

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS
MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE GASTROENTEROLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
GENERAL CALIXTO GARCÍA IÑIGUEZ

**BIOPSIA HEPÁTICA: UTILIDAD DE
MÉTODOS CUALICUANTITATIVOS
EN DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO
DE LA HEPATITIS CRÓNICA VIRAL**

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

DR. BIENVENIDO GRA ORAMAS

CIUDAD DE LA HABANA
2008

Agradecimientos

A la profesora Helen Gonzalez Sjostrom, por su insistencia de 30 años, para que optara al Doctorado de Ciencias Médicas, con los resultados de mi trabajo y por el apoyo y orientación al desarrollo de esta tesis.

A los doctores Arcadio Sotto Escobar, Enrique Arús Soler, Eduardo Vilar Gómez, Enrique Galván García, Héctor Vega Sánchez, Waldo García Ferrera y José Luís López Gavilondo, por la confianza en el diagnóstico, análisis y discusión científica, de los resultados de la interpretación de las biopsias hepáticas y de la utilización de los métodos cualicuantitativos en el estudio de las biopsias de hepatitis crónicas virales, en los proyectos de investigación desarrollados en conjunto.

A Luisita y Migdalia, por el exquisito procesamiento técnico de las biopsias hepáticas, sin lo cual no hubiera sido posible este trabajo.

A Hurtado y Teresita, por sus consejos y recomendaciones.

En especial a Eduardo por su ejemplo y su apoyo en la terminación de esta tesis.

DEDICATORIA:

A Luisita, Lisbet, Lislyet, Leslie y Carolina por su cariño, compresión y ser la razón de mi vida

A mis padres, por su ejemplo.

SÍNTESIS.

Introducción: la biopsia hepática es la prueba de oro para el diagnóstico de la hepatitis crónica viral, se utilizan métodos cualicuantitativos para evaluar las alteraciones histológicas. El documento que se presenta es el resultado de varios proyectos de investigación y propone la modificación de métodos usados en la evaluación de tratamientos, al introducir nuevas variables histológicas a evaluar y utilizar los resultados del método propuesto de la primera biopsia como predictor de pronóstico **Material y Métodos:** se estudiaron 293 biopsias hepáticas de donantes asintomáticos con virus B o C positivos y 293 pares de biopsias de pacientes de hepatitis crónica B o C tratados; se realizó la comparación entre los resultados de los índices de Knodell, Ishak y el propuesto y con las cifras finales de ALAT y marcadores virales. **Resultados:** el 45% de las biopsias de donantes tenían alteraciones histológicas y el 28% fueron de hepatitis crónica. El método de Knodell no detectó cambios histológicos entre las dos biopsias en el 15% de la muestra estudiada, el de Ishak en el 11,6% y el propuesto en el 5%. La asociación entre el resultado histológico y la ALAT final fue de 58% en Knodell, en 72% en Ishak y de 84% en el método propuesto. El índice de actividad necroinflamatoria total, la necrosis periportal y la fibrosis de la primera biopsia, resultaron útiles como predictores de pronóstico en los pacientes tratados con virus B o C positivos. **Conclusiones:** La biopsia hepática es necesaria en el estudio de los donantes de sangre para categorizarlos como enfermos o no. El método propuesto tiene más precisión y certeza en la evaluación de alteraciones histológicas, una mayor asociación con los resultados enzimáticos y virológicos y es útil como predictor de pronóstico por la evaluación de la primera biopsia.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1-Objeto de la investigación.....	6
2-Problema	6
3-Hipótesis	6
4-Objetivo general	6
5-Objetivos específicos	6
CAPÍTULO 1	
UTILIDAD DE LA BIOPSIA HEPÁTICA Y SISTEMAS CUALICUANTITATIVOS EN LAS HEPATITIS CRÓNICAS VIRALES B o C.....	11
1.1- Biopsia hepática y hepatitis crónica.....	11
1.2- Hepatitis crónica:Sistemas de cuantificación.....	14
1.3- Propuesta de modificación del índice de actividad necroinflamatoria	17
1.4-Virus B de la Hepatitis.....	24
1.5-Virus C de la Hepatitis.....	26
CAPITULO DOS	
UTILIDAD DE LA BIOPSIA HEPATICA EN EL DIAGNOSTICO Y CATEGORIZACION DE DONANTES ASINTOMATICOS CON VIRUS B o C DE LA HEPATITIS.	29
2.1- Portadores de los virus B o C de la hepatitis.....	29
2.2- Objetivo general	31
2.3- Objetivos específicos	31
2.4- Material y métodos	31
2.5- Resultados	33
2.6- Conclusiones	46
CAPITULO TRES	
METODOLOGIA EMPLEADA PARA EL DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO EN EL ESTUDIO DE LA HEPATITIS CRONICA VIRAL.....	47
3.1- Introducción	47
3.2- Objetivo general	49
3.3-Objetivos específicos	
3.4- Material y métodos	50
3.5- Resultados	53
3.6- Conclusiones.....	70

CAPITULO CUATRO	
VALIDACION DEL NUEVO SISTEMA EMPLEDO (IANIT).....	71
4.1- Introducción	71
4.2- Objetivo general	72
4.3- Objetivos específicos	72
4.4- Material y métodos	72
4.5- Resultados	74
4.6- Conclusiones	82
CAPITULO CINCO	
UTILIDAD DEL MÉTODO PROPUESTO EN EL ESTUDIO DE LA PRIMERA	
BIOPSIA, COMO INDICADOR DE PRONÓSTICO.....	83
5.1- Introducción.....	83
5.2- Objetivo General.....	84
5.3- Objetivos específicos.....	84
5.4- Material y métodos.....	84
5.5- Resultados.....	85
5.6- Conclusiones.....	96
CONCLUSIONES FINALES.....	97
RECOMENDACIONES.....	98

INTRODUCCIÓN

La biopsia hepática constituye un método diagnóstico esencial en la práctica clínica. La interpretación del tejido hepático patológico ocupa un lugar central en la evaluación de los pacientes con afecciones hepáticas, por lo que se considera todavía, a pesar del avance de otras tecnologías diagnósticas, que es la prueba de oro en algunas de las enfermedades del hígado (1-4).

La variabilidad de las alteraciones histopatológicas presente en las enfermedades difusas hepáticas es escasa, lo que permite, con este tipo de biopsia, llegar a un diagnóstico adecuado; ya que generalmente las muestras obtenidas tienen 15 mm de longitud o más y de 4 a 6 espacios porta, lo que ha sido reportado en numerosas publicaciones que reconocen su valor diagnóstico (5-9).

El estudio de las alteraciones histopatológicas permite efectuar o confirmar un diagnóstico, evaluar un pronóstico y seguir los efectos de una terapéutica mediante biopsias repetidas; sin embargo, es necesario por el médico de asistencia complementarla con una información clínica y bioquímica pormenorizada, lograr que la muestra de tejido sea suficiente, esté bien conservada y que se tengan los conocimientos necesarios para la interpretación del informe del patólogo (10).

El patólogo requiere calidad de la técnica anatomo-patológica, análisis y síntesis de las lesiones histopatológicas para el diagnóstico de la biopsia y realizar la correlación anatomo-clínica de las biopsias diagnosticadas. Es

esencial realizar el estudio histológico sin conocer antes los datos clínicos y bioquímicos del enfermo para tener una apreciación histopatológica de cada biopsia sin estar prejuiciado por estas informaciones.

Las enfermedades crónicas del hígado o hepatopatías crónicas requieren la realización de biopsia hepática para un correcto diagnóstico; así la misma constituye el método diagnóstico esencial de la hepatitis crónicas, y a pesar del desarrollo de técnicas de imagenología y biología molecular, no se puede diagnosticar una hepatitis crónica sino es mediante la biopsia hepática (11-13). No solamente su utilidad es para establecer un diagnóstico, sino también para la determinación del grado de actividad necroinflamatoria de la enfermedad o estadiamiento de la fibrosis, para la evaluación de un tratamiento y por último para la detección o exclusión de otras lesiones (14-18).

Las principales lesiones histológicas que se observan en la hepatitis crónica, están representadas por el proceso inflamatorio de los espacios porta y la necrosis de los hepatocitos a su alrededor, denominada necrosis periportal o de la interfase como la lesión fundamental. Además, las lesiones necroinflamatorias del lobulillo también constituyen alteraciones que se presentan en mayor o menor grado en la hepatitis crónica, así como la fibrosis de espacios porta, su extensión al lobulillo y la posible evolución a cirrosis, como mecanismo de reparación, constituyen lesiones histológicas de mal pronóstico (19-29).

El uso extensivo de la biopsia hepática en la práctica médica y la necesidad de mejorar los métodos de estadiamiento y graduación en pacientes con hepatitis crónicas virales, determinó la aparición de métodos de evaluación cualicuantitativa

de estas lesiones, para categorizar más objetivamente variaciones en la magnitud de las alteraciones histomorfológicas (30-36). Estos métodos se han difundido ampliamente en las dos últimas décadas con el fin de seleccionar y evaluar adecuadamente pacientes con hepatopatías crónicas. (37-43).

La biopsia hepática tiene entre sus principales funciones, realizar el diagnóstico de una determinada enfermedad hepática, establecer la severidad de la enfermedad, es necesario un análisis cualcuantitativo de las lesiones, que darán lugar a grados o categorías de mayor o menor gravedad, lo que puede reflejar, como progresá la enfermedad hacia formas más severas.

En la práctica de la Medicina es común categorizar mediante una observación no cuantificable, un determinado grado de severidad de una alteración morfológica o no, como puede ser la intensidad de un soplo cardíaco, la severidad de una encefalopatía hepática, el aumento de la ecogenicidad hepática por ultrasonido en la esteatosis o el grado de várices esofágicas por endoscopía. Para el patólogo es habitual el uso de sistemas de graduación en la categorización de las neoplasias malignas. Es de señalar que los números obtenidos, como resultados de la magnitud de las lesiones, representan grados o categorías del incremento de la severidad de esas lesiones y no evaluaciones numéricas por sí mismas que pueden tener variaciones entre diferentes observadores.

En el estudio de las biopsias hepáticas se utiliza la metodología de graduación o categorización de las lesiones en enfermedades como la colangitis esclerosante, cirrosis biliar primaria, la esteatohepatitis no alcohólica o en el rechazo al transplante hepático (44-48). Sin embargo, en la hepatitis crónica viral se han utilizado varios métodos de cuantificación de las alteraciones necroinflamatorias

como los constituye el método de Knodell-Ishak, descrito por primera vez en 1981, siendo en la actualidad uno de los más utilizados. En el mismo se categorizan tres lesiones histológicas y se calcula un denominado índice de actividad histológica (30). Otros autores utilizan el estudio de dos alteraciones histológicas, combinando los diferentes grados de lesiones, en un resultado final conjunto de más o menos actividad histológica (36). Scheuer (31), utiliza en su método a evaluar tres lesiones y una de la más utilizada actualmente, conocida como la metodología de Ishak, evalúa cuatro alteraciones necroinflamatorias (34).

Los métodos de evaluación de las lesiones histológicas se usan, no sólo para determinar las variaciones de estas lesiones después de una terapéutica, sino también en comparar sus resultados con las cifras de ALAT, antes y después del tratamiento; y en menor grado con el resultado de los marcadores virales (49-53).

La introducción del método propuesto, se inicia después de la utilización del método de Knodell, en biopsias de hepatitis crónica diagnosticadas en proyectos de investigación de donantes de sangre con virus B o C de la hepatitis y con la utilización del método de Knodell o el de Ishak, en la evaluación de las alteraciones histológicas en las biopsias hepáticas asistenciales o de ensayos clínicos de pacientes con hepatitis crónica B o C, en los que no se lograba una buena asociación de los resultados de la ALAT con los resultados histológicos.

El método propuesto para la evaluación de la actividad necroinflamatoria gradúa la magnitud de siete lesiones histológicas, en tres de ellas modificando la manera de evaluar los diferentes grados de intensidad de las mismas, en una forma detallada, sencilla y reproducible, constituyendo estas lesiones los patrones básicos para el

diagnóstico de hepatitis crónica como son la inflamación del espacio porta, la necrosis periportal y los focos necroinflamatorios del lobulillo.

La introducción de la cuantificación del número de espacios porta con inflamación y con o sin necrosis periportal, denominándolos espacios porta lesionados, es una variable que consideramos esencial determinar su número en cada biopsia, pues representa un indicador importante de la gravedad o extensión del proceso necroinflamatorio del hígado; en los otros métodos sólo se menciona el número de espacios porta, al graduar la magnitud de las lesiones que presentan estas estructuras, pero no consignando cuantos están lesionadas en total (30,31,42).

En el método propuesto, la necrosis en puente se categoriza como una lesión independiente y no asociada en la misma evaluación de la necrosis periportal, como en otros métodos diagnósticos, por ser una lesión que representa un alto grado de destrucción celular y posterior alteración de la arquitectura hepática, por lo que se introduce como una nueva variable histológica a evaluar.

Se incluye la presencia de cuerpos acidófilos o células en apoptosis, en las zonas de necrosis periportal o en el lobulillo, por representar una forma importante de daño o muerte celular en las hepatitis virales, que es mencionada en otros sistemas en las alteraciones del lobulillo, pero no en forma cuantificada. Como última variable histológica a evaluar es la de conductillos biliares lesionados en espacios porta, que representan una lesión importante de daño celular de causa inmunológica.

La suma de los valores de los grados de cada alteración histológica constituye el denominado índice de actividad necroinflamatoria total (IANIT), con una escala de

evaluación de 0 a 26. Se considera que este índice refleja más fielmente la magnitud de las lesiones histológicas, que los métodos antes citados.

1. OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN. Los sistemas de evaluación cualicuantitativa de las alteraciones histológicas en las hepatitis crónica viral B o C.

2. PROBLEMA. ¿Son poco precisos los sistemas de evaluación cualicuantitativos de las alteraciones histológicas en las hepatitis crónica B o C, e insuficientes en la asociación enzimática-histológica ?

3. HIPÓTESIS. El Índice de Actividad Necroinflamatoria Total (IANIT), que incluye nuevas variables histológicas a estudiar, permite una mejor evaluación de las biopsias hepáticas, obteniendo una mayor asociación enzimática-histológica, en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con hepatitis crónica viral B o C.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad del IANIT, en la evaluación cualicuantitativa de las alteraciones histológicas, para el diagnóstico, evaluación y pronóstico de las hepatitis crónica viral B y C.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Demostrar la utilidad de la biopsia hepática en el estudio de donantes de sangre asintomáticos de los virus B o C.
- b) Perfeccionar la metodología de la evaluación cualicuantitativa de las alteraciones histológicas de las hepatitis crónicas virales, al introducir nuevas variables histológicas a cuantificar.
- c) Precisar la utilidad del IANIT, en comparación con los métodos anteriores.

- d) Demostrar la precisión del IANIT en el estudio histológico de pacientes sometidos a diferentes esquemas de tratamiento antiviral.
- e) Identificar la utilidad que tiene el IANIT, en el estudio de las lesiones histológicas de la primera biopsia, en el pronóstico de las hepatitis crónicas B y C.

Para lograr los objetivos propuestos en esta investigación, se han desarrollado las siguientes tareas o etapas de investigación:

1ra Etapa- Analizar los resultados histológicos en el estudio de 293 biopsias hepáticas en donantes de sangre con virus B o C, en relación a:

- determinar las alteraciones histológicas en esas biopsias y categorizar a estos donantes como enfermos o no.
- determinar la magnitud de las lesiones de las biopsias de hepatitis crónica por métodos cualicuantitativos en estos donantes.

2da Etapa- Analizar los resultados histológicos del IANIT y compararlos con los resultados del método de Knodell, en 200 pares de biopsias de hepatitis crónica B o C y determinar su reproducibilidad en relación a:

- comparar los índices de actividad histológica entre las primeras y segundas biopsias de ambos métodos.
- comparar las variaciones del índice de actividad histológica al final de una terapéutica y asociarlos al valor de la ALAT, entre ambos métodos.
- comportamiento de los valores de la media de las lesiones histológicas por el método propuesto, y los resultados finales de la ALAT.
- comparación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo y cociente de probabilidad de ambos métodos, tomando como patrón la histología.

-evaluar los valores del IANIT y sus variaciones, en un segundo estudio, para determinar la reproducibilidad del método propuesto, por un mismo observador.

3ra Etapa- Comparar los resultados histológicos del IANIT, con los del método de Ishak, en 293 pares de biopsias de hepatitis crónica B o C, como criterio de validación del método propuesto, en relación a:

-comparar los índices de actividad histológica entre las primeras y segundas biopsias de ambos métodos.

-comparar las variaciones del índice de actividad histológica al final de una terapéutica y asociarlos al valor de la ALAT, entre ambos métodos

-comparación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo y cociente de probabilidad de ambos métodos, tomando como patrón la histología.

4ta Etapa- Demostrar la utilidad del IANIT en el estudio de la primera biopsia, como indicador de pronóstico, en relación a:

-comparar los valores del IANIT de la primera biopsia con la ALAT final y los marcadores virales finales.

-comparar los grados de lesión de la necrosis periportal y de la fibrosis de la primera biopsia, con la ALAT final y los marcadores virales finales.

El tema de investigación propuesto, se considera que reúne las condicionales necesarias, para realizar un trabajo investigativo debido a:

La importancia del presente tema se debe que en Cuba, la cirrosis hepática, representa anualmente entre la 8^{va} y la 10^{ma} causa de muerte, constituyendo los virus B o C de la hepatitis, más del 70% de estos fallecimientos; por lo tanto, la categorización mediante biopsia hepática de enfermos con hepatitis crónica viral y

su evaluación mediante biopsias repetidas, constituye un método esencial para determinar una evolución a la cirrosis.

Tiene actualidad, por cuanto en Cuba la política de salud de control de las enfermedades crónicas y el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes con hepatitis crónicas virales, bajo tratamiento antiviral, demanda del estudio detallado de la biopsia hepática mediante métodos cualicuantitativos, como se realiza internacionalmente en centros hospitalarios de alta calidad.

Es necesario, pues brinda una mayor información al médico de asistencia, para conocer de forma detallada las alteraciones estructurales del hígado en estos enfermos de hepatitis crónica viral, hace necesario el estudio de la biopsia hepática mediante un método cualicuantitativo, en especial en la evaluación histológica post-tratamiento.

La novedad, del método propuesto en esta investigación, pues incluye nuevas alteraciones histológicas a evaluar y modifica el modo de graduar las empleadas en otros métodos, además de permitir el estudio y categorización más precisa de las lesiones histológicas en las hepatitis crónicas B o C.

El aporte de la investigación, permite la introducción de una nueva metodología cualicuantitativa en el estudio de las biopsias de hepatitis crónicas por virus B o C, más precisa confiable, y de fácil aplicación por patólogos generales o aquellos dedicados en especial a enfermedades hepáticas. Permite incluir una nueva herramienta para la graduación y estadiamiento histológico, en pacientes con diferentes esquemas de tratamiento antiviral que se aplican no solo en la práctica médica diaria, sino en el contexto de los ensayos clínicos con nuevos productos biotecnológicos.

En los capítulos de este trabajo investigativo, se utilizaran las diferentes pruebas estadísticas, que correspondan a cada uno de ellos, como serán: utilización de estadísticas descriptivas, pruebas de concordancia, pruebas de cálculo de probabilidades y tests de comparación de pruebas diagnósticas.

El estudio de las láminas histológicas se realiza a ciegas, sin conocer procedencia, asignación de tratamientos, tiempo de la biopsia e identidad del paciente, evaluando en ese momento las alteraciones histológicas por los dos métodos, que se comparan en cada tarea investigativa y sin conocer los resultados enzimáticos o virológicos de cada biopsia estudiada.

La confección del documento para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Médicas, ha sido estructurado mediante la variante de utilizar los resultados de proyectos de investigación institucionales o Ramales del Minsap, desarrollados por espacios varios años, adaptando y respetando la metodología utilizada y los resultados de cada investigación, al presentar un documento único. En estas investigaciones se han evaluado la utilización de varios métodos cualicuantitativos, para la determinación de la magnitud de las lesiones histopatológicas, en las biopsias incluidas en estas investigaciones. Finalmente se ha propuesto, la utilización de un nuevo método de estudio de cuantificación de las lesiones histológicas, en las hepatitis crónicas B o C.

CAPÍTULO 1

UTILIDAD DE LA BIOPSIA HEPÁTICA Y SISTEMAS CUALICUANTITATIVOS, EN LAS HEPATITIS CRÓNICAS VIRALES B o C.

PROPUESTA DE UN NUEVO SISTEMA CUALICUANTITATIVO (IANIT).

1.1 BIOPSIA HEPÁTICA Y HEPATITIS CRÓNICA

Durante la Segunda Guerra Mundial y en años posteriores en muchos soldados norteamericanos tanto en Europa como en Asia, que sufrieron la denominada hepatitis epidémica, se observó que evolucionaron en ocasiones a la cronicidad. En la década de los años 50 comienza a utilizarse en el estudio de estos casos la biopsia hepática y emerge el nombre de hepatitis crónica (1,18).

Desde el punto de vista clínico se define la hepatitis crónica como una enfermedad hepática que no presenta mejoría al menos durante 6 meses, después de haber comenzado la sintomatología o detectarse alteradas las transaminasas séricas. Los síntomas de la hepatitis crónicas son generalmente leves, es común el malestar general, las náuseas, el dolor abdominal en hipocondrio derecho y dolores musculares y articulares. Las transaminasas séricas están aumentadas en casi todos los pacientes de hepatitis crónica y se utiliza para monitorear y graduar la severidad de la enfermedad, y tienen además un valor pronóstico (33,54)

La hepatitis crónica no es una enfermedad simple, y se considera más bien como un síndrome clínico-patológico que tiene varias causas y caracterizado por varios grados de necrosis de hepatocitos e inflamación crónica de espacios porta, siendo

las causas más frecuentes las hepatitis virales B y C, con menos frecuencia la hepatitis autoinmune, la producida por fármacos y la criptogénica (23,55).

La clasificación de las hepatitis crónicas fue propuesta por un grupo de expertos orientados por la Organización Mundial de la Salud y publicada en 1968 (19). El propósito de esta clasificación fue distinguir subgrupos de acuerdo al grado de actividad histológica de la enfermedad, planteándose dos categorías diagnósticas, una denominada hepatitis crónica persistente con ligera actividad de la enfermedad y la hepatitis crónica agresiva con más severa actividad, en esta última, después fue aceptada la denominación de hepatitis crónica activa. También se planteaba por Popper (11), la designación de hepatitis crónica lobulillar, como una variante histológica, con daño preferentemente en el lobulillo y no en espacios porta.

La hepatitis crónica presenta varias lesiones histológicas; la más importante es la necrosis periportal, también denominada necrosis de la interfase o *piece meal necrosis*, que consiste inicialmente en la necrosis o destrucción de los hepatocitos que rodean al espacio porta, formando una especie de cubierta, denominándose a esta estructura lámina limitante (20,21). La necrosis de los hepatocitos, se extiende posteriormente erosionando los cordones celulares vecinos de la lámina limitante. Además de la pérdida celular, en los focos o áreas de necrosis, se observan degeneración balonizante o acidófila de los hepatocitos, células en apoptosis y cuerpos acidófilos; con linfocitos y algunos plasmocitos en la zona de necrosis y de daño celular, con grados variables de inflamación crónica.

La lesión de necrosis periportal, puede no afectar todos los espacios porta, ni estar igualmente lesionados o se puede observar en todo el perímetro del tracto portal, o en un solo segmento del mismo, por lo cual es importante calificar de forma

separada la magnitud de las lesiones de cada espacio porta y después obtener un criterio de conjunto de la lesión (56).

El infiltrado inflamatorio intraportal está compuesto de linfocitos y algunos plasmocitos, se puede observar desde pocas células, hasta formar paquetes densos celulares, que pueden formar folículos linfoides, a veces con centros germinales y puede presentarse en todos los tractos portales o sólo en algunos de ellos variando su magnitud entre unos y otros, en cada biopsia.(57)

La lesión lobulillar está constituida por hepatocitos balonados con citoplasma clarificado o hepatocitos disminuidos de volumen con citoplasma acidófilo, que se presentan en grupos de tres a cuatro en los cordones celulares, de forma aislada y escasos en números. La presencia de necrosis celular aislada no es frecuente, presentándose focos de necrosis de tres a cinco hepatocitos, rodeados y mezclados con linfocitos, variando la cantidad de estos focos y su situación en el lobulillo. La presencia de focos mayores o áreas de necrosis, dando lugar a la denominada necrosis confluente, mezclada con linfocitos es poco frecuente (58).

La denominada necrosis en puente es una forma de necrosis confluente, que se extiende desde un espacio porta a otro espacio o de un espacio porta a una vena centrolobulillar, se acompañada de infiltrado linfoidal, presentándose en las formas más severas de lesiones necroinflamatorias.

La presencia de células en apoptosis y de cuerpos acidófilos, es una lesión de daño y muerte celular de los hepatocitos, que se observa con frecuencia en los hepatitis crónicas virales B o C, en las zonas de necrosis periportal y en el lobulillo, en este último a veces entre hepatocitos normales o en los sinusoides, es más frecuente en la hepatitis por virus C(59,60).

La lesión de conductillos biliares de los espacios porta, es más frecuente en la hepatitis por virus C, presentándose las células del conductillo con hinchazón, vacuolización del citoplasma, picnosis nuclear o pérdida del núcleo, con linfocitos infiltrando el epitelio o rodeando el conductillo, hasta la pérdida del mismo (61).

La fibrosis se presenta en la hepatitis crónica viral B o C, como consecuencia de las lesiones necroinflamatorias antes descritas, tiene una extensión variable, puede ser intraportal y periportal sin modificaciones de la arquitectura o producir tabiques fibrosos, que se extienden al lobulillo subdividiéndolo, pudiendo llegar a la cirrosis; también se presenta extendiéndose finamente entre los sinusoides con aspecto de capilarización o como cicatrices en áreas de necrosis confluente.(62-66)

1.2 HEPATITIS CRÓNICA: SISTEMAS DE CUANTIFICACIÓN

A partir de 1981, con una publicación (30) donde se planteaba el modo de realizar una evaluación cuantitativa de las alteraciones histológicas de la hepatitis crónica, se comenzó a usar este método conocido como el índice de actividad histológica de Knodell (por ser éste el apellido del primer autor del trabajo), como criterio de graduación de las lesiones en los trabajos de evaluación de determinada terapéutica. Este índice cuantifica la inflamación portal, la necrosis y la actividad periportal, la necrosis lobulillar y la fibrosis. Al identificar el virus C como causa de hepatitis crónica, se describe una menor intensidad de lesiones necroinflamatorias (31,67), lo que ha llevado al análisis de la necesidad de utilizar una clasificación más racional de la hepatitis crónica (68-71). Actualmente se acepta la sustitución de la antigua clasificación de persistente y activa por la que hace referencia a la intensidad de las lesiones histológicas, clasificándose simplemente como hepatitis

crónica leve, moderada y severa y en algunas publicaciones se utiliza hasta la clasificación de hepatitis crónica mínima (72).

Al mismo tiempo, se han planteado críticas a la variación de la cuantificación de las lesiones histológicas, tanto las referentes a la actividad necroinflamatoria como a la fibrosis. Así Scheuer et al (31), recomiendan la utilización de cinco grados para la actividad lobulillar y la actividad de los espacios porta, uniendo el infiltrado inflamatorio y la necrosis periportal. En relación a la fibrosis, también utilizan cinco grados. En 1990, Shoerman et al (73), plantearon variaciones en la cuantificación de las lesiones, con tres grados para la lesión lobulillar, cuatro para espacios porta y cinco para la fibrosis.

En relación a casos de hepatitis autoinmune, Schwartz (74) y Bach (22) también proponen y utilizan modificaciones para la evaluación de la fibrosis y de la actividad necroinflamatoria y se han utilizado diferentes metodologías para la graduación de otras lesiones que se presentan como son: la formación de nódulos o folículos linfoides en los espacios porta (75), lesiones en conductillos biliares (76) y número de hepatocitos con vacuolas de grasa.

