6)
LBP (μ g/ml)	21,4 (15,1-26,9)
TPS (U/l)	382 (162-886)

RIC: rango intercuartílico

c) Valores de TPS sérico y su relación con el consumo de alcohol

El valor de TPS sérico en los pacientes consumidores de alcohol fue significativamente mayor que en los controles: mediana 382 U/L (RIC: 165-879 U/l) vs mediana 60 U/L (RIC: 32-110 U/l, $p<0,001$). La gran mayoría de los 138 alcohólicos presentaba valores de TPS por encima de 100 U/L (114 casos, 82,6%) y muchos presentaban valores >1000 U/l, es decir más de 10 veces por encima del valor superior de normalidad (32 casos, 23,2%).

Si comparamos los valores de TPS entre los controles y los alcohólicos estratificados por los principales grupos diagnósticos, destaca la elevación especial de TPS en los pacientes con hepatitis alcohólica (Figura 2.1). Los pacientes alcohólicos presentaron mayores concentraciones de TPS que los controles, tanto si los alcohólicos se consideran en conjunto ($p<0,001$) como cuando se compara cada una de las categorías de alcohólicos respecto a los sujetos control ($p<0,001$ en cada caso). Dentro de los pacientes alcohólicos, los mayores niveles se observaron en los pacientes con hepatitis alcohólica aguda, que presentaron concentraciones significativamente mayores que los pacientes con síndrome de abstinencia alcohólica ($p=0,001$) y los pacientes con miscelánea de causas ($p=0,006$) (Figura 2.1).

El valor del TPS sérico se correlacionó con los marcadores habituales de daño y función hepáticas (Tabla 2.2). Entre los marcadores de daño, se observa una especial correlación con la AST y entre los marcadores de función, se encuentra una especial correlación con la bilirrubina. De hecho, los valores de TPS fueron especialmente elevados en aquellos pacientes alcohólicos con cifras de bilirrubina sérica mayores de 5 mg/dl (Figura 2.2).

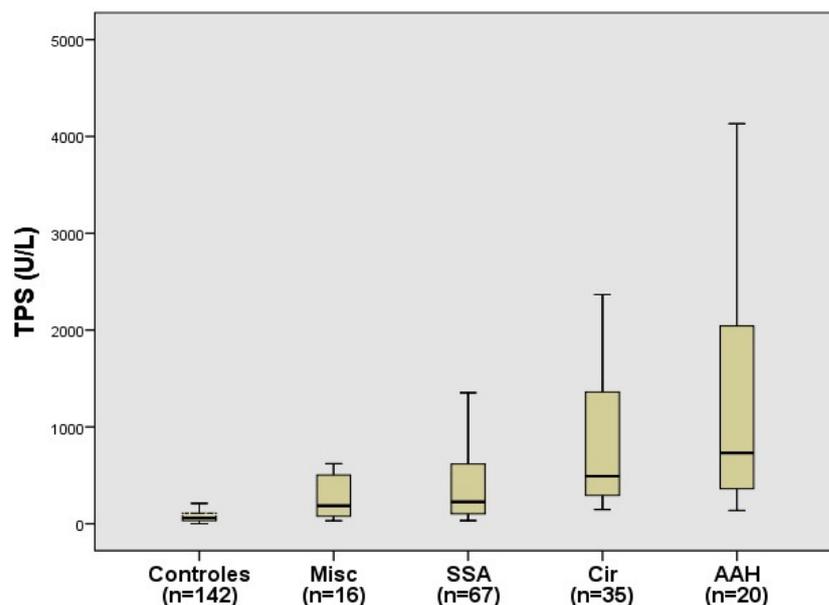


Figura 2.1: Diagrama de cajas de los valores de TPS sérico en los controles poblacionales y los alcohólicos ingresados en el hospital estratificados en grupos diagnósticos. Misc, miscelánea; SAA, síndrome de abstinencia alcohólica; Cir, complicaciones de la cirrosis; HAA, hepatitis alcohólica aguda. Los valores extremos (mayores que el percentil-75 sumado a 1.5 veces el rango intercuartílico) no se han representado, pero se han tenido en cuenta en los análisis.

d) Correlación entre los valores de TPS sérico y las concentraciones séricas de las citoquinas proinflamatorias y ligandos de endotoxina

El TPS se correlacionó con las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, y TNF-alfa) (Tabla 2.3). No se observó correlación, sin embargo, con la concentración sérica de otros marcadores de inflamación que tienen relación con la exposición a productos bacterianos como lipopolisacárido (endotoxina), como son la LBP (proteína *ligadora* de lipopolisacárido) y la fracción soluble de CD14 (sCD14) (Tabla 2.3). En la Figura 2.3 se representan los niveles de TPS sérico en relación al TNF-alfa sérico, dado que el TNF-alfa es una citoquina de especial importancia en la apoptosis hepatocelular en la enfermedad hepática alcohólica.

Tabla 2.2: Correlación entre las concentraciones de TPS sérico y los marcadores de daño y función hepáticos en pacientes alcohólicos ingresados en el hospital.

	AST (U/l)	ALT (U/l)	GGT (U/l)	FAL (U/l)	Albúmina (g/dl)	Bil (mg/dl)	Índice de Quick (%)
Coefficiente	0,566	0,179	0,406	0,445	-0,236	0,513	-0,510
Valor de p	<0,001	0,036	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
Número	138	138	138	138	138	138	138

Los valores de p se han obtenido con el test de Spearman. Bil, bilirrubina total.

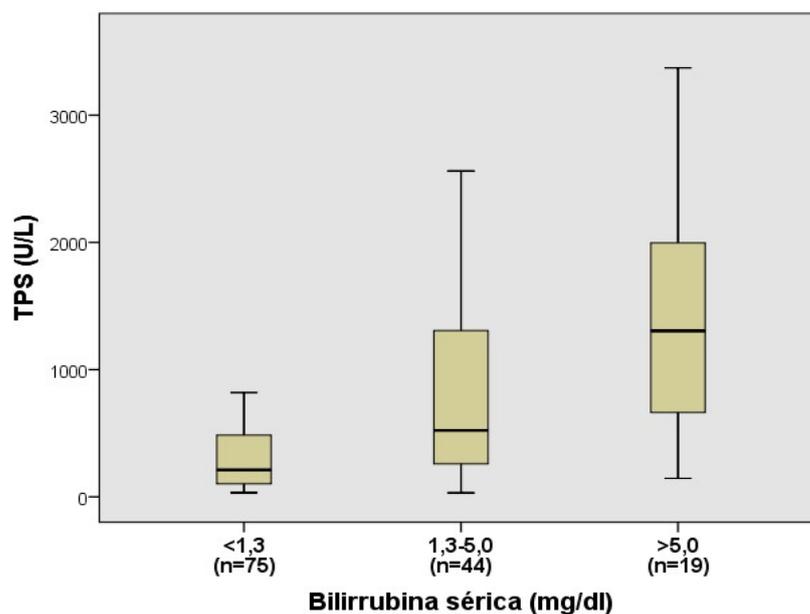


Figura 2.2: Diagrama de cajas de los valores de TPS sérico en alcohólicos ingresados en el hospital estratificados por las cifras de bilirrubina sérica total (valor superior normal de referencia, 1.3 mg/dl). Existe una tendencia significativa ($p < 0,001$) al aumento de las cifras de TPS en relación al aumento de la bilirrubina sérica. Los valores extremos (valores mayores que el percentil-75 sumado a 1.5 veces el rango intercuartílico) no se han representado, pero se han tenido en cuenta en los análisis.

Tabla 2.3. Correlación entre las concentraciones de TPS sérico y marcadores séricos de inflamación en pacientes alcohólicos ingresados en el hospital.

	TNF-alfa (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	LBP (μ g/mL)	sCD14 (pg/mL)
Coefficiente	0,387	0,255	0,517	0,034	0,016
Valor de p	<0,001	0,003	<0,001	0,692	0,849
Número	137	137	137	135	138

LBP, proteína ligadora de lipopolisacárido. sCD14, fracción soluble de CD14. Los valores de p se han obtenido con el test de Spearman.

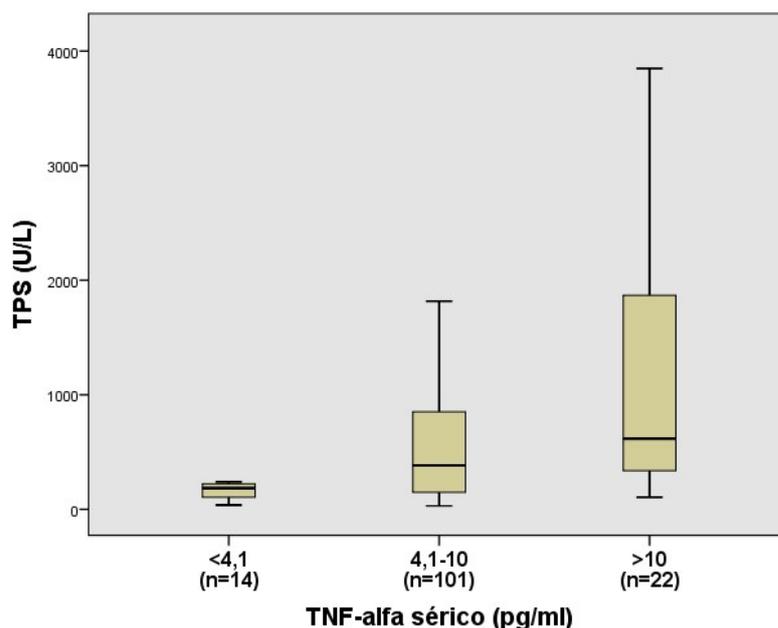


Figura 2.3: Diagrama de cajas de los valores de TPS sérico en alcoholicos ingresados en el hospital estratificados por TNF-alfa sérico (no detectable, niveles en rango normal y niveles elevados). Existe una tendencia significativa ($p < 0,001$) al aumento de las cifras de TPS en relación al aumento TNF-alfa sérico. Los valores extremos (valores mayores que el percentil-75 sumado a 1.5 veces el rango intercuartílico) no se han representado, pero se han tenido en cuenta en los análisis.

5. Discusión

El estudio demuestra que la K18 (TPS) sérica se encuentra significativamente elevada en los pacientes con consumo alcoholico respecto a los controles sanos. Sus valores se correlacionan con los marcadores habituales de daño hepático, sobre todo con la AST, y con los marcadores de función hepática, sobre todo con la bilirrubina. Además, las concentraciones séricas de K18 (TPS) se correlacionaron con las concentraciones de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- α . No se observó la misma correlación, sin embargo, entre las concentraciones de K18 (TPS) sérico y la de ligandos de endotoxina como LBP y sCD14.

Los valores de TSP sérico elevados en pacientes con consumo alcoholico confirman los resultados de estudios previos (94,96,198). El alcohol activa la apoptosis hepática tanto por la vía intrínseca (43) como extrínseca (47) provocando así la liberación al suero de los componentes celulares degradados del hepatocito como los fragmentos de K18 (14).

Los valores de K18 (TPS) sérica, como ya se había apuntado en estudios previos (94,198), se correlacionan con los principales marcadores de daño hepático (AST, ALT, fosfatasa alcalina, albúmina, bilirrubina e índice de Quick). Hay que hacer especial hincapié en la asociación existente entre la K18 (TPS) y la bilirrubina, pues los valores de K18 (TPS) fueron particularmente elevados en aquellos pacientes con bilirrubina sérica mayor a 5 mg/dl, cifra que habitualmente se emplea para la definición clínica de hepatitis alcoholica (Figura 2.4). Estos datos son concordantes con los encontrados en otros estudios (73,94,98) en los cuales los pacientes con

datos de hepatitis aguda alcohólica en la histología presentaban valores más elevados de TPS, M30 o M65.

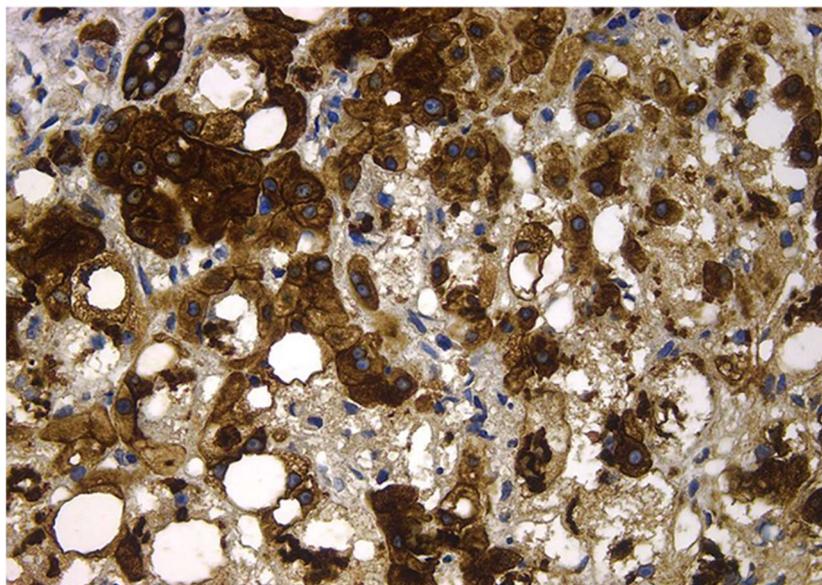


Figura 2.4. Biopsia hepática de un paciente con hepatitis alcohólica perteneciente al estudio y TPS>1000 U/l (magnificación original, 40x). Se realizó una tinción inmunohistoquímica comercial que utilizando CAM 5.2 MAb (clone CAM 5.2, Becton Dickinson, Mountain View, CA) que reconoce K18 y K8. Se observa una intensa tinción para queratina-18 de los agregados intra-hepatocitarios que coinciden con los cuerpos de Mallory en la tinción con hematoxilina y eosina.

Además, los valores de K18 (TPS) sérico en pacientes alcohólicos se correlacionaron también con los valores séricos de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α). Debido al aumento de la permeabilidad intestinal debido al efecto del alcohol a este nivel, se produce un aumento de las endotoxinas circulantes(50). Esto provoca una activación del sistema monocito-macrófago que se evidencia con la liberación al torrente circulatorio de IL-6, IL-8 y TNF- α . De hecho, en estudios previos, se ha observado un aumento de la IL-6 e IL-8 en pacientes con consumo alcohólico (201,203–208) y de TNF- α en pacientes con hepatopatía alcohólica (200). Además, la correlación entre los niveles de TNF- α séricos y la K18 (TPS) sérica es consistente con la idea del papel del TNF- α en la apoptosis hepatocitaria en la hepatopatía alcohólica. De hecho las concentraciones de TNF- α se relacionan con la presencia de enfermedad hepática avanzada y hepatitis aguda alcohólica (100,209,210) y tienen valor pronóstico relacionándose con los valores de la escala de Maddrey y la mortalidad en pacientes con hepatitis aguda alcohólica (211–214). Por este motivo se ha llegado a plantear el uso de fármacos anti-TNF α (infliximab y etanercept) con resultados dispares: por un lado se ha observado un descenso de las citoquinas inflamatorias y de los parámetros de gravedad de las hepatitis agudas(215–219) pero con un aumento de mortalidad al mes y seis meses postratamiento (220); por lo que no se recomiendan en el momento actual.

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que valora la relación entre las citoquinas proinflamatorias y la K18 (TPS) en pacientes alcohólicos, siendo necesarios más estudios para confirmar estos hallazgos.

6. Conclusiones

Se confirma la elevación de K18 (TPS) sérica en alcohólicos, frecuente y en muchos casos marcada. Esta se asocia a la elevación de marcadores de daño hepático, especialmente los indicativos de hepatitis alcohólica y además se correlaciona con la elevación de citoquinas proinflamatorias. La correlación entre los niveles de TNF-alfa séricos y la K18 (TPS) sérica es consistente con la idea del papel del TNF-alfa en la apoptosis en la hepatopatía alcohólica.

En conjunto, los datos indican una posible utilidad de la K18 (TPS) sérico como marcador de hepatitis alcohólica, complementario a los habituales.



Subestudio 3:

Utilidad de las concentraciones séricas de queratina-18 (TPS) en diagnóstico y seguimiento de pacientes con hígado graso no alcohólico

1. Introducción específica

La enfermedad por hígado graso no alcohólica (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) es una de las principales causas de hepatopatía en los países desarrollados. Se asocia a sobrepeso, obesidad, diabetes mellitus y síndrome metabólico (51). En algunos pacientes se produce un aumento de la apoptosis de los hepatocitos con datos de inflamación provocando lo que es conocido como esteatohepatitis no alcohólica (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH) (221). Estos pacientes desarrollan más fibrosis hepática, evolucionan con más frecuencia a cirrosis que aquellos pacientes con esteatosis hepática simple (*Non-Alcoholic simple Steatosis*, NAS) (51) y presentan mayor mortalidad que la población general (222).

Todos aquellos pacientes con factores de riesgo (obesidad, diabetes, sobrepeso o síndrome metabólico) y aumento de transaminasas o datos de hipertensión portal deben ser sometidos a pruebas para confirmar o descartar el diagnóstico de NAFLD. El diagnóstico de esteatosis hepática se suele realizar mediante ecografía hepática, aun así esta no es capaz de diferenciar la presencia o no de NASH (51). El *gold standard* para el diagnóstico sigue siendo la biopsia hepática, pero se está investigando el uso de métodos no invasivos como marcadores serológicos u otras pruebas de imagen (51).

La determinación en suero de los fragmentos de K18 como TPS (*Tissue Polypeptide Specific Antigen*), M30 y M65 pueden ser útiles para diferenciar un paciente con NAFLD de uno sano (122,138) y un paciente con NASH de uno con NAS (123,133,134,223,224). Además los niveles de los tres parámetros se han relacionado con el daño histológico (grado de esteatosis, inflamación, balonización y fibrosis hepática) y con los valores de transaminasas (109,138,144). Finalmente, tanto TPS como M30 han mejorado tras la reducción de peso con dieta (148), ejercicio (147) o cirugía bariátrica (113) o la utilización de fármacos como metformina, pioglitazona o vitamina E (150). No existen, en nuestro conocimiento, suficientes estudios de su valor pronóstico a largo plazo en los pacientes con NAFLD.

2. Objetivos

Los objetivos del estudio fueron (1) valorar la posible elevación de la K18 (TPS) sérico en pacientes con diferentes formas de NAFLD con respecto a controles sanos y (2) comprobar si los valores de K18 (TPS) presentan valor pronóstico (en términos de fallecimiento o desarrollo de complicaciones como cirrosis, hepatocarcinoma, o necesidad de trasplante hepático).

3. Pacientes, material y métodos

a) Diseño del estudio y participantes

Se realizó un estudio observacional de base transversal en el que se incluyeron 40 pacientes que fueron biopsiados por sospecha de NAFLD entre el 2 de abril de 2002 y el 6 de noviembre de 2006 en el Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, con estudio longitudinal de seguimiento a 28 de enero de 2020 (ver más adelante). Se consideró como portadores de NALFD a todos aquellos pacientes con esteatosis en la biopsia hepática, siendo criterios de exclusión el consumo de más de 20 g/alcohol al día, la positividad para serologías de VHB y VHC, la positividad para ANA, AMA, AML y anti-LKM que configuraron un diagnóstico de hepatitis autoinmune, o depósitos de cobre o hierro en tejido hepático que correspondieron a un diagnóstico de enfermedad de Wilson o hemocromatosis, respectivamente. Se diagnosticaron como NASH aquellos pacientes con inflamación, necrosis y fibrosis en la biopsia hepática. A todos los pacientes se les realizó una analítica con determinación de TPS sérico previo a la biopsia hepática dentro de la rutina asistencial en la unidad clínica. Se realizó un seguimiento

de los pacientes mediante revisión de los historiales clínicos analizando el desarrollo de cirrosis, hepatocarcinoma, necesidad de trasplante hepático o fallecimiento a fecha de 28 de enero de 2020. Los casos fueron seguidos hasta su último contacto con el sistema de salud y los desenlaces, por infrecuentes, presentados de forma sólo descriptiva.

Para la comparación de los valores basales de TPS, se utilizaron como controles a sujetos sanos de similar edad y sexo y con un índice de masa corporal (IMC) menor a 30, provenientes de un estudio previo realizado en el municipio de A Estrada (72). Brevemente, Se obtuvo una muestra estratificada (n=720) por edad de los adultos (>18 años) de los habitantes del municipio de la Estrada a partir del registro del SERGAS (que incluye un 95% de la población). De estos, 469 aceptaron participar en el estudio. Para este estudio incluimos 33 sujetos sin consumo alcohólico y del mismo segmento de edad que los sujetos de estudio. A estos controles también se les había realizado una determinación de TPS sérico (72). El tamaño muestral permitiría detectar un efecto (diferencia de medias) en el TPS de 25 U/L, con una desviación estándar del mismo en la población de 20 U/L, con un riesgo alfa del 5% y beta del 20% (potencia, 80%).

b) Determinaciones serológicas e histológicas

A todos los pacientes se les realizó una analítica con determinación de TPS sérico previo a la biopsia hepática dentro de la analítica de rutina asistencial en la unidad clínica. Las concentraciones serológicas de TPS se determinaron con un inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Immulite-TPS; Siemens Medical Solution Diagnostics, Gwynedd, UK) a través de una plataforma automatizada (Immulite-2000, Siemens). El test emplea el anticuerpo monoclonal M3, que es específico frente a los residuos 322-340 de la queratina-18 (57)(62). El límite de detección de este método es de 15 U/l y se considera como límite superior de la normalidad 80 U/l.

Todas las biopsias hepáticas fueron revisadas a ciegas por un único anatomopatólogo, que valoró de forma semicuantitativa la presencia de esteatosis (leve, moderada o grave, según afectase a <10%, 10-50% o >50% de los hepatocitos), el grado de fibrosis (ausente, leve [sólo portal] o extensa) y la presencia de necrosis hepatocitaria (ausente, escasa o frecuente). Los pacientes, de acuerdo con los anteriores y según el criterio del patólogo, fueron clasificados como esteatosis simple (NAS) o esteatohepatitis (NASH).

c) Análisis estadísticos

Se realizó un análisis descriptivo de las variables mencionadas, mediante porcentajes para variables cualitativas y medidas habituales de tendencia central y dispersión para las cualitativas. Para los estudios analíticos se empleó el test de Mann-Whitney (para comparación de variables numéricas entre dos grupos) y el test de Spearman para el análisis de correlación. Consideramos estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. A efectos de cálculos estadísticos, los valores indetectables de TPS se consideraron como cero. Todos los contrastes fueron bilaterales. La evolución de los pacientes en el seguimiento se realizó de modo descriptivo, dado el escaso número de eventos (ver más adelante).

d) Consideraciones éticas

El estudio retrospectivo de los historiales clínicos se realizó tras aprobación del comité de ética y siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki.

4. Resultados

e) Características generales

Se incluyeron 40 pacientes con diagnóstico histológico de NAFLD, con una mediana de edad de 46 años (RIC: 40-57 años), siendo un 70,0% mujeres. En los sujetos-control, la mediana de edad era 40 años (RIC: 29-53 años), siendo un 69,7% mujeres.

La mediana de IMC en los pacientes con NAFLD era 29,7 kg/m² (RIC: 26,2-31,6 kg/m²) y la mediana de IMC en los sujetos-control era 22,6 kg/m² (RIC: 21,0-23,7 kg/m²).

La mayoría de los pacientes (45,0%) presentaban datos de esteatosis leve-moderada en las ecografías realizadas. En cuanto a los resultados histológicos: un 67,5% presentaba esteatosis leve, un 75,0% fibrosis leve-moderada y un 49,5% necrosis leve-moderada. Cumplían criterios de NASH 12 pacientes (30,0%). El resto de características generales de la población del estudio se describen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Características bioquímicas, ecográficas e histológicas de los pacientes.

