



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Evaluación de la Rigidez Hepática y Renal  
mediante Elastografía Cuantitativa con Técnica  
ARFI en Modelos Experimentales de Rata.**

**D. Guillermo Carbonell López del Castillo**

**2018**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Evaluación de la rigidez hepática y renal mediante elastografía cuantitativa con técnica ARFI en modelos experimentales de rata.

**D. Guillermo Carbonell López del Castillo**

Directores:

**Juan de Dios Berna Serna**

**Francisco Javier Salazar Aparicio**

**Carlos Manuel Martínez Cáceres**

**2018**





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Dermatología, Estomatología y  
Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina

**Juan de Dios Berna Serna**

AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada: **“Evaluación de la rigidez hepática y renal mediante elastografía cuantitativa con técnica ARFI en modelos experimentales de rata”**, realizada por Guillermo Carbonell López del Castillo bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y, para que surta los efectos oportunos al interesado, firmo la presente en Murcia, a doce de diciembre de dos mil diecisiete.





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina

**Francisco Javier Salazar Aparicio**

AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada: **“Evaluación de la rigidez hepática y renal mediante elastografía cuantitativa con técnica ARFI en modelos experimentales de rata”**, realizada por Guillermo Carbonell López del Castillo bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y, para que surta los efectos oportunos al interesado, firmo la presente en Murcia, a doce de diciembre de dos mil diecisiete.





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

Doctor de Universidad adscrito al IMIB y al HCU  
Virgen de la Arrixaca de Murcia

**Carlos Manuel Martínez Cáceres**

AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada: **“Evaluación de la rigidez hepática y renal mediante elastografía cuantitativa con técnica ARFI en modelos experimentales de rata”**, realizada por Guillermo Carbonell López del Castillo bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y, para que surta los efectos oportunos al interesado, firmo la presente en Murcia, a doce de diciembre de dos mil diecisiete.



# AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, las enseñanzas, la paciencia y apoyo incondicional de mis directores de tesis Juan de Dios Berna, Javier Salazar y Carlos Martínez, sin los cuales no hubiese podido finalizar este trabajo.

A los compañeros del departamento de Fisiología, de la facultad de veterinaria y del CEIB de la Universidad de Murcia que han colaborado en este proyecto, por tantas horas de trabajo y de buenos momentos.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Radiodiagnóstico del HCUVA, por los ánimos que me han transmitido durante todo este tiempo y por los buenos momentos vividos durante los cuatro años de residencia.

A mis amigos, por su confianza y apoyo constante. Mención especial para Luisma Sánchez Siles, por aportar su experiencia y consejos a este trabajo.

A mi familia, en especial a mi madre, a mis hermanas y abuela, por su infinita paciencia y por no dejar nunca de creer en mí.

Y, finalmente, a mi padre, por ser mi guía y ejemplo. Siempre te estaré agradecido por todo lo que has hecho por mí.

A todos, muchísimas gracias.



# RESUMEN

Las enfermedades hepáticas y renal crónicas constituyen una potencial causa de morbimortalidad en países desarrollados. Su fisiopatología se basa, entre otros factores, en el desarrollo de una fibrosis parenquimatosa progresiva y en muchas ocasiones irreversible, que conlleva a la malfunción de estos órganos. En la actualidad, el método “gold standard” para una correcta valoración de la afectación continúa siendo la biopsia, pese a sus limitaciones de muestreo y posibles complicaciones, algunas de ellas potencialmente mortales.

En los últimos años, han ido surgiendo métodos diagnósticos no invasivos para poder cuantificar el grado de afectación hepática y renal, a través de cambios en la elasticidad del parénquima. Los métodos elastográficos basados en la ecografía, entre ellos la técnica ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse), han demostrado resultados prometedores para erigirse como un importante método diagnóstico no invasivo para el diagnóstico y graduación de la enfermedad hepática y renal crónica, pero aún continúan presentando limitaciones y puntos de controversia.

Con el propósito de esclarecer estos puntos, hemos evaluado la rigidez del parénquima hepático y renal mediante técnica ARFI en dos modelos animales experimentales de rata con inducción de diferentes grados de hepatopatía y nefropatía, y hemos llevado a cabo un estudio de correlación con los valores analíticos e histológicos. Los estudios se realizaron tanto de forma *in vivo* como *ex vivo* para determinar posibles factores que artefacten las mediciones, establecer posibles correlaciones entre los distintos tipos de mediciones y para tratar de optimizar la adquisición de valores mediante técnica ARFI.

Los resultados obtenidos revelaron un aumento de las velocidades de corte obtenidas con ARFI en los estudios *in vivo* con respecto a los *ex vivo*, tanto en parénquima hepático como renal, hecho que sugiere que diversos factores pueden alterar las mediciones. Además, hemos detectado unos valores de correlación elevados entre las mediciones adquiridas con ARFI y el grado de fibrosis, más evidentes en parénquima hepático, y, sobre todo, en las exploraciones *ex vivo*. Estos resultados podrían indicar una posible sobreestimación de las medidas en el método *in vivo*. Una correcta planificación y optimización en la adquisición de medidas con ARFI podría limitar estas fuentes de artefacto, para obtener resultados más fiables, precisos y reproducibles. Por otra parte, hemos apreciado alteraciones en las mediciones con ARFI en animales con grados histológicos de hepatopatía y nefropatía incipientes que presentaban parámetros analíticos normales. Estos hallazgos ponen de manifiesto la potencial capacidad de la técnica sonoelastográfica ARFI de detectar patología de forma precoz.

# SUMMARY

Chronic liver and kidney diseases are a potential cause of morbidity and mortality in developed countries. Its pathophysiology is based, among other factors, on the development of a progressive and often irreversible parenchymal fibrosis, which leads to the malfunction of these organs. Currently, biopsy is still the “gold standard” method to evaluate these affections, despite its sampling limitations and possible complications, some of them potentially fatal.

Recently, non-invasive diagnostic methods have been emerging to quantify the degree of hepatic and renal damage by measuring the changes in parenchymal elasticity. Elastographic methods based on ultrasound, including the ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) technique, have shown promising results as a non-invasive diagnostic method for the diagnosis and grading of chronic liver and kidney disease. However, the techniques have several limitations.

In order to clarify these points, we have evaluated the hepatic and renal parenchymal elasticity using the ARFI technique in two experimental rat animal models (with induction of different degrees of liver disease and nephropathy). Moreover, we have carried out a correlation study with the analytical and histological values. The studies were carried out both *in vivo* and *ex vivo* to: 1) determine possible measurement artifact factors, 2) establish possible correlations between the different types of measurements and 3) try to optimize the acquisition of values using the ARFI technique.

Both in hepatic and renal parenchyma, the results showed an increase in the ARFI values in the *in vivo* studies compared to the *ex vivo* ones, which suggests that several factors can alter the measurements. In addition, we detected a high correlation values between the measurements acquired with ARFI and the degree of fibrosis, more evident in liver parenchyma, and, especially, in *ex vivo* scans. These results could indicate a possible overestimation of the measures in the *in vivo* method. Proper planning and optimization in the acquisition of ARFI measurements could limit these artifact sources, to obtain a more reliable, accurate and reproducible results. On the other hand, we have observed ARFI measurements alterations in animals with low histological degrees of hepatopathy and nephropathy and normal analytical parameters. These findings highlight the potential ability of the ARFI sonoelastographic technique to detect pathology early.

# INDICE GENERAL

<b>Capítulo I. ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b> Introducción	<b>1</b>
<b>1.2</b> Epidemiología	<b>3</b>
<b>1.3</b> Manifestaciones clínicas	<b>5</b>
<b>1.4</b> Historia natural	<b>5</b>
<b>1.5</b> Factores de riesgo	<b>6</b>
1.5.1 Edad	7
1.5.2 Síndrome metabólico	7
1.5.3 Género	7
1.5.4 Diferencias étnicas	8
1.5.5 Dieta	8
1.5.6 Apnea obstructiva del sueño	8
1.5.7 Factores genéticos	9
<b>1.6</b> Mecanismo patogénico	<b>9</b>
<b>1.7</b> Histopatología	<b>10</b>
1.7.1 Esteatosis con inflamación y/ fibrosis	10
1.7.2 Esteatohepatitis	11
1.7.3 Fibrosis	11
<b>1.8</b> Diagnóstico	<b>12</b>
1.8.1 Métodos invasivos. Biopsia hepática	12
1.8.1.1 Determinación del grado de esteatosis	13
1.8.1.2 Graduación y clasificación de NAFLD/NASH	13
1.8.2 Métodos no invasivos	14
1.8.2.1 Pruebas clínicas y analíticas	14
1.8.2.2 Pruebas de imagen convencionales	16
1.8.2.3 Métodos elastográficos	20
<b>Capítulo II. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b> Introducción	<b>23</b>
<b>2.2</b> Epidemiología	<b>24</b>
<b>2.3</b> Manifestaciones clínicas	<b>25</b>
<b>2.4</b> Historia natural	<b>26</b>
<b>2.5</b> Factores de riesgo	<b>27</b>
2.5.1 Factores de susceptibilidad	27
2.5.2 Factores de iniciación	27
2.5.3 Factores de progresión	28
2.5.4 Factores terminales	28
<b>2.6</b> Mecanismo patogénico	<b>28</b>
2.6.1 Glomeruloesclerosis	28
2.6.2 Fibrosis túbulo-intersticial	29
<b>2.7</b> Histopatología	<b>30</b>
<b>2.8</b> Diagnóstico	<b>30</b>
2.8.1 Métodos invasivos. Biopsia renal	30
2.8.2 Métodos no invasivos	31
2.8.2.1 Estimación de la filtración glomerular	31
2.8.2.2 Evaluación de la lesión renal	33

<b>Capítulo III. SONOELASTOGRAFÍA MEDIANTE ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Generalidades</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Principios físicos</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Factores que influyen a la velocidad de las ondas de cizallamiento</b>	<b>39</b>
3.3.1 Factores físicos	40
3.3.2 Factores geométricos	43
3.3.3 Factores anatómicos	43
3.3.4 Factores fisiológicos	45
<b>3.4 Utilidad de ARFI en la hepatopatía crónica</b>	<b>46</b>
<b>3.5 Utilidad de ARFI en la nefropatía crónica</b>	<b>47</b>
<b>3.6 Comparación entre la cuantificación ARFI de parénquima hepático y renal</b>	<b>49</b>
3.6.1 Arquitectura interna	49
3.6.2 Aporte vascular	49
3.6.3 Cambios relacionados con la edad	50
<b>Capítulo IV. LA RATA DE LABORATORIO COMO MODELO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Generalidades</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Anatomía hepática</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Anatomía renal</b>	<b>54</b>
<b>Capítulo V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Objetivos</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Hipótesis de trabajo</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
<b>6.1 Obtención de los grupos experimentales</b>	<b>59</b>
6.1.1 Diseño del modelo experimental	61
<b>6.2 Extracción sanguínea y determinaciones analíticas realizadas</b>	<b>63</b>
<b>6.3 Función renal en rata anestesiada</b>	<b>64</b>
6.3.1 Preparación quirúrgica	64
6.3.2 Determinaciones realizadas	66
<b>6.4 Estudio ecográfico convencional y evaluación mediante técnica ARFI</b>	<b>67</b>
6.4.1 Ecografía convencional	68
6.4.1.1 Modelo in vivo	68
6.4.1.2 Modelo ex vivo	71
6.4.2 Evaluación mediante técnica ARFI	74
<b>6.5 Estudio histopatológico, histoquímico e inmunohistoquímico</b>	<b>77</b>
6.5.1 Análisis histológico	78
6.5.1.1 Valoración de la actividad necroinflamatoria del parénquima hepático	79
6.5.1.2 Valoración histopatológica del grado de esteatosis hepática	80
6.5.2 Análisis histoquímico	80
6.5.3 Análisis inmunohistoquímico	81
<b>6.6 Análisis estadístico</b>	<b>83</b>

<b>Capítulo VII. RESULTADOS</b>	<b>85</b>
<b>7.1 Estudio en rata Wistar. Comparación entre modelo in vivo y ex vivo</b>	<b>85</b>
7.1.1 Hígado	85
7.1.1.1 Características clínicas	85
7.1.1.2 Características histopatológicas	86
7.1.1.3 Evaluación con técnica ARFI	89
7.1.2 Riñón	92
7.1.2.1 Características clínicas	92
7.1.2.2 Características histopatológicas	92
7.1.2.3 Evaluación con técnica ARFI	94
<b>7.2 Estudio ex vivo en modelos de rata Sprague-Dawley</b>	<b>95</b>
7.2.1 Hígado	96
7.2.1.1 Características clínicas	96
7.2.1.2 Características histopatológicas	97
7.2.1.3 Evaluación con técnica ARFI	104
7.2.2 Riñón	106
7.2.2.1 Características clínicas	106
7.2.2.2 Características Histopatológicas	106
7.2.2.3 Evaluación con técnica ARFI	111
<b>Capítulo VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>113</b>
<b>8.1 Estudio en rata Wistar. Comparación entre modelo in vivo y ex vivo</b>	<b>113</b>
<b>8.2 Estudio ex vivo en modelos de rata Sprague-Dawley</b>	<b>122</b>
<b>8.3 Discusión conjunta de las experiencias con rata Wistar y Sprague-Dawley</b>	<b>124</b>
<b>8.4 Limitaciones</b>	<b>125</b>
<b>Capítulo IX. CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>129</b>



# INDICE DE ABREVIATURAS

**A/CR:** ratio albuminuria/creatinina en orina

**AAR:** ratio AST/ALT

**ALT:** alanina aminotransferasa

**ANA:** anticuerpos antinucleares

**AOS:** apnea obstructiva del sueño

**ARA:** receptores AT1

**ARFI:** Acoustic Radiation Force Impulse

**ASMA:** anticuerpos anti-músculo liso

**AST:** aspartato aminotransferasa

**CAP:** parámetro de atenuación controlada mediante ultrasonidos

**CHC:** carcinoma hepatocelular

**CKD-EPI:** ecuación para la TFG de la *“Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration”*

**EF:** secuencia “en fase”

**ERC:** Enfermedad Renal Crónica

**ET:** elastografía transitoria

**FO:** Secuencia “Fase Opuesta”

**GGT:** gamma glutamil transferasa

**HDL:** “High Density lipoprotein”

**IgG:** inmunoglobulina G

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**KDIGO:** *“Kidney Disease: Improving Global Outcomes”*

**KPa:** Kilo Pascales

**MDRD-IDMS:** ecuación para la TFG de la *“Modification of Diet in Renal Disease”*

**MEC:** Matriz extracelular

**NAFLD:** *“non-alcoholic fatty liver Disease” (enfermedad grasa hepática no alcohólica)*

**NAS:** score de actividad de NAFLD

**NASH:** *“non-alcoholic steatohepatitis” (esteatohepatitis no alcohólica)*

**NASH CRN-NAS:** *“NASH clinical research network’s NAFLD activity score”*

**PNPLA3:** *“patatin-like phospholipase domain-containing protein 3”*

**PRESS:** espectroscopia de punto-resuelto

**RDI:** Región de interés

**RM:** Resonancia Magnética

**SAF:** clasificación histológica para determinar la esteatosis (S), actividad (A) y fibrosis (F)

**SD:** Sprague-Dawley

**TC:** Tomografía Computerizada

**TE:** tiempo de eco

**TFG:** Tasa de filtración glomerular

**UH:** Unidades Hounsfield

**Vc:** Velocidad de corte (m/s)

**VHC:** Virus de la hepatitis C

# CAPÍTULO I

## ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA

### 1.1 Introducción

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (*non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) representa la manifestación hepática del síndrome metabólico y, frecuentemente, coexiste con obesidad, dislipemia y resistencia a la insulina. A consecuencia del aumento de la obesidad, la NAFLD se ha convertido en la causa más común de alteraciones en los test de función hepática en multitud de regiones a nivel mundial (Amstrong et al., 2012).

Tradicionalmente, los desórdenes grasos del hígado se han clasificado en alcohólicos y no alcohólicos (Figura 1.1). La NAFLD se define como la presencia de esteatosis macrovesicular en >5% de los hepatocitos en pacientes no consumidores o con un consumo bajo de alcohol (<20g/día en mujeres y <30g/día en varones) (Hashimoto, Tanai & Tokushige, 2013).

Este desorden representa un amplio espectro de patologías que abarca desde la esteatosis simple (un 80-90% de los casos), hasta la esteatohepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis* (NASH)) que comprende el restante 10-20%.



**Figura 1.1.** La enfermedad grasa hepática se clasifica en alcohólica y no alcohólica. Dentro de la NAFLD, encontramos la esteatosis hepática simple y la NASH, en función de las características histológicas encontradas.

La esteatosis hepática simple es una entidad clínica benigna y no progresiva, mientras que la NASH puede progresar a cirrosis y a carcinoma hepatocelular (CHC). La NASH se caracteriza histológicamente por una esteatosis asociada a un daño celular (degeneración globosa), inflamación y diversos grados de fibrosis hepática, unas características histológicas indistinguibles de las descritas en la hepatitis de origen alcohólico. La NASH se ha erigido como un entidad clínico-patológica (Chalasani et al., 2012), donde la biopsia hepática continúa siendo la técnica de elección para realizar un diagnóstico definitivo.

Aunque existe una NAFLD/NASH primaria asociada a obesidad, diabetes o dislipemia, así como al llamado síndrome metabólico o de resistencia insulínica, también se ha descrito una NAFLD/NASH secundaria, una entidad infrecuente que puede estar asociada a múltiples procesos (síndrome ovárico poliquístico, enfermedades endocrinológicas, apnea del sueño, resección pancreato-duodenal, etc). Aunque históricamente la enfermedad grasa hepática inducida por fármacos ha sido incluida bajo el término de NAFLD, la guía clínica propuesta por la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas no incluye a los fármacos esteatogénicos como causa de NAFLD (Figura 1.2).

### NAFLD PRIMARIA

- *Obesidad, diabetes mellitus tipo 2, dislipemia, síndrome metabólico*

### NAFLD SECUNDARIA

- *Hipopituitarismo, hipotiroidismo, síndrome del ovario poliquístico, hipogonadismo, apnea obstructiva del sueño, resección pancreato-duodenal, farmacológica, nutrición parenteral, síndrome del intestino corto*

**Figura 1.2.** Tipos de NAFLD en función del mecanismo causal

Por otra parte, la NAFLD puede coexistir con otras enfermedades hepáticas como la infección por virus de la hepatitis C (VHC), hemocromatosis y enfermedad alcohólica hepática, con un aumento en la velocidad de progresión de la enfermedad (Powell, Jonsson & Clouston, 2005).

## 1.2 Epidemiología

La NAFLD es una de las causas más comunes de hepatopatía crónica en adultos, siendo la NASH actualmente la segunda indicación de trasplante hepático, con vistas de convertirse probablemente en la indicación principal en las próximas décadas (Charlton et al., 2011).

Aunque se desconoce la prevalencia global con exactitud, un estudio de Loomba y Sanyal (2013) estima que mil millones de individuos presentan NAFLD.

Estudios poblacionales en Estados Unidos y China, mediante la utilización de estudios espectroscópicos de resonancia magnética (RM), estiman que, aproximadamente, el 28-31% de la población general tiene esteatosis hepática y un 8% muestra una elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) debido a NAFLD (Browning et al., 2004; Wong et al. 2012; Farrell, Wong & Chitturi, 2013). Además, más de un tercio de la población estadounidense muestra algún grado de obesidad en la actualidad, encontrando una interesante asociación entre la prevalencia de NAFLD y la prevalencia de obesidad (Loomb & Sanyal, 2013). En el caso de Europa y países del Medio Este, encontramos una oscilación entre el 20% y el 30%. En España, un estudio multicéntrico transversal realizado por Caballería et al. (2010) demostró una prevalencia del 33.4% en hombres y de 20.3% en mujeres, con una prevalencia global del 25.8%, de pacientes con NAFLD durante estudios ecográficos. Los datos de prevalencia estudiados en Japón y

Australia con muy similares a los descritos en países europeos (Eguchi et al., 2012; Chitturi et al., 2007).

Con respecto a los datos referidos al subcontinente indio, la prevalencia de NAFLD en la población urbana abarca entre el 16% y el 32% y en las zonas rurales, a consecuencia de llevar estilos de vida y dietas tradicionales, la prevalencia no alcanza el 9% (Das et al., 2010). Estos datos ponen de manifiesto la clara relación entre el estilo de vida sedentario y la globalización de la dieta de países occidentales con el aumento de la prevalencia de la NAFLD.