En 1995, Ishak, (34) publica una variación en la clasificación de Knodell que se ha utilizado en algunos trabajos de evaluación de terapéutica (77). En 1999 se publica una revisión de los métodos de cuantificación de las lesiones en la hepatitis crónica (37), y más recientemente, Scheuer, et al (78), señalan sus principales dificultades y virtudes, recomendando la utilización de algún sistema de medición de lesiones en la evaluación de protocolos de tratamiento de las hepatitis crónicas B o C; o en su relación con el pronóstico clínico (79). Más reciente en el año 2007, por Goodman (43) se realiza una detallada revisión de los índices necroinflamatorios.

Los métodos o sistemas de graduación de las lesiones en las hepatitis crónicas, se pueden agrupar en los que realizan sólo una descripción de las lesiones, los que evalúan dos o tres lesiones con un número limitado de categorías o clasificaciones numéricas en cada lesión y los más complejos, con un número mayor de lesiones a evaluar y con más categorías o clasificaciones de cada lesión. Para un diagnóstico de rutina, se prefiere un sistema simple de pocas lesiones, como el sistema de Batts-Ludwig (35), o el denominado sistema Metavir, propuesto por Bedossa et al. (36); mientras que para una mejor interpretación de las lesiones histopatológicas y una mayor información para el médico de asistencia, se utilizan los métodos de Knodell (30) o el Ishak (34). (ver Anexo 1).

El método de Knodell, evalúa tres lesiones necroinflamatorias, como son la inflamación portal y las lesiones del lobulillo en cuatro categorías y la necrosis periportal unida a la necrosis en puente en siete categorías o clasificaciones numéricas. Se señala como defecto importante, que no califica con una numeración continua las lesiones, de esa forma la lesión que ocupa siete categorías es evaluada de 0-10 puntos. Otro defecto del método, se observa en el cálculo final de las lesiones necroinflamatorias, al que suma también el cálculo de la fibrosis, que es una lesión reparativa y no inflamatoria. Esta suma de lesiones da lugar al Índice de Actividad Histológica, con una evaluación de 0-22; a pesar de estos señalamientos es uno de los índices más usados en las publicaciones.

El método de Ishak, que es una modificación del método de Knodell, evalúa cuatro lesiones necroinflamatorias en cinco categorías, que son la necrosis periportal, las lesiones necroinflamatorias del lobulillo y la inflamación portal y añade la necrosis confluente junto a la necrosis en puente a evaluar en siete categorías, con un

Índice de Actividad Histológica de 0-18. La evaluación de la necrosis confluente , que es una lesión que se observa en la hepatitis viral aguda y que es muy poco frecuente en la hepatitis crónica y además su unión a la necrosis en puente, se señala como un defecto del método; al igual que la descripción poco detallada de la categorización de algunas de las lesiones histológicas. (43).

La interpretación de las alteraciones histológicas en las hepatitis virales (80), y con variaciones de estas lesiones en las biopsias de hepatitis crónicas C, han dado lugar a la creación de métodos de graduación histológica de estas lesiones (80-82), que difieren muy poco de los ya comentados. La reproducibilidad de los sistemas cualicuantitativos de las hepatitis crónicas y su validación por un mismo observador o varios observadores, se analizan en varias publicaciones, tanto para las lesiones necroinflamatorias (83-85) como para la fibrosis (86,87).

1.3 PROPUESTA DE UN NUEVO SISTEMA CUALICUANTITATIVO (IANIT).

La proposición del método cualicuantitativo de este trabajo de investigación (IANIT), como una modificación al método de Knodell y al de Ishak, se basa en evaluar de una forma detallada y precisa, las alteraciones histológicas, producidas por los virus de la hepatitis B o C, y por la respuesta inmunológica del enfermo, después de utilizar los métodos de Knodell y de Ishak, en varios proyectos de investigación, evaluando ventajas y desventajas, considerando que ambos métodos resultan insuficientes, para una buena diferenciación de los cambios histológicos entre dos biopsias y poder realizar una adecuada asociación de los resultados enzimáticos-viroológicos con los de la biopsia.

Las lesiones de daño celular de degeneración balonizante y necrosis de los hepatocitos, se deben a acciones de linfocitos citotóxicos, contra los virus B o C,

que producen citoquinas y destruyen los hepatocitos, además activan mediadores de la respuesta inflamatoria, con aumento de las células inflamatorias en los focos de necrosis(88-90).La necrosis en puente, es una forma muy severa de actividad necrótica del lobulillo (91,92), que representa una forma persistente de infección viral, con un mal pronóstico y seguida de fibrosis con distorsión de la arquitectura, presentándose en la recrudescencia o reactivación de ambos virus, por lo que en el método propuesto se evalúa como una variable histológica independiente, por la importancia de la misma. Su evaluación de 0 a 4.

Las lesiones de daño celular de degeneración acidófila, los mecanismos que llevan a la apoptosis y a la formación de cuerpos acidófilos (93,94), están también constituidos por factores inmunológicos, a partir de la acción de linfocitos citotóxicos y el factor de necrosis tumoral (95,96) y otras citoquinas, producen una necrosis celular, que contribuye al aumento de la ALAT (97), debido a lo cual en el método propuesto, se incluye su evaluación como una variable histológica independiente, en las lesiones necroinflamatorias del lobulillo, no evaluada en otros sistemas de esa forma. Su evaluación de 0 a 3.

En cuanto a los tractos portales afectados, ya se ha señalado que la magnitud del infiltrado inflamatorio intraportal o periportal, puede variar entre ellos y observarse espacios porta sin una respuesta inflamatoria; por lo que el método propuesto plantea separar la calificación de la magnitud del infiltrado inflamatorio del espacio porta,(alteración evaluada en la mayoría de los sistemas ya citados),e incluir como una nueva variable a evaluar el número de espacios porta lesionados presentes en la biopsia, brindando una información de la extensión o gravedad del proceso necroinflamatorio de los espacios porta. Su evaluación de 0 a 4.

Las lesiones de daño de los conductillos biliares en los espacios porta, también están producidas por mecanismos inmunológicos, dependientes de partículas virales de los virus B o C, dentro de estas células que tiene el mismo desarrollo embrionario de los hepatocitos y dan lugar a alteraciones morfológicas, que lesionan las estructuras del espacio porta, lo que se ha planteado evaluar como una lesión independiente (98,99). Su evaluación de 0 a 3.

Las otras lesiones a evaluar en el método propuesto, son la necrosis periportal, las lesiones necroinflamatorias del lobulillo y el infiltrado de espacios porta, que son las alteraciones histológicas que se evalúan de forma independiente en la mayoría de los métodos citados, se modifica su modo de evaluar , al hacer más objetivas y precisas las características histológicas de cada categoría de las lesiones. Cada alteración histológica es evaluada de 0 a 4.

A cada biopsia se le realizó un estudio detallado de las alteraciones histológicas, de esa forma en el estudio de cada espacio porta se evaluaron los siguientes datos de cada alteración histológica:

Presencia, distribución, magnitud y composición del infiltrado inflamatorio.

Presencia, distribución, magnitud y extensión de la necrosis periportal.

Presencia, localización, magnitud y extensión de la fibrosis.

Presencia, aspecto y número de conductos biliares lesionados.

Número de espacios porta lesionados.

En el estudio detallado de los lobulillos hepáticos se evaluarán los siguientes datos:

Presencia, distribución, magnitud y extensión de la necrosis lobulillar y el infiltrado inflamatorio.

Presencia, magnitud y localización de cuerpos acidófilos.

Presencia, magnitud y extensión de la necrosis en puente.

El Índice de Actividad Necroinflamatoria Total (IANIT) está constituido por:

1. Necrosis de la interfase o periportal (n. p) 0-4 (modificación 75,76)

0- ausente

1- pequeños focos de n .p. en menos del 20% del perímetro, en menos del 50% de espacios porta.

2- pequeñas áreas de n. p. en forma aislada, en más del 50% de espacios porta.

3- área de n. p. hasta el 50% del perímetro, en más del 50% de espacios porta.

4- áreas de n.p. en más del 50% del perímetro, en más del 50% de espacios porta

2. Inflamación portal 0-4 (modificación 30, 31,70)

0- ausente

1- aisladas células inflamatorias de menos del 50% de espacios porta

2- grupos de células inflamatorias en menos del 50% de espacios porta.

3- grupos de células inflamatorias en más del 50% del área de todos los espacios porta.

4- grupos de células inflamatorias formando densos acumulos en toda el área de todos los espacios porta.

3. Lesión lobulillar (necrosis e inflamación focal) 0-4 (modificación 31,100)

0 - ausente

1- hasta 2 pequeños focos puntuales de grupos de células inflamatorias en sitios de necrosis focal en campos de 100x.

2- hasta 5 pequeños focos de iguales características.

3- hasta 10 pequeños focos de iguales características.

4- más de 10 pequeños focos de iguales características.

4. Cuerpos acidófilos (apoptosis) 0-3 (modificación 22 variable no utilizada)

0 - ausente

1- menos de 10 cuerpos acidófilos por corte histológico

2 - hasta de 20 cuerpos acidófilos por corte histológico

3 - más de 20 cuerpos acidófilos por corte histológico

5. Necrosis en puente 0-4 (valoración de nueva variable)

0- ausente

1- en menos del 25% de espacios porta

2- hasta el 50 % de espacios porta

3- hasta el 75 % de espacios porta

4- en más del 75 % de espacios porta

6. Lesión de conductillos biliares (degeneración celular, pérdida o infiltrado linfoides) 0-3 (modificación variable no utilizada.)

0- ausente

1- hasta el 25 % de espacios porta con lesión de conductillos

2- hasta el 50 % de espacios porta con lesión de conductillos

3- más de 50 % de espacios porta con lesión de conductillos

7. Número de espacios porta lesiones 0-4 (valoración de nueva variable)

0- ausente

1- menos del 25 % de espacios porta lesionados

2- hasta el 50 % de espacios porta lesionados

3- hasta el 75 % de espacios porta lesionados

4- más del 75 % de espacios porta lesionados

El valor del índice varía entre 0 y 26., constituye la suma de todos las lesiones necroinflamatorias, denominado Índice de Actividad Necroinflamatoria Total (IANIT).

La fibrosis será evaluada de 0-4 según Scheuer (78)

0- ausente

1- expansión fibrosa de espacios porta

2- expansión fibrosa de espacios porta con pequeñas extensiones al lobulillo

3-expansión fibrosa de espacios porta con tractos fibrosos, que se extienden al lobulillo distorsionándolos

4- cirrosis

La utilización de términos como foco, área, grupos de células, que se utilizan en la método propuesto, son las mismas que se describen en métodos anteriores y son conocidos y trabajados, por los patólogos en el diagnóstico de biopsias hepáticas.

En relación al diagnóstico histológico de la hepatitis crónica, es de vital importancia el tamaño del cilindro a estudiar. En su trabajo, Brunetti et al. (101) compara la utilización de biopsias por aguja fina (0,8 mm) o agujas de diámetro normal (1,2 mm) en 149 pacientes y demuestra que los resultados diagnósticos son mucho mejores con la utilización de agujas de mayor diámetro. Se señala que la longitud del cilindro hepático, es esencial para un diagnóstico acertado. Bedossa et al. (102) plantea la longitud al menos de 25mm del cilindro, es necesario para una acuciosa valoración de la fibrosis en los sistemas de evaluación. Colloredo et al. (103), usando un papel negro sobre la lámina histológica realiza el diagnóstico en diferentes longitudes de hasta 5,10, 15, 20, 25 o más de 25mm, concluyendo que sí es mayor el tamaño del cilindro, el grado de lesión necroinflamatoria o de fibrosis es mayor, recomendando que es necesaria la longitud de 20mm o más para un

diagnóstico eficiente. La longitud de 20mm del cilindro es aceptada en otra publicación (48), otros reportan como satisfactoria la longitud de 15mm (9,12,104,105).

No solo es importante la longitud del cilindro hepático, sino el número de espacios porta completos que se observan, según diferentes autores el número varía desde 11 referidos por Colloredo (103) hasta cuatro por Brunetti (101). Otros trabajos plantean 5 espacios porta, 6 y 8 (106,107). Uno de los patólogos más reconocido en el diagnóstico de la hepatitis crónica, Peter J. Scheuer, plantea que mientras más grande es el tamaño del cilindro hepático es mejor y que entre 6 y 8 espacios porta es suficiente para un diagnóstico de calidad (108).

La posibilidad de un error de muestreo en el cilindro obtenido se ha evaluado, Soloway (6) plantea que las alteraciones histológicas en la hepatitis crónica son uniformes, y no en la cirrosis hepática. Knodell et al. en 1977 (109) realiza dos biopsias a la vez en cada paciente, refiere escasas variaciones en el grado de algunas lesiones histológicas, pero que no son suficientes para variar el diagnóstico.

En 1995 (110) se reporta usando el sistema de Knodell en 74 pacientes, con virus C de la hepatitis algunas diferencias en la evaluación cuantitativa de la necrosis lobulillar y periportal y de la inflamación del espacio porta. Más reciente, en el 2003 se reporta (111) el 45% de diferencia en la actividad necroinflamatoria y en la fibrosis con el sistema Knodell; en el 2002 se reporta (112) un 24% de diferencias al menos de un grado en la inflamación y del 33% en la fibrosis, usando el sistema Metavir, en biopsias de ambos lóbulos.

En un excelente estudio de 254 biopsias evaluadas por 15 patólogos (113), en relación a las diferentes alteraciones histopatológicas en las hepatitis crónica donde evaluaron la influencia del patólogo que diagnostica y las características de la biopsia, concluyen que el grado de experiencia en la interpretación de la biopsia hepática dada por la especialización en la patología hepática, el tiempo en que esté dedicado a esta actividad y el desarrollo científico de la institución donde trabaja, influyen positivamente para un diagnóstico correcto en aquellas biopsias pequeñas. Como este trabajo investigativo se relaciona con los virus B y C de la hepatitis se exponen se exponen algunas características biológicas, de diagnóstico y formas de presentación clínica, que se asocian con los resultados que se presentan en los diferentes capítulos, pues ambos virus pueden evolucionar a hepatopatías crónicas, como hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepático.

1. 4 VIRUS DE LA HEPATITIS B

El virus de la hepatitis B es un virus de doble cadena DNA, que replica en parte través de RNA intermediario, su genoma tiene aproximadamente 3,200 pares de bases, con 8 tipos diferentes de genotipos, con una distribución en numerosas áreas geográficas, que tienen poca influencia en la evolución de la enfermedad (114). Está compuesto por 4 genes diferentes que codifican con numerosas proteínas vírales, el gen central o core codifica para la síntesis de proteínas de cubierta viral, denominándose AgcHB y el denominado pre-core o AgeHB. El gen S codifica las proteínas de envoltura denominadas Pre-S1 y Pre-S2 y la proteína S denominada AgsHB, antiguamente conocida como Antígeno Australia (115); estos productos proteicos vírales, son utilizados en diagnóstico serológico e histológico.

El gen P codifica para la síntesis de la polimerasa viral de importancia en la replicación viral y el gen X, que es el menos estudiado, denominado Agx, como un potente transactivador asociado a la carcinogénesis del virus B. La determinación de la presencia de los antígenos del virus B en tejido hepático, ha permitido evaluar los mecanismos de penetración viral en los hepatocitos, la replicación viral y la respuesta del huésped, utilizando las técnicas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia en la demostración del AgsHB, del AgeHB y del AgcHB en el citoplasma y núcleos de los hepatocitos (116).

El virus B de la hepatitis está considerado entre los agentes infecciosos más diseminados en nuestro planeta, considerándose que 350 millones de personas están catalogados como portadores crónicos de la infección (117), calculándose unas 520,000 muertes anuales por este virus, estimándose que el 5 por ciento de la población mundial está afectada por este virus (118). En grupos de riesgo se señalan drogadictos, hemodializados, pacientes infectados por HIV, personas con múltiples parejas sexuales y hombres que tienen sexo con hombres (119). El personal de salud es considerado como de riesgo principalmente por la violación de medidas de seguridad, en áreas de laboratorios y de urgencias medicas (120).

El daño de los hepatocitos en la hepatitis B es debido a la respuesta inmune del huésped, dependiente de linfocitos citotóxicos clase I VHB demostrados en tejido hepático y en sangre periférica (121). Los linfocitos T4 identificados en el hígado, permite una respuesta coordinada humoral y celular contra el virus B (122), desencadenan apoptosis en los hepatocitos infectados y permiten el reclutamiento de células, que dan lugar a los focos necroinflamatorios. La extensión y severidad

de la hepatitis depende de la respuesta inmune del huésped, produciéndose cuatro diferentes evoluciones a infectados por el virus B.

- una respuesta inmune normal, produce la eliminación del virus y clínicamente se representa por una hepatitis aguda
- una respuesta inmune exagerada y poco específica puede producir una necrosis severa, que dará lugar a una hepatitis fulminante.
- una respuesta inmunológica débil, insuficiente y continuada, con un daño celular de hepatocitos mantenido da lugar a una hepatitis crónica y posible cirrosis
- una respuesta inmunológica muy limitada o una tolerancia inmunológica al virus B, no produce lesión hepática o es ínfima y corresponde al estado de portador asintomático.

La infección crónica del virus B, es una dinámica interacción entre el virus, los hepatocitos y el sistema inmune del organismo y puede evolucionar entre brotes y remisiones, en la biopsia cambios necroinflamatorios del lobulillo, pueden llegar a necrosis en puente con linfocitos T8 citotóxicos y que segregan interferón y factor de necrosis tumoral, reflejando la ALAT la magnitud de la respuesta inmune. (123)

1.5 VIRUS DE LA HEPATITIS C

El virus de la hepatitis C es un virus de simple cadena RNA, su genoma de alrededor de 9,600 nucleótidos, es trasladado dentro de una poli proteína de 3000 aminoácidos. Esta formado por tres proteínas estructurales denominadas core, E1 y E2 localizadas en su terminal amino, ocupando la cuarta parte de la poliproteína y por las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4 y NS5, en la porción remanente de la poli proteína (124). Las proteínas E1 y E2 son de envoltura y el core o AgcHB son los mayores componentes del virus C (125,126), dando lugar a 6 genotipos

diferentes, con importante presencia en diferentes áreas geográficas y con distintas evolución en las formas clínicas crónicas por virus C (127). El virus C de la hepatitis esta reportado que 170 millones de personas , están afectados crónicamente (128), y que la evolución a cirrosis o hepatocarcinoma representa alrededor de 280,000 muertes cada año, estimándose que 2,7 millones de personas están infectadas por este virus en los Estados Unidos de Norteamérica (129) .

.La progresión de la hepatitis crónica C, se estima que a los 20 años, el 22% de los pacientes evolucionan a cirrosis y que los denominados donantes asintomáticos, a los 20 años el 4% también evolucionan a cirrosis (130). Se reporta que el 85 % de los infectados por el virus de la hepatitis C, van a la infección crónica, generalmente asintomático en el 75%. Se reporta que hasta el 25%, con cifras de ALAT normales y RNA-VHC positivo en sangre, pueden tener lesiones leves en el estudio biopsico y que los pacientes con cifras elevadas de ALAT y con daño celular de moderado a severo, evolucionan a cirrosis en pocos años y del 2 al 5% de las cirrosis a hepatocarcinoma cada año (131).

La demostración de partículas vírales como diagnóstico corriente en biopsias, como sucede con el virus de la hepatitis B, no esta disponible técnicamente en este momento, aunque existen algunos trabajos que han reportado la detección de proteínas vírales en muestras de tejido, aunque no se ha generalizado esta tecnología (132,133). En Cuba, en pacientes del Instituto de Gastroenterología y en cooperación otros centros de investigación, mediante técnicas de microscopia de transmisión y de inmunomicroscopía electrónica, se han demostrado la presencia de partículas vírales en el citoplasma y núcleos de hepatocitos infectados y en células no parenquimatosas del hígado (98,134-136).

La presencia de proteínas vírales en hepatocitos y en células mononucleares periféricas, en enfermos con RNA del virus C ausente en suero (137), demuestra que formas replicativas del virus C, pueden persistir en hepatocitos y monocitos.

La vía de transmisión del virus C de la hepatitis mas frecuente es la hemática, constituyendo la primera causa de las hepatitis postransfusional (138). Otras fuentes de contagio, incluyen inyecciones a repetición, drogadictos, enfermos dializados, no constituyendo la transmisión sexual una vía infección, el personal de la salud constituye un grupo de riesgo. La respuesta inmune del huésped, en las vías de eliminación viral determina en primera instancia la evolución de la enfermedad, la existencia de linfocitos citotóxicos específicos contra el virus C representan la vía principal de la respuesta inmune, además de T4 específicos que completan la respuesta del huésped, demostrándose que una respuesta débil de ambas clases de linfocitos, permiten el paso a la cronicidad, mientras que una respuesta efectiva, puede eliminar el virus.

Lo expuesto en este capítulo, demuestra la importancia del estudio detallado de las alteraciones histológicas, en biopsias hepáticas, provenientes de enfermos o portadores asintomáticos del virus B o C de la hepatitis, y su utilización en el conocimiento de la magnitud y extensión de estas lesiones, después de una terapéutica determinada, como criterio de evaluación del estado de la enfermedad.

CAPITULO 2

UTILIDAD DE LA BIOPSIA HEPÁTICA EN EL DIAGNOSTICO Y CATEGORIZACIÓN DE DONANTES ASINTOMÁTICOS CON VIRUS B O C DE LA HEPATITIS.

Este capítulo es el resultado de varias investigaciones institucionales realizadas en el Instituto de Gastroenterología, en los últimas dos décadas del pasado siglo, relacionadas con el estudio de donantes voluntarios de sangre, portadores de los virus B o C de la hepatitis y la importancia de la biopsia hepática, en el estudio detallado de las alteraciones histológicas, en estos donantes. La respuesta inmune de cada persona infectada por los virus B o C de la hepatitis, como se ha señalado en los párrafos anteriores, define la alteración histológica que se pueda presentar en tejido hepático y las alteraciones en el orden clínico y bioquímico que se presentan en estas personas, pudiendo catalogarse como enfermos o no.

2.1- PORTADORES DE LOS VIRUS B O C DE LA HEPATITIS.

En relación al virus B de la hepatitis, la prevalencia de la infección varia de 0,1% en algunos países de Europa y América del Norte hasta el 15% en algunos países de Asia y África (139), se conoce que una de las formas de evolución clínica, es el denominado portador sano o asintomático, considerando que tiene inicialmente AgsHB positivo en suero, con cifras de ALAT normales y sin síntomas y signos de

enfermedad hepática. Desde 1970 se reportan numerosos estudios, con realización de biopsias hepática, que se pueden resumir de la siguiente forma:

Tabla 1 Resultados histológicos en pacientes portadores sanos de VHB.

	N	Normal	Lesión Mínima	HCP	HCA	Esteatosis	CH
ALAT normal	220	67	108	33	-	-	12
ALAT elevada	139	17	48	30	38	2	4

HCP Hepatitis crónica persistente HCA Hepatitis crónica activa CH Cirrosis
Bibliografía (140-148).

Estos resultados señalan un mayor número de biopsias de hepatopatías crónicas, con enzimas elevadas, aunque también se observan lesiones mínimas y de hepatitis crónicas persistentes con cifras normales de ALAT.

Similar al virus B de la hepatitis, se ha definido el criterio de portador sano del virus C, como el sujeto con anticuerpos contra el virus C de la hepatitis, RNA-HVC en suero positivo, aminotransferasas normales y sin lesión histológica en el hígado (149-150). La presencia de lesiones histológicas en algunos sujetos, han puesto en duda la existencia del portador sano o asintomático de este virus (151), sin embargo, se acepta la existencia del denominado portador sano inactivo, igual que por el virus B. En la siguiente tabla se resumen, algunos trabajos con resultados histológicos de sujetos con anti-HVC y RNA-HVC positivos y enzimas normales .

Tabla 2 Resultados histológicos en pacientes portadores de VHC.

	N	Normal	Lesión Mínima	HCP	HCA	CH	Esteatosis
ALAT normal	614	80	27	269	217	7	14

HCP Hepatitis crónica persistente HCA Hepatitis crónica activa CH Cirrosis
Bibliografía (151-157).

Los resultados de estos estudios reflejan, siguiendo la misma metodología y con un número apreciable de sujetos estudiados, la presencia del 13% de casos con histología normal, considerándose como portadores del virus C de la hepatitis. Igual que en el virus B, estos portadores sanos, con enzimas normales, son candidatos a donantes de sangre voluntarios, que solo después del estudio de su sangre, para la detección de marcadores virales de los virus de la hepatitis y la medición de las aminotransferasas, se determina que son portadores del virus C y al estudiarlos correctamente, mediante la biopsia hepática se pueden categorizar como enfermos o portadores.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar lesiones histológicas en biopsias hepáticas, de donantes de sangre asintomáticos con AgsHB o anti-HVC positivos.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la presencia de alteraciones histopatológicas hepáticas, en donantes de sangre asintomáticos virus B o C positivos y categorizarlos o no como enfermos.

2.4 MATERIAL Y MÉTODOS.

En un proyecto de investigación institucional, se estudiaron de forma prospectiva las biopsias hepáticas procedentes de donantes voluntarios de sangre, enviados al Instituto de Gastroenterología por algunos bancos de sangre de Ciudad de La Habana, al detectarse el anti-HVC o el AgsHB en la sangre donada. A cada donante enviado se le repitió el estudio de los marcadores virales en el Laboratorio de Inmunología del IGE, mediante la técnica ultramicroenzimática (SUMA) con los reactivos del Centro de Inmunoensayo; aquellos pacientes que fueron positivos se le realizó un examen físico, una historia epidemiológica y un estudio de enzimas

hepáticas, proponiéndoseles la realización de una biopsia hepática bajo visión laparoscópica. Se estudiaron 130 biopsias de donantes B positivo y 100 biopsias de donantes anti HVC positivo en un período de dos años, solamente fueron utilizadas las biopsias que presentaron como mínimo 6 espacios porta, fueron procesados según lo referido en el capítulo de introducción y evaluados 20 cortes histológicos en cada biopsia y cuantificadas las alteraciones histológicas según el Sistema de Knodell, referido anteriormente.

Se clasificaron las biopsias según sus alteraciones en normales, hepatitis crónica mínima, leve, moderada y severa. Se consideró el diagnóstico de cirrosis según los criterios histológicos conocidos y el de esteatosis si presentaban vacuolas grasas, más del 15% de los hepatocitos y se clasificaron algunas biopsias como lesión mínima si presentaban las siguientes alteraciones:

En aumentos de 100x en el lobulillo, menos del 5% de hepatocitos balonados o con degeneración acidófila, menos del 5% de necrosis aislada de hepatocitos o menos de 2 o 3 focos de necrosis de 3 a 4 hepatocitos con escasos linfocitos y en espacios porta la presencia de escasas células inflamatorias en menos del 25% de tractos portales. Se utilizó la denominación de lesión mínima en este trabajo, como un símil a lesiones histológicas en glomérulos, de fácil compresión por los patólogos y pretendiendo se comprendiera la magnitud de la lesión descrita.

Se estudió un segundo grupo de 63 biopsias de donantes voluntarios, agrupados como donantes especiales por plasmaféresis provenientes del Banco de Sangre de Provincial, que fueron clasificados como anti HVC positivo, se siguió el mismo procedimiento del grupo anterior y en el estudio histológico y se introdujo la

clasificación de hepatitis aguda mínima, si se observaban las siguientes alteraciones histológicas:

Moderado balonamiento celular y hepatocitos disminuidos de volumen con citoplasma eosinófilo de preferencia centrolobulillar, presencia de cuerpos, acidófilos y necrosis celular aislada de hepatocitos, escasos pequeños focos necroinflamatorios en el lobulillo, presencia de pigmento biliar en algunos hepatocitos, que en total representan alrededor del 20% de hepatocitos lesionados y ligero edema en algunos espacios porta con escaso infiltrado linfoplasmocitario.

En ambos estudios la cifra de ALAT se consideró normal hasta 40 UI, no presentándose alteraciones en el examen físico de los donantes que fueran atribuidos a la glándula hepática, clasificándose como donantes asintomáticos.

Los resultados se presentan en tablas, utilizando estadísticas de tipo descriptivo.

2.5 RESULTADOS

Los resultados del estudio de las biopsias de los donantes AgsHB o anti HVC positivos, son presentados en la Tabla 1 y Gráficos 1 y 2.

Tabla 1 Resultados histológicos de biopsias hepáticas de donantes asintomáticos.