Característica	Pacientes con NAFLD (n=40)
AST (U/l)	24,0 (18,2-37,2)
ALT (U/l)	44,0 (32,0-68,5)
GGT (U/l)	87,5 (50,7-163,0)
Datos ecográficos	
Normal	17 (42,5)
Leve-moderada	18 (45,0)
Grave	1 (2,5)
No disponible	4 (10,0)
Grado de esteatosis	
Leve	27 (67,5)
Moderada	7 (17,5)
Grave	6 (15,0)
Fibrosis	
Sin fibrosis	6 (15,0)
Leve-moderada	30 (75,0)
Extensa	4 (10)
Necrosis	
Sin necrosis	17 (42,5)
Escasa	19 (49,5)
Frecuente	4 (10,0)
Esteatohepatitis (NASH)	
Sí	12 (30,0)
No	28 (70,0)

Los datos son medianas y rangos intercuartílicos (entre paréntesis) para los datos numéricos bioquímicos, o bien número absoluto y porcentaje (entre paréntesis) para los datos ecográficos e histológicos.

f) TPS sérico y su relación con el resto de parámetros de laboratorio y los hallazgos histológicos

El valor de TPS sérico fue significativamente mayor en los pacientes con NAFLD que en los controles sanos, una mediana de 91,5 U/l (RIC: 44,2-127,7 U/l) vs 46,7 U/l (RIC: <15-98,6 U/l, p<0,005).

En la Tabla 3.2 se presenta una comparación de los datos metabólicos y de marcadores de daño hepático (incluido TPS) entre los pacientes con NASH y con esteatosis simple. Los únicos parámetros que fueron significativamente mayores en los pacientes con NASH con respecto a los pacientes con esteatosis simple fueron el IMC y la glucemia basal. El TPS sérico fue mayor en aquellos pacientes con NASH que en aquellos pacientes con esteatosis simple pero sin alcanzar la significación estadística (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Diferencias en las determinaciones de los parámetros metabólicos y los marcadores de daño hepático (incluido TPS) ente los pacientes con esteatohepatitis (NASH) y esteatosis simple (NAS).

Determinación	Esteatohepatitis (NASH) (n=12)	Esteatosis simple (NAS) (n=28)	Valor de p
IMC (kg/m ²)	30,7 (29,0-37,5)	28,7 (25,2-30,6)	0,02
Colesterol total (mg/dl)	209,5 (178,0-232,7)	219,0 (198,0-266,0)	0,16
Triglicéridos (mg/dl)	170,0 (97,5-237,2)	114,0 (73,0-210,0)	0,33
Glucemia (mg/dl)	105,0 (94,0-121,7)	95,0 (88,2-102,5)	0,03
AST (U/l)	31,0 (19,2-53,7)	22,5 (16,5-31,0)	0,17
ALT (U/l)	53,0 (29,7-116,7)	39,5 (32,0-61,5)	0,21
GGT (U/l)	84,0 (36,0-126,0)	90,9 (60,7-174,5)	0,44
Fosfatasa alcalina (U/l)	200,5 (132,0-235,7)	164,0 (133,5-224,5)	0,49
Bilirrubina total (mg/dl)	0,8 (0,4-1,2)	0,6 (0,3-0,7)	0,05
TPS (U/l)	114,5 (51,2-175,2)	79,0 (44,2-117,7)	0,34

Los datos son medianas y rangos intercuartílicos (entre paréntesis). IMC: Índice de masa corporal.

Las concentraciones de TPS sérico se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con la AST (ρ 0,36, $p=0,02$) y la ALT (ρ 0,43, $p=0,005$) séricas. Sin embargo, no se observó una clara asociación entre el valor de TPS sérico y el grado de esteatosis, fibrosis o necrosis en las biopsias (datos no mostrados).

g) Evolución de los pacientes

Tras un mínimo de 14 años de seguimiento (rango: 174-240 meses), 7 pacientes (17,5%) habían fallecido. De estos, únicamente un paciente falleció debido a su hepatopatía tras desarrollar un hepatocarcinoma sobre hígado cirrótico a 12 años del diagnóstico. En la biopsia realizada al diagnóstico, presentaba fibrosis, sin necrosis ni inflamación y no cumplía datos de NASH. El TPS al diagnóstico era de 114 U/l.

De los 33 pacientes vivos, ninguno desarrolló datos de cirrosis hepática. En 14 de los pacientes (42,4%) persistió hipertransaminasemia leve. Se le realizó ecografía hepática a 21 y 13 de ellos (61,9%) seguían presentando datos de esteatosis hepática leve-moderada.

5. Discusión

La K18 (TPS) sérica se encuentra significativamente más elevada en pacientes con NAFLD que en pacientes sanos y más elevado, pero sin alcanzar la significación estadística, en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica con respecto a aquellos con hígado graso simple. Los valores de K18 (TPS) sérica se relacionan con los valores séricos de transaminasas, pero no hemos encontrado relación con los datos histológicos de esteatosis, fibrosis o necrosis. Como también

reflejan otros estudios (123,141), nuestros pacientes con NASH también presentan mayor IMC y mayor glucemia basal, pero no mayores valores de colesterol o triglicéridos (128)(139).

Como se ha observado en estudios previos (75,113,120,126,131,133,138,224), los valores de K18 sérica pueden ser útiles para diferenciar aquellos pacientes con NAFLD de los sanos y los pacientes con NASH de aquellos con hígado graso simple.

Está indicado realizar screening de NAFLD en todos aquellos pacientes con factores de riesgo (obesidad, diabetes mellitus, hipercolesterolemia) con elevación de transaminasas (51). No obstante, hay estudios que indican que hasta un 80% de los pacientes con NAFLD presentan valores de transaminasas normales (225,226) y además los valores de transaminasas no se han relacionado con el grado de afectación histológica (227). De hecho, nosotros tampoco hemos encontrado diferencias significativas de valores de transaminasas entre pacientes con NASH y esteatosis simple. Todo esto hace necesaria la investigación de nuevos biomarcadores de *screening* donde pueden tener cabida los fragmentos de K18 (TPS, M30 y M65).

La apoptosis juega un papel fundamental en la patogénesis de la NASH: la acumulación de ácidos grasos libres en el torrente circulatorio actúa de *trigger* para la apoptosis de los hepatocitos (24). Estos pasan la membrana de los hepatocitos a través de su transportador de membrana (FATPs) provocando un aumento del estrés oxidativo intracelular (24). El estrés oxidativo provoca un aumento de la permeabilidad mitocondrial con la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas por la vía intrínseca (228). Como se ha explicado anteriormente, las caspasas efectoras degradan los diferentes componentes celulares, entre cuales se encuentra la K18 (1). Sus fragmentos son liberados al torrente sanguíneo y pueden ser detectados con técnicas como el TPS (57). De esta manera, los valores de K18 (TPS) sérica pueden ser un dato indirecto del grado de daño histológico en estos pacientes. Sin embargo, a diferencia de lo observado en otros estudios (92,118,128,129,136,138,143,144,229), no hemos observado asociación entre las alteraciones histológicas y el valor sérico de K18 (TPS). Es probable que el pequeño tamaño de la muestra pueda influir en este resultado. Como se ha observado previamente en otros estudios (130,137), los valores de fragmentos de K18 se han correlacionado con los valores de los marcadores de daño hepático habitualmente utilizados (AST y ALT).

Tras un seguimiento de un mínimo de 14 años, ninguno de los pacientes diagnosticado de NASH ha desarrollado cirrosis, hepatocarcinoma o ha fallecido debido a su hepatopatía. De hecho, el único paciente fallecido por complicaciones de su hepatopatía no presentaba criterios de NASH al inicio. Sin embargo, el valor de K18 (TPS) al diagnóstico era similar a la mediana de K18 (TPS) de los pacientes con NASH. La mayoría del resto de paciente sigue presentando elevación leve de transaminasas y datos de esteatosis hepática en la ecografía hepática. Que sepamos, existe sólo un estudio que valora la asociación de los valores de fragmentos de K18 con la evolución de los pacientes, observando que unos valores menores de M30 al diagnóstico se relacionaron con mayores tasas de remisión de hígado graso no alcohólico (108). Además, Tsutsui *et al.*(139) han observado que los cambios en los valores de M30 se correlacionaron con mejora o empeoramiento en la biopsia hepática de seguimiento.

El bajo número de pacientes incluidos es la principal limitación del estudio. Sin embargo, los resultados son similares a los obtenidos en estudios previos. Además, existen pocos estudios que realicen un seguimiento a 15 años.

6. Conclusiones

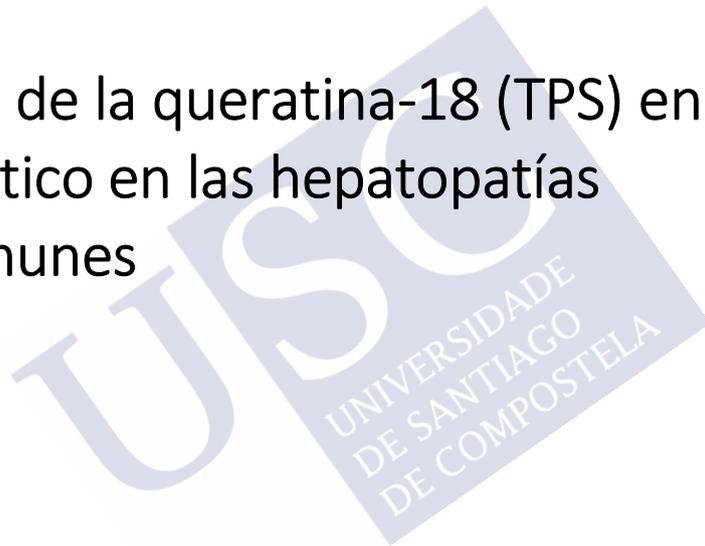
El valor de la K18 (TPS) sérica es significativamente mayor en pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico que en controles sanos y mayor, pero sin alcanzar la significación estadística, en pacientes con NASH con respecto a los pacientes con hígado graso simple. Los valores de K18 (TPS) se correlacionan con los principales marcadores de daño hepático (AST y

ALT) pero no hemos encontrado relación con el daño hepático observado en las biopsias (esteatosis, necrosis o fibrosis). Es necesaria la realización de otros estudios con mayores tamaños muestrales para confirmar estos resultados.



Subestudio 4:

Utilidad de la queratina-18 (TPS) en el diagnóstico en las hepatopatías autoinmunes



1. Introducción específica

Existen muy pocos estudios sobre las concentraciones séricas de los fragmentos de K18 en las hepatopatías autoinmunes. Este grupo de enfermedades incluye la colangitis biliar primaria (CBP), la hepatitis autoinmune y la menos frecuente colangitis esclerosante primaria. El diagnóstico de estas entidades es en ocasiones difícil, en primer lugar, porque no existe una prueba diagnóstica específica para las mismas. El diagnóstico se basa en el perfil de alteración de los marcadores de daño hepático (predominio de citólisis o de colestasis), la exclusión de otras causas, en la presencia de alteraciones inmunológicas características (elevación de IgM y presencia de anticuerpos anti-mitocondria para la CBP; elevación de IgG y presencia de anticuerpos antinucleares u otros [anti-músculo liso, anti-LKM o anti-antígeno soluble hepático] en la hepatitis autoinmune) y, frecuentemente, en una biopsia hepática concordante (230–235). En segundo lugar, las hepatopatías autoinmunes frecuentemente se solapan entre sí, dando lugar a lo que se denominan síndromes de superposición u *overlap*, especialmente entre CBP y hepatitis autoinmune (236–239). Es importante realizar un correcto diagnóstico diferencial entre estas entidades pues el tratamiento difiere en función del mismo: inmunosopresores (sobre todo la combinación de corticoides con azatioprina) en las hepatitis autoinmunes (235), ácido ursodesoxicólico en las CBP (235) y la combinación de ácido ursodesoxicólico e inmunosopresores en los síndromes de *overlap* (236).

Estudios previos encontraron cierta utilidad de los fragmentos de K18 tanto en las enfermedades colestásicas (incluyendo CBP) como en las hepatitis autoinmunes. Yagmur *et al.* (54) observaron que los niveles de M30 se encontraban elevados en pacientes con colestasis severa e inflamación ductal. Sekiguchi *et al.* (152) observaron que los niveles de M30 y M65 estaban elevados en los pacientes con CBP respecto a los controles sanos. Además, los valores de M65 se han relacionado con el grado de fibrosis hepática existente y tienen un valor pronóstico en el seguimiento a 8 años: los pacientes con M65 más elevado presentaban mayor mortalidad y mayor tasa de complicaciones (descompensación hidrópica, hepatocarcinoma y sangrado por varices). Denk *et al.* (153) también observaron que los niveles de M30 y M65 en pacientes con CBP y colangitis esclerosante primaria, eran mayores que en controles sanos. Además, los valores de M30 y M65 se relacionaron con el grado de actividad y gravedad de la colangitis esclerosante primaria. En un estudio previo de nuestro grupo (70), observamos que las concentraciones de TPS sérico se encontraban elevadas en la mayoría (63%) de 22 pacientes con hepatitis autoinmune entre un conjunto de pacientes estudiados en una consulta de Hepatología. Recientemente, Derben *et al.* (168) han observado que los fragmentos M30 y M65 mejoran la predicción de recaída de la hepatitis autoinmune con remisión bioquímica.

En nuestro conocimiento, no existen estudios que se hayan centrado en las posibles alteraciones de las concentraciones de K18 (TPS) en las diferentes hepatopatías autoinmunes, comparándoles entre ellas, así como en el potencial valor diagnóstico de la K18 (TPS) para diferenciarlas entre sí.

2. Objetivos

Los objetivos del presente subestudio son (1) comparar las concentraciones de K18 (TPS) séricas en pacientes con hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria y síndrome de solapamiento (*overlap*) entre ambas, con la finalidad de investigar si son capaces de distinguir entre esas tres entidades y (2) analizar la correlación entre las concentraciones de K18 (TPS) séricas y los marcadores habituales de daño hepático en estos pacientes.

3. Pacientes, material y métodos

a) Diseño del estudio y participantes

Se realizó un estudio observacional, transversal, en el que se incluyeron aquellos pacientes con el diagnóstico de hepatopatía autoinmune (colangitis biliar primaria [CBP], hepatitis autoinmune o síndrome de *overlap* entre ambas) en la consulta de Hepatología del Servicio de Medicina Interna de Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela desde el año 2000 hasta el 2019. A tales efectos se revisaron los historiales clínicos y se asumió el diagnóstico clínico e histológico realizado en la consulta, que sigue los criterios habituales al efecto (230–233,236,238,239). Para el presente estudio, los pacientes con hepatopatía autoinmune *overlap* probable y confirmada se incluyeron en un mismo grupo. Se eliminaron aquellos pacientes con diagnóstico incierto de hepatopatía autoinmune y aquellos (n=25) en los que no se disponía de determinación de TPS basal. En consecuencia, se incluyeron en el estudio 142 pacientes, de los que 121 (85,2%) eran mujeres. La edad mediana del conjunto de los pacientes fue 55 años (intervalo, 17-82 años). Con los criterios mencionados, 62 pacientes se clasificaron como CBP, 54 como hepatitis autoinmune, y 26 se clasificaron como hepatopatía autoinmune *overlap*. El tamaño muestral (en comparaciones de CBP vs hepatitis con o sin *overlap*) permitiría detectar un efecto (diferencia de medias) en el TPS de 15 U/L, con una desviación estándar del mismo en la población de 20 U/L, con un riesgo alfa del 5% y beta del 20% (potencia, 80%).

b) Determinaciones serológicas

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) se determinaron con un inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Immulite-TPS; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Gwynedd, UK) a través de una plataforma automatizada (Immulite-2000, Siemens). Las determinaciones se realizaron como parte de la práctica clínica habitual, que en la unidad asistencial mencionada incluye rutinariamente la determinación de K18 (TPS) como marcador de daño hepático. El test emplea el anticuerpo monoclonal M3, que es específico frente a los residuos 322-340 de la K18 (57)(62). El límite de detección de este método es de 15 U/l y se considera como límite superior de la normalidad 80 U/l. Las concentraciones séricas de inmunoglobulinas se determinaron mediante nefelometría (BNII™ System, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania).

c) Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables mencionadas (medidas habituales de tendencia central y de dispersión para las variables continuas; porcentajes para las variables cualitativas). La estadística analítica incluyó el test de Mann-Whitney para la comparación de variables numéricas entre dos grupos, el test de Kruskal-Wallis para la comparación de variables numéricas entre más de dos grupos y el test Spearman para analizar la correlación existente entre las variables numéricas. Para valorar la asociación entre variables cualitativas se empleó el test Chi-cuadrado. Para comparar la precisión diagnóstica de variables numéricas se elaboraron curvas ROC y se calculó para cada parámetro su área bajo la curva con los correspondientes intervalos de confianza al 95%. Todos los contrastes fueron bilaterales. Consideramos estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

d) Consideraciones éticas

El estudio fue realizado con la autorización del Comité Ético y dentro de las directrices de la Declaración de Helsinki.

4. Resultados

a) Características generales

La distribución de edad y sexo en los pacientes con los tres tipos de hepatopatía autoinmune se resume en la Tabla 4.1. Los pacientes con CBP tendieron a tener una edad mayor que los pacientes

con hepatitis autoinmune y síndrome *overlap*. Los pacientes con hepatitis autoinmune tendieron a ser más frecuentemente de sexo masculino que los pacientes con CBP o con síndrome *overlap* (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Datos demográficos en las diferentes categorías de hepatopatía autoinmune.

	Cirrosis biliar primaria (n=62)	Síndrome <i>overlap</i> (n=26)	Hepatitis autoinmune (n=54)	Valor de p
Edad (años)	58 (26-82)	53 (23-78)	53 (17-79)	0,136
Sexo (mujer)	57 (91,9)	24 (92,3)	40 (74,1)	0,014

Los datos de la edad son la mediana y el intervalo absoluto (entre paréntesis). Los datos del sexo son el número absoluto y el porcentaje (entre paréntesis). El valor de p ha sido obtenido con el test de Kruskal-Wallis (para la edad) y el test de Chi-cuadrado (para el sexo).

b) Valores de TPS sérico en las diferentes hepatopatías autoinmunes y su relación con el resto de parámetros analíticos

Los resultados de los marcadores de daño hepático, las inmunoglobulinas séricas y la K18 (TPS) sérico en los tres tipos de hepatopatía autoinmune se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Marcadores de daño hepático, inmunoglobulinas y TPS sérico en las diferentes categorías de hepatopatía autoinmune.

	Cirrosis biliar primaria (n=62)	Síndrome <i>overlap</i> (n=26)	Hepatitis autoinmune (n=54)	Valor de p
AST (U/l)	42 (31-63)	75 (37-187)	163 (52-770)	<0,001
ALT (U/l)	53 (37-62)	53 (37-86)	314 (79-1234)	<0,001
GGT (U/l)	148 (106-279)	189 (93-346)	104 (48-190)	0,010
F. alcalina (U/l)	379 (246-563)	407 (312-1050)	251 (188-343)	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,60 (0,50-0,80)	0,74 (0,59-3,8)	1,11 (0,60-6,1)	<0,001
IgG (mg/dl)	1319 (1090-1560)	1245 (1030-1740)	1430 (1170-1970)	0,347
IgA (mg/dl)	227 (163-345)	195 (156-251)	240 (190-341)	0,215
IgM (mg/dl)	290 (203-431)	335 (224-759)	132 (92-197)	<0,001
TPS (U/l)	111 (55-216)	183 (117-756)	239 (104-2298)	<0,001

Los datos de la edad son la mediana y el intervalo intercuartílico (entre paréntesis). Los valores de p han sido obtenidos con el test de Kruskal-Wallis.

Las concentraciones de K18 (TPS) fueron mayores en los pacientes con hepatitis autoinmune (aislada o como síndrome *overlap*) que en los pacientes con CBP aislada ($p < 0,001$; Tabla 4.2; Figura 4.1). El comportamiento del TPS fue similar al de los marcadores habituales de citolisis hepática, como la AST y la ALT (Tabla 4.2). Por el contrario, los pacientes con CBP (aislada o como síndrome *overlap*) presentaron mayores niveles de fosfatasa alcalina y de IgM que los pacientes con hepatitis autoinmune aislada (Tabla 4.2). De hecho, en el conjunto de pacientes con

hepatopatía autoinmune, la concentración de K18 (TPS) sérico se correlacionó de forma significativa con las concentraciones de AST y de ALT, pero no con las de fosfatasa alcalina o GGT (Tabla 4.3).

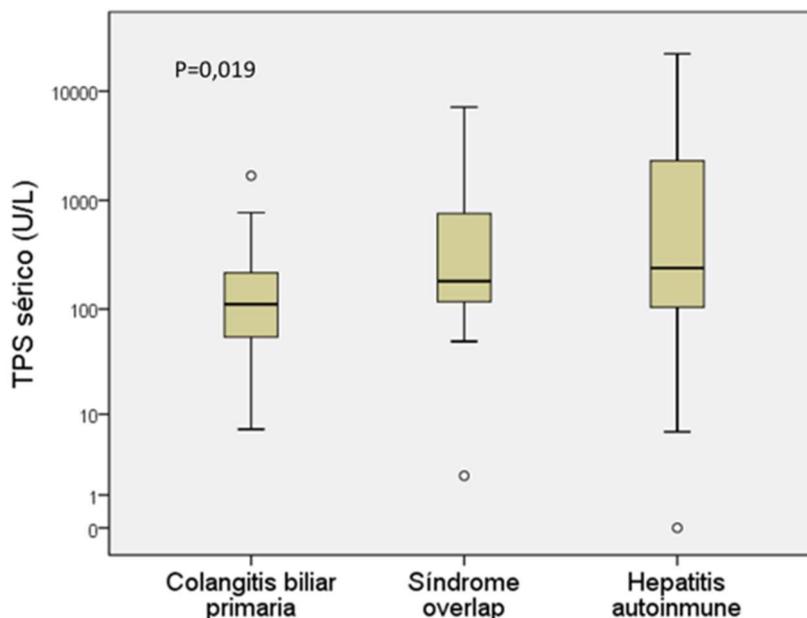


Figura 4.1. Concentraciones de K18 (TPS) sérico en las hepatopatías autoinmunes. Nótese que el eje de ordenadas está en escala logarítmica. El valor de *p* ha sido obtenido con el test de Kruskal-Wallis.

Tabla 4.3: Correlación entre las concentraciones séricas de K18 (TPS) y los marcadores de daño hepático en el conjunto de pacientes con hepatopatía autoinmune.

	AST (UI/l)	ALT (UI/l)	GGT (UI/l)	F. alcalina (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)
Coefficiente (Rho)	0,534	0,534	0,028	-0,033	0,337
Valor de p	<0,001	<0,001	0,740	0,696	<0,001
Número	142	142	142	142	142

El valor de *p* ha sido obtenido con el test de Spearman.

Las concentraciones de K18 (TPS) sérico alcanzaron niveles mayores de 1000 U/l en una proporción apreciable de pacientes. Esta proporción fue significativamente mayor en los pacientes con hepatitis autoinmune (aislada o como síndrome *overlap*) que en los pacientes con CBP aislada (Figura 4.2). Entre los últimos, sólo uno presentó tal elevación de K18 (TPS). Tres pacientes, todos ellos con hepatitis autoinmune (el 5,5% de los casos de ese grupo), presentaron valores de K18 (TPS) por encima de 10.000 U/l (es decir, más de 100 veces por encima del valor superior de normalidad). El mayor valor observado fue 21.978 U/l.

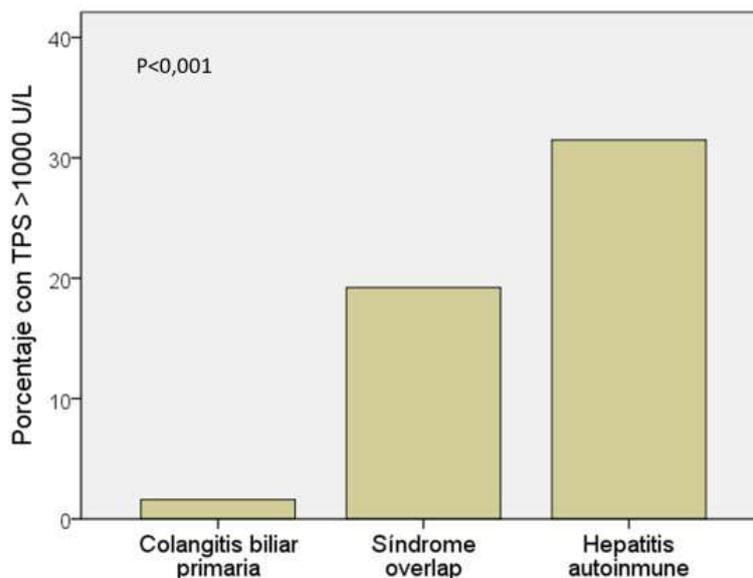


Figura 4.2. Prevalencia de concentraciones de K18 (TPS) sérico mayores de 1000 U/L en las diferentes categorías de hepatopatía autoinmune. El valor de p ha sido obtenido con el test de Chi-cuadrado.