Existe una escasez de datos en torno a los valores de prevalencia en el continente africano. Así, por ejemplo, un estudio nigeriano estima una prevalencia aproximada del 9% y unas diferencias entre zonas urbanas y zonas rurales similar a las descritas en la India (Onyekwere, Ogbera & Balogun, 2011).

En cuanto a la incidencia de esta patología, se desconocen cifras exactas. Sin embargo, atendiendo al incremento de dos a tres veces en las tasas de obesidad en América, Europa y Asia durante las últimas tres décadas, podemos asumir que la incidencia y prevalencia de la NAFLD se encuentra creciendo de forma proporcional a éstas. La NAFLD se ha convertido en la actualidad en un problema de salud pública que requiere la atención de las instituciones para instaurar medidas políticas de prevención y manejo en países donde la prevalencia se encuentra en aumento y que en la actualidad está afectando a >20-25% de la población adulta (Farrell et al., 2013).

Los datos sugieren que la prevalencia de NAFLD es muy alta en países desarrollados, aunque difieren significativamente en función del método diagnóstico utilizado y de la población estudiada. Atendiendo a los diferentes factores de riesgo, el rango de prevalencia puede variar desde un 4.5% en pacientes no diabéticos en África hasta el 99% en pacientes que van a someterse a cirugía bariátrica (Sayiner, Koenig, Henry & Younossi, 2016).

Así como la tasa de obesidad, diabetes y síndrome metabólico continúan incrementándose, la NAFLD y NASH aumentarán su impacto sobre la salud pública durante los próximos años con el consiguiente desarrollo de complicaciones a largo plazo, tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular (Sayiner et al., 2016).

### 1.3 Manifestaciones clínicas

Los pacientes con NAFLD se encuentran habitualmente asintomáticos hasta que la patología progresa a cirrosis hepática. Por lo tanto, la NAFLD es detectada habitualmente como un hallazgo casual a través de la objetivación de esteatosis hepática en estudios ecográficos rutinarios o de control de otras patologías.

La mayoría de los pacientes con NAFLD muestran resistencia insulínica, obesidad, diabetes o dislipemia. Se ha documentado que la NAFLD, además de poder ser el resultado de una resistencia insulínica, puede ejercer como causa de la misma. La NAFLD ya no se considera como una causa primaria de enfermedad hepática sino como un componente más del síndrome metabólico (Targher et al., 2007).

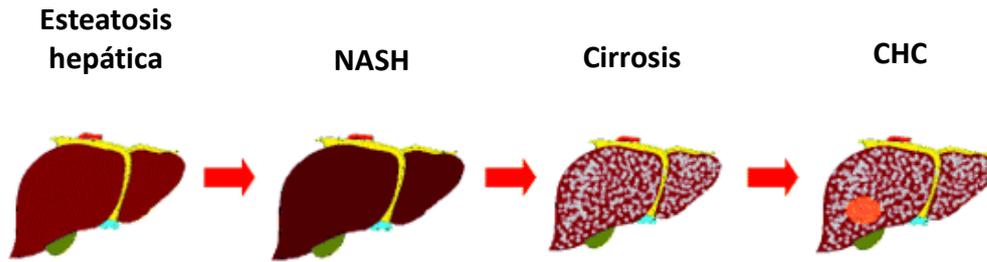
Los resultados analíticos también pueden demostrar una leve elevación de las transaminasas, lo cual puede poner de manifiesto una NAFLD silente.

### 1.4 Historia natural

Se ha postulado que hasta un 90% de pacientes con NAFLD presentan esteatosis simple, entidad con un pronóstico relativamente benigno y sin mostrar un aumento en la mortalidad (Dam-Larsen et al., 2004). Sin embargo, en un 10-30% de los casos, la enfermedad puede progresar hacia una NASH, proceso asociado con inflamación y daño hepático (Figura 1.3). Aproximadamente, un 25-40% de los pacientes con NASH desarrollarán una fibrosis hepática progresiva dando lugar, en un estadio final, a una cirrosis hepática en un 20-30% de los pacientes afectados (Matteoni et al., 1999).

El desarrollo de fibrosis hepática debido a NASH ha sido asociado a mal pronóstico a largo plazo. La mortalidad a 10 años es de un 20% en pacientes con un Child-Pugh A y un 45% presentarán descompensación en 10 años tras el diagnóstico (Sanyal et al., 2006). La progresión a fibrosis secundaria a NASH parece encontrarse en relación con mayor grado de cambios necroinflamatorios (Argo, Northup, Al-Osaimi & Caldwell, 2009) y algunos factores como edad avanzada, la presencia de diabetes y la obesidad mórbida (Adams et al., 2005).

Además, los pacientes cirróticos a causa de una NASH muestran un mayor riesgo de desarrollar CHC (2.6% por año) (Ascha et al., 2010). Además de un aumento en el riesgo de mortalidad a causa de la enfermedad hepática, los pacientes con NASH presentan un incremento de riesgo cardiovascular (Ekstedt et al., 2006).



**Figura 1.3.** Historia natural de la NAFLD (Adaptado de phenex-fxr.de)

### 1.5 Factores de riesgo

Los factores que condicionan la aparición y desarrollo de la NAFLD se resumen en la Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Factores de riesgo para desarrollar NAFLD

### **1.5.1 Edad**

Se han descrito un aumento de prevalencia de pacientes con NAFLD en pacientes con mayor edad (20% en población menor de 20 años por un 40% en pacientes mayores de 60 (Brea & Puzo, 2013), y un aumento de en la incidencia de NASH y cirrosis en pacientes mayores de 50 años en comparación con pacientes de menor edad (Sayiner et al., 2016).

### **1.5.2 Síndrome metabólico**

La detección de pacientes con síndrome metabólico es clave para identificar a pacientes con riesgo de desarrollar una NAFLD, puesto que predisponen al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y a enfermedad cardiovascular. Los criterios diagnósticos actuales requieren la presencia de 3 de 5 de los siguientes factores de riesgo (Kanwar & Kowdley, 2016):

1. Triglicéridos  $\geq 150\text{mg/dL}$
2. HDL  $< 40\text{mg/dL}$  en hombres y  $< 50\text{mg/dL}$  en mujeres
3. Hiperglucemia ( $\geq 100\text{mg/dL}$  glucosa en ayunas)
4. Aumento del perímetro abdominal (en función de datos poblacionales)
5. Hipertensión (presión sistólica  $\geq 130\text{mmHg}$ / presión diastólica  $\geq 85\text{mmHg}$ )

Aproximadamente, un tercio de los pacientes con NAFLD tienen todas las características del síndrome metabólico y  $>90\%$  al menos una (Dixon, Bhathal & O'Brien, 2001). La severidad de la NAFLD se encuentra asociada con la severidad del síndrome metabólico, siendo la NASH y la fibrosis hepática más prevalentes en pacientes con más factores de riesgo metabólicos. La resistencia insulínica es el nexo común entre NAFLD y el síndrome metabólico.

### **1.5.3 Género**

Existe cierta controversia en cuanto al papel que presenta la diferencia de géneros en el desarrollo de NAFLD. Varios estudios han proporcionado datos que sostienen un aumento de la prevalencia en pacientes varones mientras que otros estudios postulan lo contrario (Sayiner et al., 2016). Sin embargo, algunas revisiones epidemiológicas afirman que, mientras la NAFLD es más común en varones, el espectro histológico es más severo en mujeres (Angulo, Keach, Batts & Lindor, 1999).

#### **1.5.4 Diferencias étnicas**

Numerosos estudios coinciden en que el desarrollo de NAFLD es más frecuente en pacientes hispanos (Kalia & Gaglio, 2016). Además, se ha observado un incremento en la población asiática, en muchos casos en pacientes con un índice de masa corporal (IMC) normal. En un estudio estadounidense, los investigadores han reportado un grado menor de esteatosis en pacientes afroamericanos en comparación con pacientes de raza blanca, y han confirmado el mayor grado de afectación en la población hispana (Mohanty et al., 2009). Además, la población hispana parece mostrar una alta tasa de NASH y de cirrosis, mientras que la población afroamericana presenta un riesgo menor de desarrollar un fallo hepático (Satapathy & Sanyal, 2015).

#### **1.5.5 Dieta**

La dieta es considerada como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de NAFLD, especialmente una dieta alta en grasas. El modelo de dieta occidental, compuesta por altos consumos de carne roja, bollería industrial y bebidas azucaradas se encuentra asociada a mayor riesgo de síndrome metabólico y, consecuentemente, de NAFLD (Satapathy & Sanyal, 2015).

#### **1.5.6 Apnea obstructiva del sueño**

La apnea obstructiva del sueño (AOS) se caracteriza por una obstrucción completa o parcial de la vía aérea a causa de un colapso faríngeo durante el sueño (Paschetta et al., 2015). En los últimos años han empezado a verse importantes relaciones entre la AOS y la diabetes mellitus, el síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular. En la población general, la AOS muestra una prevalencia de aproximadamente el 4%, con un importante aumento de hasta el 35-45% en pacientes obesos (Satapathy & Sanyal, 2015).

En un estudio realizado por Tanné et al. (2005) los pacientes con AOS severa presentaron mayor resistencia a la insulina y un mayor porcentaje de esteatosis, así como un incremento en los cambios necroinflamatorios y fibróticos en biopsias hepáticas, en comparación con aquellos pacientes con un similar IMC pero sin presentar AOS. Se postula que el mecanismo patogénico subyacente podría basarse en una alteración en el intercambio gaseoso denominado hipoxia intermitente crónica, que podría dar lugar a un incremento en las citoquinas proinflamatorias, disfunción endotelial, estrés oxidativo, desregulación metabólica y, finalmente, a una resistencia

insulínica. Además, se ha postulado la posibilidad de que la AOS desempeñe un papel relevante en la evolución de una esteatosis simple a una NASH (Paschetta et al., 2015).

### **1.5.7 Factores genéticos**

Existen genes que parecen estar implicados en el metabolismo lipídico y en la posible predisposición a desarrollar una NAFLD. El gen PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) parece relacionarse con el incremento de depósito de grasa y triglicéridos, así como en producir procesos inflamatorios en el parénquima hepático (Kalia & Gaglio, 2016). Existen estudios en los que se asocia la posesión de dos alelos homocigotos de PNPLA 3 en pacientes de raza hispana, a una mayor sobrecarga grasa hepática (Satapathy & Sanyal, 2015), lo cual podría explicar, en parte, la mayor prevalencia de NAFLD en este grupo.

Además, se han realizado numerosos estudios en los que se advierten múltiples genes que podrían estar implicados en la aparición de una NAFLD (Kanth, Sasikala, Sharma, Rao & Reddy, 2016).

## **1.6 Mecanismo patogénico**

La NAFLD se debe a un depósito excesivo de grasa en el parénquima hepático. Específicamente, los ácidos grasos libres y la acumulación de triglicéridos son un componente fundamental para el desarrollo de la resistencia insulínica y obesidad. Los componentes patogénicos que actúan en la NAFLD son múltiples y complejos, con diferentes teorías presentadas en la literatura (Buzzeti, Pinzani & Tsochatzis, 2016).

El modelo del doble impacto es una de las teorías más aceptadas. El primer impacto consistiría en una acumulación lipídica hepática, un estilo de vida sedentario, dieta elevada en grasas, obesidad y resistencia insulínica (Buzzeti et al., 2016). El segundo impacto activaría un proceso inflamatorio que asociaría un proceso fibrogénico (Peverill, Powell & Skoien, 2014).

Esta teoría del doble impacto ha perdido fuerza en los últimos años al ser considerada demasiado simplista, y al observar que existen múltiples factores que influyen en el desarrollo de la NAFLD. Por ello, se han propuesto otros modelos multifactoriales para incluir estos otros factores. Resulta interesante el papel desempeñado por la resistencia insulínica, factor que parece ser fundamental en la evolución de esteatosis simple a NASH mediante la acumulación excesiva de ácidos grasos y la activación de una respuesta inflamatoria (Cusi, 2009).

Por otra parte, también se ha postulado el papel fundamental que tiene la flora bacteriana intestinal en la patogénesis de NAFLD a través de factores solubles que estimulan a las células hepáticas para producir citoquinas proinflamatorias, por lo que se podrían abordar estrategias terapéuticas que modifiquen la flora bacteriana para el tratamiento de la NASH (Leung, Rivera, Furness & Angus, 2016)

## **1.7 Histopatología**

La NAFLD presenta un amplio rango de manifestaciones histológicas, que pueden variar desde una esteatosis muy leve (con únicamente un 5% de los hepatocitos implicados), hasta formas de la enfermedad mucho más agresivas, con inflamación lobular y/o portal, balonización hepatocitaria, fibrosis y, finalmente, cirrosis (Sanyal et al., 2011). La presencia de <5% de hepatocitos implicados no se considera clínicamente significativa.

Se han descrito dos formas histopatológicas para describir la esteatosis celular: macrovesicular (grandes gotas lipídicas aparecen en el citoplasma hepatocitario, que pueden desplazar al núcleo y citoplasma a la periferia celular), y esteatosis microvesicular (acúmulo de numerosas gotas lipídicas de pequeño tamaño, manteniendo el núcleo celular su posición central (Paradis & Bedossa, 2008). La esteatosis microvesicular suele ser más frecuente en esteatosis de origen alcohólico (entidad denominada degeneración espumosa) (Yip & Burt, 2006).

### **1.7.1 Esteatosis con inflamación y/o fibrosis**

En pacientes con NAFLD, la existencia de esteatosis de forma aislada no suele ser la norma general, detectando, de forma frecuente, un infiltrado inflamatorio crónico (típicamente mononuclear), escasas células plasmáticas y monocitos, con escasos neutrófilos e infiltrados eosinofílicos ocasionales en presencia de lipogranulomas (Burt, Lackner & Tiniakos, 2015).

La densidad de células de Kupffer en la NAFLD ha sido correlacionada con el grado de actividad necroinflamatoria, daño hepático y grado de fibrosis. De hecho, se cree que las células de Kupffer representan un papel crucial en el desarrollo de NAFLD a través de la regulación del almacenamiento de triglicéridos, la mediación en la actividad inflamatoria, y en el daño hepático con el consiguiente desarrollo de fibrosis (Harmnon, Tiniakos & Argo, 2011).

Atendiendo al concepto clásico y más estricto de NAFLD, la presencia de daño hepatocitario y fibrosis significa que existe una progresión de la enfermedad a NASH. Sin embargo, casos leves de NAFLD en adultos han presentado un discreto grado de fibrosis, centrada

predominantemente en la zona 3 del acino. Este hecho puede dar lugar a confusión con el desarrollo de una NASH (Burt et al., 2015). En la NASH, la mayoría de expertos coinciden en que los criterios básicos de este proceso son la degeneración globosa hepatocitaria junto con esteatosis y cierto grado de inflamación (Sanyal et al., 2011). De esta forma, existe cierta controversia en cuanto al desarrollo futuro de la enfermedad en estos pacientes con NAFLD que asocian un discreto componente de inflamación/fibrosis, pero sin criterios de NASH (Bedossa, 2016).

### **1.7.2 Esteatohepatitis (NASH)**

La degeneración globosa hepatocitaria, junto con la esteatosis y la inflamación, suelen producirse en la zona 3 acinar (Burt et al., 2015). Trabajos recientes han documentado el potencial de las pruebas inmunohistoquímicas, como las pruebas realizadas con CK8/18, para la detección de NASH, aunque no se utilizan de forma rutinaria (Bedossa, 2016).

Los mecanismos por los cuales se produce la degeneración globosa hepatocitaria no han sido claramente esclarecidos, no obstante, se han propuesto diversos mecanismos posibles (Matsuda, Takada, Kanayama & Takase, 1983; Schaff & Lapis, 1990; Gores, Herman & Lemasters, 1990).

Pueden observarse cuerpos de Mallory-Denk, núcleos glucogenados, lipogranulomas acinares, megamitocondrias, fibrosis perivelular y reacción ductal (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). Sin embargo, ninguna de estas características en solitario es enteramente específica para el diagnóstico de NASH (Burt et al., 2015).

### **1.7.3 Fibrosis**

La fibrosis asociada a NAFLD suele presentar, de forma precoz, acumulación de fibras colágenas en la zona 3 sinusoidal, pudiendo englobar a los hepatocitos en estadios avanzados (Bedossa, 2016). Se ha postulado que la fibrosis pericelular muestra progresión sin acúmulo significativo de colágeno en los espacios periportales. De este modo, la fibrosis periportal se desarrolla tras la perisinusoidal, atrapando a los hepatocitos alrededor de las áreas portales y extendiendo cadenas cortas de colágeno en el interior del parénquima. En ocasiones, la formación de puentes fibrosos puede producir bandas fibróticas entre el área portal y la vena central sin atrapamiento hepatocitario ni formación de islotes (Bedossa, 2016). La tinción

mediante tricrómico de Masson puede poner de manifiesto la fibrosis y detectar de forma precoz su desarrollo en una NASH.

## 1.8 Diagnóstico

### 1.8.1 Métodos invasivos. Biopsia hepática

La biopsia hepática, aunque no se realiza de forma sistemática para el diagnóstico de la NAFLD, continúa siendo el método de elección para la detección y valoración de esteatosis hepática, daño hepatocelular, inflamación y fibrosis hepática.

Como hemos indicado previamente, la presencia de degeneración globosa hepatocitaria, junto con la esteatosis, es la característica histológica clave para diferenciar una NASH de una esteatosis simple. El score de actividad de NAFLD (NAS) es la clasificación histológica más utilizada para el estudio de la NAFLD (Kleiner et al., 2005). De forma más reciente, se ha desarrollado la clasificación SAF, que aúna la determinación de esteatosis (S), actividad inflamatoria (A), y fibrosis (F), y ha demostrado ser más precisa en la caracterización de NASH (Bedossa et al., 2012).

No obstante, la biopsia hepática muestra considerables limitaciones que cuestionan su uso. En primer lugar, se trata de un procedimiento invasivo no exento de complicaciones, algunas de ellas potencialmente graves. Dentro de ellas destacan el dolor relacionado con la punción, hemorragia, neumotórax, perforación visceral, peritonitis biliar, infecciones, etc., y, en algunos casos extremos, puede provocar la muerte del paciente (Rockey, Caldwell, Goodman, Nelson & Smith, 2009). Otra de las limitaciones observadas tiene que ver con los errores de muestreo en pacientes con enfermedad hepática difusa, debido a la escasa cantidad de tejido que se extrae en cada punción, siendo en ocasiones necesario repetir el procedimiento, con el consecuente aumento del riesgo de complicaciones post-punción (Poynard, Ratziu & Bedossa, 2000). Otra de las limitaciones que presenta la biopsia hepática consiste en la visión estática que nos ofrece de la enfermedad, siendo cuestionado su uso repetido en el seguimiento de los pacientes para monitorizar la posible respuesta al tratamiento (Sánchez, 2016).

Por lo tanto, se deben de establecer procedimientos diagnósticos no invasivos para poder diagnosticar y clasificar la NAFLD sin necesidad de utilizar procedimientos invasivos para evitar sus posibles complicaciones. De esta forma, la biopsia hepática debe utilizarse en pacientes donde el diagnóstico es incierto o si las determinaciones no invasivas son ineficaces (Anstee, McPherson & Day, 2011).

### 1.8.1.1 Determinación del grado de esteatosis

A partir del punto de partida de una acumulación lipídica de al menos un 5% de los hepatocitos, el grado de afectación parenquimatosa se divide en tercios (Brunt et al., 1999):

1. 5-33% - Esteatosis leve
2. 34-66% - Esteatosis moderada
3. >66% - Esteatosis severa

La esteatosis, cuando no es muy abundante, suele acumularse en la zona 3 de la unidad acinar, pero cuando el acúmulo es mayor la distribución suele ser panacinar. Sin embargo, en casos menos habituales y en pacientes con tratamiento para la esteatosis este tipo de distribución puede variar, apareciendo en torno a la zona 1 del acino o de manera aleatoria (Burt et al., 2015).

Es importante reseñar que las pruebas convencionales de imagen, tales como la ecografía, la tomografía computarizada (TC) y la RM, no son lo suficientemente sensibles para detectar sobrecargas lipídicas <30% (Burt et al., 2015). No obstante, algunas técnicas de imagen avanzada, como el parámetro de atenuación controlado ecográfico y la espectro-RM si han arrojado resultados prometedores en la evaluación del grado de esteatosis (Karlis et al., 2014; Schiimmer et al., 2015).

### 1.8.1.2 Graduación y clasificación de NAFLD/NASH

Con el objetivo de proporcionar un método consistente y reproducible para el diagnóstico del NAFLD, los sistemas de clasificación deben recoger, de forma semicuantitativa, los datos de las características morfológicas que conforman a la enfermedad.