Clasificación histológica	No.	%
Hígado normal	140	60,86%
Lesión mínima	32	14,91%
Hepatitis crónica	53	23,04%
Cirrosis	2	0,86%
Esteatosis	3	1,30%
	230	100%

Fuente. Resultados de la investigación.

GRAFICO 1
RESULTADOS DE BIOPSIAS DE DONANTES
ASINTOMATICOS B POSITIVOS N=130

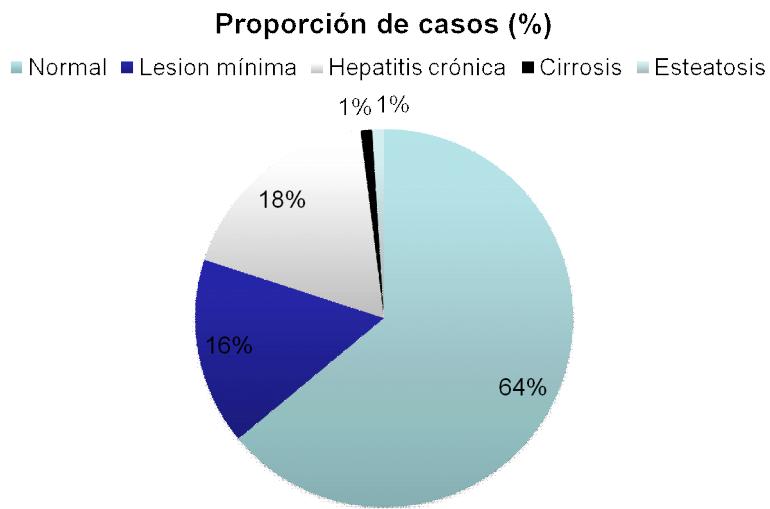
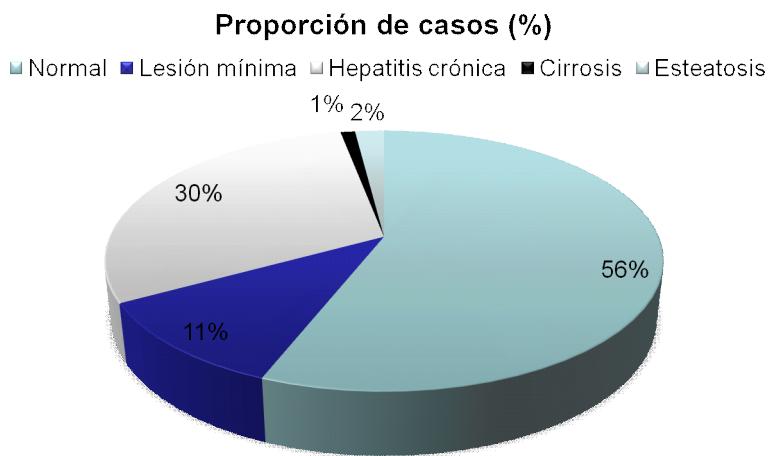


GRAFICO 2
RESULTADO DE BIOPSIAS DE DONANTES
ASINTOMATICOS C POSITIVOS N=100



En la tabla 1 se observa, que el 39,14% de las biopsias estudiadas presentaban alteraciones histológicas, dependientes de los virus de la hepatitis y que el 23,04% eran hepatitis crónicas. El gráfico 1, muestra que el 36% de los donantes asintomáticos o sanos con AgsHB+ presentaban alteraciones histológicas en la biopsia hepática, mientras que en los donantes anti-HVC+, la biopsia presentó alteraciones en el 44%. Estas alteraciones, a excepción de la esteatosis hepática, pueden ser atribuidas a los virus B o C de las hepatitis, es de destacar que el 18% de la biopsias de donantes con virus B, correspondieron a hepatitis crónica y el 30% en los donantes C positivo. (ver Gráfico 1 y 2).

En la literatura revisada en las publicaciones con metodología similar a la utilizada en este trabajo, se informan resultados generalmente coincidentes, Afifi et al. (158), en un estudio de 115 casos, obtienen que el 33% de las biopsias de virus B presentaban alteraciones y el 75% de las de virus C. En relación a los donantes de sangre virus B positivos, los resultados de diferentes publicaciones (159-164), informan alteraciones histopatológicas del hígado entre el 20% y 60%, siendo del 44% en las publicaciones en su conjunto. En relación a los donantes de sangre con virus C positivo, se han publicado en los últimos 20 años numerosos trabajos (158,165-168), en los cuales se reportan alteraciones histológicas hepáticas en alrededor del 90% de las biopsias; sin embargo es de señalar que tanto para el virus B como para el C, un porcentaje importante de estas alteraciones se clasifican como lesiones mínimas o inespecíficas, dadas por alteraciones de daño celular como balonamiento o acidofilia del citoplasma del hepatocito, algún pequeño foco necroinflamatorio o escasa respuesta inflamatoria del lobulillo.

En este trabajo se obtuvo, que el 18% de las biopsias de virus B positivo, presentan hepatitis crónica y en el 30% del virus C; en los mismos publicaciones citadas en el párrafo anterior, se reportan que en las biopsias de donantes B se diagnosticó, hepatitis crónica en el 44% y en el 72% de las biopsias de donantes con virus C; en publicaciones más recientes referidas a donantes asintomáticos virus C positivos se reportan resultados algo disímiles entre un trabajo y otro, con diagnóstico histológico de hepatitis crónica, que van desde el 8% de las biopsias, hasta un trabajo del 100% (169-172); mientras que otra publicación en donantes jóvenes se reporta el 50% con hepatitis crónica (173). Es de señalar que en estos resultados, se diagnosticaron dos casos como cirrosis, coincidiendo en lo revisado en la literatura en que se reporta entre el 2 y 4% de cirróticos en estos donantes asintomáticos.

En la tabla 2 se presentan los resultados de los donantes con lesión histológica y cifras normales de ALAT.

Tabla 2 Relación de lesiones histológicas en donantes con ALAT normal.

Clasificación histológica	total de lesiones	total ALAT normal	%
Lesión mínima	32	20	62,5
Hepatitis crónica	53	30	56,6
Cirrosis	2	2	100
Esteatosis	3	2	66
Total	90	54	60

Fuente: Resultados de la investigación

En esta tabla se observa que el 60% de los donantes con alteraciones histológicas presentaban cifras normales de ALAT, de 53 con hepatitis crónica en 30 la ALAT fue normal, corresponden al 56,60% de las biopsias diagnosticadas como hepatitis crónica, lo que se considera una cifra alta, para estos donantes.

Tabla 3 Presencia de lesión histológica en donantes con cifras normales de ALAT, según virus B o C.

Clasificación	AgsHB			anti HVC		
	n	No.	%	n	No.	%
histológica						
Lesión mínima	21	12	57,14	11	8	72,72
Hepatitis crónica	23	7	30,43	30	23	76,66
Cirrosis	1	1	100	1	1	100
Esteatosis	1	1	100	2	2	100
Total	46	21	45,65	44	34	77,27

Fuente: Resultados de la Investigación

Esta Tabla 3 muestra los resultados de donantes, según su tipo de virus con alteraciones histológicas y ALAT normal, representando el 45,65% en los donantes con virus B y elevándose hasta 77,2% en las de virus C; las biopsias diagnosticadas como hepatitis crónicas y ALAT normal, fueron el 30,43% en los donantes B y el 76,66 % en los donantes C, en estos últimos 3 de 4 tenían enzimas normales. En la tabla siguiente, se presentan los resultados de las biopsias diagnosticadas como hepatitis crónicas, clasificadas según la magnitud de sus alteraciones, con cifras de ALAT normales.

Tabla 4 Resultados de biopsias de hepatitis crónica en donantes con ALAT normal

Clasificación	Ags HB+			anti HVC		
	n	No.	%	n	No.	%
histológica						
Mínima	2	2	100	12	12	100
Leve	6	4	66,66	11	9	81,81
Moderada	11	1	9,09	7	2	28,57
Severa	4	-	-	0	-	-
Total	23	7	30,43	30	23	76,66

Fuente: Resultados de la investigación

En ambos grupos de donantes, se observan un amplio predominio de cifras normales de ALAT, en aquellas hepatitis crónica diagnosticadas con un menor grado de lesión necroinflamatoria (mínimas y leves). Es de señalar que el 28,57% de las biopsias de hepatitis crónica moderada cursan con ALAT normal, en el grupo de donantes con virus C. La tabla muestra que en el grupo de donantes B, predominan los grados mayores de lesión, con 15 de 23 biopsias, diagnosticadas como hepatitis crónicas moderadas o severas; mientras que en el grupo de donantes C, predominan los grados menores de lesión, con 23 de 30 biopsias diagnosticadas como hepatitis crónicas mínimas o leves.

El estudio de las biopsias y en su categorización en diferentes grados de la hepatitis crónica, en las muestras de biopsias de donantes asintomáticos, permiten clasificarlos según la magnitud de las lesiones histopatológicas y tienen un criterio cualitativo de su gravedad. Los resultados de esta clasificación, demostraron que las biopsias de hepatitis crónica del grupo de virus B, se categorizan la mayoría como moderadas o severas; mientras los del grupo C hubo un franco predominio de lesiones menos severas, catalogándose más del 76,66% de la mismas como mínima o leve; esta forma de clasificar las hepatitis crónica reviste gran utilidad para evaluar la respuesta a las diferentes terapéuticas y por el patólogo es fundamental su conocimiento.

En este capítulo que se analizan los resultados de las biopsias de estos dos grupos de donantes, y cuáles eran las cifras de ALAT en el tiempo que se tomó la muestra biopsia, se observa en las tablas antes comentadas, el elevado número de donantes que presentando lesiones histológicas tenían cifras normales de la ALAT, incluyendo biopsias de hepatitis crónicas de diferentes grados de lesión e incluso

cirrosis. Esta situación ha sido evaluada en la literatura revisada, con diferentes enfoques y resultados, que se discuten a continuación.

El estudio de los donantes de sangre positivos al AgsHB, se reporta en numerosos trabajos, algunos de los cuales con realización de biopsias hepáticas, que se puede resumir de la siguiente manera:

Resumen de resultados histológicos en donantes con infección por VHB.

	N	Normal	Lesión Mínima	HCP	HCA	CH
ALAT normal	121	78	15	15	13	-
ALAT elevada	49	2	30	15	1	1

HCP Hepatitis crónica persistente HCA Hepatitis crónica activa CH Cirrosis
Bibliografía (159-164).

Estos resultados demuestran, que el 96% de los donantes, con ALAT elevada presentaban algún grado de alteración histológica, aunque un número importante de donantes con cifras normales enzimáticas 35,50%, también presentaban alteraciones histológicas.

En el siguiente resumen se presentan, algunos resultados de trabajos, de donantes de sangre anti-HVC positivos con estudios de biopsia hepática

Resumen de resultados histológicos donantes con infección por VHC.

	N	Normal	Lesión Mínima	HCP	HCA	CH
ALAT normal	184	39	57	56	32	0
ALAT elevada	220	0	73	130	17	0

HCP Hepatitis crónica persistente HCA Hepatitis crónica activa CH Cirrosis
Bibliografía (158,165-168,174).

Los resultados de estos trabajos demuestran la presencia de lesiones histológicas de hepatopatías crónicas, en el 100% de los donantes con ALAT elevada, pero también en el 78,90% con cifras normales de ALAT.

Entre los temas más debatidos en la literatura, relacionados con las personas con virus B o C de la hepatitis, es lo relacionado con las cifras de la ALAT y la presencia o no de alteraciones histopatológicas en la biopsia hepática (152-157) y más particularmente en relación al virus C, en que las lesiones tienen menos intensidad. Esta problemática, es una realidad en relación a los donantes de sangre asintomáticos, muchos de los cuales presentan cifras normales de ALAT.

La relación de las cifras de la ALAT y las alteraciones histopatológicas hepáticas, observados en la biopsia hepática, también es discutida en la literatura, se plantea la utilidad de la realización de la biopsia hepática o no en los donantes asintomáticos. Curtiss et al. (154), plantean que sí la infección de estos virus está bien documentada, hay que considerar la biopsia hepática.

Sí la ALAT es normal o cerca de lo normal, otro autor (174) refiere que la alta frecuencia de hepatopatía crónica en donantes asintomáticos, con ALAT normal no excluye la realización de la biopsia; Berenjeba (175), refiere que los portadores crónicos asintomáticos pueden tener lesiones histológicas del hígado que pueden llegar hasta la cirrosis. Afifi et al. (158) señala un paralelismo entre las láminas histológicas (hepatitis crónicas) y los resultados biológicos (citolisis) y virológicos, existe entre la mitad de los sujetos estudiados y Loria (176) plantea que existe correlación entre las variables biológicas e histológicas, a pesar de la distribución heterogénea de las lesiones hepáticas y la fluctuación de las transaminasas.

Sin embargo, otros autores (177-178), plantean que no siempre la biopsia es indispensable para llegar a un diagnóstico de portador sano, la ausencia de correlación de la actividad sérica de las transaminasas con la severidad de las lesiones histológicas, en algunos casos, no justifica la realización de la biopsia hepática. El criterio de la realización o no de la biopsia hepática, en los donantes asintomáticos o inactivos de los virus B o C de la hepatitis, no corresponde al patólogo, y lo esencial para el patólogo, es hacer con la mayor calidad el diagnóstico de cada biopsia hepática, lograr utilizar la clasificación actual de las hepatitis crónicas (33) y realizar la evaluación cuantitativa de las diferentes lesiones histológicas observadas en el cilindro hepático, que permite un estudio detallado de cada alteración y una valoración numérica de la actividad necroinflamatoria por una parte y de la reparación mediante la fibrosis separadamente (37); con los resultados expresados de la muestra estudiada el autor considera la necesidad de realizar la biopsia hepática en estos donantes.

El estudio detallado de las alteraciones histopatológicas hepáticas, en los casos con diagnóstico hepatitis crónica por biopsia, permite la valoración cuantitativa de estas alteraciones y siguiendo el método de Knodell (30), en la siguiente tabla, se presentan los resultados del estudio cualicuantitativo de estas biopsias, calculando índice de actividad histológica sin incluir la fibrosis.

Tabla 5 Resultados del Método de Knodell, en las hepatitis crónicas.

L. lobul.	Infl Portal	Necros, Perip.	Índice Actividad	Fibrosis
Virus B n=23	0,77	2,40	2,70	5,87
Virus C n=30	0,43	1,50	1,60	3,53

Fuente: Resultados de la investigación

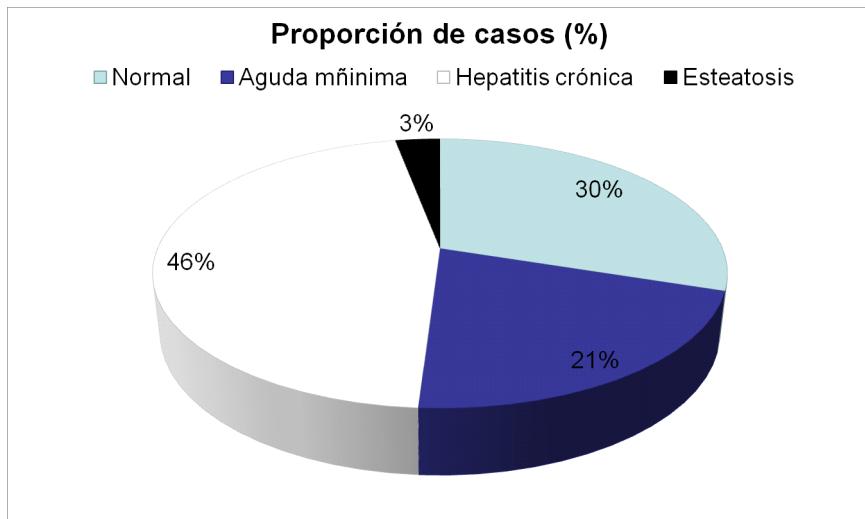
En el índice de actividad necroinflamatoria, en las hepatitis crónica de ambos grupos de donantes, la actividad necroinflamatoria 5,87, la necrosis periportal de 2,70 y el infiltrado de espacios porta de 2,40 de las biopsias de los donantes B, fue mayor que los valores obtenidos en el grupo C. Estos resultados cuantitativos confirman que las lesiones histopatológicas del virus B son mayores que los del virus C. En un estudio de 98 portadores asintomáticos (179), se reporta un índice de actividad histológica por el método de Knodell de 7,0 con 1,8 de fibrosis, en un área como Hong Kong donde existe una alta prevalencia de virus B. Otro trabajo (180) en 58 biopsias de portadores inactivos B, según el método de Ishak (34), reporta un índice de actividad histológica de 2,0 y una fibrosis de 1.4, no existiendo ninguna biopsia con una evaluación mayor de 6 en su actividad necroinflamatoria.

En cuanto donantes asintomáticos virus C, la utilización de métodos cuantitativos es usada en diferentes trabajos, con el método de Knodell (181), se reporta una media en el índice de actividad necroinflamatorias de 2,8 con 9 pacientes solamente con un índice mayor de 6; otra publicación reporta valores de 3,5 +0,8 para el índice de actividad necroinflamatoria y 1.5 +0,4 para la fibrosis (182). Obviad et al.(168) en su trabajo relaciona las cifras de ALAT, con la valoración de los diferentes alteraciones histológicas de la hepatitis crónica y obtiene que en el grupo con la ALAT doble de la cifra normal, tiene una valoración mayor de las lesiones necroinflamatorias y de la fibrosis.

Estos resultados confirman, lo útil que es la evaluación cuantitativa, de las diferentes lesiones histopatológicas de la hepatitis crónica, que se pueden asociar con los resultados de ALAT, que permiten tener un criterio de la evaluación de las lesiones y demuestran que en general las lesiones del virus C son menos severas.

En el grupo de donantes especiales por plasmaféresis, se obtuvieron los siguientes diagnósticos de las 63 biopsias estudiadas, que se presentan en el gráfico 3..

GRAFICO 3
RESULTADO DE BIOPSIAS DE DONANTES POR
PLASMAFERESIS C POSITIVOS N=63



Se observa que el 70% de las biopsias presentaban alteraciones histológicas relacionadas con el virus de la hepatitis C, a excepción de los dos casos de esteatosis; que representan solo el 3% de la muestra estudiada; es de destacar que el 21% de las biopsias tenían lesiones de daño celular y de necrosis de carácter agudo, que se clasificaron como hepatitis aguda mínima, como un resultado a señalar es que el 46% de las biopsias fueron de hepatitis crónica, lo que representa una elevada cifra de donantes de esta investigación con lesiones crónicas. (ver Gráfico 3) En la tabla siguiente se presentan los resultados histológicos y las cifras de ALAT, al momento de realizar la biopsia, en este grupo de donantes por plasmaféresis, infectados por el virus C.

Tabla 6 Resultados histológicos y cifras de ALAT en donantes por plasmaféresis

Clasificación	ALAT normal			ALAT elevada	
	n	No.	%	No.	%
histológica					
Hígado normal	19	17	89,47	2	10,52
H. aguda mínima	13	-	-	13	100
H. crónica	29	14	48,27	15	51,72
Esteatosis	2	-	-	2	100
Total	63	31	49,20	32	50,80

Fuente: Resultados de la investigación

En este grupo de donantes especiales por plasmaféresis, 31 donantes presentaban cifras normales de ALAT para el 49,20 % de la muestra, .mientras que el 100% de las diagnosticadas como hepatitis aguda mínima presentaban la ALAT elevada. Se destaca que el 48,27% del total de las 29 biopsias de hepatitis crónica en estos donantes, tenían cifras de ALAT normales , lo que justifica la necesidad del estudio de estos donantes mediante una biopsia hepática.

En la siguiente tabla se relaciona la clasificación histológica de las hepatitis crónicas, con las cifras de ALAT normales y elevadas, en este grupo de donantes por plasmaféresis.

Tabla 7 Relación de biopsias de hepatitis crónica y cifras de ALAT en donantes por plasmaféresis.

Clasificación	ALAT Normal			ALAT Elevada	
	total	n	%	n	%
histológica					
H.C. mínima	12	8	66,66	4	33,33
H.C. leve	5	3	60	2	40
H.C. moderada	7	2	28,57	5	71,42
H.C. severa	5	1	20	4	80
Total	29	14	48,27	15	51,72

Fuente: Resultados de la investigación

Los resultados de la tabla muestran, que las hepatitis crónicas, clasificadas como mínimas y leves, en el 64,70% tenían cifras de ALAT normales y que al aumentar, según la clasificación, las biopsias con mayor grado de lesión necroinflamatoria, se observan mayor número de donantes con cifras elevadas de ALAT; sin embargo el 25 % de las moderadas y severas presentaban cifras normales de ALAT.

El estudio de los donantes especiales por plasmaférésis portadores del virus C de la hepatitis, demostró que presentaban alteraciones histológicas relacionados con el virus en el 70% de la muestra, en especial con el 46% de las biopsias catalogadas como hepatitis crónica y de ellos la mitad tenían cifras normales de ALAT. Al ubicarse las hepatitis crónica en la clasificación actual, se observa que los grados menores de lesión (HC mínima leve) tienen en general cifras normales de ALAT, mientras que las hepatitis crónica moderada presentan cifras elevadas de ALAT. Un resultado importante fue la presencia de lesiones histopatológicas con daño celular leve (balonamiento y acidofilia del citoplasma) y respuesta inflamatoria escasa en el lobulillo, con cifras de ALAT ligeramente elevadas, en los cuales la necrosis del hepatocito y la respuesta inflamatoria de los espacios porta fueron de muy poca intensidad y de limitada extensión, catalogadas por el aspecto histológico como aguda mínima. Estos resultados justifican el estudio de la biopsia hepática en estos donantes especiales, estando estos resultados en concordancia con lo obtenido por Laskus et al (183) que encontraron que el 77% de sus casos presentaban hepatitis crónica.

La realización de la biopsia hepática en los donantes de sangre asintomáticos, con virus de la hepatitis, para la caracterización de las alteraciones histopatológicas hepáticas y la categorización de estos donantes, se considera de utilidad con los

resultados presentados en este trabajo investigativo. Se afirma la necesidad de la biopsia hepática, y el estudio detallado de la misma y su asociación con los resultados enzimáticos; pues es bien conocido que solamente por el estudio clínico, enzimático o virológico de estos donantes asintomáticos, no es posible determinar la presencia de alteraciones hepáticas o no. (166,184,185).

El bajo costo y la relativa seguridad de la biopsia hepática, el alto costo y la morbilidad de la terapia de Interferón, en combinación o no con otras antivirales; y los resultados de donantes con ALAT normales repetidas con alteraciones histológicas, demandan la realización del estudio biopsico inicial. Los resultados presentados en las diferentes tablas, en los dos grupos de donantes voluntarios de sangre, demuestran la utilidad de la biopsia hepática en la categorización de estos donantes, en conocer sí presentan o no enfermedad hepática, a pesar de no presentar sintomatología clínica o cifras anormales de la ALAT.

2.6 CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de diferentes lesiones histológicas y que la biopsia hepática es necesaria, para el estudio de donantes de sangre asintomáticos, para categorizarlos como enfermos, aún con cifras de ALAT normales.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO EN EL ESTUDIO DE LA HEPATITIS CRÓNICA VIRAL.

3.1 INTRODUCCIÓN.

Los resultados que se presentan en este capítulo, forman parte de un Proyecto Ramal de Investigación, cuyo código fue 98040079, terminado, discutido y enviado al grupo de expertos del Programa Ramal de Enfermedades Crónicas en el año 2005. En este capítulo, se propone la utilización de cuatro nuevas variables histológicas a evaluar (necrosis en puente, cuerpos acidófilos, conductillos biliares lesionados y número de espacios porta lesionados), y la variación del modo de cuantificar otras tres lesiones (necrosis periportal, inflamación portal y lesión lobulillar), como medio de evaluar de una forma más estricta y detallada, los cambios histológicos que se observan en el hígado, después de una terapéutica en las hepatitis crónicas por virus B o C.

Los resultados presentados en este capítulo, tienen sus antecedentes en otros proyectos de investigación desarrollados en el Instituto de Gastroenterología, relacionados con diferentes tratamientos en pacientes con hepatitis crónica B o C, en los que el estudio detallado de las alteraciones histológicas hepáticas, ha sido fundamental en la caracterización del enfermo y en la evaluación de la terapéutica.

De esa forma en relación a la eficacia de un tratamiento específico, se han realizado numerosas investigaciones (186-189), al asociar en la mayoría de ellas las cifras de ALAT con las alteraciones histológicas, se utilizó fundamentalmente el

índice de Knodell (30), también se han asociado las alteraciones histológicas esenciales de la hepatitis crónica, con el posible pronóstico de estos enfermos, pero en general de forma poco precisa (75,76,100-190,191).

En la literatura revisada no se utiliza una variable histológica de gran importancia, que sería no solo la intensidad de la respuesta necroinflamatoria de espacios porta, sino el número de espacios porta lesionados, ya que estas lesiones están diseminadas en la glándula hepática, pero no son homogéneas. La evaluación de cada espacio porta en varios cortes que se deben estudiar, en una biopsia con 6 espacios porta útiles, como mínimo, permite tener un criterio histopatológico más seguro, de la extensión y magnitud de la afectación de los espacios porta y por tanto de la lesión del hígado, pues no es igual la presencia del 100% de los espacios porta lesionados en una biopsia, que la afectación del 50%.

Otra variable histológica, que cuantitativamente otros métodos le dan poco valor es la presencia de la necrosis en puente, pues no se realiza una cuantificación del número de espacios porta involucrada en la lesión y la magnitud de la extensión de la misma, ya que se incorpora en la medición de la necrosis periportal al evaluarla en conjunto. Por la importancia de esta lesión, en la calificación de la actividad necroinflamatoria de cada biopsia y la evolución futura del área lesionada, debe categorizarse como una lesión independiente.

También es importante la evaluación en grados de las lesiones de daño celular, como la presencia de cuerpos acidófilos o células que han sufrido apoptosis y las lesiones que se presentan en los conductillos biliares, que constituyen importantes lesiones necroinflamatorias, producidas por los virus B o C de la hepatitis.

Es necesario valorar, de forma más uniforme, el proceso inflamatorio de espacios porta y de la necrosis periportal, utilizando una graduación hasta 5 diferentes categorías de evaluación. En el estudio de los cambios histológicos de los espacios porta, se realiza una evaluación integral de cada uno de ellos, observada en varios cortes, evaluando uno a cada vez y categorizar de esa forma el grado de lesión entre los diferentes niveles del corte histológico y se evalúa como un solo espacio porta, aunque se hayan estudiado 10 o más cortes del mismo espacio, y permite un mayor criterio de extensión de las lesiones. Las alteraciones necroinflamatorias del lobulillo, se evalúan en cinco categorías igualmente, para su mejor estudio.

Estas nuevas variables de medición y la modificación de la evaluación de otras utilizadas en otros métodos, permitirán comparar los resultados obtenidos con los obtenidos por el método de Knodell, asociarlos a la evolución de la ALAT post-tratamiento y evaluar la eficacia del método propuesto.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la precisión del IANIT y compararlo con el de Knodell.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Presentar una modificación del método de Knodell, con introducción de nuevas variables histológicas a evaluar y comparar los resultados entre ambos métodos, después de una terapéutica. .
- b) Determinar la reproducibilidad del método propuesto, en un segundo estudio por un mismo observador.

3.4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 200 pares de biopsias de adultos procedentes de casos de hepatitis crónicas sometidos a tratamiento antiviral sin tener en cuenta el tipo de

medicamentos y la dosis utilizada. La primera biopsia fue utilizada para hacer el diagnóstico de la enfermedad y la segunda, realizada a los seis meses o un año después de terminado el tratamiento, para evaluar los cambios histológicos que se presentaban. Cada biopsia, debía tener seis espacios porta como mínimo y realizarse 20 cortes de la misma, de esa forma se garantiza un material suficiente para el estudio detallado de las alteraciones histológicas. A las muestras de biopsia, se les realizaron las coloraciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Roque para el estudio de las lesiones.