La presentación de la hepatitis autoinmune (aislada o como síndrome *overlap*) en forma de hepatitis aguda no fue infrecuente y los casos se corresponden con los mencionados de elevación marcada de K18 (TPS) sérico, en paralelo a la elevación de transaminasas. En la Figura 4.3 se representa un paciente con hepatitis autoinmune presentada como hepatitis aguda, así como su evolución a lo largo del tiempo. Como puede observarse, la elevación de K18 (TPS) fue remitiendo a lo largo del tiempo, con el tratamiento basado en corticoides, hasta normalizarse, aunque los episodios de hepatotoxicidad por azatioprina y los episodios de *flare-up* durante la evolución se acompañaron de aumento de la K18 (TPS) sérico, en paralelo al aumento de transaminasas en todos ellos (Figura 4.3).

La Figura 4.4 representa las curvas ROC para comparar el valor diagnóstico de hepatitis autoinmune de la K18 (TPS) sérica en comparación a los marcadores habituales de daño hepático (transaminasas, AST y ALT). La K18 (TPS) sérica demostró un valor diagnóstico similar a sólo ligeramente inferior al de las transaminasas (Figura 4.4).

5. Discusión

El presente subestudio muestra que las concentraciones séricas de los fragmentos de K18 (TPS) se elevan significativamente en los pacientes con hepatopatías autoinmunes. Las concentraciones son más altas en los pacientes con hepatitis autoinmune que en los pacientes con CBP. Los pacientes con síndrome *overlap* presentan niveles de K18 (TPS) similares a los de los pacientes con hepatitis autoinmune. De esta forma, las concentraciones séricas de K18 (TPS) tienen valor diagnóstico en la diferenciación de CBP vs hepatitis autoinmune (con o sin síndrome *overlap*). Nuestros resultados ofrecen resultados similares cuando se trata de diferenciar entre CBP con y sin síndrome *overlap* (datos no mostrados). El valor en este aspecto, no es aparentemente mayor que el de los marcadores habituales de citólisis (AST y ALT séricas) con las cuales se correlaciona. No es de extrañar que las transaminasas muestren valor diagnóstico de síndrome *overlap* entre los pacientes con CBP, ya que sus valores forman parte de los criterios diagnósticos habituales (236–239). En este aspecto, la elevación de la K18 (TPS) sérica es un marcador adicional, diferente

de las transaminasas, representante de una proteína estructural del hepatocito liberada por necrosis o apoptosis, que puede añadir información en estas circunstancias.

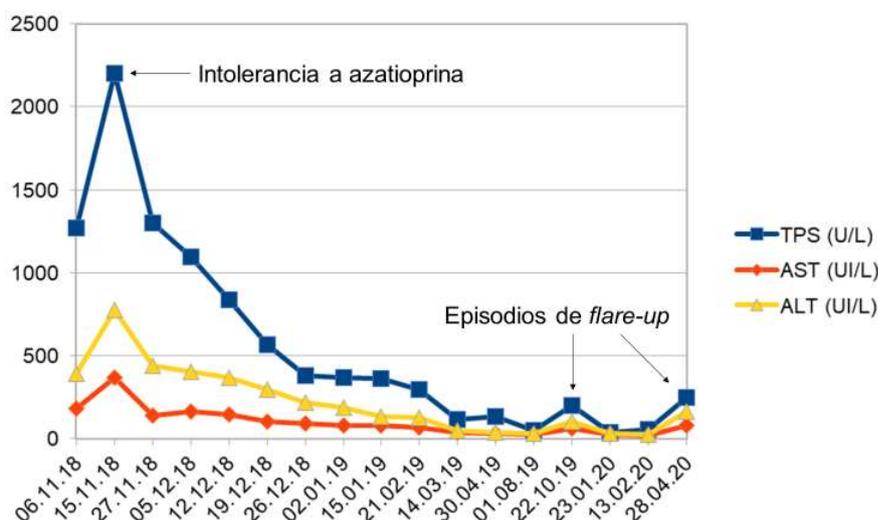


Figura 4.3. Evolución en el tiempo (18 meses) de la K18 (TPS) sérico y los marcadores habituales de daño hepático (AST y ALT) en una paciente de 51 años con hepatitis aguda autoinmune. Fue tratada con corticoides (prednisona, en dosis descendentes) y azatioprina, que hubo de suspenderse por intolerancia digestiva y hepatotoxicidad, siendo sustituida por micofenolato. Presentó dos episodios de exacerbación (flare-up) que se resolvieron con aumento de la dosis de corticoide. Nótese que los intervalos en el eje de abscisas no se corresponden con las distancias reales en el tiempo.

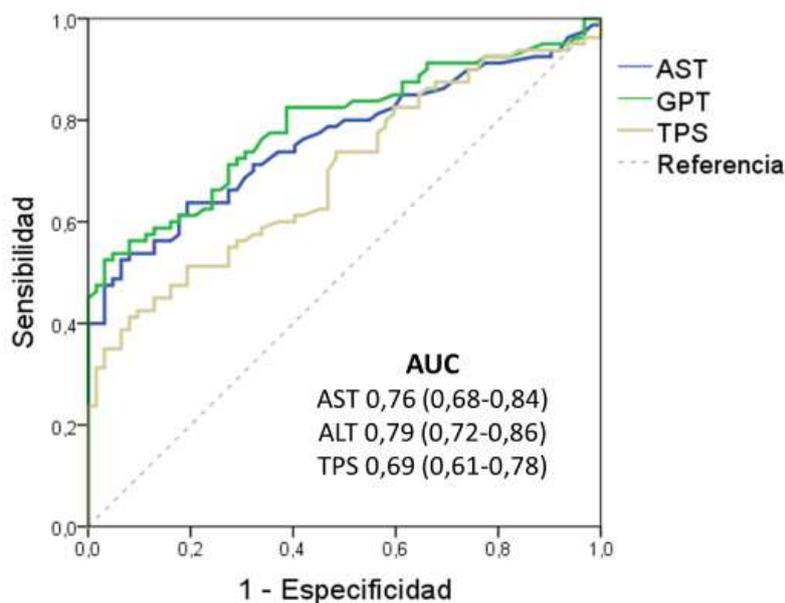


Figura 4.4. Curvas ROC (receiver-operating characteristics) que muestran el valor diagnóstico de la K18 (TPS) sérico en el diagnóstico de hepatitis autoinmune. Para el presente análisis se han unido los pacientes con hepatitis autoinmune pura ($n=54$) y los pacientes con síndrome overlap de hepatitis autoinmune y CBP ($n=26$). AUC, área bajo la curva (entre paréntesis, el intervalo de confianza al 95%).

Una proporción notable de pacientes con hepatitis autoinmune (en torno a un tercio) presentan, en el momento de debut, valores de K18 (TPS) sérica extraordinariamente altos (mayores de 1000 U/L, es decir, más de 10 veces por encima del intervalo superior de normalidad). En una proporción apreciable de pacientes con hepatitis autoinmune (en torno al 5%), las concentraciones de K18 (TPS) sérico superaron en 100 veces el valor superior normal. Todos esos casos correspondieron a formas de presentación de la hepatitis autoinmune en forma de hepatitis aguda. Las concentraciones tan elevadas de K18 (TPS) en estos casos indican el elevado índice de necrosis y apoptosis hepatocitaria en esta situación.

En estos casos de hepatitis autoinmune presentados como hepatitis aguda grave, al igual que en los pacientes con formas de presentación menos agudas, los niveles de K18 (TPS) se normalizaron de forma progresiva en el seguimiento, aunque éste no fue objeto de este estudio. Recientemente, han observado que la determinación los fragmentos de K18 (M30 y M65) puede ser útil para predecir la recaída de la hepatitis autoinmune con remisión bioquímica en los marcadores habituales (168). Este aspecto no ha sido abordado en el presente estudio, pero confirma la impresión previa en nuestro grupo, que usa rutinariamente la determinación de K18 (TPS) en estos casos en la consulta de Hepatología. En algún caso concreto que se ha presentado de modo ilustrativo, se observa como las concentraciones de K18 (TPS) se correlacionan con las de AST y ALT y aumentan paralelamente en los episodios de *flare-up*. Harán falta estudios futuros para determinar si la K18 (TPS) tiene mejor valor diagnóstico que los marcadores habituales de daño hepático (AST y ALT) en esta situación. La determinación del fragmento TPS de la K18 tiene la ventaja respecto a los M30 y M65, en cualquier caso, de su disponibilidad como determinación automática dentro de las plataformas bioquímicas de uso clínico habitual.

6. Conclusiones

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) sérica se encuentran frecuentemente elevadas en los pacientes con hepatopatías autoinmunes, especialmente en los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome *overlap*. En esos casos, las concentraciones de K18 (TPS) frecuentemente alcanzan niveles basales muy altos (>1000 U/L), en los casos presentados como hepatitis aguda. Las concentraciones de K18 (TPS) sérica se correlacionan con las de AST y ALT en los pacientes con hepatopatía autoinmune y podrían aportar información suplementaria para distinguir los pacientes con CBP pura de los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome *overlap*.

Subestudio 5:

Variación de las concentraciones séricas de la queratina-18 tras el trasplante hepático: comparación con la queratina-19

1. Introducción específica

El trasplante hepático es el tratamiento de elección en caso de enfermedad hepática terminal o de fallo hepático agudo con una mejora tanto en la cantidad como la calidad de vida de los pacientes (240,241). Durante el procedimiento quirúrgico se produce una lesión por isquemia-reperusión en el tejido hepático. Tras el clampaje de la arteria hepática y de la vena porta se produce un proceso de isquemia en el tejido por cese del flujo sanguíneo. Esto provoca una disminución de la fosforilación oxidativa con una disminución del ATP celular provocando tanto necrosis y apoptosis de los hepatocitos y células ductales (242) como una disfunción de las células endoteliales, leucocitos y plaquetas (243). Durante la reperusión, la lesión se perpetúa sobre todo por un fallo en la microcirculación secundaria a la balonización de las células endoteliales, a la presencia de vasoconstricción y al atrapamiento de leucocitos y agregados plaquetarios en los sinusoides. Esto provoca un aumento del periodo de hipoxia en el tejido con áreas de “*no reflux*” (244,245). Todo esto provoca una activación de las células de Kupffer y de los neutrófilos que liberan citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, prostaglandinas) y radicales libres de oxígeno que provocan la activación de la apoptosis tanto por vía intrínseca como por la extrínseca (244).

El conocimiento de la fisiopatología del daño por isquemia-reperusión es importante para intentar prevenirlo o reducirlo. Por ejemplo, se ha observado que añadir antioxidantes (alopurinol, N-acetil-cisteína, α -tocoferol, superóxido dismutasa o catalasa) (243–245) o moléculas antiapoptóticas (246) a las soluciones para preservación del órgano disminuye el daño por isquemia-reperusión. Además, en ratones, la utilización de inmunosupresores como micofenolato o la combinación micofenolato/tacrolimus también disminuye la apoptosis de hepatocitos tras el trasplante (247).

Las concentraciones séricas de queratinas y de sus fragmentos pueden ser útiles para diferenciar entre los diferentes mecanismos de muerte celular (necrosis o apoptosis) (14,60). Ulukaya *et al.* (156) y Brenner *et al.* (155) han estudiado la variación de los niveles de M30 y M65 tras el trasplante hepático. Han observado un aumento de ambos en el postrasplante inmediato, con un posterior descenso progresivo hasta normalizarse sus valores a los 7 días. Los valores de M65 son mayores a los de M30 en las primeras horas, produciéndose un pico de M30 a las 48 h. Estos datos parecen indicar que el daño por isquemia-reperusión se produce por mayoritariamente por necrosis en un primer momento y, luego, por apoptosis en un segundo tiempo. Brenner *et al.* (155) han observado además un aumento de los valores de M30 y M65 en aquellos pacientes que presentaron complicaciones isquémicas o infecciosas en el postrasplante, pudiendo ser por lo tanto útiles para identificar complicaciones en estos pacientes de forma precoz. En nuestro conocimiento, no se han realizado estudios analizando la variación de los fragmentos de K19 (CIFRA 21-1) ni se han realizado estudios a largo plazo en pacientes con trasplante hepático que permitan delinear el perfil evolutivo de las queratinas y sus fragmentos, como paso preliminar a su utilización como marcadores de las complicaciones postrasplante.

2. Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron (1) describir las variaciones en las concentraciones de los fragmentos de K18 (TPS y M30) y K19 (CYFRA 21-1) tras el trasplante hepático, a corto y medio plazo, y (2) valorar, en casos individuales, sus cambios en relación con la aparición de complicaciones durante el postrasplante.

3. Pacientes, material y métodos

a) Diseño del estudio y participantes

Se realizó un estudio descriptivo observacional, longitudinal (cohorte prospectiva) en el que se incluyeron 11 pacientes que recibieron trasplante hepático ortotópico procedente de cadáver en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela entre diciembre 2008 y marzo 2009. Dado el carácter piloto y descriptivo no se realizó estimación del tamaño muestral.

Se extrajeron muestras de suero de cada paciente antes de trasplante (basal) y a intervalos regulares tras el mismo (24 horas, 3 días, 6 días, 10 días, 1 mes, 2 meses, 4 meses y 6 meses). No fue posible realizar la extracción a las 24 horas post-trasplante en uno de los pacientes.

b) Determinaciones serológicas

Las determinaciones estándares de los marcadores hepáticos se realizaron con un Advia 1650 Chemistry Analyzer (Bayer Diagnostics, Leverkusen, Germany) y las muestras para la determinación de la concentración de queratinas se congelaron a -40°C.

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) se determinaron con un inmunoensayo quimioluminiscente comercial (Immulite-TPS; Siemens Medical Solution Diagnostics, Gwynedd, UK) a través de una plataforma automatizada (Immulite-2000, Siemens) (62)(57). El límite de detección de este método es de 15 U/l y se considera como límite superior de la normalidad 100 U/l.

Los niveles séricas de M30, fragmento de la K18 con un neoepítipo que se genera en la apoptosis, se determinaron utilizando un inmunoensayo comercial (M30-Apoptosense; PEVIVA AB, Bromma, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante (59). Para calibrar el ensayo se utilizaron las concentraciones de referencia del anticuerpo M30. La absorbancia se calculó con un lector de ELISA a 450 nm. El límite de detección de este método es de 25 U/l y se considera como límite superior de la normalidad 260 U/l.

Los niveles de K19 (CYFRA 21-1) se determinaron con un inmunoensayo quimioluminiscente comercial en un Roche Elecsys Immunoassay Analyzer (Elecsys CYFRA 21-1; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (61). Se considera como límite superior de la normalidad una concentración en suero de CYFRA 21-1 de 3,3 ng/ml.

c) Estudios histológicos

Todas las biopsias fueron valoradas a ciegas por el mismo anatomopatólogo. Las muestras hepáticas fueron incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina siguiendo los procedimientos estándares. Para la realización de los estudios inmunohistoquímicos se digirieron las secciones hepáticas desparafinadas con ChemMateProteinase K (Dako, Glostrup, Denmark) durante 10 minutos. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo primario durante 30 minutos a temperatura ambiente y, tras esto, se aplicó el EnVisionSystem (Dako), un polímero de dextrano que contiene peroxidasa y el anticuerpo secundario murino, durante otros 30 minutos. Entre las dos incubaciones se lavaron las secciones con solución tampón (ChemMate Buffer kit, Dako). Las reacciones positivas se revelaron utilizando, como cromógeno, diaminobezidina (DAB, Dako) y las secciones se contratiñeron con Harris hematoxylin (Panreas, Barcelona, Spain) durante 2 minutos.

El anticuerpo primario incluye K19 (clone RCK 108, Dako), K18 (clone DC10, Dako) y anticuerpo monoclonal M30 (M30 CytoDEATH; Alexis Biochemicals, Nottingham, UK).

Se definió como índice apoptótico (*apoptotic score*) se definió como el número de hepatocitos que contenían inclusiones reactivas a M30 por cada 50 campos microscópicos aleatorios utilizando un aumento de 40x (77)(248).

d) Análisis estadísticos

Los datos se presentan en cada momento del estudio de forma descriptiva, con su mediana, rango intercuartil y extremos mediante diagramas de cajas. Se utilizó el test de Wilcoxon para comparar los valores de muestras apareadas. Para evaluar correlación, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. No hubo pérdidas en el seguimiento. Todos los contrastes fueron bilaterales. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

e) Consideraciones éticas

Todos los pacientes son mayores de 18 años dieron el consentimiento informado para participar en el estudio, que fue revisado y aprobado por el comité ético y se atuvo a los criterios establecidos en la Declaración de Helsinki.

4. Resultados

a) Características generales

Se incluyeron en el estudio 11 pacientes (siete de ellos varones) de edades comprendidas entre los 40 y los 64 años (Tabla 5.1). Todos ellos presentaban un estadio avanzado de cirrosis. Ocho de ellos tenían el antecedente de consumo de riesgo de alcohol. Inicialmente todos recibieron el tratamiento inmunosupresor estándar compuesto por corticoides y tacrolimus. Las características generales de los pacientes (motivo por el que se indicó el trasplante, tiempo de isquemia y presencia de complicaciones post-trasplante) se exponen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Características generales de los pacientes trasplantados.

Nº	Edad (años) /sexo	Indicación de trasplante	Isquemia (minutos)	Complicaciones post-trasplante
1	56/V	Cirrosis (alcohol y VHC)	260	Recurrencia de la hepatitis C
2	56/M	Cirrosis (alcohol) y hepatocarcinoma	720	Ninguna
3	45/M	Cirrosis (alcohol)	690	Diabetes mellitus <i>de novo</i>
4	43/V	Cirrosis (alcohol)	360	Rechazo celular agudo (día +33); diabetes mellitus <i>de novo</i>
5	53/V	Cirrosis (alcohol)	700	Rechazo celular agudo (día +10)
6	40/M	Cirrosis (alcohol)	240	Obstrucción intestinal (hernia umbilical)
7	62/M	Cirrosis (autoimmune)	420	Ninguna
8	58/V	Cirrosis (alcohol)	300	Insuficiencia renal leve
9	55/V	Cirrosis (VHB) y hepatocarcinoma	630	Ninguna
10	64/V	Cirrosis (VHC)	360	Recurrencia de la hepatitis C
11	61/V	Cirrosis (alcohol)	300	Rechazo celular agudo (día +56); diabetes mellitus <i>de novo</i> ; insuficiencia renal leve

V: varón, M: mujer, VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B.

b) Variación de las queratinas y sus fragmentos tras el trasplante

En la mayoría de los pacientes, los niveles de CYFRA 21-1, TPS y M30 pre-trasplante se encontraban elevados, con una mediana de concentraciones pre-trasplante de 3,6 ng/ml, 201 U/l y 403 U/l respectivamente (Figura 5.1).

Las concentraciones de los fragmentos de K18 (TPS y M30) aumentaron drásticamente en el período inmediato post-trasplante (Figura 5.1). El aumento de TPS y M30 ocurrió paralelamente, aunque por lo general, el pico de concentraciones de TPS tendió a ocurrir antes (en el día +1) que el de M30 que alcanzó la mayor mediana de los valores en el día +3 (Figura 5.1). Por consiguiente, la ratio TPS/M30 en el inmediato post-trasplante fue mayor en el día +1 y menor en el día +3 (Figura 5.2). Posteriormente, las concentraciones de ambos (TPS y M30), decrecieron. El decrecimiento de las concentraciones de TPS fue bastante abrupto, mientras que el descenso de las concentraciones de M30 fue más lento en el postrasplante (Figura 5.1). A los seis meses del trasplante las concentraciones de ambos fueron significativamente menores que en las muestras pre-trasplante (Figura 5.1).

Por lo general, las variaciones de concentraciones de los fragmentos de la K18 (TPS y M30) fueron similares a las de la AST y de la ALT (Figura 5.1). Existió correlación entre los niveles de TPS y M30 y los de AST y ALT. En el inmediato post-trasplante, la correlación entre los niveles de fragmentos de la K18 y las transaminasas fue mayor para el TPS que para M30 y mayor para AST que para ALT (Tabla 5.2).

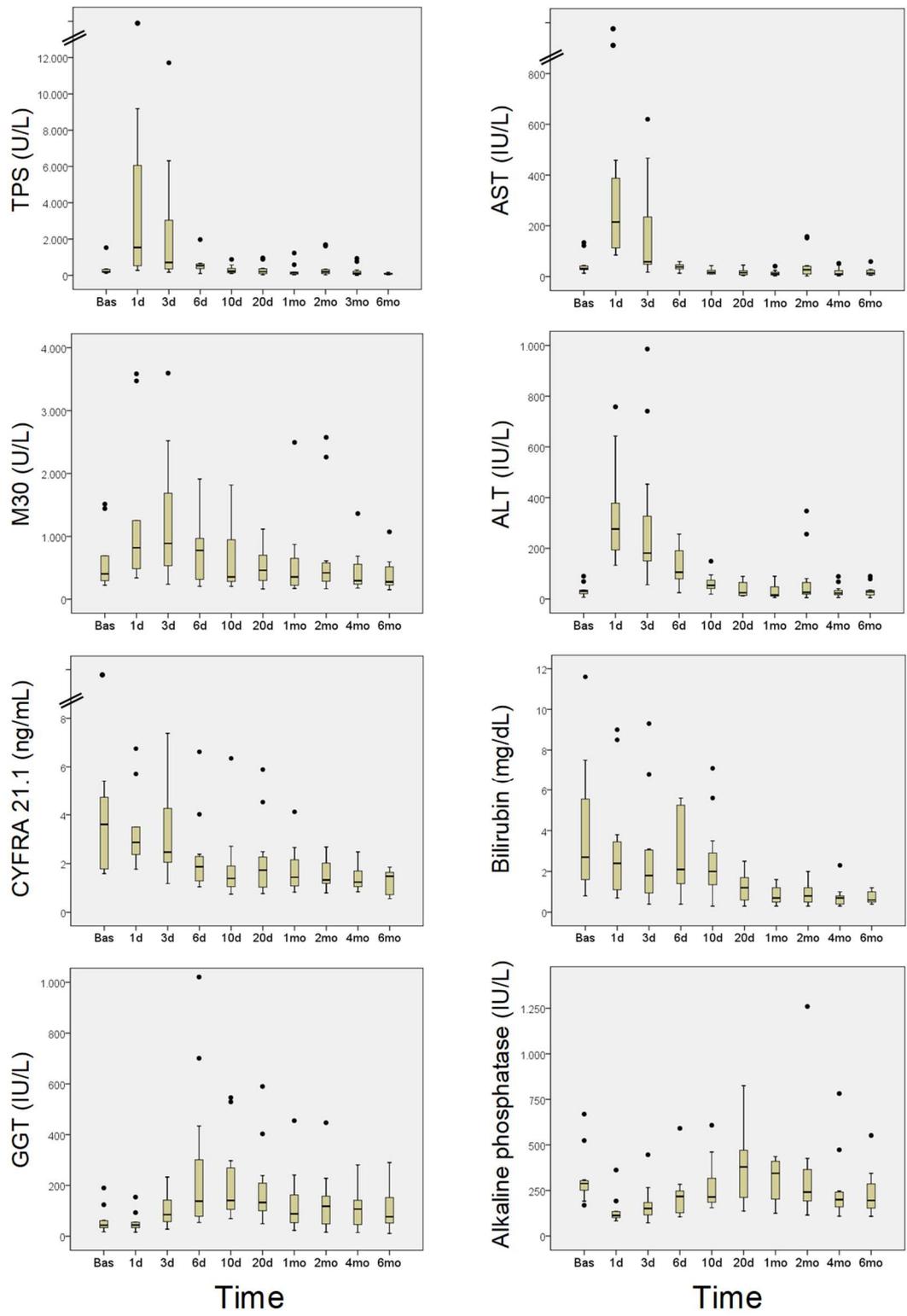
Los niveles séricos de K19 (CYFRA 21-1) se comportaron de forma diferentes, con un descenso constante desde las concentraciones basales sin presentar un aumento significativo de las mismas en el inmediato postrasplante (Figura 5.1). A partir del sexto día postrasplante, las concentraciones de CYFRA 21-1 fueron significativamente menores de las pre-trasplante (Figura 5.1). Las concentraciones de CYFRA 21-1 se correlacionaron en el inmediato postrasplante con los niveles séricos de bilirrubina (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Correlación entre los valores de queratinas séricas y los marcadores hepáticos habituales de daño hepático en el postrasplante inmediato.