En la actualidad, se utilizan tres sistemas de medida: “NASH clinical research network’s NAFLD activity score” (NASH CRN-NAS); esteatosis, actividad inflamatoria y fibrosis (SAF en inglés); y el método Brunt (Brunt et al., 1999; Kleiner et al., 2005; Bedossa et al., 2012).

- NASH CRN-NAS: es un sistema de puntuación que utiliza valores numéricos para valorar el grado de actividad. Incluye la evaluación de esteatosis (0-3 puntos), balonización hepatocelular (0-2 puntos) e inflamación acinar (0-3 puntos), así como el estadio de fibrosis, por separado (0-4 puntos). Utilizando un límite de <3 puntos (actividad inflamatoria), se ha demostrado un buen grado de correlación entre la clasificación NAS y la ausencia de un diagnóstico histológico de NASH. Además, utilizando un límite igual

o mayor de 5, se ha identificado una buena correlación con el diagnóstico histológico de NASH (Kleiner et al., 2005).

- Score SAF: es un sistema que fue originalmente diseñado para graduar y clasificar la NAFLD en pacientes obesos mórbidos que fuesen a someterse a cirugía bariátrica. Posteriormente, se han añadido pacientes con riesgo de sufrir síndrome metabólico y su concomitante NAFLD. En este método de clasificación, la actividad inflamatoria (consistente en la detección de degeneración globosa hepatocitaria e inflamación lobular) marca la diferencia entre NAFLD y NASH (pacientes con NASH muestran  $A > 2$ , mientras que ningún paciente con  $A < 2$  presenta NASH) (Bedossa et al., 2012).
- Sistema Brunt: utiliza tres grados de afectación (leve, moderada y severa) evaluando tres parámetros histológicos (esteatosis, degeneración globosa e inflamación). Este sistema también utiliza una forma de graduación que se basa en la localización y en el grado de fibrosis (Brunt et al., 1999).

A pesar de los esfuerzos para conseguir un método de clasificación estandarizado y altamente reproducible, la clasificación de NAFLD sigue presentando importantes limitaciones para poder evaluar un proceso tan complejo y con tantos factores diferentes actuando (Burt et al., 2015).

## **1.8.2 Métodos no invasivos**

### **1.8.2.1 Pruebas clínicas y analíticas**

El diagnóstico de NAFLD requiere la demostración de la presencia de esteatosis hepática por estudios de imagen o histológicos, y han de excluirse otras causas de enfermedad hepática o esteatosis (Chalasani et al., 2012). La NAFLD es habitualmente asintomática por lo que suele diagnosticarse de forma incidental tras apreciar un nivel anormal de enzimas hepáticas o tras la detección de esteatosis durante la realización de pruebas de imagen.

Si se demuestra una alteración en las enzimas hepáticas, normalmente se aprecia un moderado aumento de las transaminasas alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y/o de la gamma glutamil transferasa (GGT). Sin embargo, aproximadamente un 80% de los pacientes muestran un nivel normal de ALT (varones  $< 40$  IU/L y mujeres  $< 31$  IU/L) (Browning et al., 2004). Por otra parte, hay que tener en cuenta que la ALT disminuye conforme la fibrosis progresa a cirrosis. Por tanto, los valores de ALT no se correlacionan con los hallazgos

histológicos y no son de utilidad en la detección precoz de NAFLD ni en la graduación de su severidad (Mofrad et al., 2003; McPherson, Stewart, Henderson, Burt & Day, 2010). Los facultativos clínicos, por lo general, confían en exceso en la alteración de las enzimas hepáticas para el diagnóstico de NAFLD, por lo que un porcentaje elevado de pacientes sin alteraciones analíticas pueden ser infradiagnosticados, perdiendo oportunidades de tratamiento. En diversos estudios se ha comprobado que el 70-80% de pacientes con obesidad central y 50-80% de individuos con diabetes tipo 2 presentan signos de NAFLD por estudios de imagen (Williams et al., 2011; Williamson et al., 2011). Por consiguiente, se requieren nuevos protocolos diagnósticos que incluyan factores de riesgo metabólicos para identificar a pacientes con NAFLD/NASH, además de la elevación de enzimas hepáticas.

En pacientes con alteración de las enzimas hepáticas se deben excluir causas alternativas de enfermedad, como el exceso de consumo de alcohol, daño hepático a causa de fármacos, hepatitis virales, enfermedades hepáticas autoinmunes, hemocromatosis, enfermedad celiaca y enfermedad de Wilson (en pacientes <45 años) (Cobbald, Anstee & Thomas, 2010).

La determinación de niveles bajos de autoanticuerpos, como anticuerpos antinucleares (ANA) y anti-músculo liso (ASMA) también ha sido demostrada en pacientes con NAFLD, generalmente asociados a valores normales de IgG, sin indicar generalmente un proceso de hepatitis autoinmune (Vuppalanchi et al., 2012). Niveles elevados de ferritina son también comunes en la NAFLD y reflejan usualmente una actividad inflamatoria subyacente o una resistencia insulínica. Una saturación de transferrina <45% descarta hemocromatosis.

Se ha desarrollado un sistema de clasificación denominado “NAFLD Liver Fat Score” que evalúa la presencia de factores de riesgo del síndrome metabólico, diabetes tipo 2, niveles de insulina en ayunas, niveles en ayunas de AST y la ratio AST/ALT (AAR), alcanzando una sensibilidad del 86% y una especificidad del 71% en función de los valores de corte utilizados (Kotronen et al., 2009). Sin embargo, este sistema de puntuación no es capaz de distinguir entre los diferentes estadios de NAFLD.

Si no hay certeza de una NAFLD y la sospecha es alta, se deberá considerar la realización de una biopsia hepática para establecer un diagnóstico definitivo.

### 1.8.2.2 Pruebas de imagen convencionales

#### Ecografía

En las imágenes de ecografía en modo B, la esteatosis hepática se identifica como un aumento difuso de la ecogenicidad debido al aumento de la reflexión del parénquima hepático secundario a la acumulación de vacuolas lipídicas (Figura 1.5).

La ecografía es la prueba inicial de cribado de esteatosis hepática al ser una técnica no invasiva, barata y presentar amplia disponibilidad (Palmentieri et al., 2006). Diferentes estudios establecen que la ecografía presenta una sensibilidad del 60-94% y una especificidad del 66-95% (Debonnie, Pauls, Fievez, Wibin, 1981) pero que su capacidad disminuye para discernir entre esteatosis y fibrosis (Taylor, Gorelick, Rosenfield & Riely, 1981). La mayoría de estudios utilizan un sistema de clasificación del grado de esteatosis (“leve”, “moderada” y “severa”) basado en la hiperecogenicidad del parénquima hepático, el aumento de diferencia de ecogenicidad entre hígado y corteza renal y la disminución de visibilidad de las paredes de los espacios porta, aunque uno de los puntos débiles de la ecografía convencional es su operador-dependencia (Fishbein et al., 2005).

En definitiva, la ecografía convencional resulta una técnica muy útil en el cribado en pacientes con sospecha de NAFLD, con datos aceptables de sensibilidad y especificidad, pero con limitaciones en cuanto a la discriminación entre esteatosis y fibrosis, en su reproducibilidad y su precisión para etiquetar el grado de sobrecarga grasa.



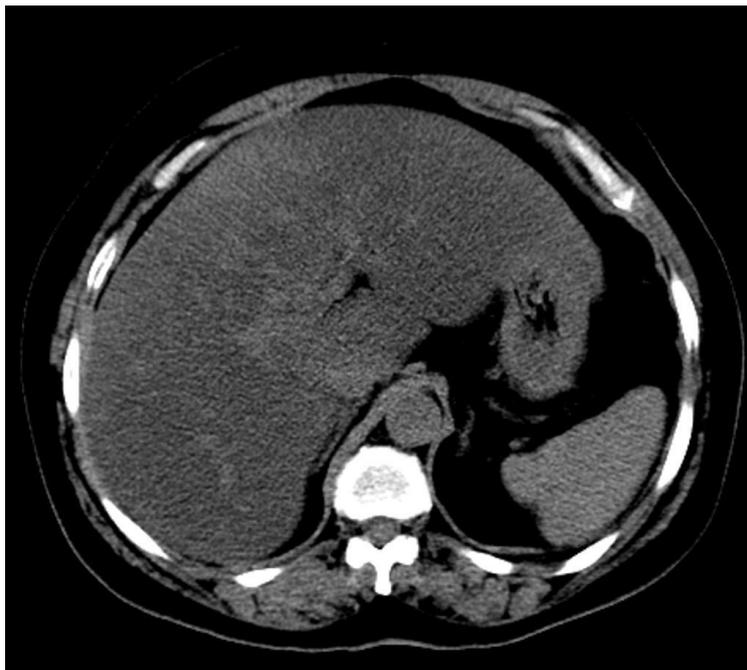
**Figura 1.5.** Aumento generalizado de la ecogenicidad hepática secundaria a esteatosis hepática difusa. (Fuente. Dr Ayush Goel, Radiopaedia.org)

### Tomografía Computarizada (TC)

La TC es otro de los métodos diagnósticos utilizados para evaluar la esteatosis hepática (Bydder et al., 1980). Esta técnica permite una excelente visualización del hígado, con la posibilidad de valorar de forma precisa los infiltrados grasos, tanto focales como difusos. La valoración de la esteatosis hepática resulta más fiable en los estudios sin contraste intravenoso, manifestándose como una disminución en los valores de atenuación del parénquima, mostrando un hígado hipodenso, todo ello secundario a la relación inversa entre el contenido graso hepático y la atenuación del parénquima (Roldan-Valadez, Favila, Martínez-López, Uribe & Méndez-Sánchez, 2008; Karcaaltincaba & Akhan, 2007) (Figura 1.6).

Para la evaluación de la esteatosis hepática se han postulado varias formas de medida, incluyendo la utilización de los valores de atenuación absolutos medidos en unidades Hounsfield (UH), la diferencia de valores de atenuación entre hígado y bazo, y el cálculo del índice bazo-hígado. En pacientes sin patología, los valores normales de atenuación del parénquima hepático se encuentran entre 50-57 UH, resultado 8-10 UH mayor que el valor encontrado en el bazo (Piekarski, Goldberg, Royal, Axel & Moss, 1980). Valores de atenuación hepáticos inferiores de 40 UH o 10 UH menores que los mostrados en bazo son altamente sugestivos de esteatosis hepática (Park et al., 2006), con un parénquima hepático más hipodenso que el esplénico. Otra forma de medida consiste en calcular el índice bazo-hígado. Valores superiores a 1.1 son altamente sugestivos de esteatosis hepática moderada (Iwasaki et al., 2004). También se ha investigado el uso del contraste intravenoso para caracterizar el grado de esteatosis, apreciando múltiples parámetros que pueden afectar a las mediciones tales como el flujo, la cantidad o la fase utilizada para realizar las mediciones (Panicek, Giess & Schwartz, 1997).

La reciente aparición de los TC de energía dual, capaces de adquirir imágenes a diferentes niveles de energía durante la misma apnea, pueden cuestionar los resultados obtenidos en estudios previos. Las primeras investigaciones afirman que, a través de la técnica de energía dual, se podría utilizar la TC para detectar y catalogar con precisión los distintos grasos de esteatosis hepática (Wang, Gao, Zou & Li, 2003). Sin embargo, una de las limitaciones de esta técnica, además de la exposición a radiación ionizante, se basa en la alteración de valores de atenuación en pacientes que presentan algunas enfermedades hepáticas difusas que podrían coexistir junto a la esteatosis, como ocurre en la sobrecarga férrica por hemocromatosis. Esta condición podría enmascarar una esteatosis hepática sobreañadida (Mendler et al., 1998). Además, hay que tener en cuenta las limitaciones existentes en pacientes con escasa infiltración grasa en hígado, pudiendo infraestimar el grado de esteatosis en pacientes con sobrecarga leve y moderada (Park et al., 2006).



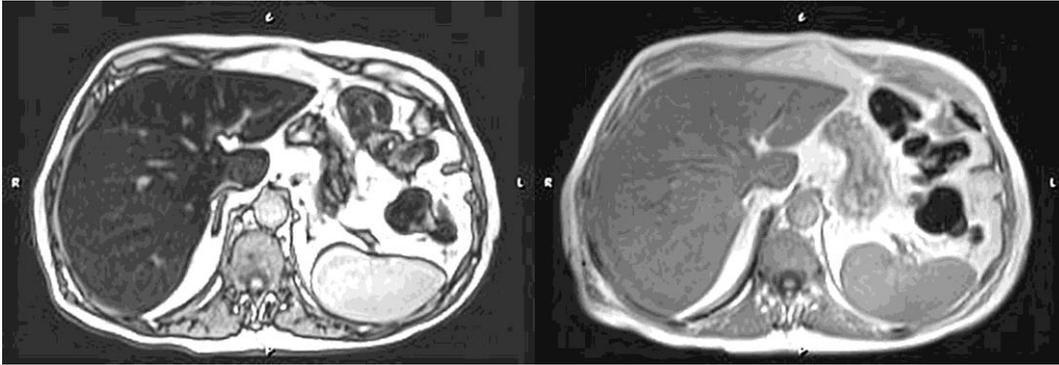
**Figura 1.6.** *Disminución generalizada de la densidad del parénquima hepático atribuible a esteatosis hepática difusa (Fuente. Dr Hani Salam, Radiopaedia.org)*

#### Resonancia Magnética (RM)

La RM es uno de los métodos no invasivos más sensibles para la caracterización de la esteatosis hepática (Schwenzer et al., 2009; McPherson et al., 2009). El fundamento físico utilizado por la RM para la determinación del contenido graso en un tejido específico se denomina “cambio químico” o “*chemical shift*”. Este principio se basa en la diferencia entre las frecuencias de precesión de los protones de hidrógeno de la grasa y el agua. Este fenómeno puede ser utilizado de diversas formas para generar imágenes de RM que muestren información acerca del contenido graso. La escasa disponibilidad y su alto coste representan sus principales limitaciones.

- Secuencia En Fase-Fase Opuesta

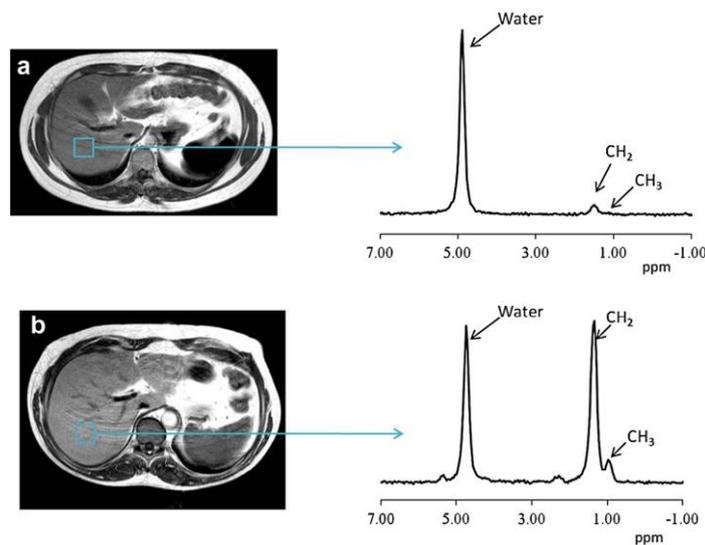
La secuencia en fase-fase opuesta (EF-FO) es la más utilizada para la evaluación del hígado graso. Utiliza las diferencias de frecuencia entre la señal del agua y de los lípidos para generar imágenes potenciadas en T1 eco de gradiente “en fase” (EF) y “en fase opuesta” (FO). Dependiendo del tiempo de eco (TE) elegido, la señal de los vectores de magnetización neta del agua y de la grasa se encontrarán al máximo o al mínimo pudiendo calcular el contenido de grasa a través de la pérdida de intensidad de señal en las secuencias FO con respecto a las en EF (Fishbein & Stevens, 2001) (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Caída de señal generalizada en parénquima hepático en secuencia “Fase Opuesta” con respecto a secuencia “En Fase” secundaria a esteatosis hepática difusa (Fuente. Dr Andrei Tsoriev, Radiopaedia.org)

- Espectroscopia por RM del hidrógeno

Es considerada como el método diagnóstico no invasivo más preciso para cuantificar la esteatosis hepática. En la mayoría de los estudios publicados, la técnica de elección es la secuencia PRESS o “espectroscopia de punto-resuelto”, desarrollada durante los años ochenta. El resultado se expresa en forma de un espectro en el que los picos corresponden a la señal emitida por la cantidad de agua y los componentes grasos presentes en el área de parénquima estudiada. Su capacidad de determinación de la cantidad de grasa hepática muestra una gran correlación con la esteatosis histológica, siendo capaz de detectar niveles de contenido graso hepático >5% (Thomas et al., 2005) (Figura 1.8).



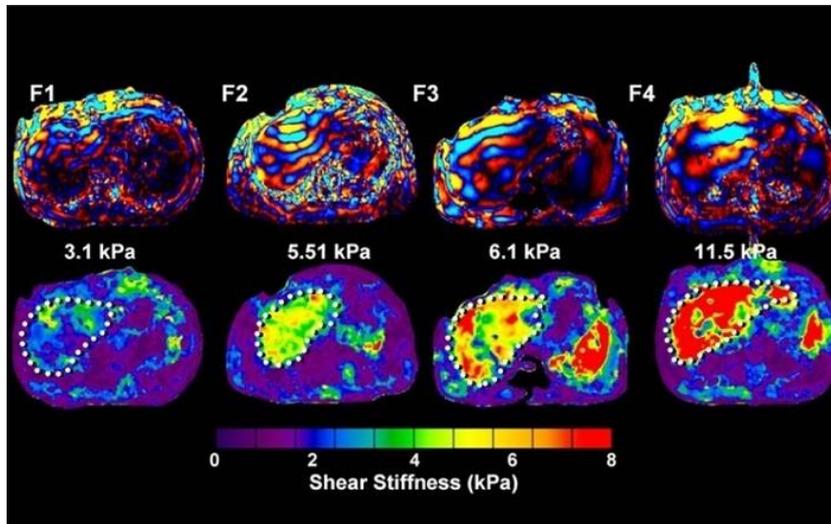
**Figura 1.8.** Imagen transversal de RM con utilización de secuencia PRESS (a) en paciente sano y (b) en paciente con esteatosis. Los picos de los espectros representan la señal emitida por el agua (Water), y por componentes de triglicéridos hepáticos (CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>). El índice de sobrecarga hepática se calcula como la ratio de CH<sub>2</sub> con el agua (Thomas EL et al., 2013).

### 1.8.2.3 Métodos elastográficos

Este tipo de pruebas son capaces de cuantificar la elasticidad del parénquima hepático. El componente principal que altera la rigidez del tejido hepático en la NAFLD es la fibrosis, aunque la esteatosis y el infiltrado inflamatorio también juegan un papel importante. Las técnicas elastográficas más utilizadas y aceptadas para el diagnóstico y caracterización de la NAFLD son las técnicas de elastografía por resonancia magnética, el parámetro de atenuación controlada mediante ultrasonidos (CAP) y las técnicas de elastosonografía cuantitativa o de onda de cizallamiento.

#### Elastografía-RM

Consiste en un método novedoso capaz de estudiar las propiedades elásticas del parénquima hepático. Mediante la utilización de secuencias específicas, este método permite medir la velocidad de propagación de las ondas mecánicas por el parénquima hepático emitidas desde un dispositivo externo, adyacente al hígado y en contacto con el cuerpo del paciente. Estas variaciones de velocidad se representan como un elastograma cuantitativo, medido en kilo pascales (kPa) (Figura 1.9). Los resultados obtenidos con esta técnica muestran alta fiabilidad para demostrar el desarrollo de fibrosis en pacientes con NAFLD, con sensibilidades y especificidades de hasta 94% y 73% respectivamente según algunos estudios (Chen et al., 2011).



**Figura 1.9.** Elastografía-RM con cuantificación de la rigidez hepática en kPa. Fuente. [news.fiu.edu](http://news.fiu.edu).

### Parámetro de atenuación controlada (CAP)

En los últimos tiempos se han ido desarrollando técnicas novedosas para intentar cuantificar la sobrecarga grasa hepática. El parámetro de atenuación controlada (CAP) es una nueva técnica ecográfica capaz de evaluar la esteatosis hepática de forma conjunta con la rigidez hepática utilizando métodos elastográficos. No obstante, se necesitan estudios con mayor número de pacientes para clarificar sus posibilidades. (Sasso, Miette, Sandrin & Beaugrand, 2012).