De cada caso se obtuvieron los datos del tipo de virus y el resultado de las cifras de ALAT, en el estudio realizado coincidente con la primera biopsia. Se clasificó cada paciente en su forma de evolución de la siguiente forma: sí se normalizaron las cifras de ALAT en el momento de la segunda biopsia (respuesta completa o sostenida R.C.) sí disminuyeron las cifras a la mitad del inicio (respuesta incompleta R.I.) o sí permaneció o aumentó el valor de la ALAT (no respuesta N. R.) Es necesario señalar que solo se incluyó en este estudio los casos que al inicio presenten cifras de ALAT dos veces y media por encima de su valor normal, la segunda cifra de ALAT se tomó de 7 a 10 días antes o después de la segunda biopsia, el valor normal de ALAT fue hasta 40 U/L.

A cada biopsia se le realizó un estudio detallado de las alteraciones histológicas sin conocer, al momento del estudio, a qué paciente corresponde y sí es una primera o segunda biopsia. En una hoja de trabajo, después de evaluada cada biopsia se anotaba la cifra de ALAT, para después realizar la comparación, entre los resultados histológicos de cada biopsia y sus cifras de ALAT.

En el método de Knodell, en su forma original (30), a la suma de las lesiones se denominó índice de actividad histológica (IAH), incluyendo en esta evaluación también la fibrosis. En la evaluación del sistema que se propone en la investigación se utilizó el denominado índice necroinflamatorio total, (IANIT). En el sistema de Knodell se utilizaron solo las tres lesiones necroinflamatorias y para el IANIT, las siete lesiones necroinflamatorias señaladas. Al comparar los resultados de la primera y la segunda biopsia de cada caso de estos índices, se clasificó su resultado en mejor (M), igual (I) o peor (P) según disminuyó en dos puntos, era igual o se elevó en dos puntos la cifra obtenida entre las dos biopsias.

Los resultados de los índices para los dos sistemas (M I P) se compararon con la respuesta final de la ALAT (RC, RI, NR) de cada caso, para evaluar la asociación entre ambos resultados. Se compararon los resultados de la necrosis periportal, inflamación portal y lesión lobulillar del método propuesto en este trabajo, con la respuesta final ALAT, se agruparon los casos de respuestas incompleta con los no respondedores, considerándolos como no respuesta (NR), al estudiarlos en cada grupo de estudio.

Se utilizó el test de Chi cuadrado para la evaluación de la asociación entre la histología y la ALAT y el test de Student para la comparación de los resultados del valor de las medias del IANIT, entre ambas biopsias. La significación estadística fue alcanzada cuando se obtuvo un valor de $\alpha=0.05$. Todos los valores de P fueron de dos colas. Se realizó la comparación de ambos métodos de evaluación de las alteraciones histológicas, mediante el test de pruebas diagnósticas, que calcula la sensibilidad, especificidad, índice de precisión, valor predictivo positivo y negativo, razón de verosimilitud positiva y negativa y el índice de Youden, relacionados con las

cifras finales de ALAT; tomado como criterio de la verdad o prueba de oro, los resultados histológicos de ambos métodos según el siguiente planteamiento:

		HISTOLOGÍA	
		NORMAL	ANORMAL
MEJOR	A=VP	B=FP	
ALAT	-----		
PEOR O IGUAL	C=FN	D=VN	

Donde A = verdadero positivo(VP) B = falso positivo(FP)

C = falso negativo(FN) D = verdadero negativo(VN)

La sensibilidad sería A

$$\frac{A}{A+C}$$

La especificidad sería B

$$\frac{B}{B+D}$$

También se calculó el valor predictivo positivo y negativo según las fórmulas:

Valor Predictivo Positivo: VP o A

$$\frac{VP}{VP+FP} \quad \frac{A}{A+B}$$

Valor Predictivo Negativo: VN o D

$$\frac{VN}{VN+FN} \quad \frac{D}{D+C}$$

Se calculó la razón de verosimilitud positiva y negativa y la concordancia entre los resultados histológicos de ambos métodos, mediante la prueba del acuerdo observado o índice de concordancia de Kappa. Todos estos resultados calculados para un intervalo de confianza del 95 %.

Los grupos de estudio estuvieron constituidos de la siguiente forma:

Grupo	N	Virus	Terapéutica
I	24	C	Interferón más Ribavirina
II	26	C	Interferón
III	25	B	Interferón más Ribavirina

IV	45	B	Ribavirina
V	30	B	Interferón
VI	50	B	No tratado

El motivo de la investigación no fue evaluar la efectividad de cada terapéutica, por lo que no se señalan más detalles de cada tipo de terapéutica empleadas en los grupos señalados.

3.5 RESULTADOS

El índice de actividad necroinflamatoria (IANIT), propuesto en este trabajo representa la suma de todas las lesiones necroinflamatorias y consideramos que brinda una información real del daño celular y la respuesta inflamatoria, de esa forma en el sistema de Knodell se evalúan 3 lesiones y en el propuesto 7 lesiones, sin contemplar la fibrosis. Los resultados de la media del índice de actividad histológica de Knodell (IAH), y del índice de actividad histológica total del método propuesto (IANIT); de las 200 primeras biopsias y las 200 segundas, de ambos sistemas presentaron los siguientes resultados:

Tabla 1 Resultados del Índice de Actividad Histológica de ambos métodos

	1ra biopsia	2da biopsia		
Sist. Knodell (IAH)	5, 02	ns		4, 14
Sist. Propuesto (IANIT)	10, 00	P menor	0, 05	8, 58

En estos resultados se observa que las cifras obtenidas por el sistema de Knodell, son inferiores a las obtenidas por el sistema propuesto, lo cual es esperado al evaluar un número diferente de lesiones, sin embargo, al comparar los resultados entre ambas biopsias, se observa que por el sistema propuesto se obtuvo una

diferencia significativa entre la media de las 200 primeras y segundas biopsias, mientras que para el sistema de Knodell, no se obtuvo una diferencia significativa.

En la tabla siguiente, se presentan de forma diferenciada los resultados del índice de actividad histológica , entre ambas biopsias, por los dos métodos:

Tabla 2 Resultados del índice de actividad histológica por grupos de tratamiento.

Grupos	n	Knodell		Propuesto	
		1ra biopsia	2da biopsia	1ra biopsia	2da biopsia
I	24	4,66	ns	3,04	9,78 *
II	26	4,54	ns	3,34	10,23 *
III	25	5,92	ns	4,16	11,28 *
IV	45	6,09	ns	5,00	11,33 ns
V	30	4,23	ns	2,99	9,83 *
VI	50	4,52	ns	5,02	9,00 ns

* p menor de 0,05 ns no significativo

Fuente: Resultados de la investigación

En la tabla 2, se observa que en ninguno de los grupos, mediante el método de Knodell, se obtuvo una diferencia significativa de los valores de la media. Por el método propuesto se obtiene una diferencia significativa en cuatro grupos de tratamiento, en los grupos IV y VI no se obtiene una diferencia significativa. Este resultado es válido pues el grupo VI con una evolución natural de la enfermedad, por lo que no se esperan cambios histológicos importantes entre las dos biopsias y en el grupo IV, la terapéutica utilizada en general no fue suficientemente efectiva, para observarse cambios histológicos, entre las dos biopsias.

La utilización de los cambios que se producen en el índice de actividad histológica, después de una terapéutica determinada, sea cual fuere el método de cuantificar las lesiones, se emplea como indicador de la eficacia de un tratamiento, mediante la comparación de los resultados de la media aritmética del índice entre la primera

y la segunda biopsia, observándose en los resultados anteriores que el método propuesto tiene una mejor precisión en la detección de estos cambios.

La biopsia hepática es de un valor incuestionable en pacientes con hepatopatía crónica y en el caso de las infecciones virales, tiene un importante rol en establecer el estado de lesión hepática (192) y también constituye una herramienta importante en el pronóstico de la enfermedad (193). El sistema de Knodell (30) fue el primer método usado en la evaluación semicuantitativa de las lesiones histopatológicas de las hepatitis crónica. Este sistema es el más reportado en la literatura, más de 900 veces antes del año 2000 (37), a pesar de los defectos que se le señalan, (no usar en su evaluación una numeración continua, pues no tiene valores de 2) y mezclar en su índice de actividad histológica las lesiones necroinflamatorias con la fibrosis en la suma total de valores, aunque los primeros representan la actividad de las lesiones y la segunda el estadío de reparación.

Los resultados obtenidos en el sistema propuesto, expresados en las tablas anteriores, muestran ser un método más eficiente, para la evaluación más exacta de las alteraciones histopatológicas en la hepatitis crónica viral. La introducción del estudio de otras lesiones histológicas, no utilizados en la evaluación de otros sistemas como el número de espacios porta lesionados, la presencia de cuerpos acidófilos y de lesiones en conductillos biliares, además de la evaluación de la necrosis en puente como una lesión separada de la necrosis periportal, se considera que es clave en estos resultados.

Además la utilización de una numeración continua y la determinación de diferencias histológicas más exactas en la necrosis periportal, la inflamación portal y la lesión

del lobulillo, contribuye a una mayor precisión de este sistema. La separación de la fibrosis y la suma del valor de todas las lesiones necroinflamatorias, conducen a la introducción del término índice de actividad necroinflamatorias total (IANIT), que permite una evaluación más exacta de la actividad de alteraciones histopatológicas.

Los resultados del índice de actividad necroinflamatoria total entre la primera y segunda biopsia permite conocer si ha existido o no, un cambio en los valores de la intensidad de las lesiones necroinflamatorias y se pueden clasificar como una mejoría histológica (M), empeoramiento (P) al aumentar esta suma o sin cambio (I), al permanecer igual la cifra obtenida. En la siguiente tabla se presentan estos resultados en los dos sistemas estudiados.

Tabla 3 Resultados del índice de actividad histológica según grupos de tratamiento y métodos de cuantificación.

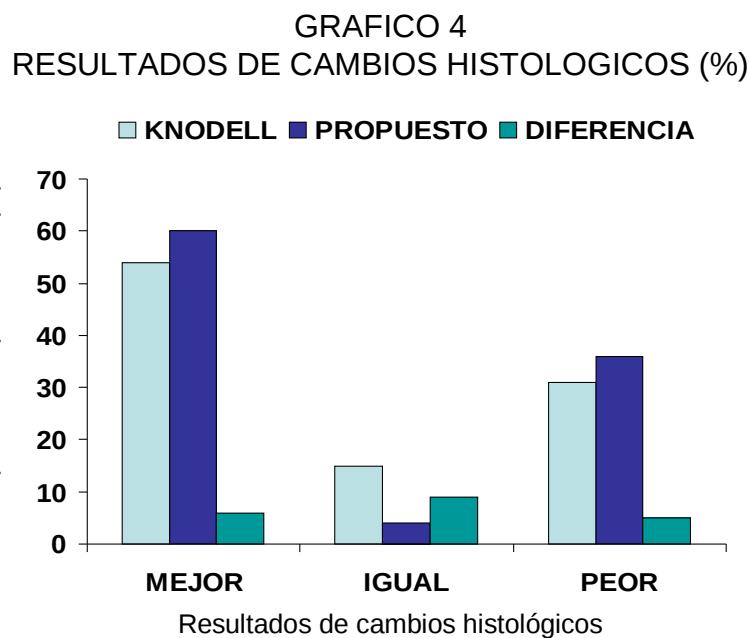
Grupo	Tto.	No.	Knodell			Propuesto			Coincidencia	
			M	I	P	M	I	P	Si	No
I y I C		50	31	8	11	37	2	11	38	12
I, IV y V B		100	64	10	26	63	3	34	84	16
VI B		50	13	12	25	20	2	28	30	20
Todos		200	108	30	62	120	7	73	154	46

M Mejor P Peor I Igual

Fuente. Resultados de esta investigación

Se observó en ambos sistemas un mayor número de casos con mejoría histológica, en los grupos del 1 al 5, que fueron los grupos tratados, y un empeoramiento del grupo VI que no recibió tratamiento. Sin embargo se observa con el sistema propuesto, que se obtiene una mejor diferenciación entre los casos con mejoría o empeoramiento histológico, al disminuir el número de biopsias con igual puntuación

en cada grupo estudiado. En la tabla se observa que no hay coincidencia en la detección de cambios histológicos mediante la cuantificación de la actividad necroinflamatorias, con un total de 46 casos, estando la mayor diferencia en aquellos en que no se detectan cambios, siendo de 30 en Knodell por 7 en el método propuesto. En el gráfico 4, se presentan los resultados de la actividad necroinflamatoria entre la primera y segunda biopsia, según el por ciento de casos en que se pudo detectar o no cambios histológicos en ambos sistemas.



En el gráfico 4 se observa, que el sistema propuesto permitió una mayor diferenciación entre los valores del IANIT entre la primera y la segunda biopsia al tener solo el 6,5% de biopsias sin cambios histológicos, contra el 15% con el sistema Knodell; este menor por ciento de biopsias con valores iguales del método propuesto permite, una mejor precisión o certeza en la determinación de los

cambios histológicos. El IANIT es un estudio más detallado de las alteraciones histológicas, con la inclusión de nuevas lesiones histológicas a evaluar, lo cual permite se clasifiquen un mayor número de biopsias con cambios histológicos.

Las pruebas de concordancia, permiten medir cuantos un procedimiento es preciso en su aplicación, el acuerdo observado o índice de concordancia, expresa el porcentaje de acuerdo de los resultados, mientras que el índice de Kappa es más preciso, al eliminar el error que se pueda introducirse por los observadores, al medir mediante datos la similitud o agrupamiento de los resultados obtenidos; se presentan los resultados obtenidos al evaluar los cambios histológicos entre ambos métodos, del índice de actividad necroinflamatoria, entre la primera y segunda biopsia:

Acuerdo observado 0,8182, Acuerdo esperado 0,7645

Kappa de Cohen 0,2281, Kappa mínimo -0,1000, Kappa Máximo 0,6480.

De esa forma el resultado expresado, con un índice de Kappa tan bajo demuestran la pobre concordancia de los resultados de ambos métodos, al tener el Knodell 30 casos con iguales resultados en ambas biopsias.

Otra forma de evaluar la precisión o certeza de los resultados de un método diagnóstico, es compararlo con los resultados de un método similar ya conocido, que es usado como prueba de oro. En esta investigación, mediante la comparación de los resultados de la denominada actividad histológica del método de Knodell con los resultados del IANIT del método propuesto, hemos calculado la sensibilidad, la

especificidad, valores predictivos y demás componentes del test estadístico, con un índice de confianza del 95%, con los siguientes resultados:

<u>Variable estadística</u>	<u>Resultado</u>	<u>I.C.95%</u>
Sensibilidad	98,12%	93,53%-99,52%
Especificidad	61, 82%	70,57%-81,04%
Valor predictivo positivo	84,17%	76,82%-79,56%
Valor predictivo negativo	96,22%	87,25%-99,06%
Índice de Validez (Precisión)	87,76%	82,18%-91,73%
Índice de Youden	0,74	
Razón de Verosimilitud Positiva	3,48	2,40-5,06
<u>Razón de Verosimilitud Negativa</u>	<u>0,03</u>	<u>0,01-0,10 n=200</u>

Los resultados de esta comparación demuestran la certeza del método propuesto, para la correcta evaluación en los cambios de las alteraciones histológicas, al obtener altas cifras en la sensibilidad, valores predictivos, precisión, índice de Youden y razón de verosimilitud positiva. También el cálculo de falsos positivos fue adecuado para este tipo de prueba diagnóstica con un 28,24% y el de falsos negativos fue excelente con 1,96%. Los resultados presentados demuestran la utilidad del método propuesto, en la muestra de biopsias hepáticas estudiadas y su mayor precisión en la determinación de los cambios histológicos, que el método de Knodell, lo que se considera por una mejor metodología de evaluación de la lesiones histológicas y la introducción de nuevas lesiones a evaluar.

Por otra parte, la evaluación de la ALAT es la señal esencial de la necrosis de los hepatocitos en la hepatitis crónica viral y su utilización en el diagnóstico y evolución de la enfermedad, se asocia en diferentes trabajos con las alteraciones histológicas, por lo que el estudio detallado de la biopsia hepática es imprescindible principalmente para la valoración de la biopsia diagnóstica inicial y en la evaluación de un ensayo clínico, como lo demuestran varias publicaciones (4,49,185,194).

En la siguiente tabla, se presentan los resultados del por ciento de la asociación de los resultados de los índices de actividad necroinflamatoria y la ALAT final.

Tabla 4, Asociación de los resultados de índices (M I P) y ALAT final (RC.y RI-NR)

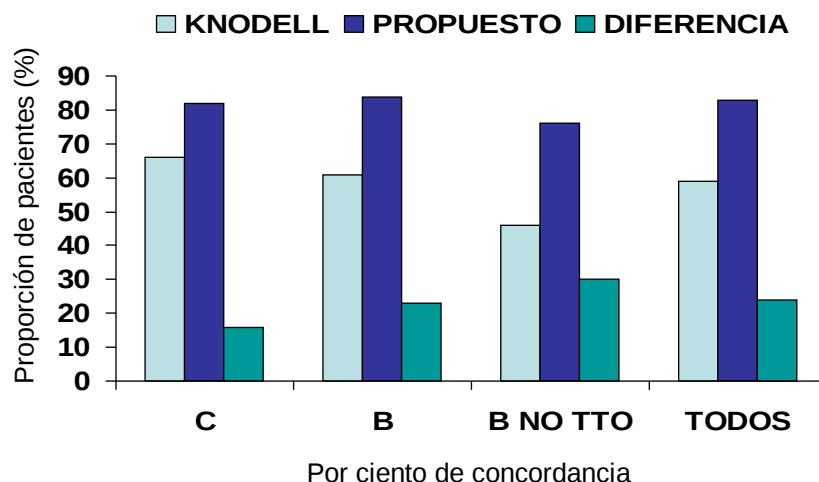
Grupo de Tto.	N	S. Knodell	S. Propuesto
I y I	C = 50	33-66 %	P - 0,05
I, IV,V	B = 100	61-61 %	P - 0,05
VI	B = 50	23-46 %	P -0,05
<u>Todos</u>	<u>= 200</u>	<u>117-58,5 %</u>	<u>P - 0,05</u>
			<u>163-81,5 %</u>

IANIT Índice de actividad necroinflamatoria total M Mejor I Igual P Peor

Fuente: resultados de esta investigación

Estos resultados demuestran, que el sistema propuesto tiene una mayor asociación tanto en los casos tratados, como no tratados, entre la respuesta enzimática con la respuesta histológica, se observa que en el método propuesto el 81,5% de los casos se presenta una asociación enzimática-histológica, y solo en el 58,5% en el sistema de Knodell en la muestra total; lo que es igual por grupos de tratamiento, de modo que el sistema propuesto permite una mejor categorización de los cambios histológicos, al realizar con una mayor precisión la determinación de estos cambios, entre la primera y segunda biopsia de cada paciente (ver Gráfico 5).

GRAFICO 5
CONCORDANCIA DEL IANIT Y LA ALAT
FINAL(%)



De lo observado en la Tabla 4 y en el Gráfico 5, en el sistema de Knodell hubo 83 casos de no asociación enzimática-histológica contra 37 del método propuesto, es de señalar que 31 del método de la investigación coincidieron con Knodell en la no asociación y solo en 6 casos por sí mismo; mientras que en Knodell fueron 52 en los que no se observó la asociación por este método de cuantificación.

Los resultados obtenidos por el propuesto, mostró una buena asociación con las cifras de ALAT de los casos estudiados, siendo superior a los obtenidos al compararlo con el sistema de Knodell. El comportamiento similar de la evolución del índice de actividad necroinflamatorias y la respuesta ALAT final en los diferentes grupos de tratamiento, con un por ciento mayor del método propuesto, si existía un mejoramiento histológico con una respuesta completa enzimática y un empeoramiento histológico con una respuesta incompleta o no respuesta, demuestra la utilidad de este método, lo cual también se observó en los resultados

numéricos del índice de actividad necroinflamatoria total .Se ha demostrado la utilidad de estos resultados, en la evaluación de ensayos clínicos de hepatitis crónica B y C, en el Instituto de Gastroenterología en publicaciones (195-196), al igual lo que ha sido reportado en numerosas publicaciones (197-202).

Los resultados de ambos métodos de evaluación de las lesiones histológicas, con los resultados finales de la ALAT, se analizan mediante tests de comparación de pruebas diagnósticas, utilizando los resultados histológicas o como prueba de oro.

	<u>Sistema Propuesto</u>	<u>Sistema de Knodell</u>
Sensibilidad	78,00%	71,88%
Especificidad	88,00%	72,22%
Índice de validez (Precisión)	81,33%	72,00%
Valor predictivo positivo	92,86%	82,14%
Valor predictivo negativo	66,67%	59,09%
Índice de Youden	0,66	0,44
Razón de verosimilitud positiva	6,50	2,59
<u>Razón de verosimilitud negativa</u>	<u>0,25</u>	<u>0,39</u> n =150

En los resultados presentados de la comparación de la ALAT final, con los resultados histológicos de ambos sistemas en los 150 pacientes que recibieron tratamiento, se observa que en todos los indicadores evaluados el sistema propuesto mostró mejor resultados que el sistema de Knodell, al obtener en todos la ALAT mayores por cientos de asociación con los resultados histológicos; en el estudio realizado añadiendo los 50 pacientes que no recibieron tratamiento, los resultados también fueron superiores en el método propuesto. Estas pruebas de

comparación de métodos diagnósticos permite conocer la precisión o certeza de una prueba con relación a otra, demostrando estos resultados que el método propuesto es más efectivo que el Knodell.

Con el método propuesto, se pueden utilizar los valores de los principales lesiones histopatológicas comparando ambas biopsias y analizando la respuesta enzimática en respondedores y no respondedores según los resultados de la ALAT final.

Tabla 5 Resultados de la media de los valores de lesiones histológicas y del IANIT según respuesta al tratamiento en los grupos de estudio. X Media SDesv.Standard

*P menor 0,05		Grupo I		n=24		C		Inf.+Rib			
Lesión	Histológica	Respondedores		n=19		no		Respondedores		n=5	
X	X	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Necrosis periportal		*1.52(1.17)		0.84(0.83)		2.60(1.51)		2.60(1.67)			
Inflamación portal		*2.78(1.63)		1.47(1.38)		2.60(1.41)		2.60(0.89)			
Lesión Lobulillar		0.68(0.82)		0.31(0.67)		0.80(1.30)		0.60(0.89)			
IANIT		*9.78(3.05)		5.00(3.92)		9.80(5.00)		10.60(2.50)			
Fibrosis		0.84(0.83)		0.84(0.83)		1.60(1.34)		1.20(1.09)			

*P menor 0.05		Grupo II		n=26		C		Inf.	
Lesión	Histológica	Respondedores n=19		no Respondedores n=7					
		X	S	X	S	X	S	X	S
Necrosis periportal		*2.00 (1.41)		0.93 (1.09)		1.72 (1.19)		1.90 (1.04)	
Inflamación portal		*2.40 (1.05)		1.46 (1.18)		2.63 (0.80)		2.45 (1.21)	
Lesión Lobulillar		0.93 (1.03)		0.33 (.072)		1.00 (1.09)		0.45 (0.52)	
IANIT		*10.40(2.84)		5.20 (3.91)		10.00 (4.07)		9.45 (4.65)	
Fibrosis		1.00(1.00)		0.93 (0.79)		1.27 (1.48)		1.63 (1.50)	

*P Menor 0,05	Grupo III		n=25		B		Inf. + Rib	
	Respondedores n=17		no Respondedores		Respondedores n=8			
	X	S	X	S	X	S	X	S
Necrosis periportal	*2.88 (1.82)		1.82 (1.51)		2.75 (1.25)		3.12 (1.03)	
Inflamación portal	2.58 (1.03)		2.17 (0.92)		2.12 (1.03)		2.75 (0.80)	
Lesión Lobulillar	*1.53 (1.21)		0.58 (0.94)		1.25 (1.16)		0.87 (0.93)	
IANIT	*12.05 (3.93)		8.23 (4.31)		9.75 (2.72)		10.87 (1.96)	
Fibrosis	1.76 (1.32)		1.41 (1.47)		1.50 (1.83)		1.75 (1.47)	

* P Menor 0,05	Grupo IV		n=45		B		Rib.	
	Respondedores n=20		no		Respondedores n=25			
	X	S	X	S	X	S	X	S
Necrosis periportal	*3.15 (1.75)		1.70 (1.98)		2.68 (1.17)		3.08 (1.24)	
Inflamación portal	*2.80 (0.65)		1.60 (0.86)		2.36 (1.19)		2.88 (0.36)	
Lesión Lobulillar	*1.15 (1.01)		0.45 (0.40)		1.24 (0.92)		1.84 (0.72)	
IANIT	*12.00 (3.71)		3.35 (4.17)		10.84 (3.55)		12.76 (3.17)	
Fibrosis	1.95 (1.21)		1.80 (1.33)		1.08 (1.00)		1.56 (1.21)	

*P Menor 0,05	Grupo V		n=30		B		Inf.	
	Respondedores=17		no Respondedores		n=13			
	X	S	X	S	X	S	X	S
Necrosis periportal	*288 (0.99)		1.00 (0.79)		2.07 (1.03)		2.30 (1.18)	
Inflamación portal	*2.41 (0.79)		1.64 (0.99)		2.00 (0.70)		2.23 (0.59)	
Lesión Lobulillar	*0.52 (0.42)		0.05 (0.24)		1.00 (0.91)		1.07 (1.75)	
IANIT	*10,23 (2.53)		5.58 (2.85)		9.30 (2.52)		9.61 (2.90)	
Fibrosis	2.01 (1.32)		1.83 (1.39)		1.87 (1.28)		2.13 (1.41)	

		* P Menor 0,05		Grupo VI		n=50		B		No Tto.	
Lesión	Histológica	Respondedores n=13		no		Respondedores		n=37			
		X	S	X	S	X	S	X	S		
Necrosis periportal		1.84	(1.40)	1.76	(1.30)	2.29	(1.22)	2.67	(1.15)		
Inflamación portal		2.38	(1.04)	2.23	(1.01)	2.08	(0.98)	2.43	(0.86)		
Lesión Lobulillar		1.00	(1.00)	0.38	(0.50)	0.86	(0.84)	0.91	(0.86)		
IANIT		9.84	(3.93)	7.84	(3.41)	*8.97	(3.45)	10.31	(3.52)		
Fibrosis		1.46	(1.37)	1.69	(1.37)	1.24	(1.18)	1.75	(1.23)		

Los resultados que se observan en los grupos de tratamiento, confirman la utilidad del cálculo del índice necroinflamatorio total propuesto en la metodología de esta investigación, pues existe una diferencia significativa entre el IANIT de la primera y segunda biopsia de todos los grupos en los pacientes respondedores, mientras que en el grupo no tratado, esta diferencia se observa en pacientes sin respuesta enzimática. La necrosis periportal con la modificación propuesta en su evaluación, también muestra una diferencia significativa, en los pacientes respondedores en todos los grupos tratados; mientras que la inflamación portal y la lesión lobulillar se observa con iguales resultados en cuatro grupos de tratamiento.

La reproducibilidad de un sistema de cuantificación de lesiones histológicas es esencial para el trabajo diario del patólogo; en cuanto a las hepatitis crónicas virales, los resultados obtenidos al comparar diferentes métodos, demuestran que no se produce diferencias significativas en los resultados, Goldin (203), compara en un estudio el sistema de Knodell y el de Scheuer, encuentra una buena

concordancia en los resultados, tanto en relación a la fibrosis como en la actividad necroinflamatoria, sin variaciones para un mismo observador o para varios.

La propuesta del método de cuantificación de las alteraciones histopatológicas de la hepatitis crónica, fue evaluado en el estudio primero de su comparación con el método de Knodell en los 200 pares de biopsias y posteriormente al comparar las mismas 400 láminas con el método de Ishak, permitió evaluar nuevamente todas las láminas histológicas mediante el método de cuantificación propuesto, en la comparación del valor de la media de la actividad necroinflamatoria total o índice de actividad histológica (IANIT). Esto posibilitó evaluar la variabilidad de cuantificación de los diferentes alteraciones por el mismo observador en dos estudios diferentes, separados meses entre uno y el otro.