	Día +1			Día +3			Día +6		
	AST (U/l)	ALT (U/l)	Bil (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	Bil (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	Bil (mg/dl)
CYFRA 21-1 (ng/ml)	0,273	0,152	0,681*	0,618*	0,409	0,191	0,451	0,183	0,781**
TPS (U/l)	0,855**	0,818**	0,401	0,900**	0,818**	0,182	0,724**	0,320	0,603*
M30 (U/l)	0,661*	0,697*	0,602	0,691*	0,655*	0,382	0,287	0,078	0,461

Bil: bilirrubina. *P<0,05; **P<0,005. Los valores de p se han obtenido con el test de Spearman.

Figura 5.1 (página siguiente): Variaciones de las queratinas y sus fragmentos tras el trasplante. En estos gráficos representamos los cambios de las K18 y sus fragmentos (medidos con TPS y M30) y de la queratina-19 (medido con CYFRA 21-1) y los comparamos con los cambios en los marcadores analíticos hepáticos utilizados habitualmente (ALT, AST, GGT, bilirrubina y fosfatasa alcalina). Bas: valor basal pre-trasplante, d: día, mo: mes.



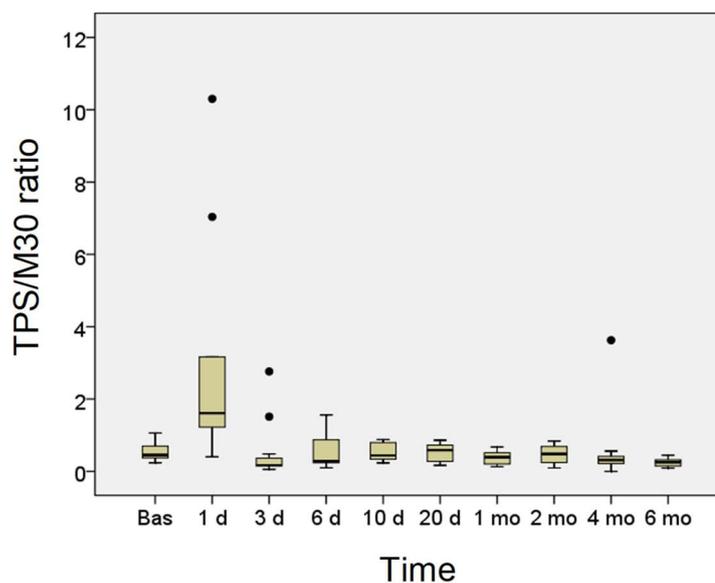


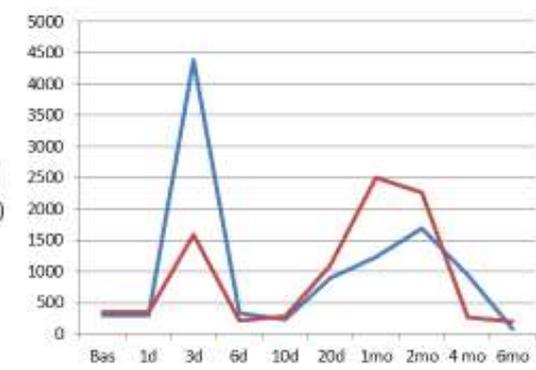
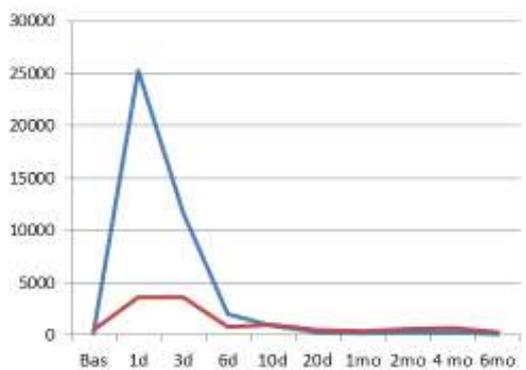
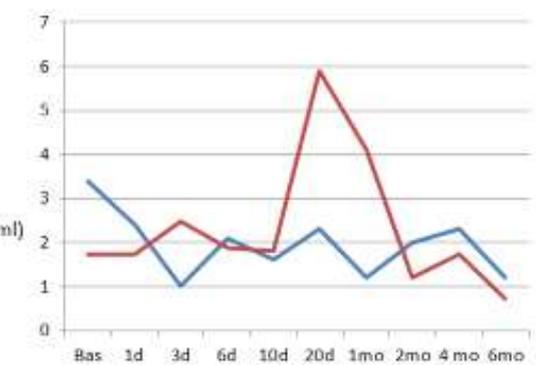
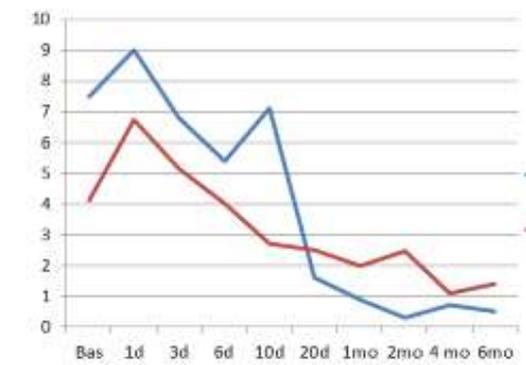
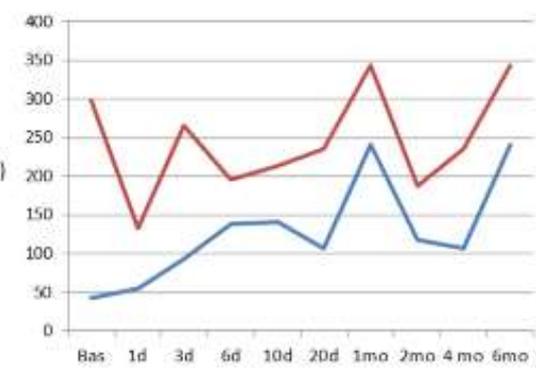
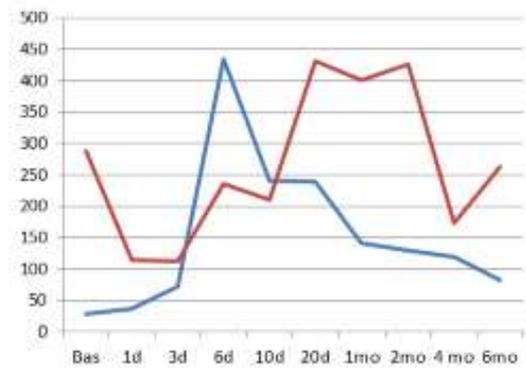
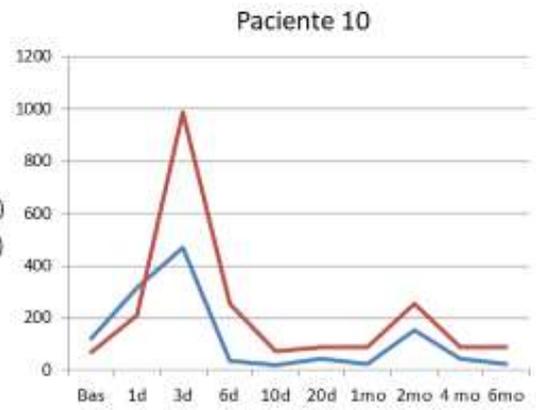
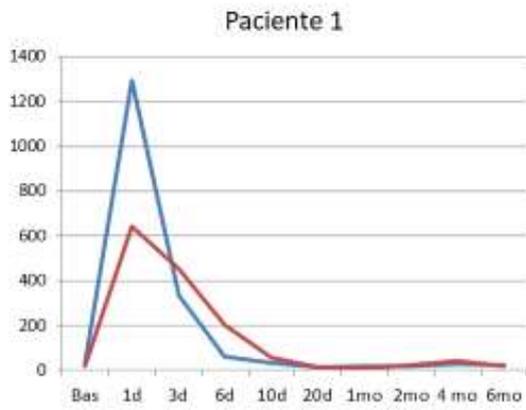
Figura 5.2: Variación de la ratio TPS/M30 tras el trasplante hepático. Bas: basal pre-trasplante, d: días, mo: meses

c) Cambios histológicos y en los parámetros analíticos en pacientes con complicaciones post-trasplante

Los estudios de inmunohistoquímica realizados en los pacientes sin complicaciones fueron negativos. Cinco pacientes presentaron complicaciones post-trasplante, necesitando la realización de una biopsia hepática para su diagnóstico (Tabla 5.1); dos pacientes presentaron una recurrencia de la hepatitis por VHC y los otros tres un rechazo agudo del injerto.

Los datos de los dos pacientes con recurrencia del VHC se presentan en la Figura 5.3. En el momento de la recurrencia se observó un aumento de los niveles de los fragmentos de K18 (TPS y M30) y K19 (CYFRA 21-1). Es de destacar que el aumento de los niveles séricos de queratinas, sobre todo de K18, fue anterior a las alteraciones en los marcadores hepáticos habituales (Figura 5.3, detalle del paciente 1 en la Figura 5.3.b). La histología de la biopsia hepática fue compatible con una recurrencia de VHC (Figura 5.4). La inmunohistoquímica para M-30 tiñó algunos hepatocitos dispersos, con índice apoptótico de 17. La inmunohistoquímica para K19 tiñó únicamente los colangiocitos (Figura 5.4).

Figura 5.3 (página siguiente): Variación de los parámetros analíticos y de las queratinas séricas a lo largo del tiempo en los dos pacientes con recurrencia del VHC.



Tiempo

Tiempo

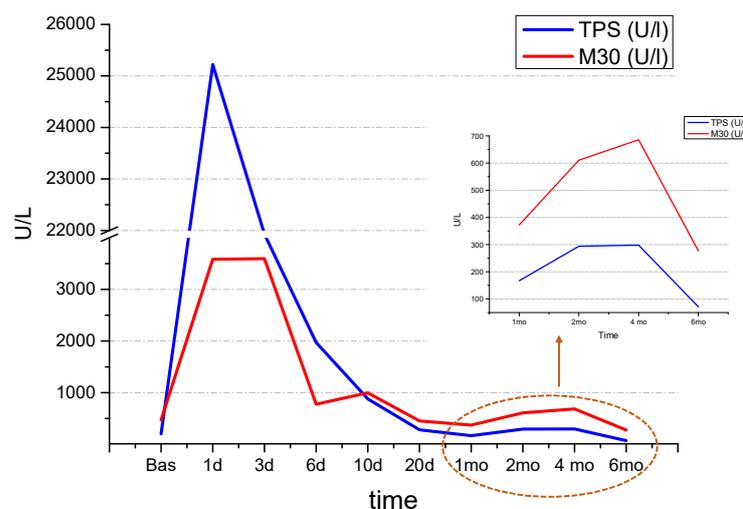


Figura 5.3.B: Variación de los parámetros analíticos y de las queratinas séricas a lo largo del tiempo en los dos pacientes con recurrencia del VHC en el paciente 1 de la figura anterior (detalle).

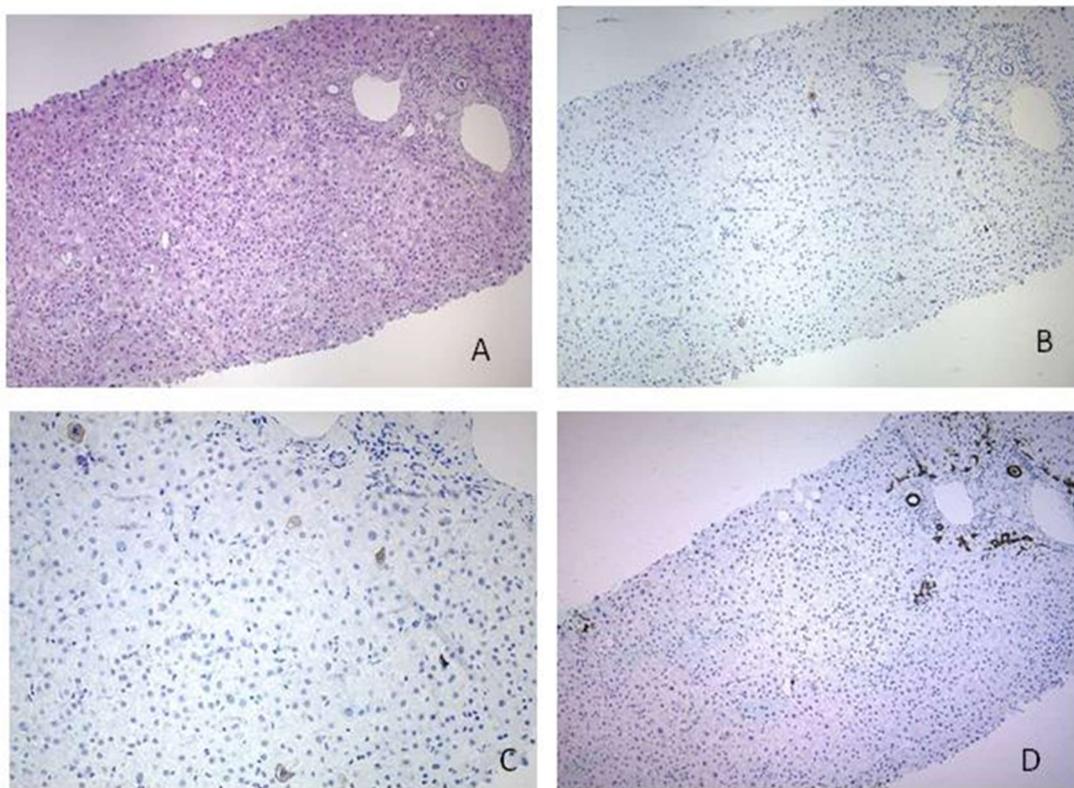


Figura 5.4: Biopsia hepática del paciente 10 tras la recurrencia de infección por VHC, a los 3 meses del trasplante. (A) Hematoxilina-eosina: se observan signos característicos de recurrencia por VHC. (B) y (C, detalle) Immunohistoquímica para M30: es positiva en los hepatocitos apoptóticos en el lóbulo hepático. (D) Immunohistoquímica para K19: es positiva únicamente en los ductos biliares normales.

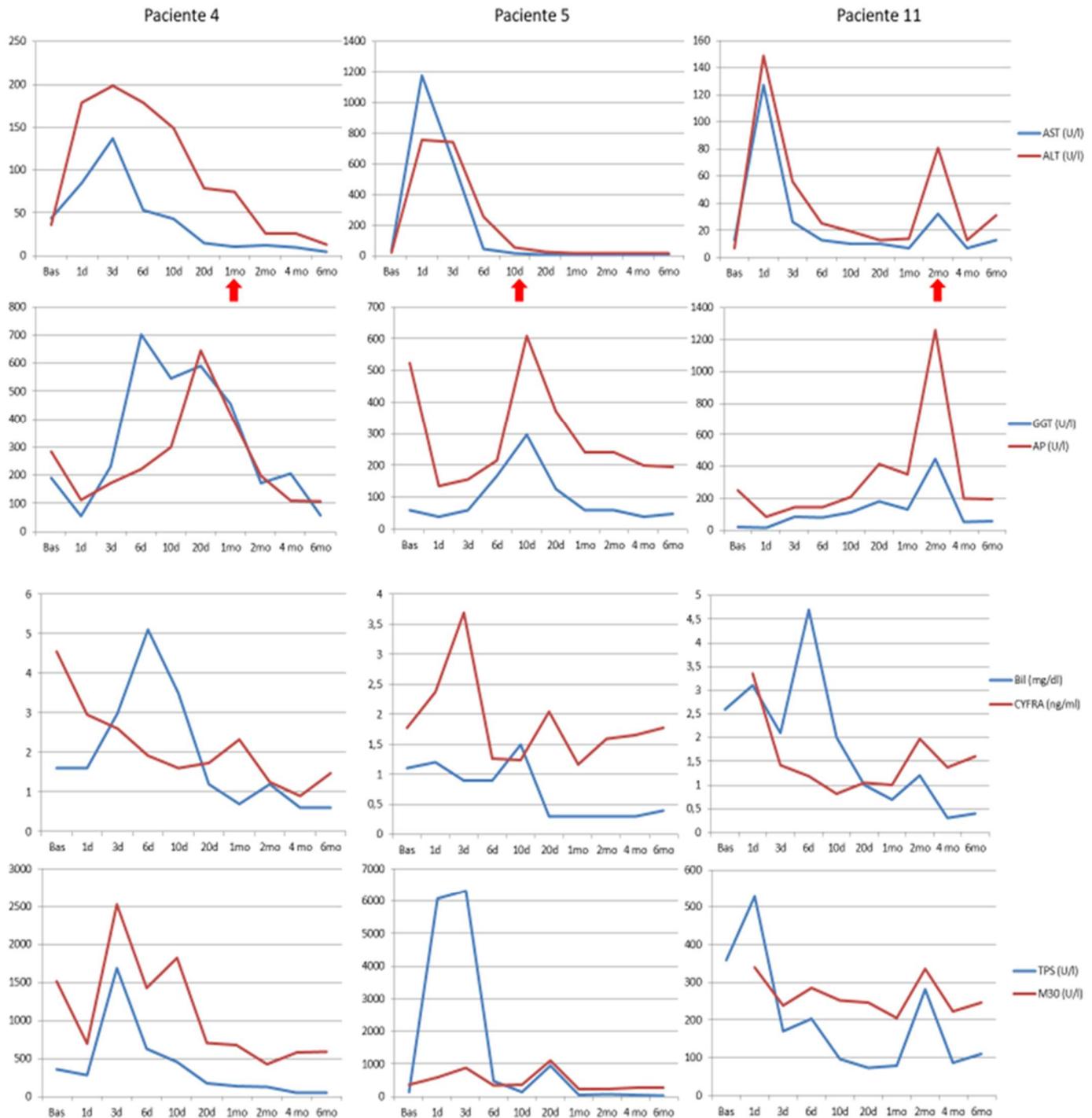


Figura 5.5. Variación de los parámetros analíticos y de las queratinas séricas a lo largo del tiempo en los tres pacientes con rechazo celular agudo. Las flechas rojas indican el momento del rechazo.

Los datos de los tres pacientes con rechazo celular agudo se representan en la Figura 5.5. Coincidiendo con el episodio de rechazo se observó un ligero incremento de los niveles séricos de K18 (M30 y TPS) en dos casos (pacientes 5 y 11) pero no en el otro (paciente 4). En los tres casos se observó un aumento transitorio de los niveles de K19 (CYFRA 21-1) coincidiendo con el episodio de rechazo y con la elevación de GGT y fosfatasa alcalina (Figura 5.5).

En los estudios histológicos, la tinción con hematoxilina-eosina revelaron los datos típicos de un rechazo celular agudo, la inmunohistoquímica para M30 neo-epitopo fue negativa (índice apoptótico de cero) y la inmunohistoquímica para K19 fue positiva en los ductos biliares y en algún hepatocito disperso (Figura 5.6).

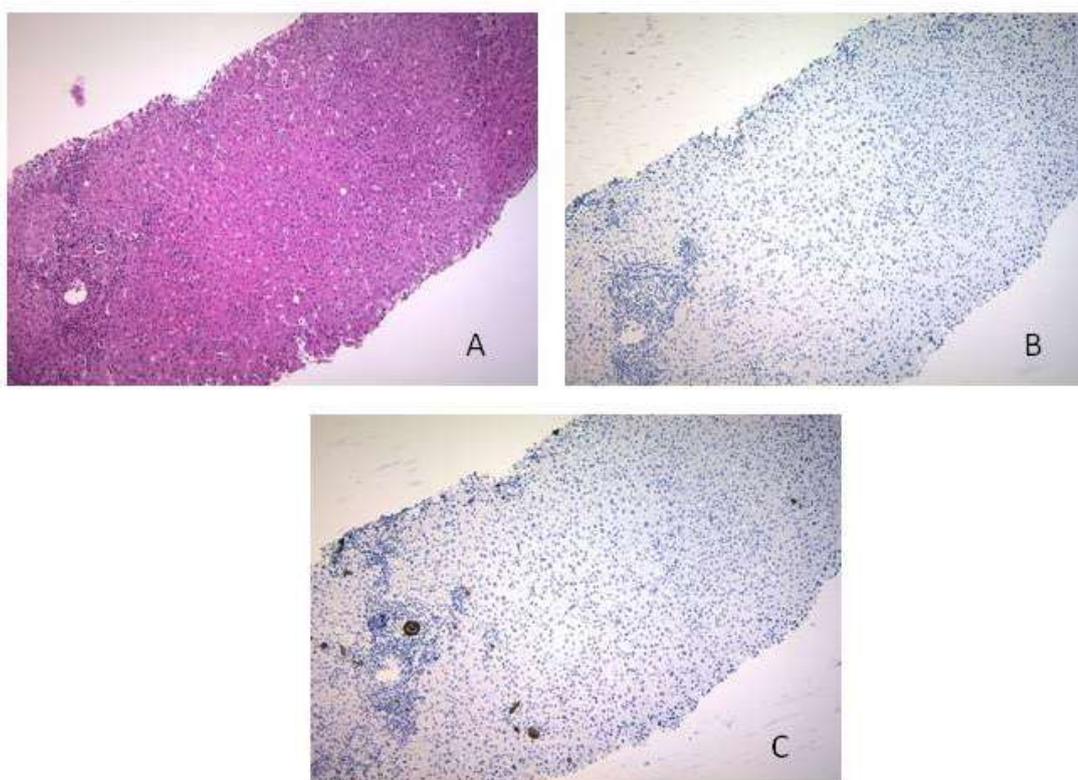


Figura 5.6: Biopsia hepática del paciente 4 tras presentar un rechazo celular agudo al trasplante hepático. La biopsia hepática se realizó el día +33 postrasplante. (A) Hematoxilina-eosina: se observan los signos típicos del rechazo celular agudo. (B) Inmunohistoquímica para neo-epitopo M30: es negativa. (C) Inmunohistoquímica para K19: es positiva en los ductos biliares normales y en algún hepatocito disperso.

5. Discusión

El trasplante hepático es una de las terapias estándares en pacientes con enfermedades hepáticas en estado avanzado. El estudio de los mecanismos subyacentes al daño por isquemia-perfusión y de las complicaciones tardías puede servir como base para el tratamiento y la prevención de las mismas. En este estudio, intentamos definir los cambios de los niveles de queratinas hepáticas (K19 y K18) en el post-trasplante.

Los cambios que observamos en los niveles séricos de queratinas nos indican que tras el trasplante se produce tanto un proceso de necrosis como de apoptosis. Los niveles séricos de los

fragmentos de K18 (TPS y M30) aumentan drásticamente en los primeros 3 días tras el procedimiento. Sin embargo, las concentraciones séricas de K19 no aumentan en el mismo periodo. Los cambios de TPS y M30 son similares, pero no paralelos, de hecho, el pico de TPS tiende a ocurrir antes, de esta manera la ratio TPS/M30 es mayor en el día +1 que en el día +3. Estos datos nos indican que el daño hepático precoz por isquemia-reperfusión es debido a ambos procesos: necrosis y apoptosis; con predominio de la necrosis en las primeras horas postrasplante y de la apoptosis en los siguientes días. Tanto Ulukaya (156) como Brenner (249), observaron resultados similares. La relativa contribución entre apoptosis y necrosis puede ser importante para futuras investigaciones para intentar prevenir la disfunción precoz del injerto, como por ejemplo con el desarrollo de fármacos anti-apoptóticos (246,250). El aumento de los niveles de los fragmentos de K18 desciende rápidamente pasados los días, siendo más rápido el descenso del TPS que el de M30. A los seis meses tras el trasplante las concentraciones de ambos marcadores fueron significativamente menores que los niveles pre-trasplante. Por lo general, los cambios de las concentraciones de los fragmentos de K18 son similares a los cambios de los niveles séricos de AST y ALT. Estudios previos observaron una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de los fragmentos de K18 y los niveles de transaminasas, siendo mayor en ALT (70).