### Elastografía cuantitativa o de onda de cizallamiento

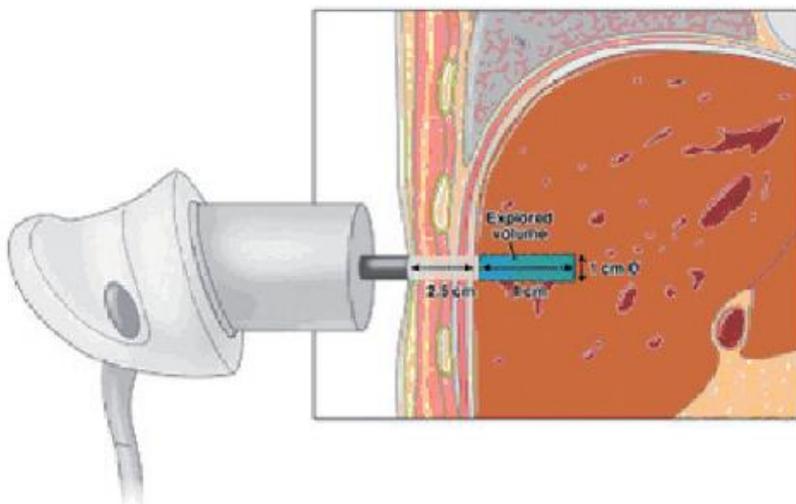
Este tipo de técnicas se basan en la medición de la velocidad de propagación de las ondas transversales o de cizallamiento, generadas tras un proceso de estimulación del tejido y su recuperación a su estado basal. Estas ondas mecánicas generadas se propagan de forma perpendicular a la dirección de desplazamiento del tejido (Sporea et al., 2012). Las dos técnicas más representativas son la elastografía transitoria (ET), la técnica más empleada en diversos estudios para la valoración de la rigidez hepática, y la técnica de fuerza pulsada de radiación acústica (ARFI), utilizada en la presente tesis doctoral.

- Elastografía de transición (ET)

La elastografía de transición (ET, FibroScan®, Echosens, Francia), es el primer método elastográfico basado en el estudio de las ondas de cizallamiento. Mide la velocidad de propagación de la onda mecánica a través del tejido, emitiendo un resultado en kilo Pascales (kPa) (Figura 1.10). Una velocidad de propagación mayor obtenida en la región de interés se relaciona con un aumento de la rigidez. En parénquima hepático, este incremento de la velocidad se relaciona directamente con la cantidad de fibrosis hepática (Sandrin et al., 2003). Se han realizado numerosos estudios en pacientes con hepatopatía crónica por VHC, estableciendo correlaciones entre las determinaciones de velocidad con FibroScan y el grado de fibrosis histológica aplicando la escala METAVIR (Friedrich–Rust et al., 2008; Rizzo et al., 2011). Además, ha demostrado ser una prueba de gran utilidad en el diagnóstico de fibrosis significativa y cirrosis, pero es poco sensible en pacientes con fibrosis incipiente (Asensio del Barrio, Polo de Santos, Luengo Matos, Sánchez-Gómez & Alcázar Alcázar, 2009).

En pacientes con NAFLD, habitualmente su uso es limitado debido a la elevada prevalencia de obesidad en estos individuos. Algunos estudios han reportado importantes limitaciones técnicas

en pacientes con un IMC >30 (Wong et al., 2010) y en pacientes con ascitis. Además, el hecho de no ser una prueba de imagen limita la posibilidad de seleccionar áreas de tejido propicias para una determinación más correcta de las mediciones.



**Figura 1.10.** Medición de la elasticidad hepática mediante FibroScan. Fuente. V. de Lédinghen & Vergniol, 2008).

- Acoustic Radiation Force Impulse Imaging (ARFI)

Consiste en una novedosa técnica sonoeslastográfica que se implementa en un aparato de ultrasonidos convencional y que permite aunar la información recogida con el modo B ecográfico y la información acerca de la elasticidad tisular. Muestra una capacidad similar a la elastografía de transición en la valoración de la fibrosis hepática y representa una importante alternativa en pacientes obesos (Ebinuma et al., 2011).

No obstante, se necesita de la realización de un mayor número de estudios para estandarizar la técnica y comprender aquellos factores que podrían artefactar las mediciones.

# *CAPÍTULO II*

## *ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA*

### **2.1 Introducción**

Enfermedad renal crónica (ERC) es el término utilizado para englobar un conjunto heterogéneo de enfermedades que afectan a la estructura y a la función renal. Las diferencias de expresión se verán relacionadas en parte a causa de la patología, severidad y al grado de progresión.

Desde la introducción de este término en la “Guía de prácticas clínicas en enfermedad renal crónica” de la National Kidney Foundation (2002), las guías clínicas han recomendado un cambio de concepto de la ERC, pasando de ser una enfermedad potencialmente mortal que afecta a una parte pequeña de la población y que necesita el tratamiento por parte de un especialista, hacia una enfermedad común con distintos grados de severidad que no solo puede ser tratada por un nefrólogo o un médico internista, sino que debe abordarse como un problema de salud pública para su prevención, detección precoz y manejo (Levey et al., 2007).

La definición de ERC está basada en la presencia de daño renal o un descenso de la función renal, durante 3 meses o más, independientemente del diagnóstico clínico. El daño renal se detecta a través del grado de albuminuria y el descenso de la función renal, a través de la tasa de filtración glomerular (TFG  $<60\text{mL}/\text{min por } 1.73\text{m}^2$ ) (Stevens et al., 2009; National Kidney Foundation, 2002).

Debido al importante papel que desempeña la TFG en la fisiopatología de las complicaciones, la enfermedad se clasifica en cinco estadios (Figura 2.1).

ESTADIO	DESCRIPCIÓN	TFG (mL/min por 1.73m <sup>2</sup> )
-	Riesgo elevado	≥60 (con factores de riesgo de ERC)
1	Daño renal con TFG normal o aumentada	≥90
2	Daño renal con TFG levemente disminuida	60-89
3	TFG moderadamente disminuida	30-59
4	TFG severamente disminuida	15-29
5	Fallo renal	<15 (o diálisis)

**Figura 2.1.** Estadio de ERC en función de la tasa de filtración glomerular

## 2.2 Epidemiología

Varios países han desarrollado programas de seguimiento para monitorizar un posible fallo renal en pacientes tratados con diálisis o trasplante (Kepler, 2010).

La incidencia y prevalencia de la enfermedad renal ERC difiere de forma sustancial entre países y regiones. Más del 80% de los pacientes tratados de ERC pertenecen a países desarrollados, con poblaciones de avanzada edad y acceso universal a los programas de salud (White, Chadban, Jan, Chapman & Cass, 2008). En cuanto a los países pobres o en vías de desarrollo los datos son significativamente menores que en países desarrollados, pero con tendencia ascendente (Jha et al., 2013).

El importante aumento de la población prevista para los próximos años en países en desarrollo, como China o la India, sugieren que el número de casos de ERC presente un incremento desproporcionado a consecuencia del aumento de edad poblacional. Este incremento puede verse aún más afectado a consecuencia del aumento de la prevalencia de patologías crónicas como la hipertensión y la diabetes, así como al descenso de otras posibles causas de muerte, como los ictus o la enfermedad cardiovascular, a consecuencia de una mejora en el acceso a tratamientos (Jha et al., 2013).

Por otra parte, el cálculo de pacientes con ERC asintomática o con sintomatología leve, que comprende un 80-90% de los casos, es difícil (Stevens & Lenin, 2013). Aunque existen datos epidemiológicos sobre estadios tempranos de ERC en varios países, éstos presentan gran cantidad de limitaciones debido al tipo de población estudiada, los métodos para determinar la TFG y la proteinuria. Los estudios suelen presentar un diseño transversal siendo necesario la

realización de estudios prospectivos. Además, en estudios poblacionales dentro del mismo país, se han identificado diferencias entre distintos subgrupos, apreciando un incremento en el riesgo de desarrollar una ERC en pacientes asiáticos y de raza negra en Reino Unido, individuos de raza negra, hispanos y en nativos americanos en Estados Unidos, e indígenas australianos, aborígenes y maoríes en Nueva Zelanda, así como en Naciones Originarias de Canadá (Feehally, 2005; McDonald, Maguire & Hoy, 2003; Ashton & Duffie, 2011).

En cuanto a las características demográficas de la población con ERC, varían ampliamente a nivel mundial, apareciendo la enfermedad en amplios rangos de edad distintos en función del estudio (Rajapurkar et al 2012; Zhang et al., 2012; Arogundade & Barsoum, 2008).

### **2.3 Manifestaciones clínicas**

En países desarrollados, la ERC se asocia generalmente con la edad avanzada, diabetes, hipertensión, obesidad y enfermedad cardiovascular, siendo la glomeruloesclerosis diabética y nefroesclerosis hipertensiva las entidades patológicas más importantes, junto con el desarrollo de una fibrosis renal progresiva que conduce a un fracaso renal. No obstante, el diagnóstico exacto suele ser difícil (Housman & Shropshire, 2010).

La glomeruloesclerosis diabética se caracteriza por un lento aumento de la albuminuria, hipertensión y una caída progresiva de la TFG, en ocasiones identificando un síndrome nefrótico.

La nefroesclerosis hipertensiva no presenta marcadores distintivos de daño renal, pero se puede apreciar niveles altos de albuminuria tras el inicio de un descenso de la TFG.

Algunos pacientes diabéticos y con enfermedad renal crónica no muestran características típicas de la glomeruloesclerosis diabética, y hallazgos de nefroesclerosis hipertensiva suelen ser más severos de lo esperado debido al nivel de presión sanguínea. La presencia de sedimento urinario anómalo, o anomalías específicas en imagen podrían sugerir otra causa de enfermedad renal.

En países en vías de desarrollo, causas comunes de enfermedad renal crónica incluyen enfermedades glomerulares y tubulointersticiales secundarias a infecciones y exposición a drogas o tóxicos.

## 2.4 Historia natural

Los hallazgos encontrados en estudios clínicos y experimentales han sugerido que la proteinuria presenta un papel importante en la progresión de la enfermedad (Remuzzi, Benigni & Remuzzi, 2006).

Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto una relación entre el incremento de la albuminuria, la mortalidad, el desarrollo de enfermedad renal, y además y de forma independiente a una baja TFG con factores de riesgo cardiovascular. A vista de estos hallazgos, se ha recomendado modificar la clasificación para establecer el pronóstico añadiendo el grado de albuminuria (Levey et al., 2011).

El fallo renal ha sido considerado tradicionalmente como la consecuencia más grave en la ERC, y sus síntomas suelen deberse a complicaciones secundarias a una insuficiencia renal. Cuando la sintomatología es severa, únicamente pueden ser tratados mediante realización de diálisis o de un trasplante renal. El fallo renal se define como una TFG inferior a 15ml/min por 1.73m<sup>2</sup>, o por la necesidad de tratamiento con diálisis o trasplante y se considera como una enfermedad renal terminal. Otras posibilidades en paciente con una TFG disminuida incluyen un aumento del riesgo cardiovascular, daño renal agudo, infecciones, deterioro cognitivo, y deterioro físico (James, Hemmelgarn & Tonelli, 2010). Las complicaciones pueden producirse en cualquier estadio, hecho que puede conllevar riesgo de muerte sin producirse una progresión final a un fallo renal, y puede deberse a efectos adversos por intervenciones para prevenir o tratar la enfermedad (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Historia natural de la enfermedad renal crónica. Adaptado de National Kidney Foundation (2002).

## 2.5 Factores de riesgo

Múltiples estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado la conexión entre varios factores y el comienzo y progresión de la ERC. Se puede establecer una clasificación dividida en varias categorías (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Factores de riesgo para el desarrollo de ERC

### 2.5.1 Factores de susceptibilidad

Son aquellos que predisponen al daño renal. Algunos de ellos son predisposición familiar (Bergman, Key, Kirk, Warnock & Rostand, 1996), la edad avanzada y el sexo masculino (United States Renal Data System, 2003), historia familiar de ERC, tamaño renal reducido, bajo peso al nacer, raza nativa americana y minorías étnicas, así como bajo nivel socioeconómico.

### 2.5.2 Factores de iniciación

Son condiciones que inician el daño renal. Ejemplos representativos serían la diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, obesidad (Haroun et al., 2003), enfermedades autoinmunes,

infecciones sistémicas, infecciones del tracto urinario, nefrolitiasis, obstrucción del sistema excretor urinario y la toxicidad por fármacos.

### **2.5.3 Factores de progresión**

Causan un empeoramiento del daño renal y aceleran el proceso de fracaso renal: Los altos niveles de proteinuria (Iseki, Ikemiya, Iseki & Takishita, 2003; Remuzzi, 1988), la presión sanguínea alta, pobres controles de glucemia en pacientes diabéticos o el tabaco (Orth et al., 1998) constituyen este tipo de factores.

### **2.5.4 Factores terminales**

Incrementan la morbilidad y mortalidad en el fracaso renal. Son desencadenantes de complicaciones. Entre ellos destacan las bajas dosis de diálisis, los accesos vasculares temporales y los niveles bajos de albúmina sérica.

## **2.6 Mecanismo patogénico**

### **2.6.1 Glomeruloesclerosis**

La glomeruloesclerosis progresiva presenta marcadas similitudes con la aterosclerosis (El-Nahas, 1988). Comparten factores de riesgo, más específicamente la hipertensión, la dislipemia y el tabaco. Los dos procesos se ven afectados por un daño y disfunción endotelial, producción de células musculares lisas o mesangiales, y un daño en el pericito. Tal como ocurre en la aterosclerosis, las fuerzas de estrés inducidas por la hipertensión provocan daño, activación y disfunción del endotelio glomerular, hecho que conduce a un proceso microinflamatorio que conlleva la interacción entre células inflamatorias y células mensangiales, con la activación, proliferación y disfunción de estas últimas.

La comunicación intercelular depende de la liberación de citoquinas y factores de crecimiento (Cybulsky, 2000). Bajo la influencia de los factores de crecimiento las células mesangiales regresan a un fenotipo mensangial embrionario, los mesangioblastos, capaces de secretar una cantidad excesiva de proteínas de MEC, produciendo una expansión mensangial, un signo precoz de glomeruloesclerosis (El-Nahas, 2003).

Recientemente se ha reconocido el fundamental papel del podocito en la patogénesis de la glomeruloesclerosis. El estiramiento de estas células puede dejar áreas de membrana basal

glomerular al descubierto, favoreciendo la adherencia en la cápsula de Bowman (Pavenstadt, Kriz & Krezler, 2003).

El devenir del remodelado glomerular depende del balance resultante entre los procesos de regeneración y de cicatrización tisular. La resolución del proceso microinflamatorio conlleva la recuperación fenotípica madura de las células glomerulares, evitando en acúmulo excesivo de proteínas de MEC. Por el contrario, una activación persistente de los mecanismos inflamatorios dará lugar a procesos de inducción apoptóticos y a la liberación de proteínas de MEC, dando lugar a una fibrosis y glomeruloesclerosis irreversible.

### **2.6.2 Fibrosis túbulo-intersticial**

El proceso de cicatrización y fibrosis túbulo-intersticial se encuentran íntimamente asociados con el fracaso de la función renal. Al igual que ocurría en la glomeruloesclerosis, la fibrosis túbulo-intersticial conlleva inflamación, proliferación y apoptosis celular (El Nahas, 2003).

Estudios experimentales han puesto de manifiesto el importante papel de la proteinuria en el comienzo de la inflamación tubulointersticial (Schieppati & Remuzzi, 2003). La excesiva reabsorción de albúmina por las células del túbulo proximal en estudios *in vitro*, estimulan la producción de varios mediadores proinflamatorios, entre ellos citoquinas. Estos agentes son capaces de atraer células inflamatorias al intersticio renal e iniciar interacciones con fibroblastos intersticiales. La activación y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con la asociada generación de proteínas de MEC, conducen a fibrosis intersticial.

Además, las células tubulares pueden contribuir al proceso fibrogénico al ser capaces de cambiar su fenotipo, influenciadas por algunos factores de crecimiento, dando lugar a células mesenquimales capaces de producir proteínas de MEC.

El desarrollo del proceso de fibrosis tubulointersticial va a depender de la capacidad de resolución del proceso inflamatorio, de la regeneración tubular, de la autolimitación de formación de fibroblastos y de la posibilidad de romper esas proteínas de MEC excesivas. Un proceso de daño continuado, junto con la inflamación y la activación fibroblástica darán lugar a una fibrosis irreversible, al igual que ocurría en la glomeruloesclerosis (El-Nahas & Bello, 2006).

## 2.7 Histopatología

La fibrosis renal, caracterizada por una glomeruloesclerosis y una fibrosis tubulointersticial, es la manifestación final común de una amplia variedad de enfermedades renales crónicas. Independientemente de la causa etiológica, una enfermedad renal crónica progresiva suele derivar en la formación de tejido cicatricial lo cual conlleva una destrucción completa del parénquima renal y una insuficiencia renal terminal, una grave condición que requiere de la realización de diálisis o de un trasplante (Liu, 2006).

La patogénesis de la fibrosis renal es, al igual que ocurría en la fibrosis hepática, un proceso progresivo caracterizado principalmente en la excesiva acumulación y depósito de proteínas de MEC.

Los hallazgos histopatológicos que se describen en la fibrosis renal suelen describirse como glomeruloesclerosis, fibrosis túbulo-intersticial, infiltración inflamatoria y pérdida de la arquitectura renal normal (atrofia tubular, una pérdida de capilares y un descenso de los podocitos). Los procesos celulares subyacentes que producen estas presentaciones histológicas son aún más complicados. Incluyen una activación mesangial y fibroblástica, una transición de epitelio tubular a mesenquimal, infiltración de monocitos/macrófagos y células T y apoptosis celular (Liu, 2006).

## 2.8 Diagnóstico

### 2.8.1 Métodos invasivos. Biopsia renal

La biopsia renal es un procedimiento esencial en el diagnóstico y caracterización de la enfermedad renal crónica. Sin embargo, no existen guías de actuación globales que fijen sus indicaciones de uso y existe cierta controversia acerca de sus limitaciones. Nos proporciona el diagnóstico directo de enfermedad renal en casos de enfermedades glomerulares, túbulo-intersticiales, vasculares y enfermedades sistémicas con afectación renal.

Aunque la biopsia renal es el procedimiento de elección para el diagnóstico definitivo de la fibrosis renal, presenta importantes riesgos al causar complicaciones potencialmente graves como hematomas, hematuria macroscópica, fistulas arteriovenosas e infecciones (Guo et al., 2013). Además, es altamente susceptible a cometer errores de muestreo y considerables variaciones intra e interobservador que le pueden restar precisión a la técnica (Dhaun, Bellamy, Cattran & Kluth, 2014). Por tanto, resulta indispensable desarrollar un método diagnóstico no

invasivo y reproducible que nos proporcione una precisa diferenciación entre riñones sanos y enfermos, y que nos facilite clasificar la enfermedad en función de su severidad.

## 2.8.2 Métodos no invasivos

La ERC puede diagnosticarse a través del cálculo de la TFG, acompañado del estudio de alteraciones analíticas en sangre y orina, con unos valores de filtración inferiores a 60mL/min durante más de 3 meses. Estos hallazgos pueden ser complementados mediante pruebas de imagen y biopsia renal (Bruno et al., 2013).

La etiología y el proceso fisiopatológico de la ERC puede ser muy variada, pero el resultado común de la mayoría de estos procesos patológicos es el desarrollo de una fibrosis renal, con una disminución del número de nefronas funcionales (Bruno et al., 2013). De esta forma, el tratamiento de la fibrosis renal es uno de los retos en el manejo de la ERC, y el diagnóstico precoz se plantea imprescindible para una estrategia de tratamiento efectiva.

### 2.8.2.1 Estimación de la filtración glomerular

La filtración glomerular (FG) es la mejor herramienta para evaluar la función renal. Los valores de FG varían en función de múltiples factores como la edad, el sexo, el IMC, etc., con unos valores normales de 90-140 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> en personas adultas jóvenes sanas.

Para realizar su medición se han utilizado una serie de sustancias exógenas como la inulina (método de elección) pero su uso en la práctica diaria es limitado, siendo necesaria la utilización de sustancias de producción endógena para facilitar el proceso. Es por ello que el aclaramiento de creatinina corregido por la superficie corporal (1,73m<sup>2</sup>), tanto en suero como en orina de 24h, ha sido el método de elección para calcular la FG.