Los resultados del índice de actividad necroinflamatoria del primer estudio, fueron de 10,05 para la primera biopsia y de 8,58 para la segunda, en el segundo estudio fue de 10,24 y 8,77 respectivamente. Estos resultados fueron prácticamente iguales, con valores de 0,09 y 0,19 de diferencias, para las medias entre las dos mediciones de la primera y los dos de la segunda biopsia, lo que demuestra que no hubo variaciones en la cuantificación de las lesiones en ambos estudios al utilizar el método propuesto en este trabajo. Otra forma de comparación de si hubo variabilidad de los resultados, por el mismo observador en los dos estudios, es el análisis de si hubo mejoría, empeoramiento o permaneció igual, el índice necroinflamatorio, al comparar el resultado en los 200 pares de biopsias lo cual se presenta en las siguientes tablas.

Tabla 6 Resultados del IANIT en dos estudios por un mismo observador(número)

Grupos	1er Estudio				2do Estudio		
	N	M	I	P	M	I	P
I y II C	50	37	2	11	37	2	11
III, IV y V B	100	63	3	34	63	4	33
VI B	50	20	2	28	20	4	26
	200	120	7	73	120	10	70

N Número M Mejor P Peor I Igual Fuente: Resultados de esta investigación

Los resultados presentados, demuestran que para cada grupo de estudio y en el total de biopsias comparadas, no existieron variaciones en los resultados en los dos estudios, tanto en los que presentaron mejoría o empeoramiento; en el segundo estudio 10 casos permanecieron igual, contra 7 en el primero. Estos resultados demuestran, que el método propuesto, utilizado por el mismo observador, no mostró variabilidad en la cuantificación de las lesiones histológicas, pues solo el 1,5% de las 200 biopsias presentaron diferente clasificación.

La utilización de las pruebas de concordancia, también evalúan la variabilidad de un observador, al repetir un estudio con el mismo método de cuantificación. Al evaluar estas pruebas estadísticas obtuvimos los siguientes resultados:

Acuerdo observado:0,9709, Acuerdo esperado:0,8818

Kappa de Cohen: 0,7537, Kappa Mínimo: -0,0148, Kappa Máximo 0,9418.

Estos resultados, con las altas cifras obtenidas en el Acuerdo observado y el Kappa validan la reproducibilidad del método propuesto, la buena precisión o certeza en sus resultados y la no variación intraobservador al utilizar este método.

El problema de la variación por el observador, en la cuantificación de las lesiones de la hepatitis crónica, es bien conocido, desde hace tiempo (204), sin embargo

con varias precauciones, se puede llegar a un aceptable nivel de seguridad y concordancia entre diferentes observadores o un solo observador. Un punto importante es la buena definición de los criterios, de la evaluación de cada lesión, que tiene que estar bien explícita en el sistema de medición que se utiliza, además de la reproducibilidad del mismo y su simplicidad. Otro punto importante, para los protocolos terapéuticos con diferentes medicamentos, es el estudio de la biopsia sin datos clínicos y el diagnóstico de las diferentes muestras de cada paciente en un mismo momento, sin conocer su orden y realizar este estudio en conjunto con varios casos (78), lo cual reduce el error del observador, haciendo más realizablemente segura la cuantificación de las lesiones.(205) .

El estudio en sesiones de trabajo de 15 a 20 pares de biopsias por sesión y no separada de muchos días entre ellos, permiten una similar evaluación de cada biopsia y una reducción del posible margen de error en la interpretación de las lesiones, que es la forma que se realizó este trabajo.

Los resultados de la media del índice de actividad histológica total, en las dos evaluaciones de la primera y segunda biopsia, no mostraron diferencia en sus puntuaciones, lo que demuestra la reproducibilidad del método utilizado. Los resultados similares de la media del índice de actividad histológica y la no variabilidad en la cuantificación de las lesiones histopatológicas, obtenidos en las dos evaluaciones de las 400 biopsias, demuestran la validez y reproducibilidad de la metodología empleada, utilizada por un mismo observador y con experiencia en la cuantificación de lesiones histopatológicas hepáticas.

Se debe señalar que por las características de este trabajo investigativo, para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias Médicas, el estudio ha sido realizado

como trabajo propio o individual, no planificándose la participación o evaluación de la metodología propuesta por varios observadores. Como se señala en la literatura revisada los conocimientos, preparación y experiencia del observador, minimiza la posibilidad de variaciones en la cuantificación de las lesiones histopatológicas entre diferentes observadores (70,78,113), En Cuba la variabilidad interobservadores ha sido mínima, en la práctica diagnóstica y de evaluación de lesiones, utilizando el sistema de Knodell en protocolos terapéuticos por parte de patólogos dedicados al estudio del hígado de los departamentos varios hospitales.

La utilización de los sistemas de graduación de las lesiones necroinflamatorias y de estadiamiento de la fibrosis en la hepatitis crónica, constituye una necesidad, para su asociación con el comportamiento clínico y enzimático de estos enfermos. Uno de los trabajos más recientes (206) al comparar dos sistemas diferentes de medición en hepatitis crónica B y C, encuentra una adecuada correlación entre la medición de la actividad necroinflamatoria y de la fibrosis de los dos sistemas con las cifras de transaminasas séricas. Se han señalado inconvenientes en estos sistemas de medición, como serían que los números obtenidos al evaluar cada alteración histopatológica, constituyen mediciones subjetivas y que pueden tener variaciones entre el mismo observador o en diferentes observadores (36,78,).

En el IANIT, se considera que este margen de error, señalado por la posible subjetividad de la evaluación, se supera o disminuye, al definir de una forma clara, precisa, sencilla y reproducible las diferentes alteraciones histopatológicas que, de forma separada reciben diferentes calificación numérica en las siete lesiones necroinflamatorias evaluadas. También favorece este resultado la evaluación

numérica de las lesiones necroinflamatorias de 0 a 4 y de 0 a 3, según el tipo de lesión, lo que permite una fácil clasificación de las mismas.

Se considera que el sistema propuesto es útil, reproducible para un patólogo general con poca experiencia en estas mediciones y que al observar en varios cortes histológicos las diferentes lesiones, permite una mejor evaluación de las mismas y ser utilizado en el diagnóstico de estas biopsias, en la evaluación de diferentes tratamientos sujetos o no a ensayos clínicos y además pueden ser usados como pronóstico de las hepatitis crónica B y C.

3.6 CONCLUSIONES

La introducción de nuevas variables histológicas (necrosis en puente, número de espacios porta lesionados, cuerpos acidófilos y conductillos biliares lesionados), permitió una mejor valoración del daño celular y la respuesta inflamatoria.

La asociación entre el resultado de la actividad necroinflamatoria y la respuesta ALAT final, fue más precisa en el IANIT que en el método de Knodell.

Se determinó la reproducibilidad del método propuesto por un mismo observador, al obtener resultados similares en la evaluación del IANIT.

CAPITULO 4

VALIDACIÓN DEL NUEVO SISTEMA EMPLEADO (IANIT)

4.1 INTRODUCCIÓN

La utilización de los sistemas o métodos de cuantificación, de las alteraciones histológicas, en las hepatitis crónicas virales, es de suma importancia en la evaluación de la efectividad de una terapéutica determinada y la confirmación de su reproducibilidad en diferentes métodos ha sido probada. El método de Ishak, ha demostrado su reproducibilidad en varias publicaciones (206-209), es uno de los más utilizados actualmente. La modificación propuesta por Ishak (34) del índice de actividad histológica de Knodell (30), se ha estado utilizando en numerosas publicaciones en los últimos 10 años, en la evaluación de alteraciones histológicas de enfermos con diferentes tratamientos.

Este índice modificado con una puntuación máxima de 18, evalúa cuatro grupos diferentes de lesiones necroinflamatorias; mientras que la propuesta de modificación presentada en el capítulo anterior, evalúa siete grupos de lesiones necroinflamatorias, separando y evaluando algunas alteraciones de forma individual; la comparación de los resultados de la actividad necroinflamatoria del índice propuesto en esta investigación, con los resultados del propuesto por Ishak; aceptado y utilizado por diferentes grupos de trabajo; permitiría determinar si los

valores obtenidos en el IANIT, se corresponden con el de Ishak y de esa forma, considerar como válida y útil la metodología de cuantificación de esta investigación. El motivo de este capítulo es el estudio de la validación del método propuesto, en la comparación con el método de Ishak, en la valoración de las lesiones del tejido hepático en las hepatitis crónicas B o C, después de una terapéutica.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la validez del método propuesto, en comparación del método de Ishak.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar los resultados de los índices de actividad histológica entre las primeras y segundas biopsias de ambos métodos.

Comparar las variaciones del índice de actividad histológica al final de una terapéutica y asociarlos al valor de la ALAT, entre ambos métodos

Comparar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo y razón de verosimilitud de ambos métodos, tomando como patrón de comparación la histología.

4.4 MATERIAL Y MÉTODOS

Además, de los 200 pares de biopsias, se evaluaron 93 pares de biopsias más, provenientes de otros dos protocolos terapéuticos, catalogados como:

Grupo VII B: n = 43 Interferón más Lamivudina

Grupo VIII C: n = 50 Interferón más Ribavirina

Se determinó el índice de actividad histológica total por cada par de biopsias, se reunieron en cada grupo, para ambos sistemas de medición utilizados y se agruparon por tipo de virus, por grupos de casos con ALAT normal al final del 6

meses de terminado el tratamiento, en los cuales se calculó la media del índice y se compararon los resultados de ambos sistemas, y se aplicó el test de Student para muestras pareadas, para determinar diferencias estadísticas entre ambas biopsias por grupo, para cada sistema con una significación de menos de 0,05. En ambos sistemas, se determinó los resultados del índice de actividad histológica y se clasificó en mejor (M), igual (I) y peor (P) según disminuyera entre la primera y segunda biopsia, permaneciera con igual valor o aumentara en la segunda biopsia y se compararon los resultados obtenidos en ambos sistemas. También, se comparó la asociación entre el resultado del índice de actividad histológica y los valores de ALAT final, entre ambos sistemas en los grupos de tratamiento, el no tratamiento y todos los pares de biopsias.

Se utilizó el test de Chi cuadrado para la evaluación del resultado de la asociación en por ciento y el test de Student para la comparación de los resultados del valor de las medias del IANIT, entre ambas biopsias, en cada test estadístico con una significación menor de 0,05. Se realizó la comparación de ambos métodos de evaluación de las alteraciones histológicas, mediante el test de pruebas diagnósticas, que calcula la sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo y negativo, razón de verosimilitud positiva y negativa y el índice de Youden, relacionados con las cifras finales de ALAT; tomado como criterio de la verdad o prueba de oro, los resultados histológicos de ambos métodos

Se calculó la razón de verosimilitud positiva y negativa y la concordancia entre los resultados histológicos de ambos métodos, mediante la prueba del acuerdo observado o índice de concordancia. Todos estos resultados calculados para un intervalo de confianza del 95 %.

4.5 RESULTADOS

En la siguiente tabla, se presenta el resultado de los dos métodos del índice de actividad necroinflamatoria.

Tabla 1 Relación entre el IANITY el IAH de Ishak según ALAT en grupos de tratamiento.

<u>Grupos</u>	<u>n</u>	<u>M. Propuesto</u>		<u>M. Ishak</u>	
		<u>1ra Biopsia</u>	<u>2da Biopsia</u>	<u>1ra Biopsia</u>	<u>2da Biopsia</u>
Todos (I-VIII)	293	8,91 - 7,24ns		5,17 - 4,21ns	
Tratados (noVI)	243	*9,06 - 6,75		*5,15 - 3,92	
Tratados ALAT normal	154	*9,30 - 5,00		*5,10 - 2,70	
Tratados B ALAT normal	86	*9,73 - 5,83		*5,75 - 3,24	
Tratados C ALAT normal	68	*8,32 - 3,94		*4,28 - 2,03	
ns no significativo		* P menor 0.05			

Fuente: Resultados de esta investigación

Los resultados presentados en la tabla 1, demuestran la similitud de los resultados del índice de actividad histológica de ambos métodos, su utilidad en la evaluación cuantitativa de las lesiones histológicas entre la primera y segunda biopsia en los enfermos tratados con diferentes terapéuticas y que normalizan las cifras de ALAT, en que disminuyen sensiblemente los valores del índice en ambos métodos entre las dos biopsias y permiten con esta similitud de resultados, plantear que el método propuesto se puede considerar igualmente válido, como el de Ishak.

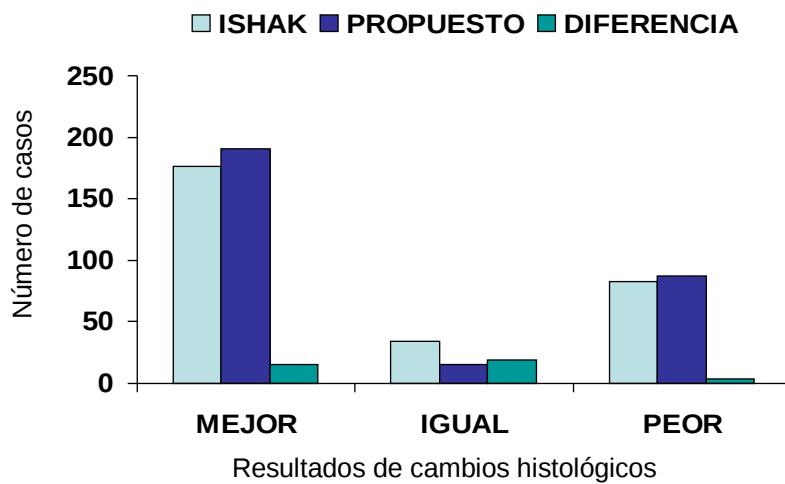
Los resultados del índice de actividad histológica total entre la primera y segunda biopsia, permite conocer si existen cambios en los valores del mismo, si hay mejoría histológica (M), si hay empeoramiento histológico (P), o si no hay cambios en su valor (I); en la tabla 2 y en el gráfico 6 se presentan los resultados comparativos de ambos métodos de estudio en por ciento y en números totales

TABLA 2 Resultados del IANIT y del IAH de Ishak entre ambas biopsias (%)

Grupos	n	M. Propuesto			M. Ishak		
		M	I	P	M	I	P
Tto Grupos C (I-II-VIII)	100	79	4	17	71	14	15
Tto Grupos B (III-IV- VII)	143	64,3	4,9	31,8	60,8	9,8	29,4
No Tto Grupo (VI)	50	40	8	52	36	12	52
Total	293	63,2	5,1	29,7	60,1	11,6	29,3

N numero M Mejor P Peor I Igual Fuente: Resultados de esta investigación.

GRAFICO 6
RESULTADOS DE CAMBIOS HISTOLOGICOS
NUMEROS N= 293



En el análisis comparativo de los dos métodos en la tabla 2 y en el gráfico 6, se observa una similitud en el número de casos en que mejora o empeora el índice de actividad histológica. En relación, a las biopsias en que los valores del índice son iguales en la primera y segunda biopsia, el método de Ishak tuvo un resultado de 34 casos para 11,6% de la muestra total, en que no hubo cambios en el índice, mientras que en el método propuesto fue solo del 5,1% o 15 pares de biopsias, con igual valor del índice de actividad histológica.

Al utilizar las pruebas de concordancia, al comparar los cambios del índice de actividad necroinflamatoria en ambos métodos, entre las dos biopsias, se obtiene:

Acuerdo observado: 0,9006 Acuerdo esperado: 0,8033

Kappa de Cohen:0,4949 Kappa mínimo:-0,0523 Kappa máximo: 0,8032

Estos resultados de calificar con un alto resultado el Acuerdo Observado o Índice de Concordancia y un resultado aceptable (mayor de 0,40) del Kappa de Cohen, justifican la validación del método propuesto con el método de Ishak, según los resultados de la muestra de 293 pares de biopsias, de esta investigación.

La utilización de tests estadísticos en la comparación de pruebas diagnósticas, permite conocer cuan fiable es una de ellas al compararla, con una prueba ya reconocida. De esa forma se puede comparar los resultados del Índice de Actividad Histológica de Ishak, con los resultados el IANIT y determinar la confiabilidad del método propuesto en la categorización de los cambios histológicos, al calcular la sensibilidad, especificidad ,valores predictivos y precisión del método propuesto.

Variables Estadísticas	Resultados	I.C. 95%
Sensibilidad	97,64%	94,10-99,17%
Especificidad	78,91%	69,73-85,56%
Índice de Validez (Precisión)	90,97%	86,86-93,81%
Valor Predictivo Positivo	89,21%	83,73-92,51%
Valor Predictivo Negativo	94,98%	87,74-98,00%
Índice de Youden	0,83	
Razón de Verosimilitud Positiva	4,64	3,14-6,85
Razón de Verosimilitud Negativa	0,03	0,01-0,08 n=293

Los resultados obtenidos con las altas cifras de la sensibilidad, valores predictivos, índice de Youden, en la razón de verosimilitud positiva y el índice de confianza y en las cifras del cálculo de falsos positivos de 21,11% y 2,43% de falsos negativos , permiten plantear la buena precisión o certeza del método propuesto, en la categorización de los cambios histológicos, al compararlo con el método de Ishak.

Los resultados presentados confirman, que el método propuesto es similar en su utilidad al de Ishak, al tener resultados muy similares en la evaluación del índice de actividad histológica, aunque el método propuesto tiene un menor número de casos, con igual valor de ambas biopsias, considerándose que puede ser resultado de la evaluación de siete alteraciones histológicas y no solamente de cuatro del método de comparación.

En relación al sistema de Ishak, se publica por Westin un estudio con 3 observadores, demostrando que no hay diferencias numéricas en los diferentes alteraciones histológicas que evalúan el sistema, plantea que es reproducible y que al compararlo con el sistema de Knodell da una información más detallada (207).

Otro trabajo (209) menciona la buena correlación entre el sistema de Metavir y de Ishak, con una mejor concordancia entre la fibrosis, que en la actividad necroinflamatoria. Rosario y Ramakrisna (206) en su trabajo realizado en la India, concluyen al comparar el sistema de Ishak con el de Metavir, que ambos sistemas son apropiados para la evaluación de biopsias de hepatitis crónica B o C. En un extenso estudio publicado en el 2005 (113), usando el sistema de Metavir, se compara la concordancia de la evaluación de las diferentes lesiones de la hepatitis crónicas, por más de 10 observadores, con diferencias, en sí son patólogos generales, con diferentes tiempos de trabajo o sí eran expertos en la interpretación

de biopsias hepáticas, concluyendo que el nivel de experiencia, relacionado a la especificación, duración en el trabajo y categoría del departamento en que trabaja, era lo que determinaba una mejor concordancia en la evaluación de las lesiones.

Usando el sistema de Metavir (70) se estudió por 10 patólogos expertos en enfermedades hepáticas, las variaciones de graduación de las lesiones de hepatitis crónica, con un buen grado de concordancia entre los diez, y con una mejor concordancia para cada observador al repetir el estudio de forma individual. El promedio de concordancia de un mismo observador, fue significativamente mejor, que la concordancia ínterobservadores, según reporta Gronbaerk (205) y en un estudio con dos observadores, se reporta en una segunda observación la diferencia de los grados de inflamación, con el sistema de Scheuer, fue del 0% y el 4% y el de la fibrosis del 6% y el 10% (112).

Estudios previos a lo citados, antes de conocer el virus C de la hepatitis, indicaban que era bajo el grado de error atribuible a la muestra de tejido hepático, en la graduación de la inflamación por un patólogo experimentado (5) y que el grado de variación en el análisis de las biopsias hepáticas era pequeño y bien determinado en cada alteración histopatológica (210), inclusive en comparaciones entre hepatitis crónica B o C o de tipo autoinmune (211).

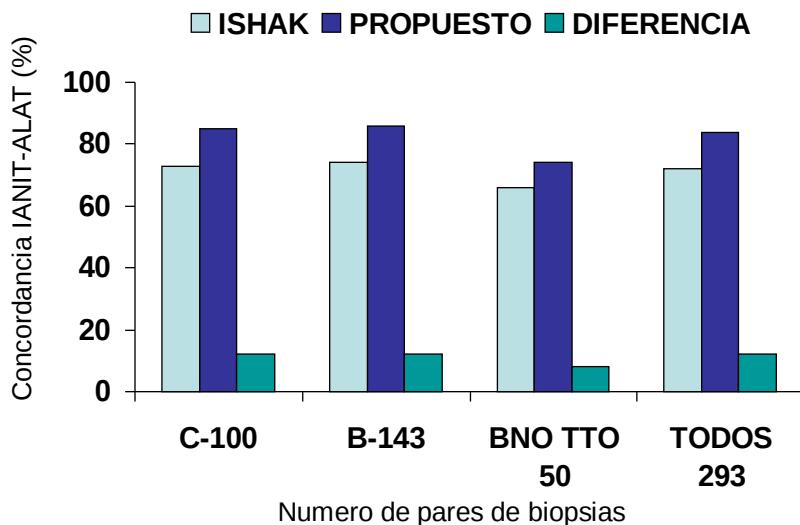
Seguidamente se presentan, los resultados de la asociación del índice de actividad histológica y la respuesta ALAT final, en ambos métodos utilizados, lo cual permite tener la evaluación de la utilidad de cada método y comparar entre ambos la asociación entre el comportamiento enzimático y el histológico.

TABLA 3 Asociación IANIT y IAH de Ishak(M.I.P.) y respuesta ALAT (RC-RI o NR).

Grupo	N	M. Ishak	M. Propuesto
Tto Grupo C=	100	73 - 73%	85 -85%
Tto Grupo B=	143	106- 74%	123-86%
No. Tto Grupo B=	50	33 - 66%	37 - 74%
Todos =	293	212 -72%	245 - 84%

Fuente: Resultados de esta investigación

GRAFICO 7
CONCORDANCIA DEL IANIT Y LA ALAT FINAL (%)



Los resultados de la tabla 3 y el gráfico 7, demuestran que el método propuesto, en cada grupo de virus tratados, como en la suma de todos los casos, tuvo una mejor asociación que el grupo de Ishak, en un 12%; aunque esta diferencia no fue significativa, lo que iguala los resultados obtenidos en ambos métodos. El análisis de la mejoría, igualdad o empeoramiento del índice necroinflamatorio y la respuesta ALAT se presenta en la siguiente tabla.

TABLA 4 Comportamiento del IANIT y IAH (M.I.P) y ALAT final (RC-RI o NR).

	Método Ishak			Método Propuesto			.
	IAH	RC	NR	IANIT	RC	NR	
C N=1 (I-II-VIII)	M=71 IP=29	56(79%) 12(42%)	15 (21%) 17 (58%)	M=79 IP=21	66(84%) 2(10%)	13(16%) 19(90%)	
B N= 143 (III-IV-V-VII)	M=87 IP=56	68(78%) 18(32%)	19(22%) 38(68%)	M=92 IP=51	79(86%) 7(14%)	13(14%) 44(86%)	
No Tto Grupo B (VI)	M=18 IP=32	7(39%) 6(19%)	11(61%) 26(81%)	M=20 IP=30	10(50%) 3(10%)	10(50%) 27(90%)	
Todos N =293	M=176 IP=117	131(75%) 36(31%)	45(25%) 81(69%)	M=191 IP=102	155(82%) 12(12%)	36(18%) 90(88%)	

IAH o IANIT Índice de actividad histológica total M Mejor I igual P Peor.

Fuente: Resultados de esta investigación

La Tabla 4 muestra como el método propuesto tiene una mejor, asociación entre la mejoría del índice de actividad necroinflamatoria y la normalización de ALAT y entre el empeoramiento histológico y la no respuesta enzimática, que el método de Ishak, tanto en los grupos separados, como en el análisis global de todos los grupos; en que mejor índice y respuesta completa fue del 82% de los casos, versus 75% en Ishak y empeoramiento histológico y no respuesta del 88% y solo 69% en el método de Ishak. Estos resultados, aunque con una mayor certeza en detectar los cambios histológicos en el método propuesto, validan la precisión del mismo, al no observarse grandes diferencias al compararlo con el método de Ishak.

Mientras se acepta que la biopsia hepática es la más segura o exacta prueba, para medir la severidad de una enfermedad hepática (9), la ALAT es la mejor prueba enzimática, para detectar enfermedad hepática. Las cifras elevadas de ALAT, se asocian con la presencia de alteraciones histopatológicas hepáticas en el curso de las hepatitis crónica B y C (212,213), al ser la elevación de la ALAT la mejor

indicación de necrosis del hepatocito (214). Esta asociación es utilizada como un elemento esencial en la actualidad en la evaluación de las terapéuticas en hepatitis crónica B o C (215,216). Los resultados de esta investigación referidas a las alteraciones histológicas, y su comparación de la ALAT antes y después de una terapéutica, demuestran de la utilidad del método en la precisión de los cambios histológicos.

. La comparación de ambos métodos con los resultados histológicos obtenidos en los mismos, se pueden medir mediante la comparación de tests de pruebas diagnósticas, tomando como patrón los resultados histológicos y evaluar como se comportaron las cifras e ALAT.

Tabla5 Resultados de Pruebas Diagnósticas entre los sistemas de cuantificación

Índice	Sistema de Ishak	Sistema propuesto
Sensibilidad	78,48%	80,48%
Especificidad	64,71%	87,50%
Índice de Validez	73,66%	85,60%
Valor Predictivo Positivo	80,52%	94,16%
Valor Predictivo Negativo	61,80%	70,79%
Índice de Youden	0,43	0,72
Razón de verosimilitud positiva	2,22	6,78
Razón de verosimilitud negativa	0,17	0,33

Los resultados de los diferentes tests de pruebas diagnósticas, presentados en la tabla anterior, demuestran que la ALAT al compararla con ambos métodos histológicos, presenta mejores resultados en todos los indicadores evaluados con

el método propuesto, tanto en esta muestra de 243 biopsias, como cuando se compara con el total de los 293 pares de biopsias evaluados, lo que demuestra que el método utilizado en esta investigación muestra una mayor precisión que el de Ishak, para la detección de los cambios histológicos en la muestra evaluada; sin presentar una diferencia significativa en estos resultados.

Los resultados presentados en este capítulo, demuestran que el método propuesto tiene resultados similares al de Ishak, tomado como método de comparación ,lo que lo valida como un método útil, inclusive con algunos resultados donde es más preciso, en la determinación de los cambios histológicos.

4.6 CONCLUSIONES

Se determinó la validez del método propuesto y su mayor precisión al:

Obtener resultados similares en el índice de actividad histológica y su variación después de una terapéutica, en ambos métodos.

El IANIT muestra una mayor precisión, al obtener menor número de casos con igual valor entre ambas biopsias y mejores resultados en los tests de pruebas diagnósticas.

CAPITULO 5

UTILIDAD DEL IANIT EN EL ESTUDIO DE LA PRIMERA BIOPSIA, COMO INDICADOR O PREDICTOR DE PRONOSTICO.

5.1 INTRODUCCIÓN.

La biopsia hepática continua siendo, el examen de referencia para efectuar el balance lesional de una hepatitis crónica viral según Cadranel (217); la necesidad de la realización de la biopsia hepática en las hepatitis crónicas se considera que es indispensable en la mayoría de los casos, para establecer una decisión terapéutica (218). La muestra de biopsia hepática no solo es de valor diagnóstico y pronóstico, pues permite detectar otras enfermedades y contribuye al conocimiento de los mecanismos de daño celular (58), y estudios con biopsias secuenciales, evidencian que el grado de las lesiones necroinflamatorias y la extensión de la fibrosis, en la biopsia inicial pueden predecir la progresión a la cirrosis.

La utilización de las comparaciones de las cifras de ALAT, al inicio y seis meses después de terminado un tratamiento, es esencial en la evaluación de la respuesta a la terapéutica en la hepatitis crónica B o C y permite sea utilizada como comparación, para evaluar las alteraciones histológicas al calcular la sensibilidad, especificidad o el valor predictivo de un sistema de cuantificación histológica(219-223). Igualmente los resultados finales de la detección del DNA del virus B, o el RNA del virus C en suero, al final de una terapéutica, es un indicador de la efectividad de la misma(50,224-228).

Los resultados de esta investigación, en los capítulos anteriores, justifica utilizar como un posible indicador de pronóstico, la cuantificación en la primera biopsia del IANIT y algunas de las alteraciones histológicas

5.2 OBJETIVO GENERAL

Demostrar la utilidad del método propuesto en el estudio de la primera biopsia, como indicador o predictor de pronóstico.

5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar los valores del IANIT de la primera biopsia y los grados de la necrosis periportal y la fibrosis, con la ALAT final y los marcadores virales finales, como indicador o predictor de pronóstico.