Los cambios de los niveles de los fragmentos de K19 (CYFRA 21-1) en el postrasplante son completamente diferentes. Se observó un descenso gradual de las concentraciones a partir de los valores pre-trasplante, sin un pico significativo en el inmediato postrasplante. Por lo general, los cambios en K19 (CYFRA 21-1) fueron similares a los que se observaron en la concentración de bilirrubina sérica. Hay que tener en cuenta que, en los hígados sanos, la expresión de la K19 queda restringida al epitelio biliar siendo la K18 y la K8 las queratinas presentes en los hepatocitos (5,7,9).

Si nos fijamos en cada paciente de forma individual, los dos pacientes con recurrencia del VHC presentaron un incremento de los niveles de los fragmentos de K18 (TPS y M30), sugiriéndonos un aumento de la necrosis y de la apoptosis durante el proceso. En consonancia, los estudios inmunohistoquímicos en esos casos mostraron un aumento del índice apoptótico estimado con inmunohistoquímica para M30. Cabe destacar que el aumento de los fragmentos de K18 fue anterior a la alteración de los marcadores hepáticos habituales.

Por otro lado, de los tres pacientes con rechazo celular agudo se observó un ligero incremento de los niveles séricos de K18 (M30 y TPS) en dos casos coincidiendo con el episodio de rechazo, pero no en el otro. Además, en los estudios inmunohistoquímicos en esos casos no se observó incremento de la apoptosis hepatocitaria. En conjunto, estos datos sugieren que la apoptosis es más relevante en complicaciones postrasplante como la recurrencia de la Hepatitis por VHC que en otras como el rechazo celular agudo. De hecho, se sabe que la apoptosis es una característica relevante de la hepatitis crónica por VHC (38,77). Además los cambios en los niveles de K18 se han relacionado tanto con infecciones en el post-trasplante como alteraciones en la perfusión hepática (155).

Hay que destacar que las concentraciones séricas de los fragmentos de K19 aumentaron tanto durante la recurrencia de VHC como durante el rechazo agudo. En algunos casos, este aumento fue anterior al incremento de los marcadores hepáticos estándares. En circunstancias normales, la K19 se expresa únicamente en las células del epitelio biliar, sin embargo se ha observado su expresión en los hepatocitos en situaciones de estrés (7,12). Se sabe que durante la recurrencia de VHC y del rechazo agudo se produce una afectación de los ductos biliares. Debido a que la K19 desciende de forma constante a partir de los niveles pre-trasplante, sus concentraciones podrían tener valor para identificar de forma sencilla las variaciones anormales que pueden indicar complicaciones post-trasplante.

Este estudio presenta ciertas limitaciones. Su objetivo principal fue definir los cambios de las queratinas séricas durante el periodo postrasplante. Los pacientes fueron seguidos de forma estricta a intervalos regulares. El estudio no está diseñado para detectar cambios que se puedan producir entre las fechas de extracciones programadas, siendo esto especialmente importante en los primeros días postrasplante, cuando los cambios son mayores. Además, el tamaño de la muestra es pequeño como para evaluar el valor diagnóstico de las queratinas séricas en dicho periodo. Los datos individuales deben ser interpretados con cautela; nuestros resultados preliminares pueden servir de base para futuros estudios para valorar la utilidad de las queratinas séricas en la detección y diagnóstico de las complicaciones del postrasplante. Finalmente, hay que destacar que las queratinas 18 y 19 se expresan en muchas células de estirpe epitelial y que por lo tanto no son específicas del tejido hepático (7,12). Sin embargo, la presencia de elevadas concentraciones en las células hepáticas y la presencia de cambios importantes de las concentraciones séricas de las mismas cuando se producen eventos específicos tras el trasplante, nos deben indicar que las queratinas séricas que medimos en nuestros pacientes provienen del tejido hepático.

El estudio de los niveles séricos de los fragmentos de queratinas puede aumentar nuestro conocimiento de las enfermedades hepáticas (7,12). Las queratinas séricas ofrecen una forma de medir la necrosis y apoptosis hepática, procesos importantes en el desarrollo de las enfermedades hepáticas. En este contexto, puede ser interesante desarrollar fármacos anti-apoptóticos para prevenir el daño hepático asociado al postrasplante inmediato. En cuanto al diagnóstico, las queratinas séricas podrían ser unos futuros marcadores de enfermedad hepática. En este contexto, las proteínas del hepatocito, como lo son las queratinas, pueden ser unos indicadores más robustos que los estándares marcadores como son las actividades enzimáticas, que se pueden ver alteradas por otros factores externos como el consumo de drogas o fármacos (198). Hay que destacar que las pruebas para determinar las concentraciones de queratinas están disponibles de forma comercial y que la determinación de estas concentraciones es sencilla utilizando plataformas estándares (251).

De todas formas, es necesario realizar más estudios para valorar la verdadera utilidad del uso de fragmentos de queratinas como marcador de complicaciones en los trasplantados hepáticos.

6. Conclusiones

El presente estudio permite delinear los cambios en las concentraciones séricas de fragmentos de K18 y K19 para estudios futuros. Los cambios en las concentraciones de K18 son diferentes a los de K19. La elevación de los niveles séricos de los fragmentos de K18 (TPS y M30) en las primeras horas postrasplante indica que el daño por isquemia-reperusión es debido a necrosis y apoptosis de los hepatocitos, con predominio de la necrosis en las primeras horas postrasplante y de la apoptosis en los siguientes días. Las concentraciones de K19 descienden paulatinamente tras el trasplante, salvo complicaciones. Hemos observado un aumento diferencial de las concentraciones de los fragmentos de K18 y K19 en aquellos pacientes con complicaciones en el postrasplante (reactivación de la infección por VHC o rechazo celular agudo), pudiendo ser estos de utilidad para identificar las complicaciones de forma precoz.

Corolario:

Ejemplo de valor predictivo negativo:
normalidad de la queratina 18 (TPS) sérica
para descartar enfermedad hepática en una
paciente con miopatía y elevación
persistente de transaminasas

1. Introducción específica

La ALT y AST son enzimas presentes en el citoplasma y mitocondrias de los hepatocitos y su elevación de los niveles en suero puede deberse a necrosis o apoptosis de los mismos (252). Sin embargo, estas enzimas también se expresan en otros tejidos: AST en cerebro, páncreas, músculo, riñón, pulmón, hematíes y leucocitos y ALT en músculo, tejido adiposo, intestinos, próstata y cerebro (252). Un daño en cualquiera de ellos puede provocar una elevación de las transaminasas (AST y ALT) en suero.

Los filamentos intermedios son un componente fundamental del citoesqueleto celular. En los hepatocitos están compuestos por queratinas (K) 18 y 8, mientras que en las células musculares el filamento intermedio que se expresa es la desmina (12). Ante una apoptosis o necrosis de hepatocitos, los fragmentos de K18 son liberados en suero (14,26) y sus niveles pueden detectarse mediante un ensayo comercial midiendo el TPS (*Tissue Polypeptide Specific Antigen*) (57). La determinación de los fragmentos de K18 (TPS) podría ser útil para diferenciar una elevación de transaminasas secundaria a daño muscular de una por daño hepático. Se presenta el caso clínico de una paciente con una miopatía de Miyoshi con elevación persistente de ALT y AST y determinación de TPS normal en la cual se descartó enfermedad hepática.

2. Descripción del caso clínico

Mujer de 16 años con antecedentes de convulsiones febriles en la infancia y sin otros antecedentes personales ni familiares de interés con elevación de transaminasas en una analítica realizada de forma rutinaria. En el momento del estudio la paciente se encontraba asintomática, sin mialgias, debilidad muscular con el ejercicio, artralgias, artritis o eritema cutáneo. Negaba consumo alcohólico previo, consumo de sustancias de uso recreativo ni de fármacos. La exploración física fue normal. En la analítica (suero) destacaba AST de 123 UI/l (normal: 8-37 UI/l), ALT 130 UI/l (normal: 3-31 UI/l), GGT de 3 UI/l (normal: 4-38 UI/l), fosfatasa alcalina de 175 UI/l (normal: 88-263 UI/l), bilirrubina total de 0,4 mg/dl (normal: 0,2-1,2 mg/dl), LDH: 759 UI/l (normal: 200-418 UI/l), creatin-fosfoquinasa (CPK) total de 6762 UI/l (normal: 23-147 UI/l) y aldolasa de 36,7 UI/l (normal < 7,5 UI/l). El valor de K18 (TPS) fue de 20 U/l (normal <80 U/l). El hemograma fue normal. El estudio de autoinmunidad (anticuerpos antinucleares, anti-DNA, anticuerpos antimitocondriales, anticuerpos antimusculo liso, anti-*liver-kidney microsomes* (LKM), anticitoplasma de neutrófilo, anticuerpos anti-M2, anticuerpos anti-LC1, anticuerpos anti-antígeno soluble hepático (SLA), y anticuerpos anti-F-Actina) fue repetidamente negativo. Los anticuerpos antitransglutaminasa fueron negativos y la IgA normal. La ferritina, el índice de saturación de transferrina, el cobre, la ceruloplasmina y la alfa-1-antitripsina fueron normales. La hormona tiroideo-estimulante (TSH) fue normal. Las serologías para VHC, Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Citomegalovirus y Virus Varicela Zóster fueron negativas. En la ecografía abdominal se observó un hígado homogéneo de tamaño, morfología y ecoestructura dentro de la normalidad. Durante el seguimiento se observó una persistencia de la elevación de transaminasas, CK y LDH (Figura C.1). Ante la negatividad del estudio de hepatopatía y la persistencia de elevación de transaminasas, se decidió realizar una biopsia hepática que fue normal. Se realizó una resonancia magnética en la cual se observaron hallazgos que sugerían una miopatía bilateral y simétrica con afectación de miembros inferiores y superiores. El electromiograma fue normal. El test de la gota seca para enfermedad de Pompe y el test de ejercicio en isquemia fueron normales. Se realizó una biopsia del deltoides observando una miopatía grado leve con ausencia de marcaje con el anticuerpo anti-disferlina en el estudio inmunohistoquímico y tinción para miofosforilasa y fosfofructoquinasa normales. El estudio genético para el gen de la disferlina no ha observado mutaciones. Ante estos hallazgos se diagnosticó a la paciente de posible miopatía de Miyoshi con elevación de transaminasas de origen muscular.

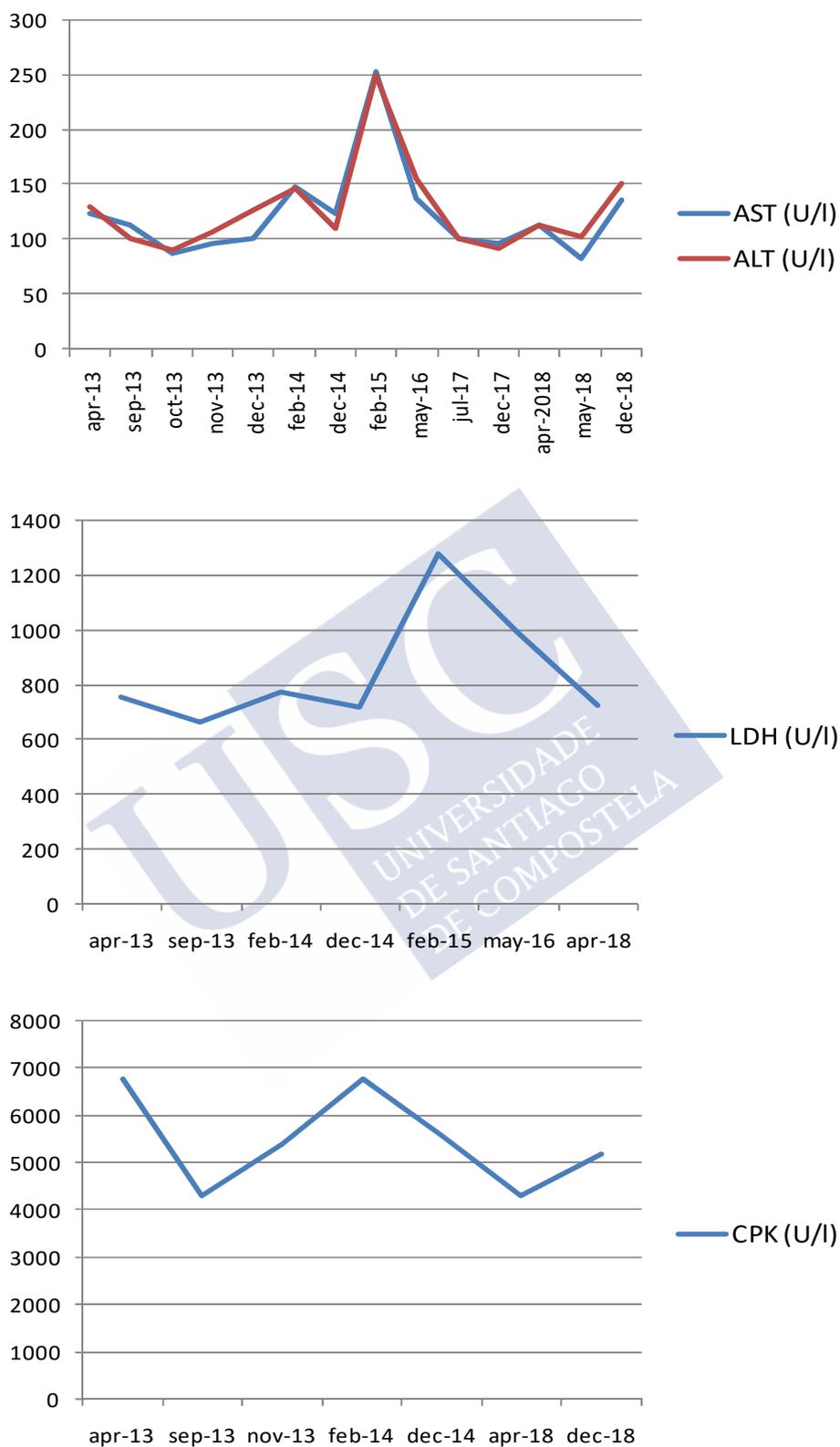


Figura C.1: Representación de la evolución de las transaminasas, creatín-fosfokinasa (CPK) y lactato-dehidrogenasa (LDH) de la paciente durante el seguimiento

3. Discusión y comentarios

Las transaminasas (ALT y AST) son enzimas que se expresan en múltiples tejidos. La AST se expresa en hígado, cerebro, páncreas, músculo, riñón, pulmón, hematíes y leucocitos y la ALT en hígado, tejido adiposo, intestinos, próstata y cerebro. Sin embargo los niveles de ALT son mayores en el tejido hepático que en resto, por eso una elevación de ALT en suero se suele relacionar con daño hepático (252). A pesar de esto, se ha descrito previamente la elevación de AST y ALT en pacientes con rhabdomiólisis (253), miopatías (254–260) o tras un ejercicio intenso (261,262). Además en algunos casos de miopatías la elevación de transaminasas puede preceder tanto la aparición de sintomatología muscular como de elevación de CPK (256,257).

Es importante diferenciar cuando la elevación de las transaminasas es debida a daño hepático o muscular, pues patologías musculares como la rhabdomiólisis pueden asociarse a un fallo hepático agudo (263). Por estos motivos, ante una elevación de ALT, lo habitual es realizar todos los estudios necesarios para descartar una hepatopatía asociada llegando incluso a realizar pruebas invasivas como una biopsia hepática. El caso que exponemos es el de una paciente con una miopatía con elevación persistente de ALT y AST sin evidencia de daño hepático en la biopsia.

En nuestro conocimiento, hasta el momento no se ha descrito ninguna prueba de laboratorio que pueda diferenciar cuando el aumento de transaminasas es debido a daño muscular o a uno hepático. Wang *et al.* (264) describieron que el ratio CPK/ALT era menor en aquellos ratones con daño muscular y hepático que en aquellos con únicamente daño muscular, pero su aplicabilidad en humanos está aún por demostrarse.

La K18 es una proteína fundamental del citoesqueleto de los hepatocitos y sus fragmentos se liberan al torrente circulatorio ante una necrosis o apoptosis de los mismos (26). Estudios previos han revelado que los fragmentos de K18 se encuentran elevados en pacientes con hepatopatía alcohólica (94), enfermedad hepática no alcohólica (133), hepatopatía por VHC (77) o hepatopatía por VHB (89). La queratina-18 se expresa en las células de epitelios simples, sin embargo no se expresa en las células musculares donde el filamento intermedio predominante es la desmina (12). En efecto, Thulin *et al.* (166) describieron que no hay variación de niveles séricos de fragmentos de K18 en aquellos pacientes que realizan ejercicio intenso a pesar de presentar elevación de ALT y AST. La determinación de K18 (TPS) podría utilizarse para descartar enfermedad hepática en aquellos pacientes con elevación de transaminasas y enzimas musculares, pudiendo evitarse la realización de estudios invasivos como una biopsia hepática, dado su valor predictivo negativo.

Discusión general



1. Limitaciones y fortalezas del estudio

Las limitaciones de cualquier estudio de corte epidemiológico pueden clasificarse en las que comprometen su validez interna o a su validez externa. Las primeras incluyen los posibles sesgos de confusión, de selección, de medición (clasificación) o de análisis (especificación). La validez externa se refiere a la *generalizabilidad* de los resultados. Se discuten a continuación estas posibles limitaciones.

1.1. Posibles problemas de confusión

La confusión, el ámbito de la investigación clínico-epidemiológica, se refiere a la distorsión de la asociación entre la exposición y un efecto por una tercera variable (de confusión) asociada con la exposición y causalmente con el efecto. El fenómeno de la confusión es particularmente un sesgo cuando se investiga causalidad. Los trabajos de esta tesis son fundamentalmente, en su conjunto, de pruebas diagnósticas, con las queratinas (especialmente K18) como marcador de enfermedades hepáticas. Parece poco probable que exista algún otro factor asociado con la exposición (enfermedad hepática) y el efecto (elevación de K18) que pueda confundir las asociaciones observadas. Es remotamente posible que alguna neoplasia epitelial concomitante eleve el TPS sin relación con hepatopatía. En este sentido, ninguno de los subestudios ha incluido pacientes con hepatocarcinoma. Fuera de esos supuestos, la elevación de K18 (TPS) es bastante específica y no sujeta a este tipo de problemas. El abuso de alcohol y la obesidad se asocian también a elevación de las concentraciones de K18 (TPS) sérica, en ambos casos a través de la hepatopatía que inducen, como se ha valorado en subestudios individuales en la presente tesis.

1.2. Posibles problemas de selección

Todos los subestudios incluidos en la presente Tesis han sido de base hospitalaria. Dos de ellos (concretamente el estudio en pacientes con abuso de alcohol y la fase inicial del estudio en los pacientes trasplantados), además, se han realizado con pacientes ingresados en el hospital. Los restantes estudios han sido realizados en pacientes de una consulta hospitalaria específica de Hepatología. Ello convierte, de entrada, a estas muestras de pacientes en una población seleccionada, lo cual no quiere decir necesariamente que implique un sesgo de selección, que dependerá de los objetivos y la población diana del estudio que se trate. Es de destacar que la determinación de K18 (TPS) en estas nuestras consultas es rutinaria desde hace años (a raíz de la experiencia del propio grupo), lo cual minimiza problemas de selección al no incluir sólo pacientes con unas características muy definidas. Aunque los subestudios presentados tenían en su mayoría un diseño de base transversal, al analizar y comparar entre ellos diferentes grupos se convierte, de facto, en diseños de casos y controles en los que existen sujetos con el efecto (la enfermedad o rasgo de ella en cuestión, los casos) y sujetos sin el efecto (controles). Los posibles sesgos de este diseño de estudio son bien conocidos incluyendo, entre otros, la ambigüedad temporal y el sesgo de recuerdo, que sería clasificable en el grupo siguiente (sesgos de medición). Tratándose la exposición en el presente estudio de diagnósticos registrados en una historia clínica, éste último parece improbable. Los sesgos característicos de los estudios de casos y controles de base hospitalaria incluyen el sesgo de Berkson, causado por la unión probabilística de diferentes tasas de hospitalización con diferentes trastornos clínicos. No parece probable, sin embargo, que sesgos como el que se comentan hayan tenido influencia en los resultados observados. En todos los estudios se cumple la premisa fundamental en los estudios de casos y controles de que estos últimos se obtienen de la misma población de la que se obtienen los casos. Se ha de tener en consideración que los estudios se han realizado en el medio poblacional en el que se pretende generalizar las conclusiones sobre el uso de las queratinas como marcadores, es decir, en consultas específicas de enfermedad. Por lo tanto, con los resultados observados, las conclusiones no serían extrapolables a otros entornos como consultas generales o de Atención Primaria.

1.3. Posibles problemas de medición (clasificación)

Los sesgos de clasificación pueden producirse cuando hay una inadecuada herramienta de medida de las exposiciones o los efectos. Si se consideran las enfermedades hepáticas como exposiciones y las concentraciones séricas como efectos, las herramientas de medida del presente estudio parecen adecuadas. Las enfermedades hepáticas han sido clasificadas siguiendo los criterios habituales, tanto clínicos, como microbiológicos (en el caso del VHC), de imagen y elastografía (en la misma entidad), o morfológico-histológicos (como en las hepatopatías autoinmunes, el hígado graso no alcohólico o algunas complicaciones post-trasplante hepático). En todo caso, como se ha comentado en el punto anterior, han sido los aplicados en la práctica clínica rutinaria en unidades específicas de Hepatología. La medición de marcadores rutinarios de daño hepático se ha realizado mediante métodos validados y con controles sistemáticos de calidad, pues son los que se aplican a diario en el laboratorio clínico de un centro de referencia. Algo parecido ocurre con la determinación de efecto principal de este estudio, la K18 (TPS), que se encuentra automatizada dentro de las plataformas de uso clínico habitual. Esto se puede entender, como se comenta más adelante, como una fortaleza del estudio. La determinación de K19 también realizó mediante un método comercial en una plataforma de uso clínico habitual. La determinación de M30, neoantígeno de la K18 generado específicamente durante la apoptosis por la vía de las caspasas, también se realizó mediante un *kit* comercial, pero a través de un ELISA no implementado en las plataformas clínicas, con las limitaciones de calibraciones en estos casos, aunque se siguieron en todo momento las instrucciones del fabricante. Esta determinación sólo se utilizó en los pacientes del subestudio 5, de forma paralela a la determinación de K18 comercial y automatizada (TPS). Desde el punto de vista de la información patogénica, hay que tener en cuenta que el análisis del TPS detecta un epítipo de la K18 que está presente en la K18 intacta y en sus fragmentos. Por lo tanto, a diferencia de los que ocurre con el neoepítipo M30 (específico de la apoptosis), el aumento de las concentraciones de TPS podría deberse tanto a necrosis como a apoptosis hepatocitaria, aunque probablemente más la primera (30).

1.4. Posibles problemas de análisis (especificación)

Los análisis empleados en los diferentes subestudios han sido los básicos habituales, con cumplimiento de los requisitos para cada uno de ellos. En todos los análisis se ha optado por estadística no paramétrica. Aunque el número amplio de casos en varios de los estudios hubieran permitido el uso de estadística paramétrica, se ha preferido la primera por la distribución marcadamente no ajustada a la normalidad de muchas de las medidas (incluida la K18 [TPS]) en la población, por su robustez en todos los supuestos y por mantener la uniformidad en todos los análisis. Por similar razón, a la hora de describir las variables continuas (como la K18 [TPS]) en las poblaciones de estudio se ha optado, de modo uniforme, por medidas de tendencia central basadas en ordenaciones (percentiles, incluida la mediana como estimador de tendencia central) y no basadas en momentos (como la media y desviación típica para tendencia central y dispersión, respectivamente). En algunas ocasiones se ha recurrido a la comparación de pruebas diagnósticas mediante curvas ROC, como es habitual en este tipo de estudios, a fin de comparar las áreas bajo curva con sus intervalos de confianza. Sólo en contadas ocasiones ha sido preciso recurrir a modelos de análisis multivariante (concretamente, mediante regresión logística) para ajustar por determinados factores de confusión o para mostrar el valor predictivo individual de determinado rasgo.