Las limitaciones que ofrece el cálculo del aclaramiento de creatinina, como la sobreestimación del FG secundario al exceso de creatinina excretado por los túbulos renales o la dificultad de la recogida de orina de 24h, ha hecho que diversas sociedades hayan desarrollado guías, como la "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO), en las que se recomienda el uso de ecuaciones obtenidas a partir de la concentración de la creatinina sérica, la edad, el sexo y el grupo étnico para la estimación de la FG. Estos sistemas han demostrado ser más precisos que la medición de la creatinina sérica aislada (National K. F., 2002). Las ecuaciones más utilizadas y aceptadas en la actualidad son la MDRD-IDMS y la CKD-EPI (Figura 2.4):

- MDRD-IDMS: derivada del estudio “*Modification of Diet in Renal Disease*” (Gracia-Garcia et al., 2012; Levey et al., 1999). Estos medios tienden a infraestimar los valores de aclaramiento, con el consiguiente aumento de exploraciones innecesarias (Stevens et al., 2007).
- CKD-EPI: La más aceptada en la actualidad, desarrollada por el grupo “*Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration*” (CKD-EPI) en 2009 (Levey et al., 2009) y recomendada en las nuevas guías de la KDIGO 2012 debido a su mayor exactitud con respecto a MDRD. Aun así, la clasificación CKD-EPI continúa mostrando dificultades en clasificar los estadios 1 y 2 de la ERC, identificar estados de hiperfiltración y la monitorización de la pérdida de FG (Montañés-Bermúdez, Bover-Sanjuán, Oliver-Samper, Ballarín-Castán & Gracia-Garcia, 2010).

<b>Ecuación CKD-EPI</b>	
Etnia blanca:	
Mujeres	$\text{Creatinina} \leq 0,7 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 144 \times (\text{creatinina}/0,7)^{-0,329} \times (0,993)^{\text{edad}}$ $\text{Creatinina} > 0,7 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 144 \times (\text{creatinina}/0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Hombres	$\text{Creatinina} \leq 0,9 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 141 \times (\text{creatinina}/0,9)^{-0,411} \times (0,993)^{\text{edad}}$ $\text{Creatinina} > 0,9 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 141 \times (\text{creatinina}/0,9)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Etnia negra:	
Mujeres	$\text{Creatinina} \leq 0,7 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 166 \times (\text{creatinina}/0,7)^{-0,329} \times (0,993)^{\text{edad}}$ $\text{Creatinina} > 0,7 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 166 \times (\text{creatinina}/0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
Hombres	$\text{Creatinina} \leq 0,9 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 163 \times (\text{creatinina}/0,9)^{-0,411} \times (0,993)^{\text{edad}}$ $\text{Creatinina} > 0,9 \text{ mg/dL } \text{FGe} = 163 \times (\text{creatinina}/0,9)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{edad}}$
<b>Ecuación MDRD-IDMS</b>	
$\text{FGe} = 175 \times (\text{creatinina})^{-1,154} \times (\text{edad})^{-0,203} \times 0,742 \text{ (si mujer)} \times 1,21 \text{ (si etnia negra)}$	

**Figura 2.4.** Ecuaciones CKD-EPI y MDRD-IDMS para la estimación de la creatinina estandarizadas (Fuente: Gracia et al., 2006)

El uso de estas ecuaciones para la estimación de la FG se ve limitado en determinadas situaciones clínicas (Gracia et al., 2006), siendo necesario un cálculo de la TG mediante depuración de creatinina en orina de 24h. Estas situaciones clínicas son las siguientes:

- Personas con IMC extremo:  $<19\text{kg/m}^2$  o  $>35\text{kg/m}^2$ .
- Personas con dietas especiales o malnutrición.
- Personas con alteraciones de la masa muscular.
- Menores de 18 años.
- Enfermedad hepática grave, ascitis o edema generalizado.
- Mujeres embarazadas.
- Casos de fracaso renal agudo o ERC reagudizada.
- Estudio de potenciales donantes renales.
- Ajuste de dosis de fármacos nefrotóxicos o de eliminación predominantemente renal.

### **2.8.2.2 Evaluación de la lesión renal**

#### Albuminuria

La determinación de elevadas concentraciones de proteínas o albúmina en orina, de forma persistente, es un importante signo de lesión renal, además de poder representar un signo de afectación sistémica, sobre todo a nivel cardio-vascular (Fernandez-Llama & Bover, 2008). Múltiples estudios han demostrado la importancia de la proteinuria en la patogenia de la progresión de ERC, así como la relación entre la albuminuria con el pronóstico renal y el aumento de la mortalidad de forma independiente a otros factores (Gracia et al., 2006). Así pues, la albuminuria constituye, junto con la FG, la base diagnóstica y la clasificación de la ERC.

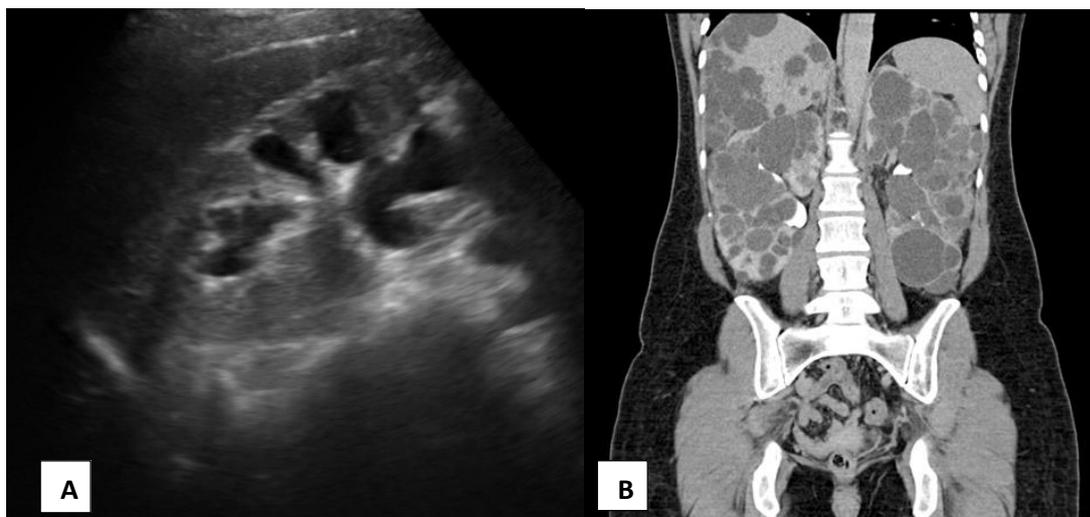
Para evitar variaciones derivadas del grado de hidratación, los resultados se deben expresar con relación a la concentración de creatinina en orina. Varias guías recomiendan la medición del cociente albuminaria/creatinina (A/CR) en orina. Para constatar la presencia de albuminuria, son necesarios dos valores elevados en tres muestras obtenidas durante un periodo de 3 a 6 meses.

#### Alteraciones en el sedimento urinario

La presencia en el sedimento urinario de hematuria y/o leucocituria durante un periodo superior a tres meses, en ausencia de infección urinario o de patología urológica, pueden ser parámetros indicativos de glomerulonefritis, pielonefritis o nefritis túbulo-intersticiales crónicas (Gracia et al., 2006).

### Pruebas de imagen

La prueba de diagnóstico por imagen más empleada en la valoración renal es la ecografía convencional. Además de descartar la presencia de patología obstructiva de la vía urinaria, nos permite valorar la estructura renal e identificar anomalías que podrían significar daño renal, como la disminución del grosor parenquimatoso, cicatrices o adelgazamiento focales corticales, aumento difuso de la ecogenicidad, o hallazgos que podrían dar un diagnóstico de sospecha de poliquistosis renal (Figura 2.5A).



**Figura 2.5.** A) Ecografía renal donde se aprecia moderada hidronefrosis, leve incremento de la ecogenicidad renal, disminución del grosor cortical y pérdida de la diferenciación córtico-medular a consecuencia de un reflujo vesico-ureteral. Fuente Dr Zareena Ansari, Radiopaedia.org. B) TC abdomino-pélvico coronal renal de un paciente con múltiples quistes renales bilaterales y hepáticos, secundarios a una enfermedad renal poliquística autosómica dominante. Fuente. Dr Erik Ranschaert, Radiopaedia.org.

Otras pruebas diagnósticas, como la pielografía tomografía computarizada, resonancia magnética o gammagrafía, pueden poner de manifiesto alteraciones morfológicas que, en el contexto clínico indicado, pueden suponer la presencia de daño renal (Martínez-Castelao et al., 2014) (Figura 2.5B).

En la actualidad, se están realizando múltiples estudios mediante técnicas de elastosonografía para la valoración del parénquima renal en pacientes con ERC. La técnica ARFI es una técnica elastográfica emergente capaz de proporcionar información acerca de la elasticidad de los tejidos. Se encuentra integrada en un ecógrafo convencional y utiliza ondas sonoras para evaluar la elasticidad tisular de forma cuantitativa a través de la medición de la velocidad de las ondas

de corte. Esta información biofísica que es capaz de proporcionarnos resulta de suma utilidad en el manejo de procesos patológicos difusos que afectan a la elasticidad de los tejidos (Shiina et al., 2015). Se han llevado a cabo varios estudios que arrojan conclusiones contradictorias en cuanto a la detección y caracterización de la fibrosis renal, resultado final de gran parte de las causas que producen una ERC. Algunos experimentos muestran una alta correlación entre los valores de ARFI y el grado de fibrosis renal (Stock et al., 2010) y con la tasa de filtración glomerular (Guo et al., 2013), mientras que otros expresan una ausencia de correlación entre ARFI y la severidad de la fibrosis (Syversveen et al., 2011) o con los resultados histológicos (Wang et al., 2014). Debido a esta aparente contradicción, se necesitan más estudios para establecer la verdadera aplicabilidad de esta técnica para el diagnóstico preciso de la fibrosis renal.



# CAPÍTULO III

## SONOELASTOGRAFÍA MEDIANTE ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE (ARFI)

### 3.1 Generalidades

El principio de palpación, utilizado en la exploración clínica desde los orígenes de la Medicina, ha sido recientemente incluido en técnicas diagnósticas capaces de caracterizar la elasticidad de los tejidos y órganos. En estos métodos diagnósticos, denominados elastográficos, la información proviene de la respuesta emitida por los tejidos explorados tras ser estimulados por fuerzas que inducen modificaciones mecánicas. La elasticidad de estos tejidos varía de forma significativa entre tejidos biológicos normales y anormales. De esta forma, podemos ser capaces de detectar y cuantificar la patología utilizando estos métodos elastográficos.

El estudio de la elasticidad de los tejidos mediante el uso de ultrasonidos se basa en la medición del desplazamiento tisular tras aplicar una fuerza sónica que lo estimule. Esta fuerza genera dos tipos de onda distintos en los tejidos, cada cual estudiada por una técnica elastográfica diferente. Las ondas longitudinales o de compresión son las estudiadas por métodos sonoelastográficos cualitativos, mientras que las ondas transversales o de cizallamiento son registradas por métodos sonoelastográficos cuantitativos. La técnica ARFI (*“Acoustic Radiation Force Impulse”*) pertenece a este último grupo de técnicas sonoelastográficas.

La modalidad ecográfica ARFI es una técnica emergente y dinámica que aúna información acerca de la elasticidad parenquimatosa del órgano diana con los datos procedentes de un estudio ecográfico convencional en modo B. Se encuentra incluido en aparatos ecográficos convencionales de última generación.

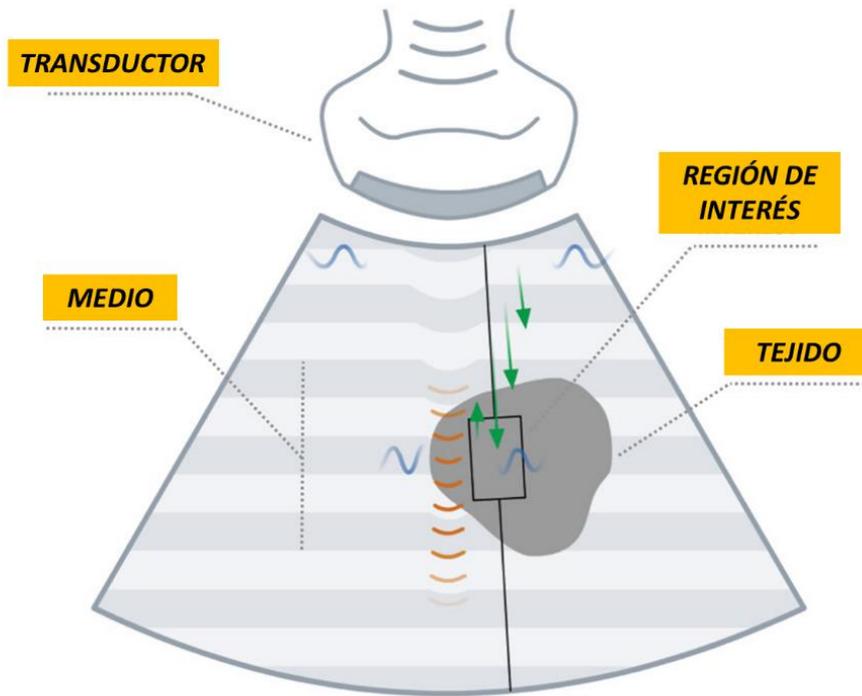
### 3.2 Principios físicos.

En la técnica ARFI, se generan ondas sonoras de cizallamiento capaces de estimular el tejido incluido en una región de interés (RDI) de dimensiones constantes situada por el explorador en el área que se desea valorar. El radiólogo selecciona la localización de la RDI en un estudio ecográfico convencional en escala de grises.

La onda acústica pulsada que se genera viaja junto con el haz principal de ultrasonidos para estimular el tejido seleccionado e inducir fuerza transversal o de cizallamiento. Presenta varias modalidades e intensidades dependiendo de la atenuación tisular, la frecuencia acústica y la intensidad del haz de ultrasonido. Estas fuerzas de cizallamiento inducidas en el tejido generan ondas transversales o de cizallamiento que se alejan de la región de excitación, de forma perpendicular al eje del haz de ultrasonidos principal.

En teoría, en un tejido perfectamente homogéneo e isotrópico, la velocidad de propagación de estas ondas de cizallamiento generadas sería directamente proporcional a la densidad y al módulo elástico transversal del tejido estudiado, estando este último relacionado con la elasticidad.

De forma simultánea a la generación de las ondas acústicas pulsadas, se emiten haces de ultrasonidos trazadores de baja intensidad, paralelos al haz ultrasónico principal, con el objetivo de monitorizar el desplazamiento tisular. Los haces trazadores interceptan las ondas de cizallamiento generadas, a diferentes distancias predefinidas y en distintos intervalos de tiempo, para obtener datos acerca de la respuesta tisular tras su estimulación. A través de estos datos se puede calcular de forma cuantitativa la velocidad de propagación de las ondas de cizallamiento, también llamadas “velocidad de corte” ( $V_c$ ), y, por lo tanto, una medida de la elasticidad. La velocidad de la onda de cizallamiento o  $V_c$  se expresa en metros por segundo (m/s) (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Técnica ARFI: las ondas pulsadas (ondas naranjas) emitidas por el transductor estimulan el tejido incluido en la región de interés. De esta forma, se producen ondas transversales o de cizallamiento (ondas azules) que son detectadas y cuantificadas mediante ondas trazadoras (flechas verdes). El resultado reflejará la velocidad (m/s) de estas ondas de cizallamiento (Adaptación de Ben Hassen, 2012).

### 3.3 Factores que influyen a la velocidad de las ondas de cizallamiento.

En condiciones ideales, el único factor que determina la velocidad de las ondas de cizallamiento, determinados por técnica ARFI, sería la elasticidad del tejido localizado en la RDI. No obstante, si nos trasladamos a la práctica clínica habitual, encontramos varios factores que podrían alterar estos valores de velocidad, tal y como describen Bruno, Minnit, Bucci y Mucelli (2016). Las variaciones que sufren las velocidades de las ondas de cizallamiento, secundarias a estos factores pueden ocasionar medidas imprecisas. Por tanto, se hace indispensable la realización de más estudios experimentales, tanto *in vivo* como *ex vivo* con la elaboración de fantomas, para identificar y cuantificar estas potenciales fuentes de artefacto que nos podrían llevar a una infra o sobreestimación de la patología.

### 3.3.1 Factores físicos

Son aquellos que afectan a la propagación de las ondas de cizallamiento. Se dividen en intrínsecos y extrínsecos

- Intrínsecos:
  - Longitud de onda: el factor intrínseco más relevante es la longitud de onda. Si se generan pulsos de ultrasonidos con baja frecuencia, estos producen importantes presiones acústicas, dando lugar a ondas de cizallamiento más veloces. En varios estudios experimentales se han detectado pequeñas diferencias estadísticamente significativas cuando se utilizan distintas frecuencias de ultrasonido para generar las ondas (Chang, Kim, Kim & Lee, 2013).
  
- Extrínsecos:
  - Compresión extrínseca: otro de los factores a tener en cuenta. Cuanto mayor sea la compresión que se ejerce con el transductor sobre el tejido, mayor será la densidad de este último, hecho que incrementa la velocidad de propagación de las ondas de cizallamiento (Syversveen et al., 2012) (Figura 3.2).

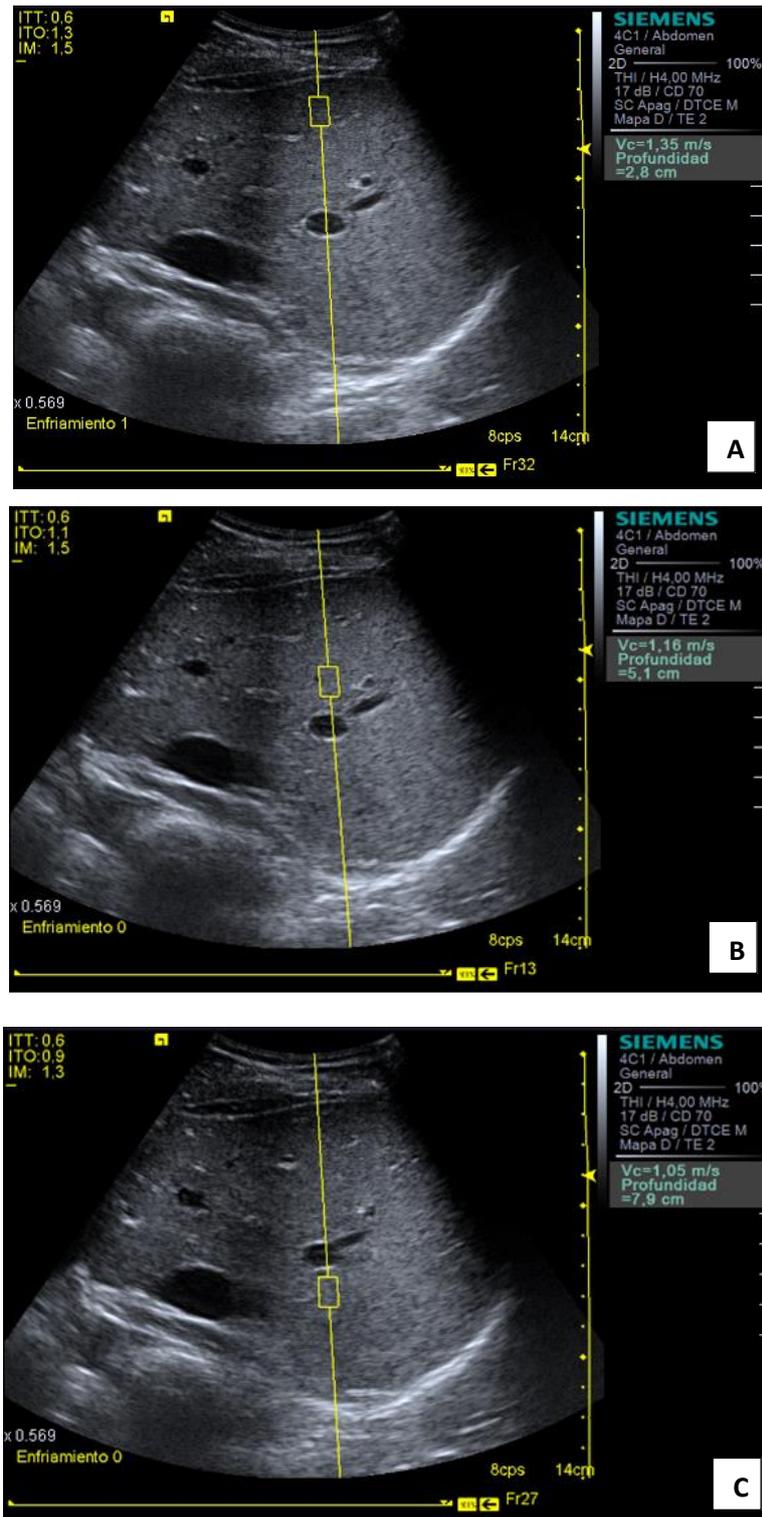


**Figura 3.2.** Efecto de la compresión extrínseca. En la figura A se han adquirido velocidades de corte de 1.18m/s en parénquima hepático, mientras que en la figura B, se ha ejercido una fuerte presión sobre pared abdominal, obteniendo un valor más alto de velocidad (1,3m/s) en la misma RDI. Fuente: elaboración propia

- **Profundidad:** el mayor grado de atenuación que sufre el haz de ultrasonidos cuando la RDI se localiza a mayor profundidad, condiciona una disminución en la velocidad de las ondas de cizallamiento (Chang et al., 2013; Kaminuma et al., 2011; Dillman et al., 2015) (Figuras 3.3 (A y B) y 3.4 (A, B y C)).