5.4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 243 pares de biopsias, de los diferentes grupos de tratamiento. Se utilizó el método propuesto; los resultados del IANIT, se clasificaron en mejor (M) e igual o peor en conjunto (IP), según los resultados de los cambios histológicos y se compararon con la ALAT y los marcadores virales finales. Se realizó la misma comparación con la media del IANIT, entre la primera y segunda biopsia. Se dividió el resultado del IANIT de la primera biopsia, en más o menos de 10, según el resultado obtenido y se comparó con la ALAT y marcadores virales finales. Los resultados de la necrosis periportal y de la fibrosis de la primera biopsia, se dividieron en lesiones de bajo grado (I) y de alto grado (II), de la siguiente forma:

	I	II
Necrosis periportal	0,1,2	3,4
Fibrosis	0,1	2,3

Estos resultados se compararon con la ALAT y marcadores virales finales. Se comparó los resultados del IANIT en M o IP, con la presencia o no del virus al final del tratamiento, de la siguiente forma:

$$(\text{IANIT M y VIRUS -}) + (\text{IANIT P y VIRUS +}) = \% \text{ de asociación}$$

$$\text{VIRUS B (M y DNA-)} + (\text{P y DNA+}) = \%$$

VIRUS C (M y RNA-) + (P y RNA+) = %

5.5 RESULTADOS.

En los capítulos anteriores se demostró la asociación del IANIT, al dividirlo en M o IP, según el resultado de los cambios histológicos con la cifras finales de ALAT, según se resume en la tabla siguiente de los pacientes tratados:

Tabla 1 Resultados del IANIT (M-IP) y ALAT final (RC-RI o NR)

	IANIT	RC	RI-NR
Grupos de Tto.	M = 171	145-84,8%	26-15,2%
n = 243	IP = 72	9-12,5%	63-87,5%
	243	154	89

Fuente: resultados de la investigación

Esta tabla muestra la coincidencia de los resultados del IANIT, con la cifras finales de la ALAT, tanto en los pacientes de respuesta completa, como de no respuesta.

En la tabla siguiente se presentan los resultados de las cifras de la media del IANIT, de las dos biopsias, con la ALAT final.

Tabla 2 Relación entre los valores del IANIT y respuesta ALAT en ambas biopsias

ALAT	1RA BIOPSIA	2DA BIOPSIA
RC n = 154	*9,30	5,00
NR n = 89	9,21	ns 7,12
243	*9,06	6,75
ns no significativo	* p menor 0,05	

Fuente: Resultados de la investigación

Estos resultados demuestran, como en los pacientes con respuesta completa de la ALAT, es significativa la diferencia del cálculo del IANIT entre las dos biopsias, no resultando lo mismo en los pacientes de no respuesta enzimática, lo que señala la precisión del método propuesto. Los resultados de las tablas anteriores, justifican la

evaluación del cálculo del IANIT de la primera biopsia y su asociación con la respuesta ALAT final, al dividirlo en más o menos de 10.

Tabla 3 Resultados del IANIT de la 1ra biopsia y RC ALAT final

Grupo de Tto.	IANIT	RC (%)
Virus C: (I,II,VIII)	menor de 10	75%
Virus B: (III,IV,V,VII)	mayor de 10	68%
<u>Virus B: (VII)</u>	<u>mayor de 10</u>	<u>75%</u>

Fuente: resultados de la investigación

Este resultado de la asociación del cálculo del IANIT de la primera biopsia, al, dividirlo en más o menos de 10, mostró que del 68 al 75% de los pacientes con virus B y el 75% de virus C, tuvieron ALAT final normal, lo que justifica que puede ser utilizado el IANIT de la primera biopsia, como un indicador del posible pronóstico de un paciente, a una terapéutica en las hepatitis crónicas B o C.

Los resultados del IANIT, se asocian a los resultados finales de los marcadores virales, que se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 4 Resultados del IANIT y marcadores virales

VIRUS	n	1ra Biopsia	2da. Biopsia
DNA- y RNA-	104	*9,41	5,36
DNA+ y RNA+	103	9,28	ns 6,97
	<u>207</u>	<u>*9,34</u>	<u>6,16</u>

ns no significativo * p menor de 0,05 Fuente: resultados de la investigación

En la tabla, se observa la diferencia significativa entre los valores de la media, de la primera y segunda biopsia en los pacientes con negativización viral y aunque también se observa disminución del IANIT, de la segunda biopsia en los pacientes que mantienen la positividad viral, esta diferencia no es significativa.

Tabla 5 Resultados del IANIT (M-IP) y los marcadores virales finales según virus

VIRUS	n	(Virus- y M Histológica)	+	(Virus+ y P Histológica)	%
B	113		45	+ 29 = 74 de 113,	65,5% asociación
C	94		43	+ 22 = 65 de 94,	69,1% asociación
	<u>207</u>		<u>88</u>	<u>+ 51 = 139 de 207,</u>	<u>67,2% asociación</u>

Fuente: resultados de la investigación

En la tabla 5, se asocian los resultados de los marcadores virales positivos y negativos, con la mejoría o el empeoramiento del IANIT, con una asociación entre el 65 y 69% de la muestra estudiada. En cuanto a la asociación de la mejoría histológica y la negativización viral , fue del 76,3% en el virus B y del 95,5% en para el virus C.

Los resultados de las tablas anteriores, permiten evaluar el IANIT de la primera biopsia, con el resultado final de los marcadores virales, buscando una asociación que se utilice como un indicador de pronóstico, con los siguientes resultados:

IANIT menor de 10: 65% DNA+ y 63% RNA-

IANIT mayor de 10: 58% DNA - y 81% RNA+

Estos resultados de la muestra estudiada, pueden ser útiles como indicadores de pronóstico, en la evaluación de la primera biopsia, en especial con el IANIT mayor de 10 en pacientes de virus C, con el 81% de positividad al final del tratamiento, mientras que con un IANIT menor de 10 es positivo el DNA del virus B en el 65%.

Los resultados presentados en este capítulo, demuestran la utilidad del IANIT en la muestra estudiada y su asociación con las cifras finales de ALAT y los marcadores virales, que justifican su utilización en la primera biopsia como indicador de un posible pronóstico.

La utilización de las comparaciones de las cifras de ALAT, al inicio y seis meses después de terminado un tratamiento, es esencial en la evaluación de la respuesta a la terapéutica en la hepatitis crónica B o C y permite que al utilizarla como un patrón de respuesta, determinar como las alteraciones histológicas valoradas en su conjunto como un índice de actividad necroinflamatoria, tiene concordancia o no con la evolución enzimática (213-215).

En el capítulo 2 se hace referencia, al comportamiento de esta enzima en portadores asintomáticos de los virus B o C, o en los donantes voluntarios B o C+ y en los enfermos diagnosticados por biopsia como hepatitis crónica, en los que se pueden encontrar fluctuaciones en las cifras de esta enzima, que pueden tener cifras normales, en mayor proporción en la hepatitis C. Estas variaciones en las cifras de ALAT, según algunos autores (229-233), han planteado la necesidad de reevaluar el valor de la cifras normales de esta enzima, basado en la presencia de lesiones histopatológicas de hepatitis crónica, en portadores asintomáticos. Sin embargo en relación a la hepatitis crónica B o C, las cifras de ALAT, continúan como un indicador fundamental de una terapéutica.(234,235)

La utilidad de la biopsia hepática en el diagnóstico de la hepatitis crónica, aún con los avances en las tecnologías bioquímicas, inmunológicas e imagenológicas, es aceptada en la actualidad (236-243), tanto en pacientes con cifras elevadas de ALAT, como con cifras normales (244-238) y en pacientes con hepatitis crónica C e insuficiencia renal crónica, antes del trasplante renal (249).

La evaluación de una terapéutica, basada en los cambios de las cifras de ALAT y de las alteraciones histológicas, es utilizada en numerosas publicaciones, teniendo los resultados de las biopsias un valor fundamental (25,27,220,250), lo que se

continúa utilizando en las publicaciones más recientes (251-258). De esa manera los resultados de esta investigación, relacionados con los cambios de la histología y de la ALAT, son válidos al mejorar la histología en el 85% de los pacientes con la respuesta ALAT sostenida en la muestra estudiada y permiten la utilización del resultado del IANIT de la biopsia inicial, como un posible indicador de pronóstico o efectividad de una terapéutica, y su división en menos o más de 10, como se observa que el 75% de los pacientes con virus C con menos de 10 en el IANIT inicial su ALAT final fue normal y en los pacientes con virus B y IANIT mayor de 10 fue del 68%.

La importancia de la evaluación de las lesiones necroinflamatorias, es señalada como un criterio necesario en el estudio de las biopsias de hepatitis crónica (259), así en la hepatitis crónica B se publica que en los grados de actividad necroinflamatoria 3-4, se observa una mejor respuesta ALAT final y el 56% de los pacientes con negativización del AgeHB (251) y en la hepatitis crónica C, se reporta que es mayor el índice de actividad necroinflamatoria, usando el método de Ishak, en los pacientes con cifras de ALAT elevadas, que en los pacientes con cifras normales (260), concordando los resultados de esta investigación con lo revisado en la literatura.

La necrosis periportal se considera como la lesión histológica de más importancia en la hepatitis crónica, se utiliza en la evaluación de determinada terapéutica y como posible pronóstico. En la siguiente tabla se presentan los resultados en los dos grupos de casos tratados, la magnitud o intensidad de la necrosis periportal en la primaria biopsia, según el método propuesto, divididos en dos grupos de menor y mayor lesión necroinflamatorias, asociados con la respuesta enzimática final.

Tabla 6 Asociación de la necrosis periportal de la 1ra biopsia y ALAT final según grupos de tratamiento.

Grupo de Tto.	n	Grados de necrosis	R.C.	R.I	N.R
I,II y VIII	C	100	Necrosis 0,1,2	74%	26%
			Necrosis 3,4	53%	47%
III, IV, V y VIII	B	143	Necrosis 0,1,2	40%	60%
			Necrosis 3,4	60%	40%
VIII		43	Necrosis 3,4	80%	20%
Nec 0,1,2	C vs		Nec 0,1,2 B (R.C.)		
74%	vs		40% p menor de 0,05		

Fuente: Resultados de esta investigación

En el grupo de pacientes de hepatitis crónica C, se observa la asociación entre los bajos grados de necrosis periportal y la normalización de la ALAT, en la muestra estudiada de enfermos con virus C, pues el 74% de los que en la primera biopsia tenían necrosis periportal de 0,1,2 normalizaron a ALAT. Mientras que el grupo de enfermos tratados por virus B, que tuvieron un mayor grado de lesión de necrosis periportal, presentaban un 60% de respuesta enzimática. Al analizar por separado los grupos de tratamiento, el grupo VIII, se observa que en el grado de necrosis periportal 3,4 obtuvo un 80% de normalización enzimática. Estos resultados demuestran, que mediante el método de estudio detallado de la necrosis periportal, de la primera biopsia, de esta investigación, se puede inferir un posible pronóstico de los casos a tratar en la hepatitis crónica B y C.

La utilización de los sistemas de graduación de las lesiones necroinflamatorias y de estadiamiento de la fibrosis en la hepatitis crónica, constituye una necesidad, para su asociación con el comportamiento clínico y enzimático de estos enfermos. Se ha valorado, la evaluación de alteraciones histológicas individuales, la necrosis

periportal es una de las más utilizadas, diferentes trabajos reportan, que a más alto grado de necrosis periportal en la primera biopsia una mayor probabilidad de evolucionar a una cirrosis hepática (195, 206), considerándose la evaluación cuantitativa de la necrosis periportal un aceptable indicador de pronóstico en las hepatitis crónicas virales.

La evaluación de la necrosis periportal de la primera biopsia, en bajo o alto grado de lesión necroinflamatoria, concuerda con los mecanismos de muerte celular y respuesta inflamatoria en las hepatitis crónica B o C (261-263) y su evolución posterior a fibrosis. La evaluación de lesiones histológicas como posible indicador de predicción ha sido utilizada en diferentes trabajos, en el estudio de la primera biopsia referente a la necrosis periportal (236,238,264,265), con resultados similares a esta investigación, pero sin realizar un estudio planificado, buscando un criterio de predicción o pronóstico para el paciente, al estudio de esta lesión en la primera biopsia. Los resultados de esta investigación, justifica la evaluación detallada de la necrosis periportal de la primera biopsia, como un indicador de pronóstico de la enfermedad, en la muestra estudiada.

La fibrosis es otra de las alteraciones histológicas que se han utilizado como criterio de pronóstico en la hepatitis crónica, al representar la misma cambio en la arquitectura hepática que comprometen el curso de esta enfermedad. En la próxima tabla analizamos la fibrosis presente en la primera biopsia, dividiéndola en fibrosis de bajo grado (0,1) y fibrosis de alto grado (2,3) y su asociación con la ALAT final.

Tabla 7 Asociación de la fibrosis de la 1ra biopsia y la respuesta ALAT final según grupos de tratamiento.

Grupo de Tto.	n	Grados de fibrosis	R.C.	R.I. N.R
I , II y VIII	C	100	Fibrosis 0,1	76% 24%
			Fibrosis 2,3	45% 55%
III, IV, V ,VII	B	143	Fibrosis 0,1	49% 51%
			Fibrosis 2,3	74% 26%
Fibrosis 0,1	C	vs	Fibrosis 0,1 B (R.C)	
73%		vs	33% pmenor de 0,05	.

Fuente: Resultados de esta investigación

La fibrosis ha sido utilizada al evaluarla en la biopsia inicial como un posible criterio de pronóstico, en esta investigación. Los pacientes de hepatitis crónica C que tenían un menor grado de fibrosis en la biopsia inicial, presentaban un mayor grado de respuesta completa enzimática para el 76%, lo que apoya lo reportado en numerosos trabajos que evalúan la disminución de la fibrosis en diferentes tratamientos (266-269), como señal de eficacia de la terapéutica utilizada. En la hepatitis crónica B, a un mayor grado de fibrosis, presentaban un mayor por ciento de respuesta completa nuestros casos (fibrosis2,3,74%); la fibrosis inicial no se ha reportado como un elemento de pronóstico en la B, aunque trabajos revisados le dan importancia (251,270).

La cuantificación aislada de la fibrosis en la hepatitis crónicas, permiten comparar la respuesta histológica a determinado tratamiento (220,222,224), incluso en casos que presentan co-infección con VIH (271,272) lo cual es en la actualidad un elemento esencial en la evolución de una terapéutica, al margen de los resultados enzimáticos o virológicos. La fibrosis presente en la primera biopsia es considerada

la lesión más importante a evaluar, pues la evolución a cirrosis constituye la complicación morfológica más grave en las hepatitis crónicas virales. La progresión de la fibrosis en las hepatitis crónicas B o C y la constitución posterior de una cirrosis, ha sido reportada en diferentes publicaciones (273), al igual que la medición de la misma en diferentes sistemas de estudios de las biopsias hepáticas (60,86,87), o en diferentes técnicas bioquímicas o imagenológicas.(274-277).

Los mecanismos del inicio de la fibrosis y su progresión en las hepatopatías crónicas, ha sido muy estudiado (278,279), al igual que la utilización de técnicas bioquímicas, enzimáticas e inmunológicas (280-282), en especial en la hepatitis crónica C (283), sin embargo la biopsia hepática en el estudio de la fibrosis y su medición, se considera todavía como la prueba de oro (239,285,286), siempre que la misma tenga un tamaño suficiente (287)

Los estudios en la progresión de la fibrosis en ambos tipos de hepatitis, han sido reportados de forma constante en numerosas publicaciones (266-270,288), referentes a la utilización de diferentes terapéuticas, por lo ya conocido, de que algunos medicamentos logran la reversibilidad de la fibrosis, según el estadio en que la misma se encuentre (289-291). Se reporta igualmente la variación de la fibrosis a diferentes estadios y el estudio de diferentes factores, que actúan de manera favorable o no, en su evolución (292-293), entre ellos la presencia de esteatosis, principalmente en pacientes con hepatitis crónica C (294-299).

La necesidad de la evaluación de la fibrosis, desde la pasada década, ha justificado la utilización de diferentes métodos morfométricos, acoplados o no a programas de computación (290,300-302), hasta los más utilizados en la actualidad(303-306), que permiten una mejor evaluación de la fibrosis, pero siempre como una

complementación de los métodos cualicuantitativos de microscopia óptica ya reportados.

El sistema utilizado en la valoración de las diferentes alteraciones microscópicas en las hepatitis crónica, nos permite analizar en forma combinada los mismos; de esa forma se puede comparar en cada biopsia la necrosis periportal y la fibrosis con los resultados enzimáticos finales. Al unir los resultados de bajo grado de lesión y los de alto grado de lesión de ambas lesiones histológicas en los dos tipos de virus, en la primera biopsia observamos lo siguiente:

Tabla 8 Asociación de la necrosis periportal y de la fibrosis con la ALAT final

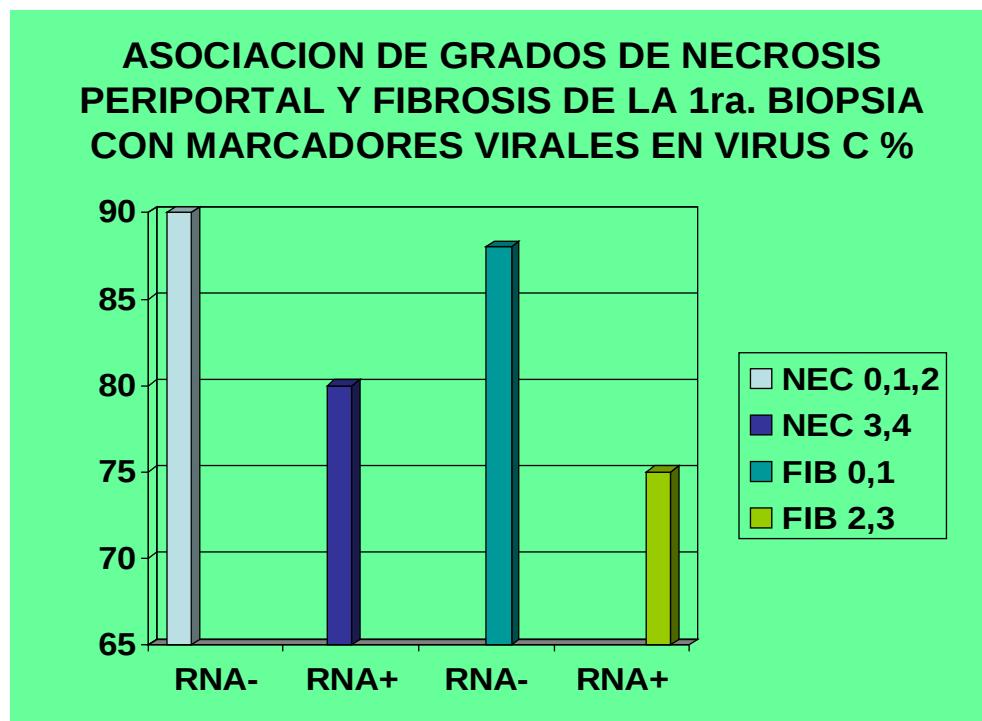
Nec 0,1,2 +	Fi b 0,1 C	vs	Nec 0,1,2 +	Fi b 0,1 B (R.C.)
	78%	vs	33%	P menor 0,05
Nec 3,4 +	F1 b 2,3 B	vs	Nec 3,4 +	F1 b 2,3 C (R.C.)
	69%	vs	43%	P menor 0,05

Fuente: Resultado de la investigación

La utilización de esta combinación de lesiones histológicas y su cuantificación en la biopsia inicial, consideramos que puede ser de utilidad como un posible criterio predictivo en los casos tratados, según lo obtenido en este estudio. Los resultados de esta investigación, referente a la cuantificación de la necrosis periportal y de la fibrosis, concuerdan con lo expresado en la literatura revisada, con mejor evolución a mayor lesión necroinflamatoria y de fibrosis en la hepatitis crónica B (251), y con menores lesiones histológicas en la hepatitis crónicas C, mejor evolución clínica (260,307). Las alteraciones histológicas como lesiones necroinflamatorias, la esteatosis y la fibrosis han sido señaladas como factores predictivos (299,308-311)

y avalan como indicador de pronóstico, el estudio de la primera biopsia, en los pacientes con hepatitis crónica B o C.

La asociación de los resultados de los diferentes grados de necrosis periportal y de fibrosis, con el resultado final de los marcadores virales, se presenta en el siguiente gráfico.



Se observa en el gráfico, que las biopsias iniciales con necrosis periportal y fibrosis de bajo grado, de los pacientes con hepatitis cónica C, negativizaron el RNA viral en 90 y 88% de los mismos , a seis meses de terminado el tratamiento, mientras los que tenían alto grado de necrosis periportal o fibrosis inicial, el RNA permaneció positivo en el 80 y 75% de los mismos. En relación al virus B, los pacientes con fibrosis de alto grado en la primera biopsia, negativizaron del DNA en el 61%, no existiendo ninguna asociación con los resultados de la necrosis

periportal de ambos grados o con la fibrosis de bajo grado, y la negativización del DNA viral. En la literatura revisada ,no encontramos publicaciones referidas a este aspecto específico.

Los resultados presentados en este capítulo, referentes a la utilización del cálculo del IANIT, su división en más o menos de 10 y a la cuantificación de la necrosis periportal y de la fibrosis, en bajo y alto grado, en las primeras biopsias de la muestra estudiada , en pacientes tratados de hepatitis crónica B o C, y comparar estos resultados, con las cifras finales de la ALAT y de los marcadores virales, demuestran que pueden ser utilizados como posibles indicadores o predictores de una respuesta terapéutica.

5.6 CONCLUSIONES

Se demostró la utilidad del cálculo del IANIT de la primera biopsia, como indicador o predictor de pronóstico.

Se demostró la utilidad del cálculo de la necrosis periportal y de la fibrosis de la primera biopsia, como indicador o predictor de pronóstico.

CONCLUSIONES FINALES

1- La biopsia hepática en el estudio de donantes asintomáticos virus B o C de la hepatitis, demuestra alteraciones histológicas, discrimina enfermos y no enfermos, debiendo extenderse al trabajo médico diario este tipo de estudio.

2- La evaluación cualicuantitativa de las alteraciones histológicas de las hepatitis crónicas virales, al introducir nuevas variables histológicas a

cuantificar (número de espacios porta lesionados, necrosis peripórtal, cuerpos acidófilos y conductillos biliares lesionados), muestra resultados más efectivos.

3- El IANIT propuesto en la evaluación de la hepatitis crónica, al compararlo con los métodos de Knodell e Ishak, mostró mejor utilidad.

4- El estudio cualicuantitativo de las alteraciones histológicas, determina la eficacia de terapéuticas en las hepatitis crónica B o C, en particular del método propuesto , sobre los métodos de Knodell o Ishak.

5- El cálculo del IANIT, la necrosis periportal y la fibrosis, de la primera biopsia, mediante el método propuesto, es útil en el pronóstico de las hepatitis crónicas B o C.

6- El IANIT brinda mayor precisión y certeza en la evaluación de las alteraciones histológicas en las hepatitis crónica B o C, que permite una mejor asociación de los resultados enzimáticos y virológicos con la histopatología.

RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que se proponen, están en relación con los resultados obtenidos en los diferentes capítulos, siendo las siguientes:

1- Continuar la difusión de los resultados obtenidos, en el estudio de las biopsias de los donantes de sangre asintomáticos y de los resultados obtenidos, en el

método propuesto de cuantificación de lesiones de las hepatitis crónicas por virus B y C , en eventos científicos*,publicaciones*,cursos de postgrado* o talleres.

2- Generalización y utilización del IANIT, en la cuantificación de lesiones histológicas en la hepatitis crónicas por virus B y C, en el trabajo asistencial diario en los departamentos de Anatomía Patológica de Cuba.

3- Introducir la utilización del método propuesto, en la evaluación de protocolos terapéuticos en la hepatitis B y C, en investigaciones institucionales o en cooperación con los diferentes Polos Científicos del país, en los departamentos de Anatomía Patológica.

4- Realizar las gestiones en la Oficina de Propiedad Industrial de Cuba (OCPI), para la protección del método propuesto, en relación a la categoría de Propiedad Intelectual, como fue señalado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y Medio Ambiente en la aprobación de la propuesta de este trabajo, para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas.

* Presentados en eventos científicos , realizadas publicaciones y cursos de postgrado.

METODO DE KNODELL (30).

Necrosis periportal + necrosis en puente 0-10.

Ninguna	0
Leve necrosis periportal	1
Moderada necrosis periportal (envuelve menos del 50% de la circunferencia	

de la mayoría de los tractos portales)	3
Severa necrosis periportal (envuelve más del 50% de la circunferencia de la mayoría de los tractos portales)	4
Moderada necrosis periportal leve más necrosis en puente	5
Marcada necrosis periportal moderada más necrosis en puente	6
Necrosis multilobular	10

Inflamación Portal 0-4

Ninguna	0
Leve (escasas células inflamatorias en menos de 1/3 de tractos portales)	1
Moderada (incremento de células inflamatorias en 1/3 a 2/3 de tractos portales)	3
Marcada (densos paquetes de células inflamatorias en 2/3 de tractos portales)	4

Degeneración intralobular y necrosis focal 0-4

Ninguna	0
Leve (cuerpos acidófilos, degeneración balonizante, y o escasos focos de necrosis en 1/3 de lobulillos)	1
Moderada (envuelve de 1/3 a 2/3 lobulillos)	3
Marcada (envuelve a 2/3 del lobulillo)	4

La suma del índice necroinflamatorio es de 0-18

METODO DE ISHAK (34).

Necrosis periportal o hepatitis de la interfase 0-4

Ninguna	0
Leve (focal en pocas áreas portales)	1
Leve/Moderada (focal en la mayoría de áreas portales)	2
Moderada (continua alrededor de menos del 50% de tractos portales)	3
Severa (continua alrededor de más del 50% de tractos portales)	4

Necrosis confluente 0-6

Ninguna	0
Focal necrosis confluente	1
Necrosis confluente en algunas áreas de zona 3	2
Necrosis confluente en la mayoría de las áreas de la zona 3	3
Necrosis confluente de la zona 3 más necrosis en puente ocasional	4
Necrosis confluente de la zona 3 más necrosis en puente múltiple	5
Necrosis panacinar o multilobulillar	6

Necrosis focal, apoptosis e inflamación focal 0-4

Ninguna	0
Un foco o menos por 10x objetivo	1
Dos a cuatro focos por 10x objetivo	2
Cinco a diez focos por 10x objetivo	3
Más de 10 focos por 10x objetivo	4

Inflamación Portal 0-4

Ninguna	0
Leve, en algunas o todas las áreas portales	1
Moderada, en algunas o todas las áreas portales	2
Moderada/Marcada, en todas las áreas portales	3
Severa, en todas las áreas portales	4

La suma del índice necroinflamatorio es de 0 a 18.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Smetana HF. The histologic diagnosis of viral hepatitis by needle biopsy. Gastroenterology, 1954;26:612-625.
- 2- Limberg B, Hopher WW, Kommerel B: Histological differential diagnosis of focal liver lesions by ultrasonically guided fine needle biopsy. Gut, 1987;28:237-241.