1.5. Posibles limitaciones a la validez externa

Como se ha comentado anteriormente, los estudios han sido realizados en el entorno hospitalario, en una consulta específica de Hepatología y en pacientes ingresados en un hospital de referencia. Dada esta población seleccionada, los resultados no pueden ser extrapolables a otras poblaciones de índole más general. A pesar de tratarse de un estudio unicéntrico y, por lo

tanto, sólo en el centro de referencia de un área geográfica determinada, en pacientes de etnia casi-universalmente *caucásica*, pensamos que ello no le resta validez externa. De entrada, no parece haber razones para pensar que algún hecho particular de los pacientes del área mencionada les haga comportarse en este aspecto (relación de las concentraciones de queratinas y enfermedad hepática) de forma distinta a los de otros entornos geográficos o de diferente etnia.

1.6. Fortalezas del estudio

Algunas de las posibles fortalezas del estudio ya se han comentado de forma paralela a las limitaciones en los párrafos precedentes. En conjunto, los estudios se adaptaron a las directrices de la iniciativa STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*), como se hace constar en el Anexo a esta tesis. Creemos de destacar, en este aspecto, el abanico amplio de trastornos hepáticos estudiados, que incluyen los más frecuentes en nuestro medio en el adulto. Los estudios en una consulta específica y dentro del protocolo habitual (incluida la determinación de K18 [TPS], que se realiza de forma rutinaria desde hace años en nuestras consultas y no en casos seleccionados), lo cual le añade interés clínico y *generalizabilidad* a entornos clínicos similares. El número de sujetos a estudio ha sido suficientemente amplio en los subestudios para aportar suficiente potencia a los mismos, quizá con la excepción del subestudio en pacientes no hígado graso no alcohólico (en el que se prefirió incluir sólo pacientes biopsiados), como se ha comentado en su discusión particular.

2. Conclusiones comentadas

Aunque cada uno de los subestudios se ha seguido de una Discusión específica, se comentan a continuación las conclusiones de cada uno de ellos (que se corresponden con las conclusiones de esta tesis), en los aspectos que merecen una valoración conjunta y con énfasis, intentando no reiterar las discusiones individuales al final de cada subestudio, en los aspectos fundamentales que soportan dichas conclusiones.

2.1. En los pacientes con hepatitis crónica por virus hepatitis C (VHC):

La concentración de K18 (TPS) sérico es útil para estimar el grado de fibrosis hepática pre-tratamiento. Tanto el grado de fibrosis como los niveles de K18 (TPS) mejoran tras el tratamiento con antivirales de acción directa. La no mejoría de K18 (TPS) tras el tratamiento puede indicar la coexistencia de otras causas de hepatopatía o complicaciones.

De acuerdo con nuestros resultados, las concentraciones séricas de K18 (TPS) son capaces de predecir, por sí solas, una fibrosis hepática avanzada (grado 3 o mayor), con un área bajo la curva ROC que no es significativamente distinta a la de *scores* más complejos en su cálculo como FIB-4 o APRI. El TPS puede aportar cierta información complementaria a la fórmula FIB-4, aunque no tanto a la fórmula APRI. Los valores de TPS se relacionan también con los de ALT, AST, fosfatasa alcalina, INR y con el grado de fibrosis hepática. Todo ello concuerda con lo descrito previamente para el TPS (77) y con los estudios realizados con otros epítomos de K18, como M30 (34,37,81,82,193). De acuerdo con ello, la determinación de K18 (TPS) podría ser útil o suplementaria en pacientes con dificultades (por ejemplo, obesidad extrema) o no disponibilidad para la realización de elastografía hepática.

El tratamiento con antivirales directos frente al VHC fue seguido de una marcada reducción de las concentraciones séricas de K18 (TPS). Es de destacar que, basalmente, un porcentaje apreciable (40,9%) de los pacientes con infección por VHC y transaminasas normales presentaban concentraciones de K18 (TPS) elevadas. Estos datos hablan de una mayor sensibilidad de la K18 (TPS) para detectar el daño hepático, aunque éste no era uno de los objetivos del presente estudio. El descenso de la K18 (detectada mediante otros tests, concretamente M30) se había

descrito tras el tratamiento con interferón y ribavirina, en épocas previas a los antivirales de acción directa (71,78,86,87). A pesar de la curación de la infección por VHC en la gran mayoría de los casos, como es habitual, la K18 (TPS) permaneció elevada en el suero en, aproximadamente, un tercio de los pacientes al cabo de 3 meses de finalizar el tratamiento. De ellos, dos terceras partes presentaban factores adicionales para la elevación de este marcador, entre los que se han comentado más arriba. Por todo ello, unido a la mayor sensibilidad que se ha comentado, la persistencia de TPS elevado podría ser un indicador de una causa de enfermedad hepática adicional que no se debe subestimar, una vez eliminado el VHC.

2.2. En los pacientes con abuso de alcohol:

Se confirma la elevación de K18 (TPS) sérica, frecuente y, en muchos casos, marcada. Ésta se asocia a la elevación de marcadores de daño hepático, especialmente los indicativos de hepatitis alcohólica, con posible utilidad como marcador de la misma. La K18 (TPS) sérica se correlaciona con la elevación de citoquinas proinflamatorias. La correlación entre los niveles de TNF-alfa séricos y el K18 (TPS) sérica es consistente con la idea del papel del TNF-alfa en la apoptosis en la hepatopatía alcohólica.

Más del 80% de los pacientes con abuso de alcohol ingresados en el hospital presentaban concentraciones de K18 (TPS) por encima de 100 U/l casi la cuarta parte del total presentaban valores por encima de 1000 U/l, es decir más de 10 veces por encima del valor superior de normalidad. Estos últimos pacientes presentaban datos clínico-bioquímicos de hepatitis alcohólica, lo cual reafirma el posible papel diagnóstico de la K18 (TPS) en esta entidad (73,94,98). Una cuarta parte de los pacientes con hepatitis alcohólica aguda en esta serie presentaban concentraciones de K18 (TPS) por encima de 2000 U/l. No es de extrañar que aumente la K18 en el suero de estos pacientes, ya que los agregados de K18 intra-hepatocitarios, en forma de cuerpos o hialina de Mallory, es un hecho citológico característico de la hepatitis alcohólica. El valor diagnóstico de la K18 (TPS) en los pacientes con hepatopatía alcohólica podría verse aumentado dada la escasa elevación que tienen los pacientes en los marcadores habituales de citólisis (AST y, sobre todo, ALT) en este grupo de enfermedades hepáticas.

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) se correlacionaron con las concentraciones de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- α . No se observó la misma correlación, sin embargo, entre las concentraciones de K18 (TPS) sérico y la de *ligandos* de endotoxina como LBP y sCD14. En nuestro conocimiento, estos aspectos no habían sido nunca estudiados. Aunque el mero hecho de estar basado en una correlación positiva es, por si solo, un argumento débil, este hallazgo, buscado con hipótesis *a priori*, es consistente el papel del TNF- α en la apoptosis hepatocitaria en la hepatopatía alcohólica. La elevación de las concentraciones séricas de TNF- α se observan en la enfermedad hepática avanzada y la hepatitis aguda alcohólica (100,209,210-214), aunque hasta la fecha los fármacos anti-TNF no han mostrado utilidad en esta situación (215-220).

2.3. En los pacientes con hígado graso no alcohólico:

El valor de la K18 (TPS) sérica es significativamente mayor en pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico que en controles sanos y mayor, pero sin alcanzar la significación estadística, en pacientes con esteatohepatitis con respecto a los pacientes con hígado graso simple. Los valores de K18 (TPS) se correlacionan con los principales marcadores de daño hepático (AST y ALT) pero no hemos encontrado relación con el daño hepático observado en las biopsias (esteatosis, necrosis o fibrosis). Es necesaria la realización de otros estudios con mayores tamaños muestrales para confirmar estos resultados y su valor pronóstico.

Las concentraciones de K18 (TPS) séricas fueron mayores en pacientes con hígado graso no alcohólico que en los controles poblacionales con masa corporal normal. También fueron mayores en los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica con respecto a aquellos con hígado

graso simple, aunque sin alcanzar la significación estadística. En este aspecto, los hallazgos son confirmatorios de estudios previos que demostraron que algunas determinaciones de K18 pueden ser útiles para diferenciar aquellos pacientes con enfermedad grasa hepática de los sanos y los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica de aquellos con hígado graso simple (75,113,120,126,131,133,138,224). Sin embargo, hasta un 80% de los pacientes con enfermedad grasa hepática no alcohólica presentan valores de transaminasas normales (225,226) y además los valores de transaminasas no se han relacionado con el grado de afectación histológica (227). Todo esto hace necesaria la investigación de nuevos biomarcadores de cribado donde pueden tener cabida los fragmentos de K18 (TPS, M30 y M65), probablemente con un tamaño muestral mayor. Lo mismo puede decirse de la K18 sérica como marcador pronóstico en estos pacientes. Tras un seguimiento de un mínimo de 14 años, ninguno de los pacientes diagnosticado de esteatohepatitis en nuestro estudio desarrolló cirrosis, hepatocarcinoma o falleció debido a su hepatopatía, aunque la mayoría los pacientes seguía presentando elevación leve de transaminasas y datos de esteatosis en la ecografía hepática. En nuestro conocimiento, existe sólo un estudio que estudió el valor de fragmentos de K18 con la evolución de los pacientes, observando que los valores menores de M30 al diagnóstico se relacionaban con mayores tasas de remisión del hígado graso (108). En otro estudio, los cambios en los valores de M30 se correlacionaron con mejoría o empeoramiento en la biopsia hepática de seguimiento (139). En conjunto, el valor diagnóstico y pronóstico de las concentraciones de K18 (TPS) merece valorarse en estudios futuros más amplios.

2.4. En los pacientes con hepatopatías autoinmunes:

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) sérica se encuentran frecuentemente elevadas en los pacientes con hepatopatías autoinmunes, especialmente en los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome overlap. En esos casos, las concentraciones de K18 (TPS) frecuentemente alcanzan niveles basales muy altos (>1000 U/L), en los casos presentados como hepatitis aguda. Las concentraciones de K18 (TPS) sérica se correlacionan con las de AST y ALT en los pacientes con hepatopatía autoinmune y podrían aportar información suplementaria para distinguir los pacientes con CBP pura de los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome overlap.

La elevación de K18 (TPS) fue frecuente en los pacientes con hepatopatía autoinmune. Las concentraciones de K18 (TPS) fueron mayores en los pacientes con hepatitis autoinmune que en los pacientes con CBP. Esto es concordante con la K18 (TPS) como marcador de necrosis o apoptosis hepatocitaria, que es más prominente en los pacientes con hepatitis autoinmune que en los pacientes con CBP. Los pacientes con síndrome *overlap* presentaron niveles de K18 (TPS) similares a los de los pacientes con hepatitis autoinmune. En torno a un tercio de las hepatitis autoinmunes presentaron valores de K18 (TPS) sérica superiores a 1000 U/l (más de 10 veces por encima del intervalo superior de normalidad) y en torno al 5% presentaron valores superiores a 10.000 U/l (más de 100 veces el valor superior normal). Las concentraciones séricas de K18 (TPS) aportaron valor diagnóstico en la diferenciación de CBP vs hepatitis autoinmune (con o sin síndrome *overlap*), aunque no mayor que el de los marcadores habituales de citólisis (AST y ALT séricas) con las cuales, también en este grupo de entidades, la K18 (TPS) se correlaciona. Dado que la elevación de transaminasas forma parte de los criterios habituales para la definición de síndrome *overlap*, resulta conveniente disponer de un marcador fidedigno adicional, ajeno a los criterios de definición. No hay que olvidar que las transaminasas (AST y ALT) se pueden ver elevadas, con frecuencia, en situaciones patológicas diferentes de hepatopatía; entre otras, están las alteraciones musculares, con el ejemplo que se ha incluido en esta tests como Corolario. Recientemente, han observado que la determinación los fragmentos de K18 (M30 y M65) puede ser útil para predecir la recaída de la hepatitis autoinmune con remisión bioquímica en los marcadores habituales (168). La impresión clínica de que la determinación de K18 (TPS) sería útil

en la detección de recaídas en el seguimiento de la hepatitis autoinmune, reflejada en algún caso puntual en el presente trabajo, deberá ser corroborada en estudios futuros.

2.5. En los pacientes con trasplante hepático:

El presente estudio permite delinear los cambios en las concentraciones séricas de fragmentos de K18 y K19 para estudios futuros. Los cambios en las concentraciones de K18 son diferentes a los de K19. La elevación de los niveles séricos de los fragmentos de K18 (TPS y M30) en las primeras horas postrasplante indican que el daño por isquemia-reperfusión es debido a necrosis y apoptosis de los hepatocitos, con predominio de la necrosis en las primeras horas postrasplante y de la apoptosis en los siguientes días. Las concentraciones de K19 descienden paulatinamente tras el trasplante, salvo complicaciones. Los cambios en el perfil de la evolución de las queratinas podrían servir de base para estudios ulteriores de su valor en el diagnóstico de las complicaciones postrasplante hepático.

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la evolución de la K18 (medida mediante TPS y ensayo para M30, marcador específico de apoptosis) más allá del postrasplante inmediato (nuestro estudio abarcó los 6 meses postrasplante) y el primero que compara la evolución de los fragmentos séricos de K18 con los de K19. Los niveles séricos de los fragmentos de K18 (TPS y M30) aumentan llamativamente en los primeros 3 días tras el trasplante, de modo similar a las transaminasas. Los cambios de TPS y M30 séricos son similares, pero no enteramente paralelos, pues el pico de TPS tiende a ocurrir antes, indicando predominio de la necrosis en las primeras horas postrasplante y de la apoptosis en los siguientes días. Los cambios de los niveles de los fragmentos de K19 en el postrasplante fueron completamente diferentes. Se observó un descenso gradual de las concentraciones a partir de los valores pre-trasplante, en una evolución similar a la de la bilirrubina sérica. Hay que tener en cuenta que, en condiciones normales, la expresión de la K19 queda restringida al epitelio biliar siendo la K18 y la K8 las queratinas presentes en los hepatocitos (5,7,9).

La relativa contribución entre apoptosis y necrosis puede ser importante para futuras investigaciones para intentar prevenir la disfunción precoz del injerto, como por ejemplo con el desarrollo de fármacos anti-apoptóticos (246,250). En este aspecto, nuestros datos contribuyen a delinear el patrón de evolución normal con el que comparar las alteraciones que se encuentren en el perfil de queratinas séricas en las complicaciones post-trasplante.

2.6. En el conjunto de los estudios mencionados:

En conjunto, de los subestudios realizados puede concluirse que la determinación de K18 (TPS) sérica añade información a los marcadores habituales de daño hepático. La información que aporta es paralela a la de las transaminasas, pero con la ventaja de no verse influida por factores no hepáticos (especificidad) y de ser una determinación diferente (no una actividad enzimática, sino una proteína estructural del citoesqueleto hepatocitario) que se degrada durante la apoptosis. En contrapartida, su valor como marcador tumoral (su diseño original como marcador sérico) se verá comprometido en los pacientes con enfermedad hepática.

Conclusiones



En los pacientes con hepatitis crónica por virus hepatitis C (VHC):

La concentración de K18 (TPS) sérico es útil para estimar el grado de fibrosis hepática pre-tratamiento. Tanto el grado de fibrosis como los niveles de K18 (TPS) mejoran tras el tratamiento con antivirales de acción directa. La no mejoría de K18 (TPS) tras el tratamiento puede indicar la coexistencia de otras causas de hepatopatía o complicaciones.

En los pacientes con abuso de alcohol:

Se confirma la elevación de K18 (TPS) sérica, frecuente y, en muchos casos, marcada. Ésta se asocia a la elevación de marcadores de daño hepático, especialmente los indicativos de hepatitis alcohólica, con posible utilidad como marcador de la misma. La K18 (TPS) sérica se correlaciona con la elevación de citoquinas proinflamatorias. La correlación entre los niveles de TNF-alfa séricos y el K18 (TPS) sérica es consistente con la idea del papel del TNF-alfa en la apoptosis en la hepatopatía alcohólica.

En los pacientes con hígado graso no alcohólico:

El valor de la K18 (TPS) sérica es significativamente mayor en pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico que en controles sanos y mayor, pero sin alcanzar la significación estadística, en pacientes con NASH con respecto a los pacientes con hígado graso simple. Los valores de K18 (TPS) se correlacionan con los principales marcadores de daño hepático (AST y ALT) pero no hemos encontrado relación con el daño hepático observado en las biopsias (esteatosis, necrosis o fibrosis). Es necesaria la realización de otros estudios con mayores tamaños muestrales para confirmar estos resultados y su valor pronóstico.

En los pacientes con hepatopatías autoinmunes:

Las concentraciones séricas de K18 (TPS) sérica se encuentran frecuentemente elevadas en los pacientes con hepatopatías autoinmunes, especialmente en los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome *overlap*. En esos casos, las concentraciones de K18 (TPS) frecuentemente alcanzan niveles basales muy altos (>1000 U/L), en los casos presentados como hepatitis aguda. Las concentraciones de K18 (TPS) sérica se correlacionan con las de AST y ALT en los pacientes con hepatopatía autoinmune y podrían aportar información suplementaria para distinguir los pacientes con CBP pura de los pacientes con hepatitis autoinmune, aislada o asociada a CBP como síndrome *overlap*.

En los pacientes con trasplante hepático:

El presente estudio permite delinear los cambios en las concentraciones séricas de fragmentos de K18 y K19 para estudios futuros. Los cambios en las concentraciones de K18 son diferentes a los de K19. La elevación de los niveles séricos de los fragmentos de K18 (TPS y M30) en las primeras horas postrasplante indican que el daño por isquemia-reperfusión es debido a necrosis y apoptosis de los hepatocitos, con predominio de la necrosis en las primeras horas postrasplante y de la apoptosis en los siguientes días. Las concentraciones de K19 descienden paulatinamente tras el trasplante, salvo complicaciones. Los cambios en el perfil de la evolución de las queratinas podrían servir de base para estudios ulteriores de su valor en el diagnóstico de las complicaciones postrasplante hepático.

En el conjunto de los estudios mencionados:

La determinación de K18 (TPS) sérica añade información a los marcadores habituales de daño hepático. En contrapartida, su valor como marcador tumoral (su diseño original como marcador sérico) se verá comprometido en los pacientes con enfermedad hepática.



Bibliografía



1. Ueno T, Toi M, Linder S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed Pharmacother* 2005;59 Suppl 2:S359-62.
2. Fuchs E. Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *J Cell Biol* 1994;125:511-6.
3. Omary MB, Ku NO. Intermediate filament proteins of the liver: Emerging disease association and functions. *Hepatology* 1997;25:1043-8.
4. Fuchs E, Weber K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annu Rev Biochem* 1994;63:345-82.
5. Omary M, Ku N-O, Toivola DM. Keratins: Guardians of the liver. *Hepatology* 2002;35:251-7.
6. Omary MB, Coulombe PA, McLean WHI. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 2004;351:2087-100.
7. Strnad P, Stumptner C, Zatloukal K, Denk H. Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease. *Histochem Cell Biol* 2008;129:735-49.
8. Ku N-O, Strnad P, Zhong B-H, Tao G-Z, Omary MB. Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* 2007;46:1639-49.
9. Van Eyken P, Desmet VJ. Cytokeratins and the liver. *Liver* 1993;13:113-22.
10. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Fickert P, Lackner C, Trauner M, et al. The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol* 2004;204:367-76.
11. Ku NO, Wright TL, Terrault NA, Gish R, Omary MB. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *J Clin Invest* 1997;99:19-23.
12. Omary MB, Ku N-O, Strnad P, Hanada S. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J Clin Invest* 2009;119:1794-805.
13. Oshima RG. Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ* 2002;9:486-92.
14. Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997;138:1379-94.
15. Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 1997;272:33197-203.
16. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43(S1):S31-44.
17. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-74.
18. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14:1237-43.
19. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005;54:1024-33.
20. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. In: *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 977-1010.
21. Malhi H, Gores GJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology* 2008;134:1641-54.
22. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int* 2006;26:904-11.
23. Chakraborty JB, Oakley F, Walsh MJ. Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease

- and fibrosis. *Int J Hepatol* 2012;2012:1–10.
24. Alkhoury N, Carter-Kent C, Feldstein AE. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5:201–12.
 25. Riordan SM, Williams R. Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 2003;23:203–16.
 26. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol* 2014;60:1063–74.
 27. Bantel H, Ruck P, Gregor M, Schulze-Osthoff K. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol* 2001;80:230–9.
 28. Seidel N, Volkmann X, Länger F, Flemming P, Manns MP, Schulze-Osthoff K, et al. The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *Hepatology* 2005;42:113–20.
 29. McPartland JL, Guzail MA, Kendall CH, Pringle JH. Apoptosis in chronic viral hepatitis parallels histological activity: An immunohistochemical investigation using anti-activated caspase-3 and M30 Cytodeath antibody. *Int J Exp Pathol* 2008;86:19–24.
 30. Sheard MA, Vojtesek B, Simickova M, Valik D. Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis. *J Cell Biochem* 2002;85:670–7.
 31. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273–8.
 32. Mehal W, Imaeda A. Cell death and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2010;30:226–31.
 33. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003;83:655–63.
 34. Valva P, Casciato P, Lezama C, Galoppo M, Gadano A, Galdame O, et al. Serum apoptosis markers related to liver damage in chronic hepatitis C: sFas as a marker of advanced fibrosis in children and adults while M30 of severe steatosis only in children. *PLoS One* 2013;8:e53519.
 35. Choi YH, Jin N, Kelly F, Sakthivel SK, Yu T. Elevation of alanine aminotransferase activity occurs after activation of the cell-death signaling initiated by pattern-recognition receptors but before activation of cytolytic effectors in NK or CD8+ T cells in the liver during acute HCV infection. *PLoS One* 2016;11:e0165533.
 36. Lim EJ, El Khobar K, Chin R, Earnest-Silveira L, Angus PW, Bock C-T, et al. Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. *J Gen Virol* 2014;95:2204–15.
 37. Parfieniuk-Kowerda A, Lapinski TW, Rogalska-Plonska M, Swiderska M, Panasiuk A, Jaroszewicz J, et al. Serum cytochrome c and m30-neoepitope of cytokeratin-18 in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2014;34:544–50.
 38. Bantel H, Lügering A, Heidemann J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg CP, et al. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004;40:1078–87.
 39. Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W, et al. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:758–67.
 40. Calabrese F, Pontisso P, Pettenazzo E, Benvegnù L, Vario A, Chemello L, et al. Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. *Hepatology* 2000;31:1153–9.

41. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72:3691–7.
42. Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001;34:248–53.
43. Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 2005;10:3093–9.
44. Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* 1987;4:8–14.
45. Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742–7.
46. Fukui H, Brauner B, Bode JC, Bode C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 1991;12:162–9.
47. Hanck C, Rossol S, Bocker U, Tokus M, Singer MV. Presence of plasma endotoxin is correlated with tumour necrosis factor receptor levels and diseases activity in alcoholic cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 1998;33:606–8.
48. Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991;13:267–76.
49. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467–76.
50. Dhanda AD, Lee RWL, Collins PL, McCune CA. Molecular targets in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:5504–13.
51. Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2017;377:2063–72.
52. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437–43.
53. Woolbright BL, Dorko K, Antoine DJ, Clarke JI, Gholami P, Li F, et al. Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;283:168–77.
54. Yagmur E, Trautwein C, Leers MPG, Gressner AM, Tacke F. Elevated apoptosis-associated cytokeratin 18 fragments (CK18Asp386) in serum of patients with chronic liver diseases indicate hepatic and biliary inflammation. *Clin Biochem* 2007;40:651–5.
55. Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, Stumptner C, Zatloukal K, Denk H. Mallory body formation in primary biliary cirrhosis is associated with increased amounts and abnormal phosphorylation and ubiquitination of cytokeratins. *J Hepatol* 2003;38:387–94.
56. Vliegenthart ADB, Antoine DJ, Dear JW. Target biomarker profile for the clinical management of paracetamol overdose. *Br J Clin Pharmacol* 2015;80:351–62.
57. Einarsson R, Rydlander L. Tissue polypeptide specific antigen (TPS) detects a specific epitope structure on human cytokeratin. *Anticancer Res* 1997;17:3121–4.
58. Rydlander L, Ziegler E, Bergman T, Schöberl E, Steiner G, Bergman AC, et al. Molecular characterization of a tissue-polypeptide-specific-antigen epitope and its relationship to

- human cytokeratin 18. *Eur J Biochem* 1996;241:309–14.
59. Leers MP, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999;187:567–72.
60. Kramer G, Erdal H, Mertens HJMM, Nap M, Mauermann J, Steiner G, et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* 2004;64:1751–6.
61. Bodenmüller H, Ofenloch-Hähnle B, Lane EB, Dessauer A, Böttger V, Donié F. Lung cancer-associated keratin 19 fragments: development and biochemical characterisation of the new serum assay Enzymun-Test CYFRA 21-1. *Int J Biol Markers* 9:75–81.
62. Bonfrer JM, Groeneveld EM, Korse CM, van Dalen A, Oomen LC, Ivanyi D. Monoclonal antibody M3 used in tissue polypeptide-specific antigen assay for the quantification of tissue polypeptide antigen recognizes keratin 18. *Tumour Biol* 1994;15:210–22.
63. Devine PL, McGuckin MA, Quin RJ, Ward BG. Predictive value of the combination of serum markers, CA125, CASA and TPS in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1995;5:170–8.
64. Tarle M, Frković-Grazio S, Kraljić I, Kovacíc K. A more objective staging of advanced prostate cancer--routine recognition of malignant endocrine structures: the assessment of serum TPS, PSA, and NSE values. *Prostate* 1994;24:143–8.
65. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39:718–27.
66. Buccheri G, Ferrigno D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer* 2001;34 Suppl 2:S65-9.
67. Devine P, Yarker J, Fong K, McGuckin M, Scells B, Ward B, et al. Serum markers casa, cea, cyfra-21-1, msa, nse, tpa and tps in lung-cancer. *Int J Oncol* 1994;4:1129–35.
68. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004;37:529–40.
69. Glimelius B, Hoffman K, Einarsson R, Pählman L, Graf W. Monitoring palliative chemotherapy in advanced gastrointestinal cancer using serial tissue polypeptide specific antigen (TPS) measurements. *Acta Oncol* 1996;35:141–8.
70. Gonzalez-Quintela A, Mallo N, Mella C, Campos J, Perez L-F, Lopez-Rodriguez R, et al. Serum levels of cytokeratin-18 (tissue polypeptide-specific antigen) in liver diseases. *Liver Int* 2006;26:1217–24.
71. Gonzalez-Quintela A, Mallo N, Mella C, Campos J, Perez L-F, Lopez-Rodriguez R, et al. Serum levels of cytokeratin-18 (tissue polypeptide-specific antigen) in liver diseases. *Liver Int* 2006;26:1217–24.
72. Gonzalez-Quintela A, Tomé S, Fernandez-Merino C, Rey J, Meijide L, Gude F. Synergistic effect of alcohol consumption and body mass on serum concentrations of cytokeratin-18. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:2202–8.
73. Gonzalez-Quintela A, Abdulkader I, Campos J, Fernandez-Hernandez L, Lojo S. Serum levels of keratin-18 fragments [Tissue Polypeptide-Specific Antigen (TPS)] are correlated with hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *Dig Dis Sci* 2009;54:648–53.
74. Morling JR, Fallowfield JA, Williamson RM, Nee LD, Jackson AP, Glancy S, et al. Non-invasive hepatic biomarkers (ELF and CK18) in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study. *Liver Int* 2014;34:1267–77.
75. Joka D, Wahl K, Moeller S, Schlue J, Vaske B, Bahr MJ, et al. Prospective biopsy-controlled

- evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2012;55:455–64.
76. Gonzalez-Quintela A, García J, Campos J, Perez LF, Alende MR, Otero E, et al. Serum cytokeratins in alcoholic liver disease: contrasting levels of cytokeratin-18 and cytokeratin-19. *Alcohol* 2006;38:45–9.
 77. Gonzalez-Quintela A, Abdulkader I, Otero E, Freire M-A, Tomé S. Relationship between serum concentrations of keratin-18 and apoptosis in chronic hepatitis C. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:897–9.
 78. Parfieniuk-Kowerda A, Lapinski TW, Rogalska-Plonska M, Swiderska M, Panasiuk A, Jaroszewicz J, et al. Serum cytochrome c and m30-neoepitope of cytokeratin-18 in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2014;34:544–50.
 79. Jazwinski AB, Thompson AJ, Clark PJ, Naggie S, Tillmann HL, Patel K. Elevated serum CK18 levels in chronic hepatitis C patients are associated with advanced fibrosis but not steatosis. *J Viral Hepat* 2012;19:278–82.
 80. Valva P, De Matteo E, Galoppo MC, Gismondi MI, Preciado M V. Apoptosis markers related to pathogenesis of pediatric chronic hepatitis C virus infection: M30 mirrors the severity of steatosis. *J Med Virol* 2010;82:949–57.
 81. Caviglia GP, Ciancio A, Rosso C, Abate ML, Olivero A, Pellicano R, et al. Non-invasive methods for the assessment of hepatic fibrosis: transient elastography, hyaluronic acid, 13C-aminopyrine breath test and cytokeratin 18 fragment. *Ann Hepatol*;13:91–7.
 82. Rohrbach J, Stickel F, Schmid P, Thormann W, Kovari H, Scherrer A, et al. Changes in biomarkers of liver disease during successful combination antiretroviral therapy in HIV/HCV-coinfected individuals. *Antivir Ther* 2013;19:149–59.
 83. Abdel Haleem H, Zayed N, Abdel Hafez H, Fouad A, Akl M, Hassan M, et al. Evaluation of the diagnostic value of serum and tissue apoptotic cytokeratin-18 in patients with chronic hepatitis C. *Arab J Gastroenterol* 2013;14:68–72.
 84. Papatheodoridis G V., Hadziyannis E, Tsochatzis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, et al. Serum apoptotic caspase activity in chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:e87–95.
 85. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgöz S, Keskin M, Kiyici M, et al. Elevated serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) in patients with nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 2009;15:CR189-93.
 86. Volkmann X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, et al. Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006;43:1311–6.
 87. Sgier C, Müllhaupt B, Gerlach T, Moradpour D, Negro F, Malé PJ, et al. Effect of antiviral therapy on circulating cytokeratin-18 fragments in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2010;17:845–50.
 88. Bae CB, Kim SS, Ahn SJ, Cho HJ, Kim SR, Park SY, et al. Caspase-cleaved fragments of cytokeratin-18 as a marker of inflammatory activity in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2013;58:641–6.
 89. Eren F, Yilmaz Y, Kose S, Ozdemir FT, Yonal O, Kurt R, et al. Caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 in patients with chronic hepatitis B. *Clin Chim Acta* 2010;411:2029–32.
 90. Papatheodoridis G V, Hadziyannis E, Tsochatzis E, Chrysanthos N, Georgiou A, Kafiri G, et al. Serum apoptotic caspase activity as a marker of severity in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Gut* 2008;57:500–6.

91. Zheng S-J, Liu S, Liu M, McCrae MA, Li J-F, Han Y-P, et al. Prognostic value of M30/M65 for outcome of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *World J Gastroenterol* 2014;20:2403–11.
92. Cao W, Zhao C, Shen C, Wang Y. Cytokeratin 18, alanine aminotransferase, platelets and triglycerides predict the presence of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 2013;8:e82092.
93. Sumer S, Aktug Demir N, Kölgelir S, Cagkan Inkaya A, Arpacı A, Saltuk Demir L, et al. The clinical significance of serum apoptotic cytokeratin 18 neoepitope M30 (CK-18 M30) and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) levels in chronic hepatitis B patients with cirrhosis. *Hepat Mon* 2013;13:e10106.
94. González-Quintela A, Mella C, Pérez LF, Abdulkader I, Caparrini AM, Lojo S. Increased serum tissue polypeptide specific antigen (TPS) in alcoholics: a possible marker of alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1222–6.
95. Mueller S, Nahon P, Rausch V, Peccerella T, Silva I, Yagmur E, et al. Caspase-cleaved keratin-18 fragments increase during alcohol withdrawal and predict liver-related death in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2017;66:96–107.
96. Gonzalez-Quintela A, Mella C, Abdulkader I, Perez LF, Campos J, Otero E, et al. Serum levels of tissue polypeptide specific antigen are correlated with hepatocyte cytokeratin expression in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1413–8.
97. Woolbright BL, Bridges BW, Dunn W, Olson JC, Weinman SA, Jaeschke H. Cell death and prognosis of mortality in alcoholic hepatitis patients using plasma keratin-18. *Gene Expr* 2017;17:301–12.
98. Bissonnette J, Altamirano J, Devue C, Roux O, Payancé A, Lebrec D, et al. A prospective study of the utility of plasma biomarkers to diagnose alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 2017;66:555–63.
99. Bantel H, Ruck P, Schulze-Osthoff K. In situ monitoring of caspase activation in hepatobiliary diseases. *Cell Death Differ* 2000;7:504–5.
100. Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, Saint-Paul M-C, Rousseau D, Anty R, et al. Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. Ko B, editor. *PLoS One* 2011;6:e17599.
101. Schlossberger V, Worni M, Kihm C, Montani M, Datz C, Hampe J, et al. Plasma levels of K18 fragments do not correlate with alcoholic liver fibrosis. *Gut Liver* 2019;13:77-82.
102. Vatsalya V, Cave MC, Kong M, Gobejishvili L, Falkner KC, Craycroft J, et al. Keratin 18 is a diagnostic and prognostic factor for acute alcoholic hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18:2046-54.
103. Gonzalez-Quintela A, García J, Campos J, Perez LF, Alende MR, Otero E, et al. Serum cytokeratins in alcoholic liver disease: contrasting levels of cytokeratin-18 and cytokeratin-19. *Alcohol* 2006;38:45–9.
104. Bantel H, John K, Schulze-Osthoff K. Robust detection of liver steatosis and staging of NAFLD by an improved ELISA for serum cytokeratin-18 fragments. *Am J Gastroenterol* 2014;109:140–1.
105. Chan W-K, Sthaneshwar P, Nik Mustapha NR, Mahadeva S. Limited utility of plasma M30 in discriminating non-alcoholic steatohepatitis from steatosis--a comparison with routine biochemical markers. *PLoS One* 2014;9:e105903.
106. Miyasato M, Murase-Mishiba Y, Bessho M, Miyawaki M, Imbe H, Tsutsumi C, et al. The cytokeratin-18 fragment level as a biomarker of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2014;433:184–9.

107. Tabuchi M, Tomioka K, Kawakami T, Murakami Y, Hiramatsu M, Itoshima T, et al. Serum cytokeratin 18 M30 antigen level and its correlation with nutritional parameters in middle-aged Japanese males with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2010;56:271–8.
108. Wu G, Li H, Fang Q, Zhang J, Zhang M, Zhang L, et al. Complementary role of fibroblast growth factor 21 and cytokeratin 18 in monitoring the different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 2017;7:5095.
109. Darweesh SK, Abdelaziz RA, Abd-Elfatah DS, Abdelazim NA, Fathi SA, Attia D, et al. Serum cytokeratin-18 and its relation to liver fibrosis and steatosis diagnosed by FibroScan and controlled attenuation parameter in nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2019;31:633–41.
110. Chang YH, Lin HC, Hwu DW, Chang DM, Lin KC, Lee YJ. Elevated serum cytokeratin-18 concentration in patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Clin Biochem* 2019;56:141–7.
111. Fitzpatrick E, Mitry RR, Quaglia A, Hussain MJ, DeBruyne R, Dhawan A. Serum levels of CK18 M30 and leptin are useful predictors of steatohepatitis and fibrosis in paediatric NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nut.* 2010;51:500–6.
112. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu Y-C, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* 2009;50:1072–8.
113. Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, Hazen SL, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1249–54.
114. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Cassader M. Noninvasive assessment of liver disease severity with liver fat score and CK-18 in NAFLD: prognostic value of liver fat equation goes beyond hepatic fat estimation. *Hepatology* 2010;51:715–7.
115. Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2014;60:167–74.
116. Pirvulescu I, Gheorghe L, Csiki I, Becheanu G, Dumbravă M, Fica S, et al. Noninvasive clinical model for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in overweight and morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. *Chirurgia (Bucur)* 107:772–9.
117. Malik R, Chang M, Bhaskar K, Nasser I, Curry M, Schuppan D, et al. The clinical utility of biomarkers and the nonalcoholic steatohepatitis CRN liver biopsy scoring system in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:564–8.
118. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M, et al. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:837–44.
119. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, Bonnafous S, Lavallard VJ, Senni-Buratti M, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:1315–22.
120. Yilmaz Y, Eren F. Identification of a support vector machine-based biomarker panel with high sensitivity and specificity for nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2012;414:154–7.
121. Younossi ZM, Page S, Rafiq N, Bireerdinc A, Stepanova M, Hossain N, et al. A Biomarker Panel for Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) and NASH-Related Fibrosis. *Obes Surg* 2011;21:431–9.

122. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:27–33.
123. Tamimi TIA-R, Elgouhari HM, Alkhouri N, Yerian LM, Berk MP, Lopez R, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 2011;54:1224–9.
124. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, et al. A Novel Diagnostic Biomarker Panel for Obesity-related Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 2008;18:1430–7.
125. Hasegawa Y, Kim SR, Hatae T, Ohta M, Fujinami A, Sugimoto K, et al. Usefulness of cytokeratin-18M65 in diagnosing non-alcoholic steatohepatitis in Japanese population. *Dig Dis* 2015;33:715–20.
126. Kobayashi N, Kumada T, Toyoda H, Tada T, Ito T, Kage M, et al. Ability of cytokeratin-18 fragments and FIB-4 index to diagnose overall and mild fibrosis nonalcoholic steatohepatitis in Japanese nonalcoholic fatty liver disease patients. *Dig Dis* 2017;35:521–30.
127. Arab JP, Hernández-Rocha C, Morales C, Vargas JI, Solís N, Pizarro M, et al. Serum cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive marker of nonalcoholic steatohepatitis in the Chilean population. *Gastroenterol Hepatol* 2017;40:388–94.
128. Feldstein AE, Alkhouri N, De Vito R, Alisi A, Lopez R, Nobili V. Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1526–31.
129. Grigorescu M, Crisan D, Radu C, Grigorescu MD, Sparchez Z, Serban A. A novel pathophysiological-based panel of biomarkers for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:347–53.
130. Kim YS, Jung ES, Hur W, Bae SH, Choi JY, Song MJ, et al. Noninvasive predictors of nonalcoholic steatohepatitis in Korean patients with histologically proven nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol* 2013;19:120.
131. Tarantino G, Conca P, Coppola A, Vecchione R, Di Minno G. Serum concentrations of the tissue polypeptide specific antigen in patients suffering from non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest* 2007;37:48–53.
132. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011;43:617–49.
133. He L, Deng L, Zhang Q, Guo J, Zhou J, Song W, et al. Diagnostic value of CK-18, FGF-21, and related biomarker panel in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int* 2017;2017:9729107.
134. Chen J, Zhu Y, Zheng Q, Jiang J. Serum cytokeratin-18 in the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis: A meta-analysis. *Hepatol Res* 2014;44:854–62.
135. Wong VW-S, Vergniol J, Wong GL-H, Foucher J, Chan HL-Y, Le Bail B, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:454–62.
136. Shen J, Chan HL-Y, Wong GL-H, Chan AW-H, Choi PC-L, Chan H-Y, et al. Assessment of non-alcoholic fatty liver disease using serum total cell death and apoptosis markers. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:1057–66.
137. Benmassaoud A, Ghali P, Cox J, Wong P, Szabo J, Deschenes M, et al. Screening for nonalcoholic steatohepatitis by using cytokeratin 18 and transient elastography in HIV mono-infection. *PLoS One* 2018;13:e0191985.

138. Yang M, Xu D, Liu Y, Guo X, Li W, Guo C, et al. Combined Serum Biomarkers in Non-Invasive Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 2015;10:e0131664.
139. Tsutsui M, Tanaka N, Kawakubo M, Sheena Y, Horiuchi A, Komatsu M, et al. Serum fragmented cytokeratin 18 levels reflect the histologic activity score of nonalcoholic fatty liver disease more accurately than serum alanine aminotransferase levels. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:440-7.
140. Lebensztejn DM, Wierzbicka A, Socha P, Pronicki M, Skiba E, Werpachowska I, et al. Cytokeratin-18 and hyaluronic acid levels predict liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol* 2011;58:563–6.
141. Shen J, Chan HL-Y, Wong GL-H, Choi PC-L, Chan AW-H, Chan H-Y, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol* 2012;56:1363–70.
142. Valva P, De Matteo E, Galoppo M, Pedreira A, Giacove G, Lezama C, et al. Apoptosis markers in liver biopsy of nonalcoholic steatohepatitis in pediatric patients. *Hum Pathol* 2008;39:1816–22.
143. Huang J-F, Yeh M-L, Huang C-F, Huang C-I, Tsai P-C, Tai C-M, et al. Cytokeratin-18 and uric acid predicts disease severity in Taiwanese nonalcoholic steatohepatitis patients. *PLoS One* 2017;12:e0174394.
144. Mandelia C, Collyer E, Mansoor S, Lopez R, Lappe S, Nobili V, et al. Plasma cytokeratin-18 level as a novel biomarker for liver fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;63:181–7.
145. Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, Urata N, Oka T, Goto D, et al. Correlation between serum cytokeratin-18 and the progression or regression of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2015;14:837–44.
146. Vos MB, Barve S, Joshi-Barve S, Carew JD, Whittington PF, McClain CJ. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47:481–5.
147. Tarantino G, Mazzarella C, Tarantino M, Di Minno MND, Conca P. Could high levels of tissue polypeptide specific antigen, a marker of apoptosis detected in nonalcoholic steatohepatitis, improve after weight loss? *Dis Markers* 2009;26:55–63.
148. Fealy CE, Haus JM, Solomon TPJ, Pagadala M, Flask CA, McCullough AJ, et al. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Appl Physiol* 2012;113:1–6.
149. Safarian M, Mohammadpour S, Shafiee M, Ganji A, Soleimani A, Nematy M, et al. Effect of diet-induced weight loss on cytokeratin-18 levels in overweight and obese patients with liver fibrosis. *Diabetes Metab Syndr* 13:989–94.
150. Vuppalanchi R, Jain AK, Deppe R, Yates K, Comerford M, Masuoka HC, et al. Relationship between changes in serum levels of keratin 18 and changes in liver histology in children and adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:2121-30.e1-2.
151. Liang J, Liu F, Wang F, Han T, Jing L, Ma Z, et al. A noninvasive score model for prediction of NASH in patients with chronic hepatitis B and nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed Res Int* 2017;2017:8793278.
152. Sekiguchi T, Umemura T, Fujimori N, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, et al. Serum cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and poor prognosis in primary biliary cirrhosis. *PLoS One* 2015;10:e0131658.
153. Denk G, Omary A-J, Reiter FP, Hohenester S, Wimmer R, Holdenrieder S, et al. Soluble intracellular adhesion molecule, M30 and M65 as serum markers of disease activity and

- prognosis in cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2014;44:1286–98.
154. Simopoulos C, Tsaroucha AK, Asimakopoulos B, Giatromanolaki A, Gavriilidis P, Polychronidis A, et al. Total and caspase-cleaved cytokeratin 18 in chronic cholecystitis: A prospective study. *BMC Gastroenterol* 2008;8:14.
 155. Brenner T, Rosenhagen C, Brandt H, Schmitt FCF, Jung GE, Schemmer P, et al. Cell death biomarkers as early predictors for hepatic dysfunction in patients after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2012;94:185–91.
 156. Ulukaya S, Ulukaya E, Alper I, Yilmaztepe-Oral A, Kilic M. Soluble cytokeratin 18 biomarkers may provide information on the type of cell death during early ischemia and reperfusion periods of liver transplantation. *Clin Transplant*;24:848–54.
 157. Bechmann LP, Jochum C, Kocabayoglu P, Sowa J-P, Kassalik M, Gieseler RK, et al. Cytokeratin 18-based modification of the MELD score improves prediction of spontaneous survival after acute liver injury. *J Hepatol* 2010;53:639–47.
 158. Volkman X, Anstaett M, Hadem J, Stiefel P, Bahr MJ, Lehner F, et al. Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology* 2008;47:1624–33.
 159. Wang MC, Wandrer F, Schlué J, Voigtländer T, Lankisch TO, Manns MP, et al. Transjugular diagnostics in acute liver failure including measurements of hepatocentral venous biomarker gradients. *Hepatology* 2018;48:914-25.
 160. Rutherford AE, Hynan LS, Borges CBS, Forcione DG, Blackard JT, Lin W, et al. Serum apoptosis markers in acute liver failure: A pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1477–83.
 161. Adebayo D, Morabito V, Andreola F, Pieri G, Luong T-V, Dhillon A, et al. Mechanism of cell death in acute-on-chronic liver failure: a clinico-pathologic-biomarker study. *Liver Int* 2015;35:2564–74.
 162. Bechmann LP, Marquitan G, Jochum C, Saner F, Gerken G, Canbay A. Apoptosis versus necrosis rate as a predictor in acute liver failure following acetaminophen intoxication compared with acute-on-chronic liver failure. *Liver Int* 2008;28:713-6.
 163. Craig DGN, Lee P, Pryde EA, Masterton GS, Hayes PC, Simpson KJ. Circulating apoptotic and necrotic cell death markers in patients with acute liver injury. *Liver Int* 2011;31:1127–36.
 164. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J Hepatol* 2012 May;56:1070–9.
 165. Craig DGN, Lee P, Pryde EA, Masterton GS, Hayes PC, Simpson KJ. Circulating apoptotic and necrotic cell death markers in patients with acute liver injury. *Liver Int* 2011;31:1127–36.
 166. Thulin P, Nordahl G, Gry M, Yimer G, Aklillu E, Makonnen E, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int* 2014;34:367–78.
 167. Macdonald S, Andreola F, Bachtiger P, Amoros A, Pavesi M, Mookerjee R, et al. Cell death markers in patients with cirrhosis and acute decompensation. *Hepatology* 2018;67:989–1002.
 168. Derben FC, Engel B, Zachou K, Hartl J, Hartleben B, Bantel H, et al. CK-18 cell death markers improve the prediction of histological remission in autoimmune hepatitis during biochemical remission. *Liver Int* 2020 (en prensa).
 169. Lorente L, Martín MM, González-Rivero AF, Ferreres J, Solé-Violán J, Labarta L, et al. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 and mortality are associated in severe septic patients: Pilot study. *PLoS One* 2014;9:e109618.
 170. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, López RO, Ferreres J, Solé-Violán J, et al. Higher serum

- caspase-cleaved cytokeratin-18 levels during the first week of sepsis diagnosis in non-survivor patients. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1621-9.
171. Hofer S, Brenner T, Bopp C, Steppan J, Lichtenstern C, Weitz J, et al. Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. *Crit Care* 2009;13:R93.
 172. Roth GA, Krenn C, Brunner M, Moser B, Ploder M, Spittler A, et al. Elevated serum levels of epithelial cell apoptosis-specific cytokeratin 18 neoepitope m30 in critically ill patients. *Shock* 2004;22:218-20.
 173. Weemhoff JL, Woolbright BL, Jenkins RE, McGill MR, Sharpe MR, Olson JC, et al. Plasma biomarkers to study mechanisms of liver injury in patients with hypoxic hepatitis. *Liver Int* 2017;37:377-84.
 174. Luft T, Conzelmann M, Benner A, Rieger M, Hess M, Strohmaecker U, et al. Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110:4535-42.
 175. Waterhouse M, Samek E, Torres M, Bertz H, Finke J. Diagnostic utility of a soluble cytokeratin 18 assay for gastrointestinal graft-vs.-host disease detection. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1695-7.
 176. Hepatitis C [Internet]. [cited 2019 Jan 17]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
 177. Estirado Gómez A, Justo Gil S, Limia Sánchez A, Rodríguez Cobo I, Arce Arnáez A, del Amo Valero J. Prevalencia de la infección por hepatitis C en España 2017-2018 [Internet]. [cited 2020 Nov 20]. Available from: https://www.msrebs.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/docs/INFORME_INFECION_VHC_ESPANA2019.pdf.
 178. Ferenci P, Bernstein D, Lalezari J, Cohen D, Luo Y, Cooper C, et al. ABT-450/r-Ombitasvir and dasabuvir with or without ribavirin for HCV. *N Engl J Med* 2014;370:1983-92.
 179. Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, Puoti M, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014;370:1889-98.
 180. Zeuzem S, Dusheiko GM, Salupere R, Mangia A, Flisiak R, Hyland RH, et al. Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3. *N Engl J Med* 2014;370:1993-2001.
 181. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014;370:211-21.
 182. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* 2014;384:1756-65.
 183. Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, Radu M, Rafalsky V V, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014;384:403-13.
 184. Iacob S, Cerban R, Pietrareanu C, Ester C, Iacob R, Gheorghe C, et al. 100% sustained virological response and fibrosis improvement in real-life use of direct acting antivirals in genotype-1b recurrent hepatitis C following liver transplantation. *J Gastrointest Liver Dis* 2018;27:139-44.
 185. Dolmazashvili E, Abutidze A, Chkhartishvili N, Karchava M, Sharvadze L, Tsertsvadze T. Regression of liver fibrosis over a 24-week period after completing direct-acting antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C receiving care within the national hepatitis C