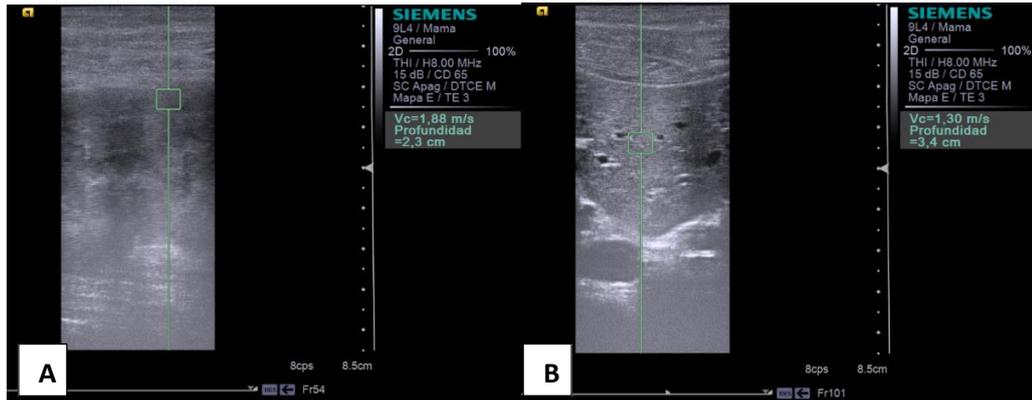
**Figura 3.3.** Efecto de la profundidad. En la figura A se ha seleccionado una RDI a 2.2cm, con unos valores de velocidad de corte de 1,54m/s. En la figura B hemos establecido una RDI a mayor profundidad que en A (4cm), con la obtención de una velocidad de corte inferior (1,2m/s). Fuente: elaboración propia



**Figura 3.4.** Efecto de la profundidad. En un mismo corte ecográfico hemos seleccionado tres RDI a distintas profundidades, con una profundidad superficial (A), intermedia (B) y profunda (C), obteniendo velocidades de corte inferiores a mayor profundidad debido al efecto de atenuación que sufre el haz de ultrasonidos. Fuente: elaboración propia

### 3.3.2 Factores geométricos

Este tipo de factores también desempeñan un papel importante a la hora de cuantificar las velocidades de las ondas de cizallamiento. El transductor debe emitir el haz de ultrasonido de forma paralela a la RDI que se quiere estudiar. De esta forma, se aumenta el número de interfases capaces de darnos información del área estudiada (Figura 3.5).

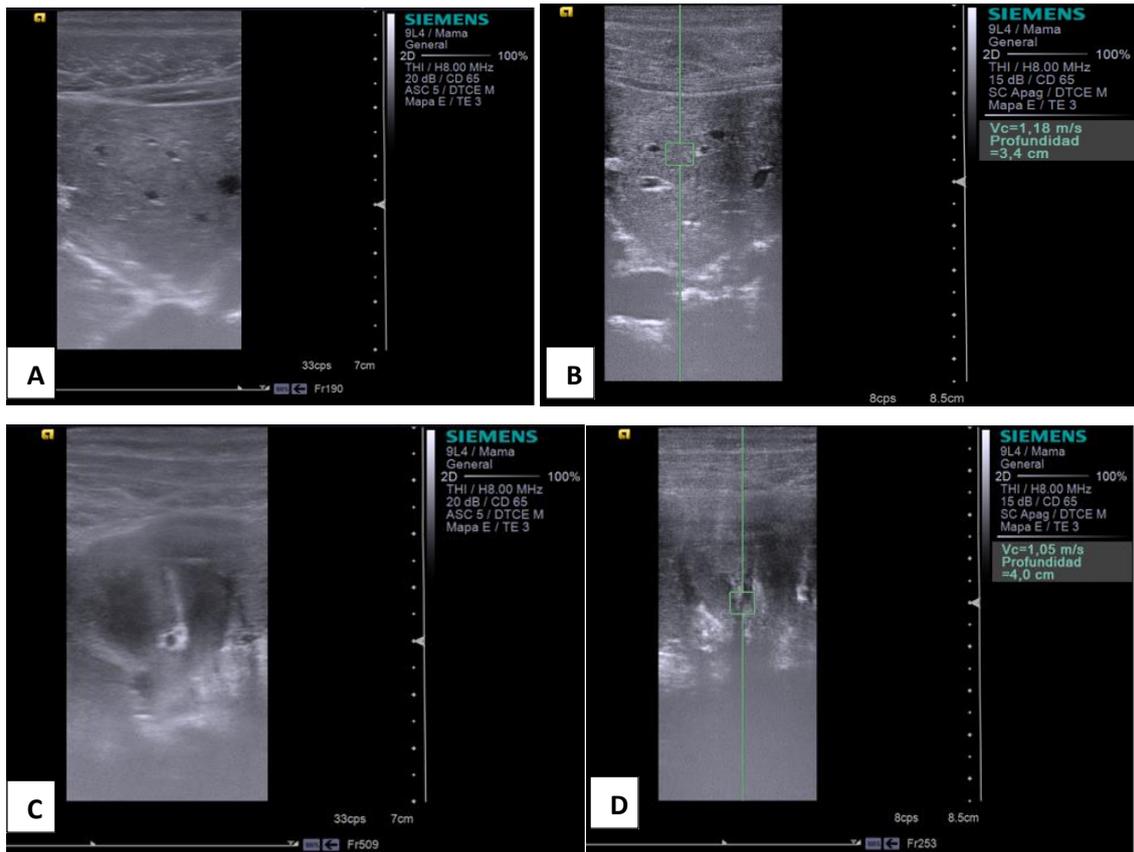


**Figura 3.5.** Selección de la RDI. Se debe intentar orientar la RDI de la forma más paralela posible al área que se quiere estudiar. La colocación de una RDI oblicua con respecto al tejido diana puede causar artefactos en las mediciones. En la imagen identificamos un trayecto paralelo a la cápsula renal (A) y hepática (B) para conseguir una mayor precisión en las medidas. Fuente: elaboración propia

### 3.3.3 Factores anatómicos

- Arquitectura parenquimatosa:

En los órganos con una estructura parenquimatosa homogénea, como el hígado, los haces de ultrasonido interactúan con un menor número de obstáculos que podrían alterarlos y atenuarlos. Sin embargo, otros órganos con una estructura más compleja, como el riñón, pueden ser más difíciles de estudiar debido a que los ultrasonidos presentarán un comportamiento distinto en función del componente del órgano estudiado (Figura 3.6).

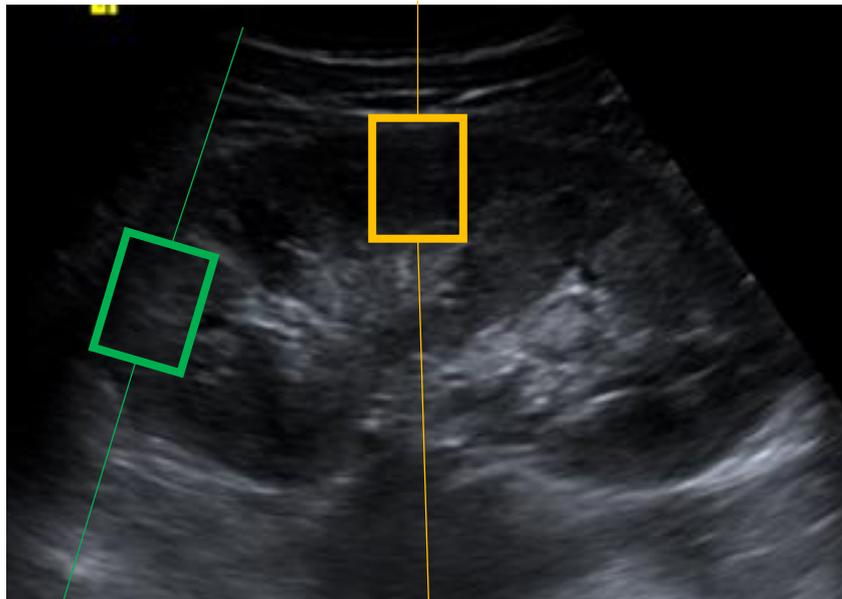


**Figura 3.6.** Diferencia de arquitectura parenquimatosa. En las figuras A y B apreciamos la ecoestructura homogénea del parénquima hepático, que nos permite establecer una RDI de calidad. En las figuras C Y D, por el contrario, apreciamos la compleja arquitectura renal conformada por la corteza y médula renal, que dificultan la selección de la RDI. Fuente: elaboración propia.

- Anisotropía:

Es uno de los factores más importantes que pueden alterar las mediciones. Es una característica que refleja la importante influencia que tiene la dirección en la que se proyectan los haces de ultrasonidos y cómo inciden sobre la muestra a estudiar. Esta característica resulta especialmente relevante en órganos como el riñón, debido a que la corteza y la médula presentan distinta estructura. La orientación paralela que presentan las asas de Henle y los vasa recta en la médula renal, y su disposición perpendicular con respecto a la superficie capsular, puede interferir en las mediciones ARFI. Si se emite el haz de ultrasonidos en dirección paralela a un segmento renal, las ondas de cizallamiento producidas seguirán un trayecto perpendicular interactuando con un mayor número de interfases, induciendo una disminución en la velocidad de propagación que nos dará como resultado una elasticidad menor. Si, por el contrario,

emitimos el haz en una dirección perpendicular, las ondas de cizallamiento resultantes mostrarán una disposición paralela a las estructuras que conforman la médula, existiendo un menor número de interacciones con el tejido, dando como resultado una velocidad de propagación más elevada, y, aparentemente, una elasticidad mayor (Gennisson, Grenier, Combe & Tanter, 2010) (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Efecto de la anisotropía. Cuando el eje principal del haz de ultrasonido es paralelo a la orientación de los vasa recta y las asas de Henle (caja amarilla), las ondas transversales presentan un trayecto perpendicular a estas estructuras, provocando una disminución en su velocidad. Si, por el contrario, la dirección del haz presenta una orientación perpendicular (caja verde), la velocidad de las ondas transversales se elevará. Fuente: elaboración propia.

### 3.3.4 Factores fisiológicos

Representa otro grupo de factores a tener en cuenta. Tal como ocurría con la anisotropía, estos factores se hacen especialmente relevantes en el riñón. En distintos estudios experimentales, se ha identificado una relación entre las velocidades ARFI y la presión sanguínea y del sistema excretor renal (Gennisson et al., 2010).

### 3.4 Utilidad de ARFI en la hepatopatía crónica

La estimación de la fibrosis hepática en el curso de una hepatopatía crónica resulta fundamental para monitorizar el tratamiento y para calcular el pronóstico de la enfermedad. Un aumento en el grado de fibrosis se traduce en un aumento de la rigidez parenquimatosa. Esta relación de proporcionalidad directa ha permitido que las técnicas sonoelastográficas, entre ellas la técnica ARFI, hayan ganado especial relevancia en los últimos años como alternativa diagnóstica rápida y eficaz a métodos invasivos como la biopsia hepática.

La prueba sonoelastográfica sobre la que se ha recogido un mayor número de datos es la elastografía transitoria (ET) mediante FibroScan®, debido a que lleva incluida en la práctica clínica más de una década. Numerosos metaanálisis realizados en pacientes con hepatopatía crónica viral señalan la correlación de las mediciones con ET con el grado histológico de fibrosis (Friedrich-Rust et al., 2008), permitiendo detectar grados moderados y severos de fibrosis hepática.

La técnica sonoelastográfica ARFI, incluida posteriormente en la práctica clínica, ha demostrado una precisión similar a la ET en pacientes con hepatopatía crónica (Bota et al., 2013; Sporea et al., 2012). No obstante, ARFI presenta una menor tasa de mediciones no válidas que la ET, además de presentar importantes ventajas al estar integrada en un aparato de ecografía convencional, que nos permite estudiar el parénquima hepático en tiempo real. De esta forma, nos permite seleccionar donde establecer la RDI, a fin de evitar áreas que puedan producir posibles artefactos, y no muestra limitaciones en pacientes obesos o con ascitis. Además, la posibilidad de realizar una exploración ecográfica convencional nos permite evaluar cualitativamente el parénquima hepático y establecer una clasificación visual de la esteatosis hepática (Joseph, Saverimuttu, Al-Sam, Cook & Maxwell, 1986), característica básica en la NAFLD.

Múltiples referencias bibliográficas consideran a la técnica sonoelastográfica ARFI como una prueba bastante precisa para detectar grados de fibrosis  $F > 2$  en pacientes con hepatopatía crónica, incluyendo NAFLD, con sensibilidades y especificidades en torno al 74% y 83% aproximadamente (Bota et al., 2013; Liu, Fu, Hong, Liu & Li, 2015), y hasta de un 87% en fibrosis avanzada F4 (Nierhoff, Ortiz, Herrmann, Zeuzem & Friedrich-Rust, 2013). Su precisión en grados menores de fibrosis todavía no está bien investigada.

Un punto importante resulta la influencia que muestran la esteatosis y el infiltrado inflamatorio agudo (Yoon et al., 2012; Yoshioka, Hashimoto & Kawabe, 2015), existiendo controversia acerca de cómo afectan estos hallazgos a las mediciones.

En cuanto a la determinación de la esteatosis, se han realizado estudios en niños con atresia biliar que demuestra que la medición con técnica ARFI puede discernir entre hígados con esteatosis significativa y en hígado sin esteatosis (Hanquinet et al., 2015). Resultados similares se han obtenido en adultos con hepatitis autoinmune (Efe, Gungoren, Ozaslan, Akbiyic & Kay, 2015) y con cirrosis biliar primaria (Zhang et al., 2014).

Existen varias recomendaciones para la realización de las mediciones con técnica ARFI en parénquima hepático:

1. Establecer las RDI en el lóbulo hepático derecho, con el objetivo de evitar los artefactos de movimiento cardiaco (Piscaglia et al., 2011).
2. Realizar las mediciones en apnea, con o sin inspiración profunda (Kamimuma et al., 2011) a fin de evitar artefactos de movimiento respiratorios.
3. Evitar la cápsula hepática y grades estructuras vasculares intrahepáticas, habitualmente más afectadas por los procesos de fibrosis, hecho que podría sobreestimar las mediciones (Jaffer et al., 2012).

Además, algunas condiciones pueden limitar la precisión de las determinaciones. Varias de ellas todavía no están bien investigadas, siendo necesaria la realización de un mayor número de estudios para poder precisar estas posibles fuentes de artefacto. La más importante y estudiada es el Índice de Masa Corporal (Bota et al., 2014), mientras que otros factores son la edad, el sexo, la ingesta de alimentos antes de la prueba, la posición del paciente y el tipo de transductor utilizado (Chang et al., 2013; Kamimuma et al., 2011; Bota et al., 2014).

### **3.5 Utilidad de ARFI en la enfermedad renal crónica**

Los prometedores resultados obtenidos en parénquima hepático con técnica ARFI para la valoración de la hepatopatía crónica, sobre todo la fibrosis parenquimatosa, han motivado la realización de múltiples estudios en parénquima renal para la evaluación de la enfermedad renal crónica. Esto se debe a que, al igual que en la hepatopatía crónica, uno de los principales procesos que se objetivan en la ERC consiste en el desarrollo de una importante fibrosis, con depósito de proteínas de matriz extracelular y pérdida de nefronas funcionales. Además, la posibilidad de estudiar la morfología renal y evaluar su tamaño, grosor cortical, diámetro pélvico y el índice de resistencia vascular mediante un estudio ecográfico convencional, convierte a la técnica ARFI en una prueba muy atractiva en el estudio de la ERC, con potencial para sustituir a

la biopsia renal. No obstante, existe gran controversia en la literatura acerca de la precisión de las mediciones debido a numerosos factores.

Se han llevado a cabo numerosos estudios en pacientes adultos con ERC, población pediátrica con reflujo vesico-ureteral y pacientes sometidos a trasplante renal, con diferentes resultados.

En pacientes con trasplante renal, un estudio elaborado por Syversveen et al. (2012) describió que la técnica ARFI no era capaz de detectar fibrosis en los injertos, mientras que otro estudio llevado a cabo por Stock et al. (2011) sí que detectó una elevación significativa en los valores de ARFI en pacientes trasplantados con rechazo agudo.

Una de las grandes limitaciones en la valoración del parénquima renal mediante técnica ARFI es la anisotropía renal. Wang et al. (2014), han resaltado una serie de consideraciones a tener en cuenta a la hora de realizar las mediciones, con el objetivo de minimizar el impacto de la anisotropía y, de ese modo, mejorar su reproducibilidad:

1. Estudiar el parénquima renal en el plano longitudinal, con el objetivo de delimitar de forma precisa la corteza, médula y seno renal.
2. La RDI debe colocarse en el interior de la corteza renal, evitando en la medida de lo posible el resto de estructuras.
3. La RDI debe situarse de forma perpendicular a la corteza renal.
4. Minimizar la compresión con el transductor sobre el parénquima.
5. Disminuir los artefactos de movimiento respiratorio.
6. Adquirir de 5-10 medidas para limitar los artefactos de muestreo.

Dentro de estas consideraciones, los dos factores fundamentales a valorar para conseguir estandarizar las medidas son la correcta localización de la RDI en el parénquima renal y la posición del paciente para intentar conseguir la mejor ventana de exploración del órgano.

En primer lugar, se debe situar la RDI exclusivamente en el interior de la corteza renal, manteniendo un ángulo perpendicular entre la caja de mediciones y la cápsula renal. Este objetivo resulta especialmente complejo, sobre todo al estudiar los polos renales. Aunque algunos artículos aceptan la posibilidad de incluir otras estructuras renales como la médula o el seno, estas variaciones podrían generar un aumento de la anisotropía y artefactar las mediciones (Wang et al., 2014).

En segundo lugar, es recomendable encontrar ventanas ecográficas que nos permitan analizar el parénquima renal en su totalidad. La profunda localización retroperitoneal de los riñones

puede dificultar su estudio, teniendo que movilizar al paciente y que ejercer un exceso de compresión con el transductor, hechos que podrían artefactar las mediciones (Syversveen et al., 2012; Bota, Bob, Sporea, Sirli & Popescu, 2015).

Se necesita un mayor número de estudios para poder establecer guías estandarizadas con el objetivo de aumentar la reproducibilidad.

### **3.6 Comparación entre la cuantificación ARFI de parénquima hepático y renal**

La técnica ARFI ha sido validada como un indicador fiable del grado de severidad de fibrosis en la hepatopatía crónica. Sin embargo, tal y como hemos descrito, persiste cierta controversia en cuanto a su utilidad en la ERC. Según Wang et al. (2014) esta diferencia puede deberse a las diferencias anatómicas y fisiológicas que existen entre los dos órganos.

#### **3.6.1 Arquitectura interna**

El hígado muestra una ecoestructura homogénea que le proporciona un comportamiento isotrópico al ser estudiado mediante ecografía. En cambio, el parénquima renal muestra una estructura compleja, compuesta por glomérulos, túbulos y componentes estromales. Además, la organización interna del sistema tubular le confiere una propiedad anisotrópica, hecho que puede conllevar artefactos en los estudios ecográficos. Gennison et al. (2012) demostró el efecto de esta anisotropía renal al comprobar que las mediciones tomadas siguiendo un plano perpendicular al eje principal de la pirámide renal resultaban sistemáticamente más elevadas que cuando se establecían las adquisiciones siguiendo un plano paralelo.