- 3-Rahu S B. Liver biopsy interpretation en chronic hepatitis. *J Inser Med.*2001;31:110-113.
- 4- Stanley AJ, Haydon GH, Piris J, Jarwo LM, Raufman JP. Assessment of liver biopsy histology in patients with normal transaminase levels .*European Journal Gastroenterol Hepatol*,1996;8:869-872.
- 5.- Soloway RD, Baggott AH, Schoenfield LJ, Summerskill WHJ.: Observer error and sampling variability tested in evaluation of hepatitis and cirrhosis by liver biopsy. *American Journal of Digestive Disease*, 1971;16:1082-1086.
- 6.- Abdi W, Millan JC, Mezey E: Sampling variability on percutaneous liver biopsy. *Archives Internal Medicine*, 1979;139:667-669.
- 7.- Holund B, Paulsen H, Schlichthing P. Reproducibility of liver biopsy diagnosis in relation to the size of the specimen: *Scandinavian Journal Gastroenterology* 1980;15:329-335.
8. Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD; Pirie DI: Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver: *Lancet*, 1986;1:523-525.
- 9.- Bravo A, Sheth SG, Chopra S: Liver biopsy *New England Journal Medicine*, 2001;344:495-500.
- 10- Baggott A H. Morphologic and etiologic diagnosis from hepatic biopsies without clinical data *Medicine*,1966;45:435-443.
- 11- Popper H, Schaffner F. The vocabulary of chronic hepatitis: *New England J Med*,1971;284:1154-1157.
- 12- Schlichting P, Houlond B, Poulsen H. Liver biopsy in chronic aggressive hepatitis; diagnostic reproducibility in relation to size of specimen . *Scand J of Gastroenterology*,1983;18:27-32.
- 13-Yussoff I F, Molleson L, Torter L, Olyuka J. Liver biopsy in hepatitis: reassessing its role in 2001. *Med J Aust*, 2002, Jun; 76 (2): 89-90.
- 14--Marcellin P, Chang T, Lim SG, Tong NJ, Sievert W, Schiffman M, et al Adefovir dipivoxil for the treatment for chronic hepatitis B, e antigen-positive. *New England J. Med*,2003;348:808-816.

- 15- Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Schiffman M, Gordon SC, Hoefs JC, et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa 2b to interferon alfa 2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;34:395-403.
- 16- ChangT, Gish RG, de Man R, Gadano A, SollanoJ, Chao YC, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HbeAg positive chronic hepatitis B. *New England J. Med.* 2006;354:1001-1010.
- 17- Pockros PJ, Jeffers L, Afdhal N, Goodman ZD, Nelson D, Gish RG, et al. Final results of a double-blind placebo-controlled trial of the antifibrotic efficacy of interferon- α in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis or cirrhosis. *Hepatology*,2007, 45:569-578.
- 18- Liaw YF, Sung JY, Chow WCH, Farrel TG, Lee CH, Yuen H et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *New England Journal of Medicine*,2004;351:1521-1531.
- 19- De Grotte J, Desmet V J, Gedigk P, Popper H, Korb G, Poulsen H, Thaler N: A Classification of chronic hepatitis. *Lancet*,1968;2:626-628.
- 20- Bianchi L, De Groote J, Desmet VJ, Gedigk , Corb. G, Popper H:. Acute and chronic hepatitis revisited: *Lancet*,1977;2:914-919.
- 21- Popper H . Changing concepts of the evolution of chronic hepatitis and the role of piecemeal necrosis. *Hepatology*,1983;3:758-762.
- 22- Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological feature of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology*,1992;15:572-577.
- 23- Lefkowitch JH, Schiff ER, Davis G, Perrillo BA, Lindsay K, Bodenheimer HC et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C. A multicenter comparative study with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*,1993;104:595-603.
- 24- Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis. *Hepatology*, 2002;36:152-160.
- 25- Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Amer. J. Clin. Path.*2000;113:40-55.
- 26- Fattovich G. Risk factors for progression of cirrhosis in chronic hepatitis B. *Semin. Liver dis.* 2003;23:47-58

- 27- Hadziyannis SJ: Histology progression of chronic hepatitis B. *New England J, Med.*2003; 348:800-807.
- 28- Standish RA, Cholongitis E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut*,2006;38: 357-360.
- 29- Goodman ZD, Beckers R, Pockros PJ, and Afdhal N. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: Evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology*,2007;45:886-894.
- 30- Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz n. et al: Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*,1981;1:431-435.
- 31- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis a need for reassessment. *Journal of Hepatology*,1991;13:372-374.
- 32- Bedossa P, Biocilas-Sage P, Callard P, Chevalier M, Degott C, Deugnier Y et al. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic. *Hepatology*,1994;20:15-20.
- 33- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer P: Classification of chronic hepatitis : diagnosis, grading and staging . *Hepatology*,1994;19:1513-1520
- 34- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Calles F ,De Grotte J, Gudat F et al: Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *Journal Hepatology*,1995;22:696-699.
- 35- Batts KP, Ludwi J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Amer. J. Surg. Patol.*1995;19:1409-1417.
- 36- Bedossa P, Poynard T. The Metavir comparative study group. An algorithm for the grading of active chronic hepatitis C. *Hepatology*,1996;24:289-293.
- 37- Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: Knodell histological index and beyond. *Hepatology* 2000;31:241-246.
- 38- Ikawa H, Hayashi Y, Minonuya T, Yano Y, Nakaji M, Nagano H, Seo Y, Kumon Y, Yoon S, Kasuga M, Itoh H, Various scoring systems evaluation. histologic feature of chronic hepatitis C treated with interferon. *Hum Pathol.* 2001, 32 :910-917.
- 39- Jevon GP. Grade and stage in chronic hepatitis. *Pediatr Dev Pathol.* 2001; 4:372-380. Review.

- 40- Nakaji M, Hayashi Y, Ninomiya T, Yano Y, Yoon S, Seo Y, et al. Histological grading and staging in chronic hepatitis: its practical correlation. *Pathol Int.* 2002;52:683-690.
- 41- Liver Scheuer PJ, Standish RA, Dhillon AP. Scoring of chronic hepatitis. *Cli Dis.* 2002;6:335-347.
- 42- Bieliauskas LA, Back-Madruga C, Lindsay KL, Snow KK, Kronfol Z, Lok AS, et al. Clinical relevance of cognitive scores in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2006;28:1346-1361.
- 43- Goodman ZD. Review. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases,. *J. of Hepatology*, 2007;47:598-607.
- 44- Ludwig J, Dickson DR: McDonald GS. Staging of chronic non suppurative destructive cholangitis. *Virchows Arch. A*,1978,379:103-112.
- 45- Younossi ZM, Gramlich T, Liu JC, Matteoti C, Petrelli M, Goldblum J et al. Non-alcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod. Path.*,1998;11:560-565.
- 46- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tet, RA, Bacon RR, Non-alcholic esteatohepatitis. A proposal for grading and staging the lesions. *Amer. J. of Gastroent.*,1999;94:2467-2474.
- 47- Kleiner D, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contas MJ, Cummings OW. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonacoholic fatty liver disease. *Hepatology*,2005;41:1313-1321.
- 48- Demetris AJ, Seaberg EC, Batts KP, Ferrel L, Lee RG, Markin R, et al. Chronic liver allograft rejection: a interinstitutional study analyzing the reality of current criteria and proposal of an expanded definition. *Amer. J. Surg. Path.*1998,22:28-39.
- 49- Andreute A, Festa V, Leandro G Rizetto M. Usefulness of liver biopsy in the evaluation of patients with elevated ALT values and serological markers of hepatitis viral infection. *Digestive Disease Sciences*,2001;46:1409-1415.
- 50- Tong MJ, Hwang SJ,, Lefkowitz R, Lee SD, Conrad A et al. Correlation of serum HCV –RNA and alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis C patients during treatment with Ribavirina. *Journal Gastroenterol Hepatol* 1994;9:587-591.

- 51- Lee Y S, Yoon S K, Chung E S, Bae S H, Choi J Y, Han J Y. The relationship of histological activity to serum ALT, HCV Genotype and HCV RNA, titers in chronic hepatitis C. *C. J Korean Med Sci.* 2001; 16: 585-591.
- 52- Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Qiu DK, Fang JY, et al. Relationship between clinical and pathologic findings in patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2796-2800.
- 53- Nahon P, Thabut G, Ziol M, Hatar MT, Cesaro F, Barget N, et al. Liver stiffness measurement versus clinicians' prediction or both for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *C. Am. J. Gastroenterol.* 2006;101:2744-2751.
- 54- Di Bisceglie A M, Goodman D, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpalder JP, Alter H: Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic post transfusion hepatitis. *Hepatology*,1991;14:969-974
- 55- Lenzi M, Ballardins G, Fusconi M, Cassani S, SelerimR, Volta U: Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet*,1990;335:258-259.
- 56- Di Guardi RM, Franceschini BA, Russo CH, Grizzi FT.Computer-aided morphometry of liver inflammation in needle biopsies. *World J Gastroenterol.* 2005 Nov 28;11(44):6995-7000.
- 57- Mosnier JF, Degott c, Marcellin P, et al .The intraportal lymphoid nodule and its environment in chronic active hepatitis C, an immunohistochemical study *Hepatology*,1993:366-371
- 58- Mosnier JF, Current anatomico-pathological classification of hepatitis: characteristics of HCV infection. *Nephrolo Dialysis Transplantation*,1996;11:12-15
- 59- Lau YN, Xic X, Lai MC, et al. Apoptosis and viral hepatitis. *Semin. Liver Dis.*,1998;18:169-176.
- 60-Delic D, Nasic Z, Prostran M, Boricic I, Tomanovic N, Cutovic M, Dokic L, Simonovic J, Svrtlih N.Histopathology of chronic hepatitis C in relation to virus genotype. *Vojnosanit Pregl.* 2006 Sep; 63 (9):819-25.
- 61- Vyberg M, The hepatitis associated bile duct lesion. *Liver*,1993;13:289-3016
- 62- Afdahl NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Amer.j. Gastroenter.*,2004;99:1160-1174.

- 63- Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khoka F, et al, Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;1124:97-104.
- 64- Zarki JP, Mc Hutchinson J, Bronowicki JP, Sturm N, García-Kennedy R, H Hodaj E, et al. Rate of natural disease progression in chronic hepatitis C, *J Hepatology*, 2003;388:307-314
- 65- Bataller R, Prenner DA. Liver fibrosis. *J.Clin. Investigation* 2005;115:209-218.
- 66- Ryder SD, Irving WR, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatitis fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut*, 2004, 53:451-455.
- 67- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis a need for reassessment. *Journal of Hepatology*, 1991;13:372-374.
- 68- Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D., Dusheiko GM: The pathology of hepatitis C. *Hepatology*, 1992;15:567-571.
- 69- Gerber MA Chronic hepatitis C: The beginning of the end of a time-honored nomenclature?. *Hepatology*, 1992;15:733-734.
- 70- Lefkowitch JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo BA, Lindsay K, Bodenheimer HC et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C. A multicenter comparative study with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 1993;104:595-603.
- 71- Bedossa P, Biocilas-Sage P, Callard P, Chevalier M, Degott C, Deugnier Y et al. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic. *Hepatology*, 1994;20:15-20.
- 72- Arista-Nass J, Pichardo ,B Rodríguez M ,Lesker M. Hepatitis C:A disease with a wide morphological spectrum *J. Clinical of Gastroenterology*, 1996; 22: 121-125.
- 73- Shoeman K, Craig PI, Liddle C, Batey RG:, Bilous M, Farrell GC, Greeson J. Chronic non A non B hepatitis. Lack of correlation between biochemical and morphological activity: *Australian J .of Medicine*, 1990;20:56-62.
- 74- Schvarcz R, Glaumann, Weiland O . Survival and histological resolution of fibrosis in patient with autoimmune chronic active hepatitis. *Journal of Hepatology*, 1993;18:15-23

- 75- Kumagai N, Kuramachi S, Toda K, Iwabuchi N, Tsuchimoto K, Tsunimatsu S, et al.. Assessment of histological features and outcome of interferon therapy in chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology*, 1996;31:69-74.
- 76- Lam N, De Guzman L, Pittrak D, Layden TJ: Clinical and histologic predictors of response to interferon Alfa in patients with chronic hepatitis C viral infection. *Digestive diseases and Sciences*, 1994;39:2660-2664.
- 77- Dienstag JL, Goldin RD; Heathcote E. Histological outcome during long-term Lamivudine therapy. *Gastroenterology*, 2003; 124:105-117.
- 78.- Scheuer PJ, Standish RA, Dillon AP. Scoring of chronic hepatitis. *Clin. in Liver Disease*. 2002; 6:335-347.
- 79- Romagmolo J, Jhangri G S, Jewell L D, Bam V G. Predicting the liver histology in chronic hepatitis C: How good is the clinician? *Am J. Gastroenterol.* 2001;96 3165-3174.
- 80- Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2001; 36:399-406.
- 81- Korb G. Chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. Histology classification and examination Pathologe. 2001;22:124-131.
- 82-, Li Hui AYew CT, Go MY, Chim AM, Chan HL, Leung NW, et al. Quantitative assessment of fibrosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis B. *Liver Int.* 2004;24:611-618.
- 83- Coton T, Matton T, Pecarrere T J, Monchy D, Debonne T M. Interobserver reproducibility of the Knodell score and the Metavir score in chronic viral hepatitis C. Results of 60 liver biopsies. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:915-916
- 84- Pasquale G, Sagnelli E, Coppola N, Onofrio M, Scarano F, Scolastico C, et al. An attempt to improve classification of HCV-correlated chronic hepatitis. *Infez Med.* 2005;13:16-22.
- 85- Sun YL, Zhao JM, Zhou GD, Wang SS, Li WS, Meng EH, et al. Cut-off period of subclassification and pathological features of severe hepatitis based on clinical and pathological analyses. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2003;17:270-273

- 86- Caballero T, Pérez Milena A, Masseroli M, O' Valle F, Salmeron F J, Delmoral R M, Sánchez Delgado G. Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image analysis quantification in sustained responder and nonresponder Interferon treated patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2001;34:740-747.
- 87- Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, et al. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat.* 2006;13:659-670.
- 88- Graboska AM, Lechner F, Klenerman P, Tighe PJ, Ryder S, Ballj K et al. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and periphral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:2388-2394.
- 89- Wedemeyer H, He H, Nacismbeni M, Davis RA, Greenberg HB, Hoofnagle JH, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C infection. *J. Immunol.* 2002;169:3447-3458.
- 90- Urbani S, Boni C, Missali G, Elia G, CavalloC, Massari M, et al. Virus specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J. Virol.* 2002;76:12423-12434.
- 91- Coosksley WG, Bradbear RA, Robinson W, et al. The prognosis of chronic active hepatitis without cirrhosis in relation to bridging necrosis. *Hepatology*, 1986;6:345-348.
- 92- Chen TJ, Liaw YF. The prognostic significance of bridging hepatic necrosis in chronic hepatitis B. A histopathologic study. *Liver* 1988;8:10-16.
- 93 - Falcón V, Acosta R, Shibayama M, Luna J, Gra Oramas B, De la Rosa M, et al. Evidences of apoptosis in hepatitis C virus-infected hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells in the absence of liver injury. *Amer. J. of Infect. Dis.* 2005;1:43-49.
- 94 - Falcón V, Acosta R, Gavilondo J, Dela Rosa M, Gra Oramas B, Menéndez I, et al. Detection of HCV components and pathological reactions in apoptotic hepatocytes from chronically HCV-infected patients. *Amer. j. of Infect. Dis.* 2005; 1:12-24.

- 95- Zhu N, Ware CG, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology*, 2001;283:178-187.
- 96- Rosser BG, Gore GJ,. Liver cells necrosis. Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology*.1995; 108:252-275.
- 97- Huang SH, Chen TC, Tsai SL, Liaw YF. Histopathology and pathobiology of hepatotropic virus-induced liver injury. *J of Gastr. and Hepatol.*1997;195-217
- 98 -Falcon V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Chinea G, Gavilondo J, Gra Oramas B et al. HCV protein localizes in the nucleus of non parenchimal liver cells from chronically HCV infected patients ,*Biochemical and Biophysical Research Communications*,2005;329:1320-1328.
- 99- Haruna Y, Kanda T, Hondas M, Takao T, Hayashi N. Detection of hepatitis C virus in the bile and bile duct epithelial cells of hepatitis C virus-infected patients, *Hepatology*,2001;33:977-980.
- 100-Mattson L, Weiland O, Glaumann H. Application of numerical scoring system for assessment of histological outcome in patients with chronic posttransfusion non A non B hepatitis with or without antibodies to hepatitis C. *Liver*1990;13:289-301
- 101- Brunetti E, Silini E, Pistorio A, Cavallero A, Marangio A, Bruno R et al: Coarse vs fine needle aspiration biopsy for the assessment of diffuse liver disease from hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*,2004;40:501-506.
- 102- Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*,2003;38:1449-1457.
- 103- Colloredo G, Guido M, Sonzogni, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller sample, the milder the disease. *Journal Hepatology*,2003;39:239-244.
- 104- Zarski PJ, Mc Hutchison J, Bronowicki JP, Sturm N, Garcia Kennedy R, Hodaj E, et al: Rate of natural disease progression in patients with chronic hepatitis C. *Journal Hepatology* ,2003;38:307-314.
- 105- Poynard T, Mc Hutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J: Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peg interferon Alfa 2b and ribavirin. *Hepatology*,2003;38:481-492.

- 106- Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M, et al: Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C. morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology*,1997;25:1028-1031:
- 107- Kaserer K, Fudler R, Steindl P, Muller CH, Wiba F, Fernci P, et al: Liver biopsy in a useful predictor of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Histopathology*,1998;32:454-461.
- 108- Scheuer PJ. Liver biopsy size matters in chronic hepatitis: bigger is better *Hepatology*,2003;38:1356-1358.
- 109- Knodell. R. G., Conrad ME, M.E.. Ishak KG:. Development of chronic liver disease after acute non A non B post transfusion hepatitis. Role of gamma globulin prophylaxis in its prevention. *Gastroenterology*,1977;72:902-909.
- 110- Flam SL, Upton M, Parker R, Chapra S. Histopathologic heterogeneity in chronic hepatitis C virus infection: are two liver biopsy specimens better than one?. *Hepatology*,1995;22:270^a.
- 111- Siddique I, El Raga HA, Madda JP, Memon A, Hassan F: Sampling variability of percutaneus liver biopsy in patients with chronic hepatitis C virus infection *Scand J. Gastroenterology*,2003;38:427-432.
- 112- Reger A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowsk, Molina EG, Pyrsopoulos NT et al: Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *American Journal. of Gastroenterology*,2002;97:2614-2618.
- 113- Rousselet M Ch, Michalak S, Dupre F, Croue A, Bedossa P, Saint-Andre JP et al: Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology* 2005;41:257-264.
- 114- Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes . *Hepatology*,2002;35:1274-1276
- 115- Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis. *American Journal of Medicine*,1996;100:98-109.
- 116- Lefkowitch JH. Hepatitis viral. *Current opinion in Gastroenterology*. 2000;16:200-207.

- 117- Lok AS. Hepatitis B virus infection : pathogenesis and management Journal of Hepatology,2000,32(Suppl):89-97.
- 118- Martinot-Peignous M, Boyer N, Colombat M, Akremii M, Pham BN, Castelman C, et al. Serum hepatitis B virus Dna levels and liver histology inactive HbsAG carriers. Journal of Hepatology, 2002;36:381-386.
- 119- Rodríguez Méndez ML, Gonzalez A, Aguilera A . Prevalence, patterns and course of post of hepatitis virus infection in intravenous drugs users with HIV-1 infection. American Journal of Gastroenterology,2000;95:1316-1322.
- 120- Mahoney FJ, Stewart K, Hu H . Progress toward the elimination hepatitis B virus transmission among health care workers in the United States. Archives Internal Medicine,1997;157:2601-2605.
- 121- Ferrari C, Penna A, Guiberti T. Intrahepatic nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B .British Journal Immunology,1987;139:2050-2058
- 122- Ferrari C, Mondeli MU, Penna A, Fiaccordari F, Chisari FV. Functional characterization of cloned intrahepatic, hepatitis virus B nucleoprotein-specific helper T cell lines. Journal Immunology,1987;139:539-544.
- 123- Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis B Age seroconversion: Implication in antihepatitis B virus therapy. J,Gastroen-Hepatol,2003;18:246-252
- 124- Hanh YS ,Subversion of immune responses by hepatitis virus: immunomodulatory strategies beyond evasion. Current Opinion Immunology 2003;15:443-449.
- 125- Baument TF Ito S ,Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural protein assembles into virus-like particles in insect cells .Journal of Virology,1998; 72:3827-3836.
- 126- Penin F, Dubuisson J, Rey JA, Moradpour D, Pawlosky JM et al. Structural Biology of hepatitis C virus. Hepatology,2004;39:5-19.
- 127- Kumar D, Farrell GC, Fung C, George J, Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocyte: reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. Hepatology,2002;36:1266-1272
- 128- Adler M, Goubaud F, Nevens F, Van Vlierberghe, Hepatitis C virus : the burden of the disease. Acta Gastroenterologic Belgic,2002;65:83-86.

- 129- Palton HM, Patel K, Behling C, Bylund D. The impact of steatosis in disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*, 2004;40:484-490.
- 130- Freeman AG, Dore GJ, Law MG, Thorpe .. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:89-816
- 131- Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Journal of Hepatology* , 1999;31:9-16.
- 132- Blight K; Lesmeweski RR, La Brooy T, Gowans RJ. Detection and distribution of hepatitis C specific antigen in naturally infected liver. *Hepatology*, 1994;19:265-272..
- 133- Nouri-Aria KT, Sallie R, Mizokami M , Portmann BC, Williams RI. Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigen in chronic liver disease. *Journal of Hepatology* 1995;175:77-83
- 134- Falcon V, Acosta-Rivero N, Chinea G, Gavilondo J, Maria C. Dela Rosa, Gra Oramas B. et al. Ultrastructural evidence of HVC infection in hepatocytes in chronically HCV infected patients . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003;305:I085-I090.
- 135- Falcon V. Acosta Rivero N, Chinea G, dela Rosa MG; Menendez I, Gra Oramas B, et al. Nuclear localization of nucleocapsid –like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV infected . *Biophysical Research Communications*, 2003;320:54-58 .
- 136- Falcon V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Menéndez I, ded la Rosa M, Gra oramas B, et al. Revisión: Evidencias de la infección por el virus C de la hepatitis en biopsias hepáticas detectadas por microscopía óptica y electrónica. *Acta microscopica* 2004;13.nos.1y2 (versión electrónica)
- 137- Falcon V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Luna-Muñoz J, Miranda M, Gra Oramas B. et al. Evidence of hepatitis C virus replication in hepatocytes and peripheral blood monocytes cells from patients negative for viral RNA in serum. *American Journal of Infection Disease*, 2005;2:1-9.

- 138- Casiraghi MA, De Paschale M, Romano F, Riffi R .Long term outcome(35years) of hepatitis C after acquisition of infection through mini transfusion of blood given at birth, *Hepatology*,2004;39:90-96.
- 139- Lee VM, Hepatitis B virus infection. *New England Journal of Medicine*,1997; 337:1733-1745.
- 140- Feiman SV; Sinclair MD, Wrobel AM. Results of long term prospective study of the hepatitis B surface antigen carrier state .*Hepatogastroenter*, 1982,29:5861.
- 141- Woolf IL, Boyes BE, Jones D. Asymptomatic liver disease in hepatitis B antigen carriers *Journal of Clinical Pathology*,1974;27:348-352.
- 142- Villanueva JP, Desrochers M, Infante-Rivard C, Willems B, Raouan G, Bourcier M et al. Chronic carriers of hepatitis B *American Journal of Digestive disease*,1976;21:18-25.
- 142- Liaw YF; Sung JL .Liver biopsy in asymptomatic carriers of HBsAG . *Gastroenterology*,1979;76:1084-1086
- 144- Koretz R, Leiven KJ; Ribhun D .Hepatitis B surface antigen carriers-to biopsy or not to biopsy. *Gastroenterology*,1978;75:860-863.
- 145- de Franchis R, Arminic A, Vecchi M. Chronic asymptomatic HBs AG carriers: histologic abnormalities and diagnostic and prognostic values of serologic markers of the HBV. *Gastroenterology*,1980;79:521-527.
- 146- Simon JB; Patel SK. Liver disease in asymptomatic carriers of hepatitis B antigen. *Gastroenterology*,1974;66: 1020-1028.
- 147- Schalfer RA, Finlayson DC, Prince AM. Liver disease in asymptomatic hepatitis B antigen carriers. *Journal of Clinical Investigation*,1974;53:71-73.
- 148- Holtermuller KH; Baumuster HG, Schafer A, Eckordt V, Arnat H I. Prospective study of hepatitis B antigen positive carriers. *Gastroenterology*,1975;69:830-832.
- 149- Brillanti S, Foli M; Gaiani A, Miglioli R, Barbara L .Persistent hepatitis C viraemia without liver disease.*Lancet*,1993;34 :464-465.
- 150-Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavaletto D, Noventa F, Pontisso P et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti HCV. *Lancet*,1992;340:697-698.

- 151- Payen JL, Izopet J. Le status de porteur sain du virus de l'hépatitis C existe-t-il . Gastroenterology Clinical Biology,1996;20:531-534.
- 152- Arejas J, Pedroto I, Freitas T, Cerqueira R, Texeira R, Pinho L et al .Hepatitis C vírus carriers with normal ALT activity: viraemia, genotype, histology and effect of interferon therapy.Hepatology,1995,22 . Suppl.343A
- 153- Montolto G, Zignego AL, Ruggieri ME, Monti M, Bascone F, Careccia G. Liver histology and serum HCV-RNA o antiHVC positive patients with persistent normal amino transferase levels Hepatology,1995;22:4Suppl.459.
- 154- Curtiss Jr, Herrera JL. Liver histology and patients with chronic hepatitis C and normal or near normal ALT levels.Hepatology,1995;212:4 Suppl.271.A
- 155-Marcellin P, Kilani A, Cymes K, Martinot M, Gournay J, Benhamou C et al. Virological and histological characteristics in antiHCV patients subjects with normal transaminases levels, Hepatology,1995;22:4 Suppl.273A
- 156- Diago M, Carbonell P, Gonzalez C ,Zapater R, Cors R, Rivera P, et al. Clinical and histological features in anti HCV Riba indeterminate patients with normal ALT. Hepatology,1995;22.4 Suppl272A.
- 157- Gholson CH, Morgan K, Catinis G, FAVOR D, Taylor B ,Gonzalez E et al., 271A Chronic hepatitis C with normal aminotransferases levels . A clinical histologic study. American Journal of Gastroenterology,1997;92:1788-1791
- 158- Afifi R ,Essaid A, Sebti MF;. Comparison entre deux groupes de donneurs de sang porteurs d'hépatitis viral B or C. Etude a propos de 115 cas. Annals Gastroenterology Hepatology,1998;34:221-225.
- 159- Vittal SB, Dourdorekas D, Shobassy N. Asymptomatic hepatic disease in blood donors with hepatitis B antigenemia .American Journal of Clinical Pathology,1974;62:649-654.
- 160- Dragoks K, Ferenti P, Denk H; Huwolka F. Clinical and histological long-term study of HBsAG positive blood donors in Austria .Hepatology 1982,2:747-749.
- 161- Singleton J, Merril D, Fitch B . Liver disease in Australia antigen blood donors. The Lancet,1971;2:785-787.

- 162- Reinicke B, Dykkjaer E, Poulsen H. A study of Australia antigen positive blood donors and their recipients with special reference to liver histology. *New England Journal of Medicine*,1972;286:867-870.
- 163- Iwarson S , Lindholm A ,Lundin P. Hepatitis-associated antigen and antibody in Swedish blood donors. *Vox Sang*,1972;22:501-509.
- 164- Russel RI; Goldberg DM, Allan J. A study of hepatic disease in Australia antigen and antibody positive blood donors .*American Journal of Digestive Disease*,1974;19:113-121.
- 165- Alberti A, Chemello L, Cavaletto D, Tagger A, Dal Canto A, Bizzori N, et al. Antibody of hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donors .*Annals Internal Medicine*, 1991;114:I010-I012.
- 166- Sefarty L, Nosbaum JB, Elglhouzzi MH, Giral P, Legendre C, Poupon R. Prevalence .severity and risk factors of liver disease in blood donors positive in a second generation anti hepatitis C virus screening test.*Hepatology* 1995;21:775-778.
- 167-Esteban J. Lopez Talavera JC, Genesca J, Madoz P, Viladomiu L. Muniz E et al. High Rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus.*Annals of Internal Medicine*,1991,115:443-445.
- 168-Obaid A, Conry-Cantilena C Alter HJ, Hayashi P. Voluntier blood donors with antibody to hepatitis C virus:clinical,biochemical, virologic and histoloogic features. *Annals of Internal Medicine*,1995;123:330-335.
- 169- Naito M, Hayashi M, Hagiwara H, Hiramatsu N, Kasahara A, Fusamoto H, et al. Serum hepatitis C virus RNA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *Hepatology*,1994;19:871-875.
- 170- Irving WL, Neal Kr, Underwood JCE, Simmonds PN, James v. Chronic hepatitis in United Kingdom blood donors infected with hepatitis C virus. *British Medical Journal*,1994;308:695-696.
- 171- Prieto M, Olaso V, Verdu C, Cordoba J,Gispert C,Rayon M, et al. Does the healthy hepatitis C virus carriers state really exist.? An Analysis using polymerase chain reaction. *Hepatology*,1995;22:413-417.