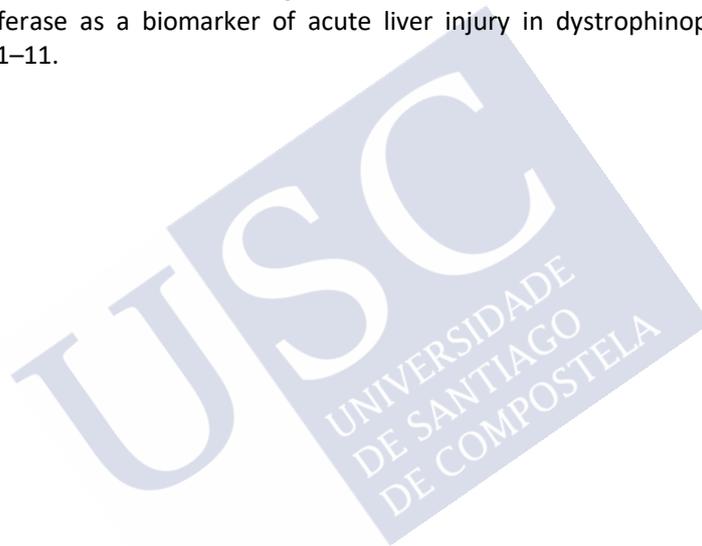
- elimination program in Georgia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2017;29:1223–30.
186. Knop V, Hoppe D, Welzel T, Vermehren J, Herrmann E, Vermehren A, et al. Regression of fibrosis and portal hypertension in HCV-associated cirrhosis and sustained virologic response after interferon-free antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2016;23:994–1002.
187. Mauro E, Crespo G, Montironi C, Londoño M-C, Hernández-Gea V, Ruiz P, et al. Portal pressure and liver stiffness measurements in the prediction of fibrosis regression after sustained virological response in recurrent hepatitis C. *Hepatology* 2018;67:1683–94.
188. Kobayashi N, Iijima H, Tada T, Kumada T, Yoshida M, Aoki T, et al. Changes in liver stiffness and steatosis among patients with hepatitis C virus infection who received direct-acting antiviral therapy and achieved sustained virological response. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018;30:546–51.
189. Martini S, Sacco M, Strona S, Arese D, Tandoi F, Dell'Olio D, et al. Impact of viral eradication with sofosbuvir-based therapy on the outcome of post-transplant hepatitis C with severe fibrosis. *Liver Int* 2017;37:62–70.
190. Friedrich-Rust M, Ong M, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, et al. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. *Gastroenterology* 2008;134:960–974.
191. Wai C, 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.
192. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007;46:32–6.
193. Jazwinski AB, Thompson AJ, Clark PJ, Naggie S, Tillmann HL, Patel K. Elevated serum CK18 levels in chronic hepatitis C patients are associated with advanced fibrosis but not steatosis. *J Viral Hepat* 2012;19:278–82.
194. Mehal W, Imaeda A. Cell death and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2010;30:226–31.
195. Fuster D, Samet JH. Alcohol use in patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 2018;379:1251–61.
196. McClain C, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:205–19.
197. Campos J, Gonzalez-Quintela A, Quinteiro C, Gude F, Perez L-F, Torre J-A, et al. The -159C/T polymorphism in the promoter region of the CD14 gene is associated with advanced liver disease and higher serum levels of acute-phase proteins in heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1206–13.
198. Gonzalez-Quintela A, Tomás S, Fernandez-Merino C, Rey J, Meijide L, Gude F. Synergistic effect of alcohol consumption and body mass on serum concentrations of cytokeratin-18. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:2202–8.
199. Gual A, Martos AR, Lligona A, Llopis JJ. Does the concept of a standard drink apply to viticultural societies? *Alcohol* 1999;34:153–60.
200. Gonzalez-Quintela A, Campos J, Loidi L, Quinteiro C, Perez L-F, Gude F. Serum TNF- α levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms. *Alcohol* 2008;42:513–8.
201. Gonzalez-Quintela A, Campos J, Gude F, Perez L-F, Tomás S. Serum concentrations of interleukin-8 in relation to different levels of alcohol consumption. *Cytokine* 2007;38:54–60.
202. Campos J, Gude F, Quinteiro C, Vidal C, Gonzalez-Quintela A. Gene by Environment

- Interaction: The -159C/T polymorphism in the promoter region of the CD14 gene modifies the effect of alcohol consumption on serum IgE levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:7–14.
203. Nicolaou C, Chatzipanagiotou S, Tzivos D, Tzavellas EO, Boufidou F, Liappas IA. Serum cytokine concentrations in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Alcohol* 2004;32:243–7.
204. Latvala J, Hietala J, Koivisto H, Järvi K, Anttila P, Niemelä O. Immune responses to ethanol metabolites and cytokine profiles differentiate alcoholics with or without liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1303–10.
205. Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1993;18:576–80.
206. Sheron N, Bird G, Koskinas J, Portmann B, Ceska M, Lindley I, et al. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* 1993;18:41–6.
207. González-Quintela A, Dominguez-Santalla M., Pérez L., Vidal C, Lojo S, Barrio E. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12. *Cytokine* 2000;12:1437–40.
208. González-Quintela A, Dominguez-Santalla M-J, Loidi L, Quinteiro C, Perez LF. Relation of tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphisms with serum concentrations and in vitro production of TNF-alpha and interleukin-8 in heavy drinkers. *Alcohol* 2004;34:273–7.
209. Gonzalez-Quintela A, Campos J, Loidi L, Quinteiro C, Perez L-F, Gude F. Serum TNF- α levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms. *Alcohol* 2008;42:513–8.
210. Daniluk J, Szuster-Ciesielska A, Drabko J, Kandefer-Szerszeń M. Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. *Alcohol* 2001;23:29–34.
211. Spahr L, Giostra E, Frossard J-L, Bresson-Hadni S, Rubbia-Brandt L, Hadengue A. Soluble TNF-R1, but not tumor necrosis factor alpha, predicts the 3-month mortality in patients with alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2004;41:229–34.
212. Bird GLA, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ, Williams RS. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 1990;112:917-20.
213. Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA, et al. Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14:255–9.
214. Rodríguez-Rodríguez E, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Milena-Abril A, Rodríguez-Moreno F, Oramas-Rodríguez J, et al. Cytokine levels in acute alcoholic hepatitis: a sequential study. *Drug Alcohol Depend* 1995;39:23–7.
215. Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, Hodges SJ, Williams R, Jalan R. Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 2003;52:1182–7.
216. Tilg H, Jalan R, Kaser A, Davies NA, Offner FA, Hodges SJ, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003;38:419–25.
217. Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard J-L, Giostra E, Rougemont A-L, Pugin J, et al. Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study. *J Hepatol* 2002;37:448–55.
218. Menon KVN, Stadheim L, Kamath PS, Wiesner RH, Gores GJ, Peine CJ, et al. A pilot study of the safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:255–60.

219. Sharma P, Kumar A, Sharma BC, Sarin SK. Infliximab monotherapy for severe alcoholic hepatitis and predictors of survival: An open label trial. *J Hepatol* 2009;50:584–91.
220. Boetticher NC, Peine CJ, Kwo P, Abrams GA, Patel T, Aqel B, et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of etanercept in the treatment of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:1953–60.
221. Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GL-H, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:461–78.
222. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011;43:617–49.
223. Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2014;60:167–74.
224. Kwok R, Tse Y-K, Wong GL-H, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease—the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther* 2014 ;39:254–69.
225. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014;28:607–18.
226. Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: Present and future. *Hepatology* 2007;46:582–9.
227. Amacher DE. Progress in the search for circulating biomarkers of nonalcoholic fatty liver disease. *Biomarkers* 2014;19:541–52.
228. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008;134:1641–54.
229. Valva P, Rios D, Casciato P, Gadano A, Galdame O, Mullen E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018;30:637-44.
230. Beuers U, Gershwin ME, Gish RG, Invernizzi P, Jones DEJ, Lindor K, et al. Changing nomenclature for PBC: From “Cirrhosis” to “Cholangitis.” *Am J Gastroenterol* 2015;110:1536–8.
231. Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa N V., Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:291–308.
232. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929–38.
233. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169–76.
234. Martin DM, Vroon DH, Nasrallah SM. Value of serum immunoglobulins in the diagnosis of liver disease. *Liver* 1984; 4:214–8.
235. Gonzalez RS, Washington K. Primary biliary cholangitis and autoimmune hepatitis. *Surg Pathol Clin* 2018;11:329–49.
236. To U, Silveira M. Overlap syndrome of autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis. *Clin Liver Dis* 2018;22:603–11.
237. Vierling JM. Autoimmune hepatitis and overlap syndromes: Diagnosis and management. *Clin*

- Gastroenterol Hepatol 2015;13:2088–108.
238. Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, Lohse AW, Manns MP, Schrupf E. Overlap syndromes: The International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol* 2011;54:374–85.
 239. Kuiper EMM, Zondervan PE, van Buuren HR. Paris Criteria are effective in diagnosis of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:530–4.
 240. Dopazo C, Bilbao I, Castells LL, Sapisochin G, Moreiras C, Campos-Varela I, et al. Analysis of adult 20-year survivors after liver transplantation. *Hepatol Int* 2015;9:461–70.
 241. Barber K, Blackwell J, Collett D, Neuberger J, UK Transplant Liver Advisory Group. Life expectancy of adult liver allograft recipients in the UK. *Gut* 2007;56:279–82.
 242. Xu W-H, Ye Q-F, Xia S-S. Apoptosis and proliferation of intrahepatic bile duct after ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:428–32.
 243. Abela CB, Homer-Vanniasinkham S. Clinical implications of ischaemia-reperfusion injury. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol* 2003;9:229–40.
 244. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2008;147:153–9.
 245. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160–6.
 246. Georgiev P, Dahm F, Graf R, Clavien P-A. Blocking the path to death: anti-apoptotic molecules in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Curr Pharm Des* 2006;12:2911–21.
 247. Lim EJ, Chin R, Nachbur U, Silke J, Jia Z, Angus PW, et al. Effect of immunosuppressive agents on hepatocyte apoptosis post-liver transplantation. *PLoS One* 2015;10:e0138522.
 248. Gonzalez-Quintela A, Abdulkader I, Campos J, Fernandez-Hernandez L, Lojo S. Serum levels of keratin-18 fragments [tissue polypeptide-specific antigen (TPS)] are correlated with hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *Dig Dis Sci* 2009;54:648–53.
 249. Brenner T, Bruckner T, Weigand MA, Hofer S. Total keratin 18 measurements in patients following orthotopic liver transplantation: what is the most suitable diagnostic assay? *Cell Death Dis* 2013;4:e836.
 250. Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005;5:269–87.
 251. Gonzalez-Quintela A, Lojo S, Otero E, Perez LF. Keratin-18 as a marker of steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:545.
 252. Liu Z, Que S, Xu J, Peng T. Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: A review. *Int J Med Sci* 2014;11:925–35.
 253. Weibrecht K, Dayno M, Darling C, Bird SB. Liver aminotransferases are elevated with rhabdomyolysis in the absence of significant liver injury. *J Med Toxicol* 2010;6:294–300.
 254. Edge K, Chinoy H, Cooper RG. Serum alanine aminotransferase elevations correlate with serum creatine phosphokinase levels in myositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:487–8.
 255. Kalafateli M, Triantos C, Tsamandas A, Kounadis G, Labropoulou-Karatzas C. Abnormal liver function tests in a patient with myotonic dystrophy type 1. *Ann Hepatol* 11:130–3.
 256. Wright MA, Yang ML, Parsons JA, Westfall JM, Yee AS. Consider muscle disease in children with elevated transaminase. *J Am Board Fam Med* 2012;25:536–40.
 257. Balaji P, Sankaranarayanan S, Venkataraman V, Sankaranarayanan VS. Incidentally detected

- elevated liver enzymes: from liver to muscle. *Indian Pediatr* 2017;54:331–2.
258. Kamath BM, Dhawan A, Mieli-Vergani G. Raised serum transaminases: not always liver disease. *Arch Dis Child* 2000;82:270–1.
259. Korones DN, Brown MR, Palis J. "Liver function tests" are not always tests of liver function. *Am J Hematol* 2001;66:46–8.
260. Helfgott SM, Karlson E, Beckman E. Misinterpretation of serum transaminase elevation in "occult" myositis. *Am J Med* 1993;95:447–9.
261. Fallon KE, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med* 1999;33:264–9.
262. Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 2005;41:380–2.
263. Akmal M, Massry SG. Reversible hepatic dysfunction associated with rhabdomyolysis. *Am J Nephrol* 1990;10:49–52.
264. Wang L, Chen M, Xu M, Li J, Feng P, He R, et al. Ratio of creatine kinase to alanine aminotransferase as a biomarker of acute liver injury in dystrophinopathy. *Dis Markers* 2018;2018:1–11.





Anexos

Anexo I - Listado de abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferasa
APRI	<i>AST-to-Platelets Ratio Index</i>
AST	Aspartato aminotransferasa
CBP	Colangitis biliar primaria
CPK	<i>Creatin-phosphokinase</i>
CYFRA 21-1	<i>CYtokeratin FRAGment 21-1</i> (queratina-19)
FA	Fosfatasa alcalina
FIB-4	Índice FIBrosis con 4 elementos
GGT	Gamma-glutamil transferasa
IMC	Índice de masa corporal
K	Queratina (keratina)
LDH	Lactato-deshidrogenasa
LR+	<i>Positive likelihood Ratio</i> (razón de verosimilitud positiva)
LPB	<i>Lipopolysaccharide-binding lipoprotein</i>
M	Mujer
M3	Anticuerpo monoclonal que detecta el epítipo (residuos 322-340) utilizado en la detección de K18 en el método comercial TPS (<i>Tissue Polypeptide Specific antigen</i>)
M30	Anticuerpo monoclonal que detecta el neoantígeno (Asp-396*) en la queratina 18 formado durante su escisión por la vía de las caspasas
M65	Anticuerpo monoclonal que detecta el epítipo (residuos 300-380) utilizado en la detección de K18
NAFLD	Enfermedad por hígado graso no alcohólica
NAS	Esteatosis hepática simple
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
TPS	<i>Tissue Polypeptide Specific Antigen</i>
TRAIL-R	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
RIC	Rango intercuartílico (percentiles 25-75)
ROC (curva)	<i>Receiver-operating characteristics</i>
STROBE	<i>Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology (Initiative for)</i>
VHB	Virus de la Hepatitis B
V	Varón
VHC	Virus de la Hepatitis C
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

Anexo II – Autorizaciones del Comité de Ética



Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Telf.: 981 54 28 12 - Fax: 981 54 18 04
www.sergas.es

Comité Ético de Investigación Clínica
Telf. (981) 54 64 25 — Fax (981) 54 18 04
E-mail: ceic@sergas.es

Informe del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

Dña. Margarita Tasende Souto, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado en su reunión del 28 de abril de 2005 la propuesta de Arturo González Quintela para que se realice el estudio titulado “*Niveles de TPS (antígeno polipeptídico tisular específico) en pacientes con hepatopatía alcohólica. Comparación con otras hepatopatías y con neoplasias epiteliales. Relación con la alteración en los niveles de otras citoqueratinas*”, con nuestro número de registro: **2005/079**, y considera que:

Se cumplen los requisitos éticos aplicables a este tipo de estudios, están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

Y que este Comité acepta, de conformidad con sus Procedimientos Normalizados de Trabajo, que dicho estudio sea realizado en el Centro/s C.H. Universitario de Santiago por Arturo González Quintela como investigador/es principal/es.

Lo que firmo en Santiago de Compostela a 29 de abril de 2005.

Firmado:

 Margarita Tasende Souto

NOTA genérica: Debido a las connotaciones éticas y la especial naturaleza del consentimiento informado, es exigible que, con anterioridad al reclutamiento de pacientes, esté disponible una versión fidedigna y redactada en gallego normativo del mismo (hojas de información y de firmas). Garantizándose así, el derecho del paciente al acceso a la información en los idiomas oficiales de Galicia y la completa comprensión del consentimiento informado.

DITAME DO COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALIZA

D. Xoán X. Casas Rodríguez , Secretario do Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 29/05/2007 o estudo:

Título: Evaluación del TPS sérico (antígeno polipeptídico tisular, queratina-18) en el diagnóstico de enfermedades hepáticas, especialmente las asociadas al consumo del alcohol

Promotor: Arturo González Quintela

Código de Rexistro CEIC de Galicia: 2007/109

Que se cumpren os requisitos éticos aplicábeis a este tipo de estudos, están xustificadas os riscos e molestias previsíbeis para o suxeito e é adecuado o procedemento para obter o consentimento informado.

E que este Comité acepta, de conformidade cos seus Procedementos Normalizados de Traballo, que o devandito estudo sexa realizado nos seguintes centros:

Centros	Investigadores principais
C.H. Universitario de Santiago	Arturo González Quintela

En Santiago de Compostela a xoves, 07 de xuño de 2007

O Secretario,



Xoán X. Casas Rodríguez

DITAME DO COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALIZA

D. Xoán X. Casas Rodríguez , Secretario do Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 30/09/2008 o estudo:

Título: Valor da queratina-18 sérica no diagnóstico diferencial das hepatopatías postrasplante hepático
Promotor: Santiago Tomé Martínez de Rituerto
Código do Promotor:
Código de Rexistro CEIC de Galicia: 2008/272

Que se cumpren os requisitos éticos aplicábeis a este tipo de estudos, están xustificadas os riscos e molestias previsíbeis para o suxeito e é adecuado o procedemento para obter o consentimento informado.

E que este Comité acepta, de conformidade cos seus Procedementos Normalizados de Traballo, que o devandito estudo sexa realizado nos seguintes centros:

Centros	Investigadores principais
C.H. Universitario de Santiago	Santiago Tomé Martínez de Rituerto

En Santiago de Compostela a 30 de setembro de 2008

O Secretario,



Xoán X. Casas Rodríguez



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/12/2018:

Título: Estudio descriptivo de las hepatopatías autoinmunes en el área sanitaria de Santiago. Factores diagnósticos y pronósticos

Promotor: Arturo González Quintela

Tipo de estudio: EPA SP

Código del Promotor: AGQ-EHA-2018-01

Código de Registro: 2018/506

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIm-G de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de Santiago	Arturo González Quintela



Documento firmado digitalmente por:
López Vázquez, Paula: 07/01/2019 09:26
SAOC-K4G4-BOAH-OFH6-8815-4684-9581-455

Anexo III – Publicaciones derivadas de la presente tesis

Cristina Macía-Rodríguez, Emilio Paez-Guillán, Alba García-Villafranca, Ana-Teresa Afonso, Esteban Otero, Santiago Tomé, Arturo González-Quintela. Changes in serum level of keratin-18 (TPS) in patients with chronic hepatitis C who received direct-acting antiviral therapy (Abstract). *European Journal of Case Reports in Internal Medicine* 2019; 6 (S1): 340-341.

Cristina Macía-Rodríguez, Emilio Paez-Guillán, Alba García-Villafranca, Ana-Teresa Afonso, Esteban Otero, Santiago Tomé, Arturo González-Quintela. Serum keratin-18 fragments are related to liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C (Abstract). *European Journal of Case Reports in Internal Medicine* 2019; 6 (S1): 342.

Cristina Macía, José Loureiro, Isabel Campos-Varela, Ihab Abdulkader, Esteban Otero, Evaristo Varo, Santiago Tomé, and Arturo Gonzalez-Quintela. Time-course changes of serum keratin concentrations after liver transplantation: contrasting results of keratin-18 and keratin-19 fragments. *Case Reports in Hepatology* 2020 (aceptado, en prensa).

Anexo IV – Lista de verificación STROBE

Lista de verificación para estudios observacionales STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*)

Sí/no/NA		Página
	Título y resumen	
Sí	Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio.	Pág. VII
Sí	Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado.	Pág. VII-VIII
	Introducción	
Sí	Indique el fundamento científico de la investigación que se comunica.	1-17
	Objetivos	
Sí	Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada.	18-20
	Material y métodos	
	Diseño del estudio	
Sí	Presente los elementos clave del diseño del estudio.	22, 35, 45, 53, 61
	Contexto	
Sí	Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluidos los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos.	22, 35, 45, 53, 61
	Participantes	
Sí	Para estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento.	22-23, 45-46, 61
NA	Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles.	NA
Sí	Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes.	22-23, 35-36, 45-46, 63, 61
NA	Estudios de cohortes apareados. Proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición.	NA
NA	Estudios de casos y controles apareados. Proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso.	NA
	Variables	
Sí	Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos.	23-24, 36-37, 45-46, 53, 61-62
	Fuentes de datos/medidas	
Sí	Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida).	23-24, 36-37, 45-46, 53, 61-62
Sí	Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida.	23-24, 36-37, 45-46, 53, 61-62

Sesgos		
Sí	Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo.	23-24, 36-37, 45-46, 53, 61-62, 77-78
Tamaño muestral		
Sí	Explique cómo se determinó el tamaño muestral.	24, 36, 46, 53, 61
Variables cuantitativas		
Sí	Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique cómo se categorizaron y por qué.	24, 37, 46, 53, 62, 78
Métodos estadísticos		
Sí	Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión.	24, 37, 46, 53, 62, 77-78
Sí	Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones.	24, 37, 46, 53, 62
Sí	Explique el tratamiento de los datos ausentes (<i>missing data</i>).	24, 37, 46, 53, 62
Sí	Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento.	22-23, 45-46, 61
NA	Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se aparearon casos y controles.	NA
NA	Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo.	NA
NA	Describa los análisis de sensibilidad.	NA
Resultados		
Participantes		
Sí	Número de participantes en cada fase del estudio, por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados.	23-24, 36-37, 45-46, 53, 61-62
Sí	Razones de la pérdida de participantes en cada fase.	23-24, 45-46, 61-62
NA	Considere el uso de un diagrama de flujo.	NA
Datos descriptivos		
Sí	Características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) e información sobre exposiciones y posibles factores de confusión.	23-24, 36-37, 45-46, 53, 61-62
Sí	Número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés.	24-31, 37-41, 46-48, 53-57, 62-69
Sí	Estudios de cohortes: resume el período de seguimiento (p. ej., promedio y total).	22-23, 45-46, 61
Datos de las variables de resultado		
Sí	Estudios de cohortes: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo.	24-31, 46-48, 62-69
NA	Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas-resumen de exposición.	NA
Sí	Estudios transversales: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen.	24-31, 37-41, 46-48, 53-57, 62-69

Resultados principales		
Sí	Proporcione estimaciones crudas (no ajustadas) y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos.	24-31, 37-41, 46-48, 53-57, 62-69
Sí	Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos	24-31, 37-41, 46-48, 53-57, 62-69
NA	Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante.	NA
Otros análisis		
NA	Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad).	NA
Discusión		
Resultados clave		
Sí	Resume los resultados principales de los objetivos del estudio.	79-82
Limitaciones		
Sí	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo.	77-79
Interpretación		
Sí	Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes.	77-82, 31-33, 41-43, 48-50, 56-58, 69-71
Generabilidad		
Sí	Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa).	78-79
Financiación		
Sí	Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente trabajo.	Pág. V