#### **3.6.2 Aporte vascular**

El riñón es un órgano ricamente vascularizado, con una perfusión de alta presión. En cambio, el hígado presenta un aporte vascular dual de baja presión, con una aportación predominante de la vena porta. En condiciones normales, se han reportado valores de ARFI marcadamente superiores en corteza renal con respecto al parénquima hepático, hecho que podría estar en estrecha relación con las evidentes diferencias de perfusión que existen entre los dos órganos (Goertz et al., 2011). Además, con la progresión de la enfermedad, la

disminución de la perfusión puede influir en la elasticidad tisular de forma más dramática en riñón que en el hígado.

### **3.6.3 Cambios relacionados con la edad**

En estudios de ARFI hepáticos llevados a cabo en niños y en adultos, no se han encontrado diferencias significativas en la elasticidad tisular en función de la edad (Liao et al., 2015; Lee, Kim, Han & Yoon, 2013). En cambio, sin han sido reportados cambios significativos en ARFI en estudios renales, atendiendo a la edad de los pacientes, con resultados contradictorios (Lee et al., 2013; Bota et al., 2015).

# ***CAPITULO IV***

## ***LA RATA DE LABORATORIO COMO MODELO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN***

### **4.1 Generalidades**

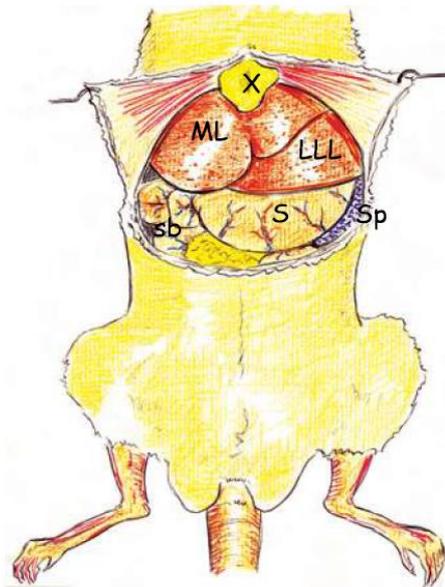
Los modelos animales de experimentación resultan indispensables en la investigación biomédica. Han sido utilizados desde el comienzo de la ciencia y continúan empleándose la actualidad en estudios médicos, veterinarios y biológicos. La mayor parte de las investigaciones han centrado su atención en los modelos de ratón y la rata, debido a su bajo coste, la facilidad en su manutención, la alta tasa de reproducción que presentan y su similitud genómica con el ser humano.

La rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*), animal que centra la presente tesis doctoral, es el segundo modelo animal utilizado en investigación en cuanto a número de citas, teniendo una gran cantidad de información acerca de ella. Presentan mayor tamaño, agresividad y resistencia a algunos alimentos con respecto a los ratones. Las ratas Wistar y las Sprague-Dawley son las dos cepas más utilizadas. Estas dos cepas de rata son albinas y no consanguíneas, con una alta tasa de reproducción y de temperamento calmado, lo que hace que sean idóneas como modelo experimental (MATER METHODS es 2012;2:113).

En la presente tesis doctoral, analizamos analíticamente, histológicamente y ecográficamente el parénquima hepático y renal en estas dos cepas de rata.

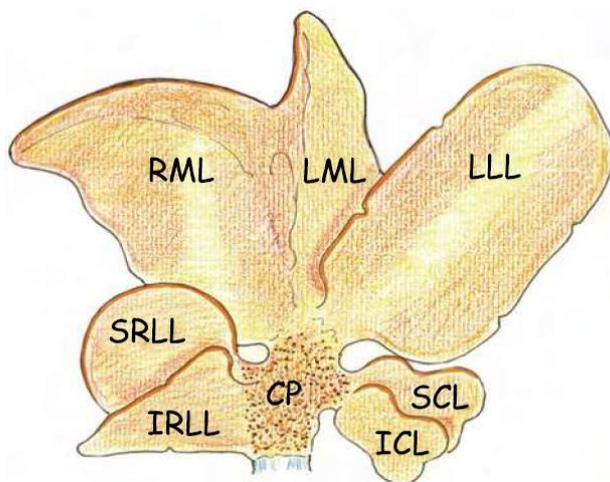
## 4.2 Anatomía hepática

El hígado es el órgano más voluminoso de la anatomía de la rata. Se encuentra ubicado sobre la cara inferior diafragmática, extendiéndose por toda la cavidad abdominal, desde arco costal derecho hasta el izquierdo (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Ilustración de laparotomía subcostal bilateral con prolongación hacia la apófisis xifoideas en rata. X: Apéndice xifoideo; ML: Lóbulo medio; LLL: Lóbulo lateral izquierdo; S: estómago, SB: Intestino delgado; Sp: Bazo. (Fuente. Aller MA & Arias J (2009), *Microsurgery in Liver Research*, Madrid, España, Bentham Books).

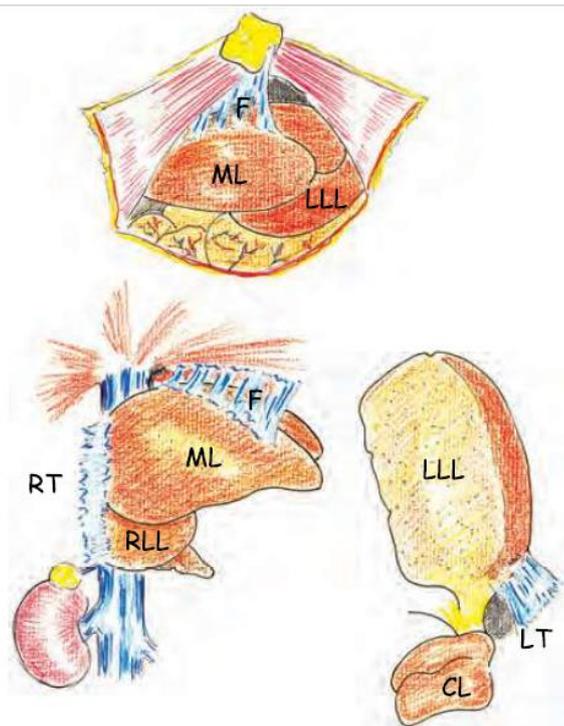
Presenta una cara superior o parietal, de forma convexa y en contacto con el diafragma, y una cara inferior o visceral, cóncava y relacionada con estómago y duodeno. Se encuentra dividido en los lóbulos derechos (lateral y medial), izquierdos (lateral y medial), cuadrado (de pequeño tamaño) y caudado (dividido en proceso uncinado y papilar) (Figura 4.2). La rata Wistar no tiene vesícula biliar.



**Figura 4.2.** Ilustración de parénquima hepático de rata constituido por los siguientes lóbulos: medial derecho (RML) y medial izquierdo (LML), lateral izquierdo (LLL), lateral superior derecho (SRL), lateral inferior derecho (IRL), caudado superior (SCL) y caudado inferior (ICL), y proceso caudado (CP) (Fuente: Aller MA & Arias J (2009), *Microsurgery in Liver Research*, Madrid, España, Bentham Books).

El complejo ligamentoso colabora con la vena cava inferior en la fijación del parénquima hepático a la cavidad abdominal (Figura 4.3). El ligamento falciforme, se extiende desde la cara parietal del hígado de forma craneal sobre el plano mediano, hasta alcanzar la apófisis xifoides. En la región dorsal se localiza el ligamento triangular derecho, que se extiende desde la pared abdominal hasta el lóbulo lateral derecho. En el lado izquierdo se sitúa el ligamento triangular izquierdo, que se extiende desde la pared dorsal hacia el lóbulo lateral izquierdo. El ligamento hepatorenal se extiende desde el lóbulo caudado, con dirección dorsal, hacia la pared abdominal, medialmente al riñón derecho e insertándose sobre la hoja derecha del mesoduodeno y del mesocolon descendente

Por la cara visceral y sobre hilio hepático, se inserta el omento menor, con una parte izquierda fijada a la curvatura menor del estómago la cual se denomina ligamento hepatogástrico, y una parte derecha fijada al duodeno denominada ligamento hepatoduodenal. En cuanto al ligamento hepato-omental, se extiende desde la cara visceral del lóbulo lateral izquierdo hasta la hoja superficial del omento menor.



**Figura 4.3.** Ilustración de los principales ligamentos del hígado de rata. F: ligamento falciforme; RT: ligamento triangular derecho; LT: ligamento triangular izquierdo; ML: lóbulo medial; LLL: lóbulo lateral izquierdo; RLL: lóbulo lateral derecho; CL: lóbulo caudado (Fuente. Aller MA & Arias J (2009), *Microsurgery in Liver Research*, Madrid, España, Bentham Books).

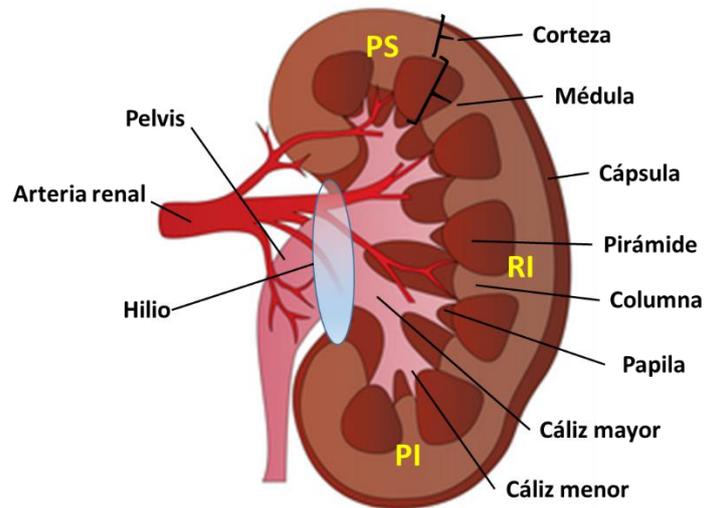
### 4.3 Anatomía renal

Los riñones de la rata, al igual que en el resto de mamíferos, son órganos redondeados o con forma de habichuela. Presentan una localización posterior en la cavidad abdominal y una disposición retroperitoneal. Se encuentran rodeados de tejido graso, denominado grasa perirrenal, y presentan una cubierta fibrosa llamada cápsula. La vertiente cóncava del riñón se denomina hilio renal, y es el punto por el cual entra la arteria renal y salen la vena renal y el uréter. Se subdivide en tres áreas de craneal a caudal, denominadas polo superior, región interpolar y polo inferior.

La estructura renal (Figura 4.4) puede dividirse en dos regiones diferentes, la corteza externa y la médula interna. La corteza renal es la porción encargada de la filtración sanguínea, a través de unas pequeñas formaciones denominadas glomérulos. La médula renal presenta la función de concentrar la orina a través de un complejo sistema de túbulos. Este sistema consigue su objetivo absorbiendo agua y electrolitos, evitando reabsorber elementos de desecho para ser

eliminados con la orina. Un glomérulo con su correspondiente red de túbulos constituye la denominada nefrona, la unidad funcional del riñón.

El sistema tubular perteneciente a múltiples nefronas se organiza para constituir las pirámides renales. El parénquima renal que queda entre dos pirámides se denomina columna y constituye una ruta por la cual los vasos sanguíneos acceden a la corteza desde el hilio renal. El vértice de las pirámides se denomina papila y constituyen el punto de drenaje desde el sistema tubular a los cálices menores. Los cálices menores convergen para dar lugar a los cálices mayores y estos convergen a su vez para dar lugar a la pelvis renal.



**Figura 4.4.** Ilustración de riñón. PS. Polo superior; RI. Región interpolare; PI. Polo inferior. (Adaptada de [www.thinglink.com](http://www.thinglink.com))



# ***CAPÍTULO V***

## ***OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO***

### **5. 1 OBJETIVOS**

- 1.** Comparar la valoración de técnica ARFI en estudios *in vivo* y *ex vivo* para valorar posibles fuentes de artefacto en la adquisición de medidas, y realizar una correlación entre ambas formas de medición con el objetivo de optimizar la adquisición en las mediciones.
- 2.** Establecer una correlación entre los valores ARFI y los parámetros analíticos hepáticos y renales para valorar su posible relación y la posibilidad de utilización de ARFI en la detección precoz de hepatopatía y nefropatía crónica.
- 3.** Establecer una correlación entre los valores de ARFI, obtenidos en parénquima hepático y renal, y las determinaciones histológicas para evaluar el potencial de la técnica ARFI como alternativa diagnóstica no invasiva a la biopsia.

## 5.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La técnica ARFI representa una contrastada medida indirecta de la elasticidad tisular, cualidad que nos podría ayudar a discernir entre un órganos sanos y órganos con patología crónica. Además, los cambios en la elasticidad tisular se encuentran en estrecha relación con su estructura histológica, hecho que podría ser de utilidad para elaborar escalas de correlación entre los valores de ARFI y las características histológicas del órgano estudiado. No obstante, existen una serie de factores que podrían alterar el resultado de las mediciones, hecho que hace indispensable la optimización de la adquisición de resultados mediante sonoelastografía ARFI. Hemos seleccionado como órganos de estudio al hígado y al riñón, debido a que sus características anatómicas y sus procesos fisiopatogénicos los hacen ideales para el estudio con técnica ARFI.

Hemos llevado a cabo el estudio tanto en modelos animales *in vivo* como en especímenes *ex vivo*, a fin de identificar posibles diferencias entre ambas modalidades mediante técnica sonoelastográfica ARFI y establecer la precisión diagnóstica de cada una al establecer correlaciones con los hallazgos histológicos encontrados en los distintos modelos animales. De esta forma podemos detectar y evaluar factores que artefacten las mediciones y proponer posibles soluciones y estrategias que ayuden a mejorar la precisión y reproducibilidad de la técnica.

Además, hemos evaluado la rigidez del parénquima hepático y renal mediante técnica ARFI en modelos de ratas obesas e hipertensas, y los hemos comparado con los resultados obtenidos en los animales controles, sin patología hepática ni renal con el fin de comprobar la utilidad diagnóstica de la técnica sonoelastográfica ARFI en la NAFLD y en la ERC.

El diagnóstico precoz y la correcta estadificación de la NAFLD es complejo y no está exento de controversia. Postulamos que la técnica elastográfica ARFI podría complementar el diagnóstico, junto con otros métodos diagnósticos no invasivos, con el fin de evitar la realización de biopsias hepáticas. En cuanto a la ERC, la detección precoz de alteraciones renales resulta fundamental para limitar la progresión de la enfermedad. Por ello, el potencial de la técnica ARFI en detectar la fibrosis renal podría complementar a las determinaciones analíticas y limitar el uso de la biopsia.

# *CAPÍTULO VI*

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

### **6.1. Obtención de los grupos experimentales.**

Los protocolos experimentales mencionados en este trabajo de Tesis Doctoral fueron diseñados de acuerdo con la “Guía de directrices y principios para la investigación en animales y humanos” de la Sociedad Americana de Fisiología y las normas de la Unión Europea aprobadas por el “Comité Institucional de Manejo y Cuidado Animal” de la Universidad de Murcia.

Todos los animales utilizados, nacieron y se criaron en el animalario de la Universidad de Murcia y se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad (12:12 horas) y temperatura (25°C) constantes. Los protocolos experimentales en esta Tesis Doctoral han sido realizados en ratas Wistar macho de 16-18 meses de edad y en ratas Sprague-Dawley (SD) macho de 4 ó 9 meses de edad.

Las ratas Wistar fueron alimentadas con una dieta control de laboratorio (61% de carbohidratos, 15% de grasas, y el 24% de proteínas).

Las ratas SD fueron alimentadas desde el destete con una dieta con contenido normal (15%) o con alto (60%) en grasa. En este último caso, el objetivo fue provocarles obesidad. Además, algunas ratas SD fueron tratadas con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (ARA) durante los primeros 14 días de vida con el objetivo de provocarles un incremento mantenido de la presión arterial (Sáez et al., 2014)

**Obtención de ratas obesas y/o con hipertensión programada durante periodo perinatal.**

Ratas SD hembra de 230-250 g de peso fueron cruzadas con machos en edad fértil de la misma especie. El primer día de gestación, denominado embrionario 0 ( $E_0$ ), fue determinado por la aparición de espermatozoides en los frotis de exudado vaginal realizados a las hembras. Tras 21-23 días de gestación, las ratas suelen parir un número variable de crías (10-16). Por ello, con el fin de estandarizar el número de crías a ser mantenidas posteriormente por cada madre, se estableció conservar 10-12 ratas por camada. Las camadas con menos de 10 animales y las de más de 16 fueron descartadas. El día del nacimiento lo nombramos como postnatal 0 ( $P_0$ ) y no realizamos ninguna maniobra experimental.

Durante los primeros 14 días de vida, es decir desde el postnatal 1 al postnatal 14 ( $P_1$ - $P_{14}$ ), a determinadas camadas les fue administrado un antagonista de los receptores  $AT_1$  de angiotensina II, (ARA), (*L158.809, Merck, Sharp & Dohme*) en una única dosis (7 mg/Kg/día) vía oral (Figura 6.1). A los grupos de animales a los que administramos el antagonista de los receptores  $AT_1$  los llamaremos genéricamente **grupo hipertenso ARA**. Paralelamente, se repitió el mismo procedimiento con otras camadas de animales sólo que esta vez en vez de administrar el ARA, se les administró un volumen equivalente (3.5  $\mu$ L/gramo peso corporal) del vehículo (*salino isotónico, NaCl 0.9%*) usado para disolver el antagonista. A los grupos de animales a los que administramos salino isotónico los llamaremos genéricamente **grupos Control**.



**Figura 6.1.** Administración del tratamiento a las crías.

En el postnatal 21, (P<sub>21</sub>), se efectuó el destete y el sexado de las crías. Posteriormente fueron alimentadas con una dieta control o con contenido elevado en grasa (60%) hasta cumplir la edad necesaria para la realización de los distintos protocolos experimentales. Cada gramo del pienso control contiene 3,2 Kcal, cuyo origen es el 61% de carbohidratos, 15% de grasas, y el 24% de proteínas. Cada gramo de dieta con alto contenido en grasa (Harlan TD.06414) contiene 5,1 kcal. El 60,3% de las kcal de esa dieta proviene de grasa (37% saturadas; 47% monoinsaturadas; 16% poliinsaturadas) y el resto de kcal proviene de carbohidratos (21,3%) y proteínas (18,4%). Las ratas alimentadas con la dieta con alto contenido en grasa serán denominadas genéricamente como **grupos con obesidad**. Por lo tanto, en las ratas SD tenemos un:

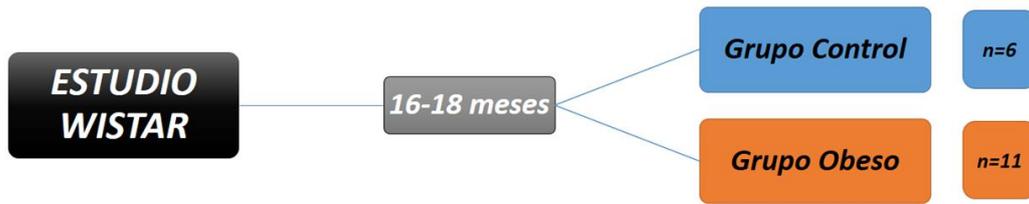
- **Grupo control.** Tratado con vehículo durante las dos primeras semanas de vida y dieta con contenido normal en grasa.
- **Grupo hipertensas ARA (HTA).** Tratado con el ARA durante las dos primeras semanas de vida y dieta con contenido normal en grasa.
- **Grupo con obesidad.** Tratado con vehículo durante las dos primeras semanas de vida y dieta con contenido elevado en grasa.
- **Grupo hipertensas ARA con obesidad (mixto).** Tratado con el ARA durante las dos primeras semanas de vida y dieta con contenido elevado en grasa.

#### 6.1.1. Diseño del modelo experimental.

Para la presente tesis doctoral, se realizaron dos estudios con dos modelos de rata de laboratorio distintos, la rata Wistar y la rata Sprague-Dawley.

La realización de estos experimentos fue aprobada por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia.