- 172- Zanella A, Conte D, Prati D, Mozzi F, Capetti C, Zanuso F, et al. Hepatitis C virus RNA and liver histology in blood donors reactive to a single antigen by second generation recombinant immunoblot assay *Hepatology*, 1995;21:913-917
- 173- Barros SGS, Vasconcelos MR, Arruda CA, Cavazzola RT, Chies MA, Madruga GPS, et al. Liver biopsy discloses occult chronic viral hepatitis C in young asymptomatic blood donors in Southern Brazil. *Hepatology*, 1995;22:271A
- 174- Sookoian S, Castiglioni T, Kina M, Castaño G, Vilar S, Viudz P et al. Liver biopsy in anti HCV+ blood donors in Buenos Aires *Hepatology*, 1995;22 Suppl
- 175- Benrejeba R, Khediri F, Ebdell N, Bavali R, Benahmed F, Etude histologique et immuno-histochimique prospective du foie chez les donneurs de sang porteurs chroniques asymptomatiques de l'antigène HBs A propos de 34 cas. *Annals Gastroenterol Hepatol*, 1994;30:157-162.
- 176- Loria A, Giral P, Sefarty L, Guechot J, Legendre C, Poupon R. Hepatite viral C :Correlations anatomo-cliniques et biologiques. *Gastroenterol Clinique Biologiques*, 1995;19:508-513.
- 177- Debonne JM, Klotz F, Parzy D, Hovette P, Martet C, Aubry P. Porteurs sains et pseudo-porteurs sains du virus de la hépatite B. Approche clinique, biologique et histologique comparée. *Annals Medicine Intern*, 1992; 143:160-164.
- 178- Deugnier Y, Interet de la biopsie hépatique dans la prise en charge des malades ayant une infection chronique par le virus de l'hépatite C. *Gastroenterol Cliniques Biologiques*, 1997;21:51-556.
- 179- Lau G, Wu P, LO Ch, Lau V, Lam Sh. Histological changes of concurrent hepatitis C virus infection in asymptomatic hepatitis B virus patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1998;13:52-56.
- 180- Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi M, Pham BN, Castelman C et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAG carriers. *Journal of Hepatology*, 2002; 36:381-386.
- 181- Ahmed MM, Elias E, O'Donnell K, Shau J, Kennedy F, Harrison FA et al. Histological progression of chronic hepatitis C virus infection in treated asymptomatic blood donors. *Hepatology*, 1995; 22:271A

- 182- Assy N, Minuk GY, Serum aspartate aminotransferase values as a useful predictor for the histologic features of chronic hepatitis C infection in adults .*Hepatology*,1995;22:272A.
- 183- Laskus T, Cianciari J, Slysarczy. Follow up of NANB hepatitis outbreak in plamaphere3sis unit. *Lancet*,1989;334-391.
- 184- Pouti C, Magrini A, Stati T, Rigato P, Montognese F, Rossi P. Clinical, histological and virological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal or abnormal alanine transaminase levels. *Hepatology*,1997;26:1393-1398.
- 185- Nutt AK, Hassan A, Lindsey J, Lamps LW, Raufman JP. Liver biopsy in the evaluation of patients with chronic hepatitis C who have repeatedly normal or near-normal serum alanine aminotransferase levels. *The American Journal of Medicine*,2000;109:62-64.
- 186 - Hosoda K, Yakosuka O, Kato N, Ito Y, Ohto M, Omata M, et al. Long-term effects of alpha-interferon for treatment of chronic hepatitis C in terms of histological changes with aminotransferase normalization and hepatitis C virus RNA seroconversion . *Gastroenterología Japonica* ,1993,28:115-117.
- 187- Marcellin N, Boyer N, Degott C, Martinot M, Duchatelle V, Giastra E, et al. Long-term histology and viral change in patients with chronic hepatitis C who responded to alpha interferon. *Liver*,1994;14:302-307.
- 188- Uchida T, Taira M, Shikata T, Moriyama M, Tanaka N, Okubo I, Arakawa Y, Histological difference between complete responders and non-responders to Interferon therapy of the livers of patients with chronic hepatitis C. *Acta Pathologica*,1993;43:230-236.
- 189- Mc Cormich SE, Goodman Z, Maydonovith CL, Sjogren MH. Evaluation of liver histology, ALT elevation and HCV-RNA titer in chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology* ,1996;91:1516-1522.
- 190- Sefarty L, Poujal S, Robert A, Carbonell L. Effect of interaction between steatosis and alcohol intake on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology*,2002;97:1807-1812

- 191- Assilah T, Boyer N, Guimont MC, Cazals-Hatem D, Tubach K, Nahon K et al. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 2003;2:1638-1643.
- 192- Saadeh H, Cammell G, Carey W, Younossi Z, Barmes D, Easley K. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2001;33:196-200.
- 193- Perrillo R. The role of liver biopsy in hepatitis C. *Hepatology*, 1997;26:575-615.
- 194- Kronenberger B, Ruster B, Lee JH, Saragin g, Rath WK, Hermann G, et al. Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal alanine transaminase levels. *Journal of Hepatology*, 2000;33:640-647.
- 195- Galván E, Vega H, Gra Oramas B, Rodriguez A, Doval M, Haedo D et al. Papel de la Ribavirina en el tratamiento de la hepatitis crónica B. *Gastroenterol Hepatol*, 2000;23:165-69.
- 196- Galván E, Vega H, Gra Oramas B, Rodriguez A, Doval M, Haedo D, et al. Eficacia e tolerância de la Ribavirina mas interferon em pacientes com hepatitis crônica B. *Gen*, 2000;34:179-186.
- 197- Omata M, Ito Y, Yokosuka O, Imazck F, Uchiume K, Taaklan S, et al. Histological changes of liver by treatment of chronic non A non B hepatitis with recombinant leucocyte interferon alpha: comparison with histological changes in chronic hepatitis B. *Digestive Disease and Sciences*, 1989;34:330-337.
- 198- Mc Hutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shifman ML, Ruster VK. Interferon alpha 2B alone or in combination with Ribavirina as initial treatment for chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, 1998;339:1485-1492.
- 199- Zeuzen S, Feiman SV, Rasenack J, Heathcote JB, Lab MY, Gane E et al. Peginterferon alpha 2a in patients with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, 2000;343:1666-1672..
- 200- Manns MP, Mc Hutchison JG, Gordon GC, Rustic VK, Sheffman M, Rendollas R et al. Peginterferon alpha 2B in combination with Ribavirina compared to interferon alpha 2B plus Ribavirina for initial treatment of chronic hepatitis C. *Lancet*, 2001;358:958-965.
- 201- Poynter T, Yuen MF, Ratzui V, Lai ChL. Viral hepatitis C. *Lancet*, 2003;362:

2095-2100.

- 202- Mizahami M, Orito E, Gibo Y. Genotype serum level of hepatitis C virus RNA and liver histology as predictors as response to Interferon alpha therapy in Japanese with patients with chronic hepatitis C. *Liver*,1996;16:23-27.
- 203- Vandelli C, Renzo F, Bagni A. Virological and histological features of hepatitis C virus patients with normal aminotransferase levels: results a ten years a prospective follow- up study . *Hepatology*,2005;42 (suppl) 232A.
- 204- Kirschner E, Chalmers TC, Popper H, Gerber MA, Stenger RJ, Goldberg JD et al: Observer error in biopsy interpretation and outcome in chronic hepatitis. *Mount Sinai Journal of Medicine*,1982; 49:472-474.
- 205- Gronbaeck K, Christensen PB, Hamilton-Dutout S, Federspiel BH, Hage E, Jensen OJ; et al . Interobserver variation in interpretation of serial liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatology*,2002;9:443-449.
- 206- Rosario B, Ramakrishna B. Histopathological study of chronic hepatitis B and C: a comparison of two scoring system. *Journal of Hepatology* 2003;38:223-229.
- 207-Westin J, Lagging LM, Wejstal R, Norbrans G, Dhillon AP. Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus Interferon, *Liver*,1999;19:183-187.
- 208- Bedossa P, Poynter T. The Metavir comparative study group. An algorithm for the grading of active chronic hepatitis C. *Hepatology*,1996;24:289-293.
- 209- Golden RD, Goldin JG, Burt AD, Dhillon PA, Hubscher S, Wyatt J et al. Intra-observer and inter-observer variation in the histopathology of chronic viral hepatitis .*Journal of Hepatology*,1996;5:649-654.
- 210- Wright M, Golden RD, Faber A, Lloyd J, Thomas H, Troop C et al: Measurements and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross sectional and longitudinal study. *Gut*, 2003; 52:574-579.
- 211- Theodossi A, Shene AM, Portmann R, Knill-Jones RP, Patrick AR, Tate RA; et al: Observer variation in assessment in liver biopsies including analysis by kappa statistics. *Gastroenterology*,1980;79:232-241.
- 212- Czaja AJ, Carpenter HA. Sensitivity, specificity and predictability of biopsy interpretation in chronic hepatitis. *Gastroenterology*, 1993; 105:1824-1832.

- 213- Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, ShimamatsuK, Inoue O et al. The long term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*,1996; 23:1334-1340.
- 214- Martinot-Peignoux M, Boyer N, Cazals-Hatem D, PhamBN, Gervais A, Breton BL et al. Prospective study on anti-hepatitis C virus-positive patients with persistently normal serum alanine transaminase with or without detectable serum hepatitis C virus RNA. *Hepatology*,2002;36:973-977.
- 215- Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban JI, Weiland O, Marcellin P, et al. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Hepatology*,2002;36:973-977.
- 216- Lau GGK, Cooksley G, Marcellin P, Piravitsutk t, Hadziyanis S, Farci P, et al. Predictors of histological improvement and relationship between sustained response and histology in patients with HBeAg positive and negative chronic hepatitis B treated with peginterferon alfa 2a. Libro de seleccion de presentaciones de la American Association for the Study of Liver Disease, San Francisco E.U. 2005.
- 217- Vandelli C, Renzo F, Bagni A. Virological and histological features of hepatitis C virus patients with normal aminotransferase levels: results a ten years a prospective follow- up study . *Hepatology*,2005,42 (suppl) 232A.
- 218- Nosbaum JB, Cadranel JF. Reste-t-il encore une place pour la ponction biopsie hepaticque au cours de la infection chronique pour le virus C. *Gastroenterol Clin Biology*,2002;26:319-320.
- 219- Heintges T, Mohr LO, Hensel F, Petry W, Borchard F, Haussinger D, Niderau C. Value of liver biopsy prior to Interferon therapy in chronic viral hepatitis. *Digestive Disease and Sciences*.1998; 43:1562-1565.
- 220- Reichard O, Glaumann H, Norkrans G, Fryden A, Schwarcz R, Weiland O. Histological outcome in patients with chronic hepatitis C given a 60 week interferon alfa 2b treatment course. *Liver*,1994;14:169-174.
- 221- Galván E, Vega H, Gra Oramas B, Rolo F, Lorenzo I. Efficacy of ribavirin in patients with chronic hepatitis B. *J. of Gastroenterology* ,2000;35 :347-352

- 222- Boyer N, Marcellin P, Duchatelle V, Martinot M, Kilani A, Pouteau M, et al. Sustained response alpha interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1995;22:291A.
- 223- Liaw YF, Sung JY, Chow WCH, Farrel TG, Lee CH, Yuen H et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *New England Journal of Medicine*, 2004;351:1521-1531.
- 224- Honkoop P, de Man R, Zardevan PE, Niester HGM, Schalm SW. Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lamivudine is associated with decrease in HBV-DNA by PCR. *Hepatology*, 1995;22:328A.
- 225- Brouwer JT, Nevens F, Bekkering F, Bourgeois N, Van Vlierberghe H, et al. Reduction of relapse rates by 18-month treatment of chronic hepatitis C. Benelux randomized trial in 300 patients. *J. of Hepatology* 2004;40:689-695.
- 226- Fried M, Shiffman M, Reddy K, Smith C, Marinos G et al. Peginterferon alfa 2b plus ribavirin for chronic hepatitis C viral infection. *N. Eng. JN. Med.* 2002;347:975-986.
- 227- de Ledinghen V, Trimoulet P, Winnock M, Foucher J, Bourlierem et al. Daily or three times a week interferon alfa 2b in combination with ribavirin or interferon alone for the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol* 2002; 37:672-680.
- 228- Mangia A, Santoro R, Piaytelli M, Leandro G, Minerva N, et al. High doses of interferon in combination with ribavirin are more effective than the standard regimen in patients with HCV genotype 1 chronic hepatitis. *J. Hepatol* 2002;37:109-116.
- 229- Tanaka J, Kumagai J, Katayama K, Komuyo Y. Sex and age-specific carriers of hepatitis B and C virus in Japan estimated by prevalence in the 3,485,648 first time blood donors during 1995-2000. *Intervirology*, 2004;47:32-40.
- 230- Kim HCH, Nam CHN, Jee SH, Han KH, Oh DK, Suh I. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 2004;327:220-226.

- 231- Prati D, Taioli D, Zanella A, Torre ED, Butelli S, Del Vecchio E, et al. Update definitions of healthy ranges from serum alanine aminotransferase levels. *Annals Internal Medicine*, 2002;137:1-9.
- 232- Kaplan M. Alanine aminotransferase levels. What's normal?. *Annals Internal Medicine*, 2000;137:49-51.
- 233- Persico M, Persico E, Suozzo R, Conte S, De Seta M, Coppola M, et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology*, 2000;118:760-764.
- 234- Kyrlagkitsis I, Portmann B, Smith H, O'Grady J, Cromp ME. Liver histology and progression of fibrosis in individuals with chronic hepatitis C and normal and elevated ALT *American Journal of Gastroenterology*, 2003;98:1588-1593.
- 235- Poynard T. EASL International consensus conference on hepatitis B *J o Hepatology* 2003;38:533-540
- 236-Kleiner DE. The liver biopsy in chronic hepatitis C, a view of the other side of the microscope. *Semin. Liver Dis.* 2005;25:52-64
- 237- Dienstag JL, Mc Hutchinson JG. American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterol.* 2006;130:231-264.
- 238- Guido M, Rugge M. Liver biopsy sampling in chronic liver hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2004;24:89-97.
- 239- Saleh HA, Abu-Rashid DH. Liver biopsy remain the gold standard for evaluation of chronic hepatitis and fibrosis. *Journ. of Gastroenterol and Liver Dis.* 2007;16:425-426.
- 240- Brahm J. Indicaciones de la biopsia hepática. *Rev. Gastroenterología Latinoamericana.* 2006;17:256-259
- 241- Aguirre J. Usefulness of the liver biopsies in chronic infection with hepatitis C virus. *Annals of Hepatology.* 2006;5:Suppl.1, 19-21.
- 242- Urrutia F. Diagnosis of patients with suspected chronic hepatitis C virus infection. *Annals of Hepatology.* 2006;5:Suppl.1,15-18.

- 243- Bain BG, Bonacini M, Govindarajan S, Ma M , Sherman M, et al: A multicentric study of the usefulness of liver biopsy in chronic hepatitis C.J. Viral Hepatology.2004;11:536-542.
- 244- Carreño V. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. World J. Gastroenterol. 2006;12:6922-6925.
- 245- Seo YS. Normal range of serum Alt level in patient with chronic hepatitis Korean J. Hepatology. 2008;14:116-121.
- 246- Hernández N. Approach to and management patients with chronic hepatitis C virus infection and normal transaminase levels. Annals of Hepatology 2006;5:Suppl.1,34-35.
- 247- Mukhopadhyay AQ, RamakrishnaB, Richard B, Podankatti R, Eapen C, Chandy G. Liver histology and immunohistochemical Indians with incidental detection of hepatitis B virus infection. Indian J. of Gastroenterol.2006;25:128-131.
- 248- Puoti C, Bellis L, Maetellino F, Guarico L, DellUnto O, et al . Chronic hepatitis C and normal Alt levels, treat the disease not the test. J. Hepatology 2004;11:375-382.
- 249- Contreras A, Ruiz J, Polanco-Cruz G, Monteon F, Celis A, et al. End-stage renal disease and hepatitis C infection: comparison of alanine aminotransferase levels and liver histology in patients with and whithout renal damage. Annals of Hepatology. 2007;1:48-54.
- 250- Shindo M, Arai K, Okono T. The clinical value of grading and staging scores for predicting a long term response and evaluating the efficacy of interferon in chronic hepatitis C. Journal of Hepatology,1997;26:492-497.
- 251- Kweon YO, Kang KH. Pretreatment Alt level and histologic activity as predictors of HbeAg loss in lamivudine treatment for chronic hepatitis B. Korean J. of Hepatolol.2004;10:31-41.
- 252- Hefs J, Vikramy S. Treatment of chronic HCV infection in special populations. International J. of Medical Sciences. 2006;3:69-74.
- 253- Hoofnagle JH, Seiff LB. Peginterferon and Ribavirin in chronic hepatitis C. The New Engl. J . of Medicine. 2006;355:2444-2451.

- 254- Borreales M, Castellon G, Fernandez F, Muñoz R, Manzano M, Solis-Herrero JA. Curación de la hepatitis crónica C con 12 meses de tratamiento con Peginterferon-alfa y Ribavirina. *Rev. Esp. Enferm. Digestivas.* 2007;99:730-741.
- 255- Kim T, Han SY, Kim JH, Yoan HA, Balk YH et al. Clinil outcome of pegylated interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *Korean J. Hepatology,* 2008;15:36-45.
- 256- Buti M, Esteban R. Long-term outcome after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Annals of hepatoloy,* 2007;4:267-269.
- 257 – Vilar E, Gra Oramas B, Arus E, Ruenes C, Avila Y. Tratamiento prolongado con Interferon alfa 2b más lamivudina en pacientes con hepatitis crónica B y antígeno e positivo. *Rev. Cub. de Medicina,*2007,46. 181-187.
- 258 – Vilar E, Gra Oramas B, Arus E, Llanio R, Ruenes C. Viusid, a nuritional supplement in combination with interferon alfa 2b and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Liver International* 2007;27 :247-257
- 259- Stephen L, Chen T, Morgan R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *International J. of medical Sciences.*2006;3:47-52.
- 260- Dor-Mohammadi T, Daryani S, Bashashati M, Hastrudi A, Haghpanah B et al. Relantship between serum alanine aminotransferase levels and liver histology in chronic hepatitis C infected patients. *Indian J. of Gastroenterolgy.* 2005;24.49-51.
- 261- Cullen JM. Mechanistic classification of liver injury. *Toxicol Pathol.* 2005;33:6-8. Review.
- 262-Orellana N I, Poniachik T J, Smok S G, Madrid S AM, Menendez A A, Tobar A E, Brahm B J. Factors associated with the severity of liver damage in chronic hepatitis C. *Rev Med Chil.* 2005;:1311-1316.
- 263 -Mohan P, Colvin C, Glymph C, Chandra RR, Kleiner DE, Patel KM, et al. Clinical spectrum and histopathologic features of chronic hepatitis C infection in children. *J Pediatr.* 2007;150:168-174.
- 264 -Gento Pena E G, López Morante A, Cordero Guevara J, Echevarría Iturbe C, Martìn Lorente J C, Olcoz Goni J C, The histological lesions of chronic hepatitis C as predicting factors of sustained response to the treatment with interferon. *An. Med. Interna.* 2001; 18: 351-356.

- 265-Petz D, Klauck S, Rohl FW, Malfertheiner P, Roessner A, Rocken C. Feasibility of histological grading and staging of chronic viral hepatitis using specimens obtained by thin-needle biopsy. *Virchows Arch.* 2003;442:238-244.
- 266- Poynard T, Mc Hutchinson J, Davis DL, Esteban-Mur R, Goodman Z, Bedossa P, Albrecht J. Impact of interferon alpha 2b and Ribavirina of progression of liver fibrosis In patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*,2000;32:1131-1137.
- 267- Poynard T, Ratzyui V, Charlotte F, Goodman Z, Mc Hutchinson, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*,2001; 34:703-734.
- 268- Shiratori T, Imazeki F, Moriyama M.,Yano M,Arakawa Y,Yoko. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to inter-feron therapy. *Annals Internal Medicine* ,2000; 132: 517-524.
- 269- Poynard T, McHutchinson J, Manns M, Trepo CH, Lindsay K Goodman Z et al. Impact of Pergylated Interferon alpha 2b and Ribavirina on liver fibrosis inpatients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* ,2002;122:1303-1313.
- 270- Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Quijodrs D, Poupon R, Tainturier MH, et al. Comparisson of fibrosis progression in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*,2003;38:257-265.
- 271- Di Martino V, Rufat P, Boyer N, Renard P, Degos F, Martinot-Peignoux M, et al. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drugs users:a long term retrospective cohort study. *Hepatology*,2001,34:193-199.
- 272- Martin-Carbonero L, Benhamou Y, Pouti M, Berenguer J, Mallolas J, Quereda C et al. Incidence and predictors of sever liver fibrosis in human immunodeficiency virus infected patients with chronic hepatitis C. A European collaborative study. *J. Clinical Infection Disease*, 2004; 38:128-133.
- 273- D'Amigo G, García-Tsao G, Pagliaro R. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis. A sistematic review of 118 studies. *J. Hepatology*. 2006;44:217-231.

- 274-Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, et al Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem.* 2005 Oct;51(10):1867-73.
- 275- Kojima H, Hongo Y, Harada H, Inove T, Mirjaje K, Kawayachi M et al. Long term histologic prognosis and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C patients treated with Interferon. *J. of Gastroentol-Hepatol*,2001;16:1015-1021.
- 276- Patel K, Lajoie A, Heaton S, Pianko S, Behling CA, Bylund ED, et al.Clinical use of hyaluronic acid as predictor of fibrosis change in hepatitis. *Journal of Gastroenterology* 2003;18:253-257.
- 277- Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, et al. Prospective comparison of Transient Elastography, Fibrotest, APRI and liver biopsy for assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*.2005; 128:343-350.
- 278- Lee JS, Kim JH. The role of activated hepatic stellate cells in liver fibrosis, portal hypertension and cancer angiogenesis. *Korean J. of Hepatology*. 2007,13:138-145.
- 279- Lysy AP, Campard D, Smets F, Najimi M, Sokal EM. Stem cells fro liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J. Gastroenterol*.2008; 14:864-875.
- 280- Rosenberg WM, Volker M, Becha M. A cohort study of a panel of serum markers as predictors of hepatic fibrosis as assessed with liver histology and image analysis. *Gastroenterology*. 2004;127:1704-1713.
- 281- Munteanu M. Non invasive biomarkers fibrotest-actitest for replacing invasive liver biopsy: the need for liver biopsy. *World J. Gastroenterol*.2006;12: 3682-3694.
- 282- Camacho V, Silveira T, Olivera J, Barros S, Cerski C. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyaluronic acid and histopathological

- findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq. Gastroenterol.* 2007; 44:118-122.
- 283- Crespo J. The art of predicting fibrosis in hepatitis C. *Rev. Esp. Enferm Dig.* 2006;98:153-160.
- 284- Sebastiani G, Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J. Gastroenterol.* 2006;12:3682-3694.
- 285- Jin SY. Role of liver biopsy in the assessment of hepatic fibrosis: Its utility and limitations. *Korean J. of Hepatol.* 2007;13:138-145.
- 286- Aresse M. Evaluación de la fibrosis hepática en la práctica clínica: Conceptos actuales y perspectivas. *Rev. Gastroenterología Latinoamericana.* 2006;17:260-264.
- 287- Poinard T, Halfon P, Costera L. Fibro Paca Group. Variability of the area under the receiver operating characteristic curves in the diagnostic evaluation of liver markers: impact of biopsy length and fragmentation. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2007;27:733-739.
- 288- Lagging G, Westin J, Swansson E, Aires N, Dhillon AP, et al. Progression of fibrosis in untreated patients with hepatitis C virus infection. *Liver*, 2002 22:136-144
- 289-Arthur M J, Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following for hepatitis. *Gastroenterology.* 2002; 122 : 1303-1313.
- 290- Duchatelle V, Maecellin P, Giostra E, Bregeaud L, Pouyeau M, Boyer N et al. Changes in liver fibrosis at the end of alpha interferon therapy and 6 to 18 months later in patients with chronic hepatitis: quantitative assessment by a morphometric method. *Journal of Hepatology*, 1998;29:20-28.
- 291- Czaja A, Carpenter H. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*, 2004;40: 646-652.
- 292- Vaquer R, Canet R, Llombart A, Rieras J, Obrador A, Goya J. Histological evolution of chronic hepatitis C. Factors related to progression. *Liver*, 1994; 14:265-269.
- 293- Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 ;38 :1149-1157.

- 294- Westin J, Nordlinder H, Lagging M NorkransG, Westin R. Steatosis accelerates fibrosis development overtime in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *Journal of Hepatology*,2002;37:837-842.
- 295- Poynard T, Ratziu V, Mc Hutchinson, Manns M, Goodman Z, Zuezen R, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alpha-2b and Ribavirina steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*,2003;38:75-85,
- 296- Palton HM, PateK K, Behling C, Bylund D, Blatt LM, Valee M et al. The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patietns. *J. of Hepatology*,2004; 40:484-490.
- 297-Fartoux L, Chazouilleres O, WendumD, Poupon R, Sefarty L. Impact of steatosis progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology*,2005;41:82-87.
- 298- Yoan EJ, Hu kQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *International J. Medical Sciences*. 2006;3:57-62.
- 299- Coral TG, Mattos AA, Mattos AZ. Steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arq. Gastroenterol.*2006; 43:265-268
- 300- Chevalier M, Guerret S, Chossegos P, Gerard F, Grimaud J. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of fibrosis in needle liver specimens:comparison with morphometric studies. *Hepatology*1994;20:349-355
- 301- PiletteC, Rousselet MS, Bedossa P, Chappard D, Oberti F et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis : quantitative image analysis vs semi-quantitative scores : comparison with serum markers. *J. Hepatol.*1998 ;28 439-446.
- 302- Masseroli M, Caballero T, O,Valle F, del Moral RM, Perez Milera A. et al. Automatic quantification of liver fibrosis : design and validation of a new image analysis method : comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *J. Hepatol.* 2000;32.456-464
- 303- O'Brien MJ, Keating MN, Elderyni S, Cerdas S, Keaveny AP et al. An assessment of digital image analysis to measure fibrosis in liver biopsy specimns of patients with chronic hepatitis C. *Amer. J. of Clin. Path.*2000; 114:712-718.

- 304- Wright M, Thurzs M, Pullen R, Thomas H, Goldin R. Quantitative versus morphological assessment of liver fibrosis semi-quantitative scores are more robust than digital image fibrosis area stimation. *Liver Inter.* 2003;23:24-28.
- 305- Lazzarini AR, Levine A, Ploutz-Snyder RJ, Sanderson SO. Advances in digital quantification technique enhance discrimination between mild and advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Inter.* 2005;25:1142-1149.
- 306- Friedenberg M, Mille L, Chung CY, Fleszler F, Banson FL, et al. Simplified method of hepatic fibrosis quantification: design of a new morphometric analysis application. *Liver Inter.* 2005;25:11565-1161.
- 307- Olaechea B. Predictive factors for response to treatment of chronic hepatitis C. *Annals of Hepatology.* 2006;5, Suppl,1,:24-28.
- 308- Jaddish N, Raja G, Esmat S, Wendell C, Russel F. Clinicopathological predictors of predict sustained viral response rates in patients with chronic hepatitis C in fection. *Indian J, of Gastroenrerol.* 2007;26:279-282.
- 309- Gomes M, Gayotto L, Chamone D, Strauss E. Alcohol intakes predisposes to more interface hepatitis in chronic hepatitis C. *Annals of Hepatology*, 2005;4: 176-183.
- 310- Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Annals of hepatology.* 2003;2:5-11.
- 311- Hakan S, Viyal T, Bulur C, Faysal D, Yakup U, et al. Clinicopathologic features of dual chronic hepatitis B andC infecion:A comparison with single hepatitis B, c and delta infections. *Annals of Hepatology.* 2008;7:52-58.