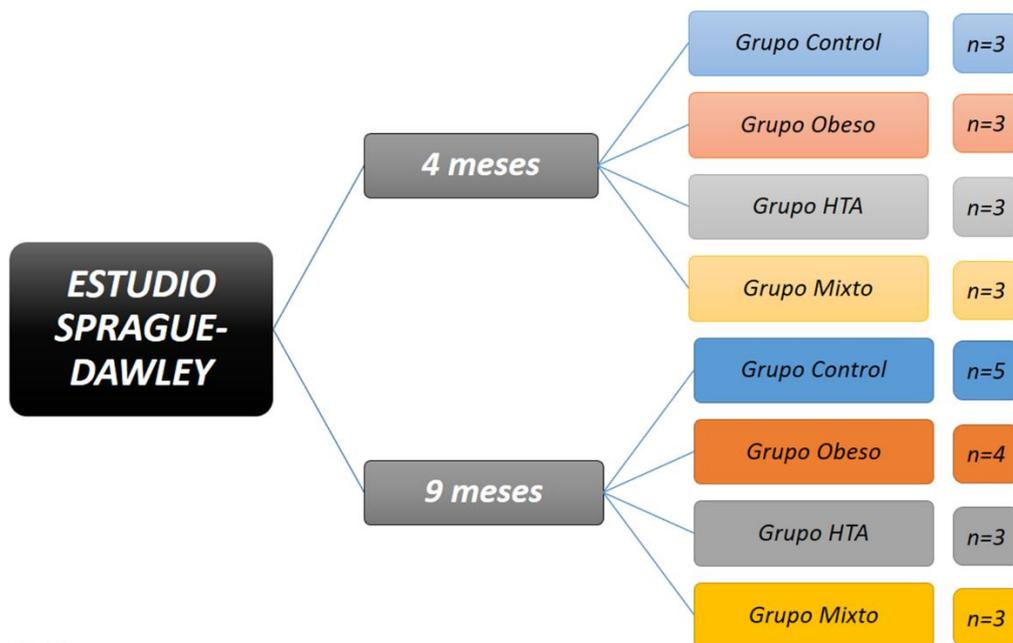
En esta primera experiencia se incluyeron 12 ratas Wistar macho obesas con diagnóstico histopatológico de hepatopatía y nefropatía crónica, y se sumaron 6 ratas Wistar macho control. Una rata del grupo de intervención falleció durante el procedimiento y fue excluida del experimento. (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Diseño de estudio con rata Wistar

Todos los individuos incluidos en la muestra fueron evaluados para obtener el perfil lipídico completo, calculando el HDL (mg/dl), el LDL (mg/dl) y los niveles de triglicéridos (mg/dl). Además, se calcularon los niveles de ALT (U/ml) para la evaluación analítica del daño hepático, y la TFG (ml/min/100gr), para la valoración del daño renal. Posteriormente, los animales fueron sometidos a una exploración ecográfica y a la valoración de las Vc (m/s) mediante técnica ARFI, con la valoración del parénquima hepático y renal tanto *in vivo* como *ex vivo*.

En segundo lugar, realizamos un estudio con 27 ratas Sprague-Dawley macho utilizando los modelos experimentales previamente descritos. La muestra fue dividida en dos grupos en función de la edad de los animales. El grupo de 4 meses estaba constituido por 12 ratas mientras que el grupo de 9 meses estaba compuesto por 15 animales. Cada grupo de edad se dividió en otros cuatro grupos denominados control, obeso, hipertenso y obeso-hipertenso (mixto), en función del tratamiento previo que habían recibido (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Diseño de estudio con rata Sprague-Dawley

Al igual que en el modelo con rata Wistar, obtuvimos el perfil lipídico, con el cálculo de HDL, LDL y los niveles de triglicéridos; la ALT para la valoración analítica hepática y la TFG para la valoración renal. Además, obtuvimos las medidas de Vc con sonoelastografía ARFI en hígado y riñón de forma únicamente *ex vivo* con el objetivo de extrapolar los resultados obtenidos con rata Wistar a un modelo animal con diferentes grados de afectación crónica en parénquima hepático y renal.

## 6.2. Extracción sanguínea y determinaciones analíticas realizadas.

Las ratas Wistar y SD fueron anestesiadas con 0.1 ml/100 g de rata de pentobarbital (*Pentothal sódico, Abbott, 50 mg/ml*) y se les realizó una extracción de sangre (5 ml) mediante punción cardíaca. La sangre fue anticoagulada con 0,1 ml de EDTA y mantenida en frío hasta su centrifugación (3000 rpm durante 15 minutos). Las muestras de plasma fueron almacenadas en tubos eppendorf a -80°C hasta que se realizaron las medidas de las concentraciones de HDL, LDL, triglicéridos y ALT.

### ➤ Concentración de LDL en plasma.

La determinación de la concentración plasmática de LDL fue realizada mediante el uso de un Kit de ELISA de la empresa “Shanghai Yehua Biological Technology” de Shanghai, China (número de catálogo: YHB0683). La absorbancia de las muestras fue realizada a una longitud de onda de 450 nm y las concentraciones se obtuvieron extrapolando esas absorbancias con las obtenidas en muestras con concentraciones conocidas en un rango de 2 a 600 ng/ml.

### ➤ Concentración de HDL en plasma.

La determinación de la concentración plasmática de HDL fue realizada mediante el uso de un Kit de ELISA de la empresa “Shanghai Yehua Biological Technology” de Shanghai, China (número de catálogo: YHB0547Ra). La absorbancia de las muestras fue realizada a una longitud de onda de 450 nm y las concentraciones se obtuvieron extrapolando esas absorbancias con las obtenidas en muestras con concentraciones conocidas en un rango de 7,5 a 120 ng/ml.

➤ **Concentración de triglicéridos en plasma.**

La determinación de la concentración plasmática de triglicéridos fue realizada mediante el uso de un Kit de ELISA de la empresa “Shanghai Yehua Biological Technology” de Shanghai, China (número de catálogo: YHB1086Ra). La absorbancia de las muestras fue realizada a una longitud de onda de 450 nm y las concentraciones se obtuvieron extrapolando esas absorbancias con las obtenidas en muestras con concentraciones conocidas en un rango de 200 a 3200 mmol/L.

➤ **Alanina Transaminasa (ALT)**

La actividad de la Alanina Transaminasa (ALT) en plasma fue realizada mediante un kit suministrado por Cayman Chemical (ref. 700260). La medida de la actividad ALT se realiza mediante la determinación de la velocidad de oxidación de NADH en una reacción en la que se emplea lactato deshidrogenasa. La oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> es proporcional al descenso de absorbancia a 340nm en las muestras preparadas de la forma descrita en las instrucciones de la compañía que suministra el kit.

### **6.3. Parámetros de Función renal.**

#### **6.3.1. Preparación quirúrgica.**

Un día antes del ensayo, los animales se dejaron en ayunas, aunque tuvieron acceso al agua ad libitum. El día del experimento, las ratas se pesaron y se anestesiaron con 0.1 ml de ketamina vía intramuscular (*Ketolar, Parke Davis, Pfizer, 100mg/ml*) y 0.1 ml/100 g de rata de pentobarbital (*Pentothal sódico, Abbott, 50 mg/ml*) vía intraperitoneal. Tras anestesarlos, procedimos al rasurado y limpieza de la zona quirúrgica de los animales con etanol de 96°C, para realizar la cirugía en condiciones de asepsia.

Con el fin de favorecer la ventilación y el aspirado de secreciones, practicamos una traqueotomía a los animales utilizando una cánula de polietileno de 2 mm de diámetro interior. Seguidamente implantamos el resto de catéteres en el siguiente orden:

- **Vejiga urinaria (PE50):** para recolección de muestras de orina.
- **Vena femoral (PE50):** para administración de albúmina y salino isotónico.
- **Arteria femoral (PE50):** para recolección de muestras de sangre y medida de presión arterial media.

Tras colocar todos los catéteres, infundimos vía endovenosa una solución de albúmina bovina (BSA) al 6% (Sigma) (1 ml/100 g de rata) para estabilizar el hematocrito después del estrés quirúrgico. Posteriormente, tomamos una muestra de orina ( $C_0$ ) y plasma ( $P_0$ ) que se utiliza para obtener los blancos en la medida de inulina  $^3\text{H}$ , y para controlar que el hematocrito esté en un valor aceptable (hasta 48% para machos y 45% para hembras). Cuando observamos signos de hemoconcentración se administra un poco más de BSA.

Posteriormente, los animales fueron trasladados a una mesa quirúrgica térmica para mantener su temperatura corporal entre 36.5-37°C. Esta temperatura se controló a lo largo de todo el experimento mediante un termómetro rectal. A continuación, implantamos una sonda (*Transonic, FlowProbe 0.7PSB307*) en la arteria renal izquierda para medir el flujo sanguíneo renal (FSR). Para ello, realizamos una incisión longitudinal en el abdomen de la rata, de manera que se pudiese apreciar el paquete visceral. Con hilo de sutura dimos tres puntos en uno de los laterales de la incisión (piel y músculo) con el fin de tener una zona de trabajo más amplia. Con la ayuda de bastoncillos de algodón desplazamos cuidadosamente las vísceras hacia el lado derecho y las contenemos con gasas, de manera que nos quedasen a la vista tanto el riñón como la vena y arteria renales. Mediante unas pinzas finas, disecamos la arteria renal y la separamos de la vena. Una vez aislada la arteria, se implantó la sonda alrededor de ella. Para que la conducción de la señal fuese correcta pusimos un poco de gel transmisor de ultrasonidos (*Kendall Meditec*) en la zona de contacto entre la sonda y la arteria, y se movió ligeramente la sonda hasta que conseguimos una buena señal. Para mantener los tejidos hidratados durante todo el experimento rellenamos con salino la cavidad abdominal y la tapamos con un poco de parafilm para evitar la evaporación.

A continuación, se conectó el catéter venoso a una bomba de infusión continua (*Harvard, SP220iz, WPI*) a través de la cual se infundió una solución compuesta por salino isotónico e inulina  $^3\text{H}$  (1.5Ci/ml) a una velocidad de infusión igual al 1% del peso corporal del animal utilizado. El catéter arterial se conectó a un transductor de presión (*AD Instruments, Bridge Amp*) vinculado a un software (*PowerLab/400, AD Instruments*) capaz de almacenar los registros de presión arterial de manera continua. Posteriormente, se dejó un periodo de estabilización de 70 minutos y se obtuvieron los valores basales durante dos periodos de 20 minutos. Las muestras de orina se tomaron al finalizar los dos periodos basales. Cinco minutos antes de concluir cada

uno de estos periodos, se extrajeron tres capilares de sangre que posteriormente se centrifugaron para obtener muestras de plasma y medir el hematocrito.

El protocolo anterior fue realizado en los siguientes grupos de ratas macho:

1. **Control de 3-4 meses** de edad (n=3).
2. **Hipertensas ARA de 3-4 meses** de edad (n=3).
3. **Obesas de 3-4 meses** de edad (n=3).
4. **Hipertensas ARA con obesidad de 3-4 meses** de edad (n=3).
5. **Control de 9-11 meses** de edad (n=5).
6. **Hipertensas ARA de 9-11 meses** de edad (n=4).
7. **Obesas de 9-11 meses** de edad (n=3).
8. **Hipertensas ARA con obesidad de 9-11 meses** de edad (n=3).

### 6.3.2. Determinaciones realizadas.

#### ➤ **Flujo de Orina (FU).**

Fue determinado gravimétricamente: la orina fue recogida en cada periodo en tubos previamente pesados en una balanza de precisión (*Mettler AB54*). Al finalizar la recolección, se volvieron a pesar los tubos y se calculó la diferencia. Considerando la densidad de la orina la misma que la del agua, se calculó el flujo de orina de la siguiente manera:

$$FU \text{ (ml.min}^{-1}\text{)} = (P_U - P_V) / T$$

$P_U$ = Peso del tubo lleno de orina (gr)

$P_V$ = Peso del tubo vacío (gr)

T= duración del período (min)

#### ➤ **Tasa de Filtración Glomerular (TFG).**

La TFG se calculó mediante la realización de aclaramientos de inulina. La inulina es un polímero de la fructosa (5 KD) que es filtrado a través de la barrera de filtración glomerular y que no se reabsorbe ni se secreta en los túbulos renales y que tampoco es sintetizado en el tejido renal. La inulina utilizada estaba marcada con tritio (*<sup>3</sup>H-inulina, American Radiolabeled Chemicals, Inc.*).

La concentración de inulina se determinó midiendo la emisión de partículas  $\beta$ . Para ello fue utilizado un contador de centelleo (*Win Spectral-Wallace*). Las muestras fueron suspendidas en 1 ml de líquido de centelleo (*Optiphase "HiSafe" 3, Perkin Elmer*).

La TFG se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{TFG (ml. min. g}^{-1}\text{)} = (\text{U}_{\text{in}} / \text{P}_{\text{in}}) \times \text{FU} / \text{g}$$

$\text{U}_{\text{in}}$  = Inulina  $^3\text{H}$  en orina (mg/ml)

$\text{P}_{\text{in}}$  = Inulina  $^3\text{H}$  en plasma (mg/ml)

FU = flujo urinario (ml.min $^{-1}$ )

g = peso de los riñones (g)

#### 6.4 Estudio ecográfico convencional y evaluación mediante ARFI

Todos los estudios ecográficos fueron llevados a cabo por un radiólogo con más de 20 años de experiencia en ecografía convencional y más de 10 años con técnica ARFI, ciego a los resultados analíticos e histológicos.

El estudio ecográfico convencional y la determinación de los valores ARFI, tanto en parénquima hepático como en renal, se realizó con un ecógrafo Acuson S2000 (Siemens, Erlangen, Germany) equipado con el software Virtual Touch Tissue Quantification, capaz de generar y detectar las ondas transversales o de cizallamiento utilizadas para determinar los valores de ARFI, representados como velocidad de corte (Vc) medida en metros por segundo. Se utilizó un transductor lineal de 9L4 para el estudio ecográfico en modo B y para el cálculo de las Vc).

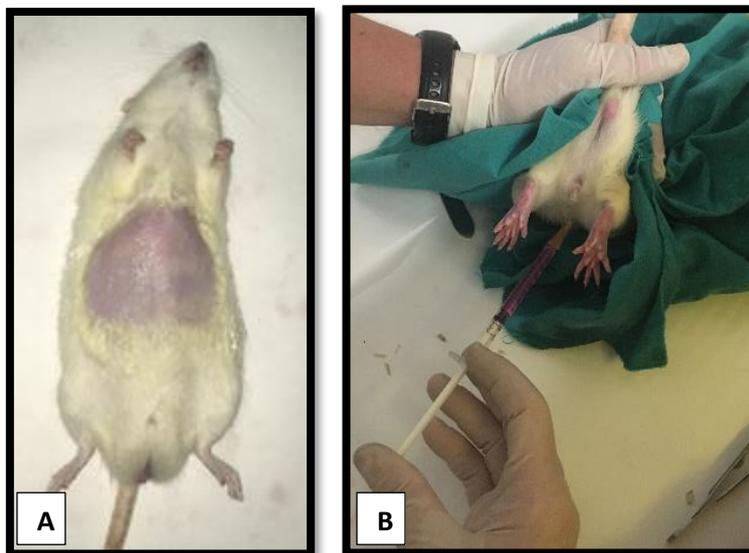
Tanto el estudio ecográfico convencional como las mediciones mediante sonoelastografía ARFI en parénquima hepático y renal, se realizaron *in vivo*, con el animal anestesiado, y *ex vivo*, tras sacrificar al animal y mediante la elaboración de fantomas ecográficos para los especímenes, en el estudio llevado a cabo en ratas Wistar, mientras que sólo establecimos medidas *ex vivo* en el estudio con ratas Sprague-Dawley.

### 6.4.1 Ecografía convencional

#### 6.4.1.1 Modelo in vivo

- **Preparación de los animales**

Para el estudio ecográfico *in vivo*, se llevó a cabo un exhaustivo rasurado del vello abdominal de los animales mediante una crema depilatoria para evitar la formación de artefactos (Figura 6.4A). A continuación, se procedió a la sedación profunda de los animales mediante la inyección intraperitoneal de 0,1ml/100gr de pentobarbital sódico para inducir un descenso en la frecuencia respiratoria y cardíaca, a fin de disminuir los artefactos producidos por los movimientos de la caja torácica y por el latido cardíaco. El propio fármaco indujo la muerte del animal a los pocos minutos de su administración (Figura 6.4B).



**Figura 6.4.** rasurado de vello abdominal mediante crema depilatoria (A) y administración de sedante intraperitoneal (B)

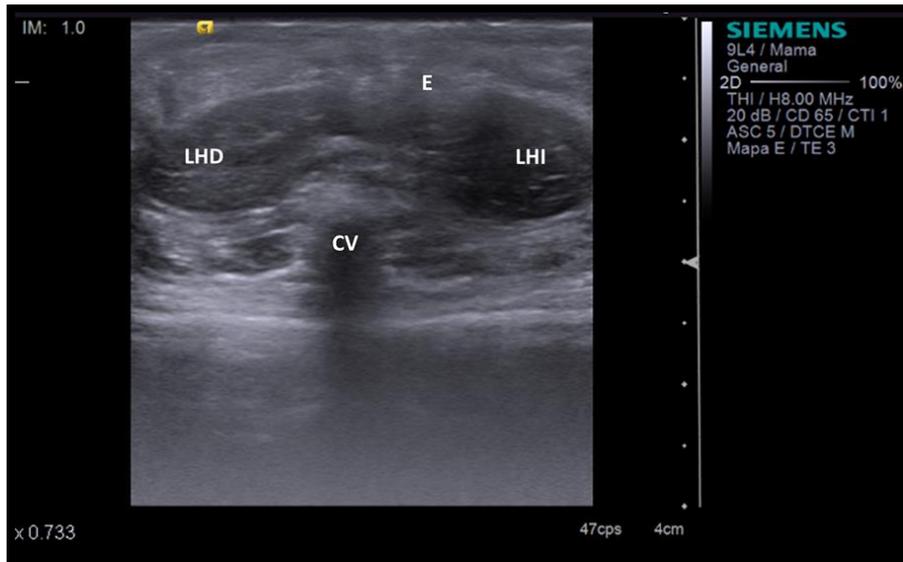
Inmediatamente después de la inyección del fármaco, los animales fueron colocados y fijados en posición de decúbito supino para permitir una adecuada exploración ecográfica, previa a la muerte del animal a consecuencia del fármaco administrado (Figura 6.5).



**Figura 6.5.** Rastreo ecográfico en cuadrantes abdominales superiores para la valoración hepática y renal.

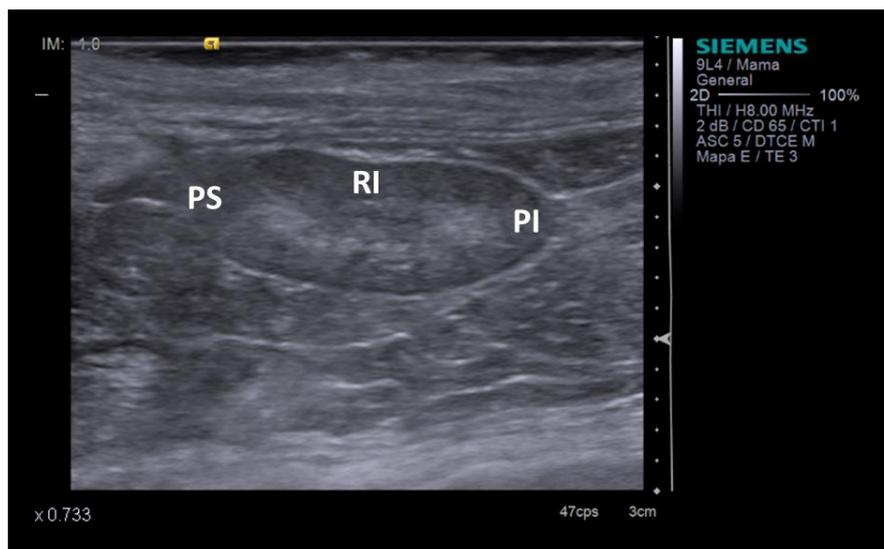
- **Realización del estudio ecográfico convencional *in vivo***

Para la realización del estudio ecográfico en modo B del parénquima hepático, se exploraron los cuadrantes abdominales superiores, centrándonos en la región subcostal, hasta localizar los dos lóbulos hepáticos derechos (Figura 6.6). Durante el estudio convencional, se exploró el lóbulo hepático derecho en su totalidad y se establecieron las regiones de interés (RDI) que posteriormente se utilizaron para el registro de los valores ARFI. Ninguno de los animales presentó alteraciones hepáticas ni biliares en el estudio ecográfico que provocaran su exclusión del estudio.



**Figura 6.6.** Corte axial ecográfico de cuadrantes abdominales superiores de rata, con identificación de parénquima hepático. LHD: lóbulo hepático derecho; LHI: lóbulo hepático izquierdo; E: estómago; CV: columna vertebral.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis ecográfico del riñón izquierdo, debido a su mejor accesibilidad ecográfica y menor interposición de estructuras intraabdominales. Para ello, se exploró el hipocondrio y flanco izquierdos hasta conseguir una ventana acústica adecuada en la que visualizar el parénquima renal en su totalidad (Figura 6.7). Ninguno de los animales mostró hidronefrosis, nefrolitiasis ni tumores renales.

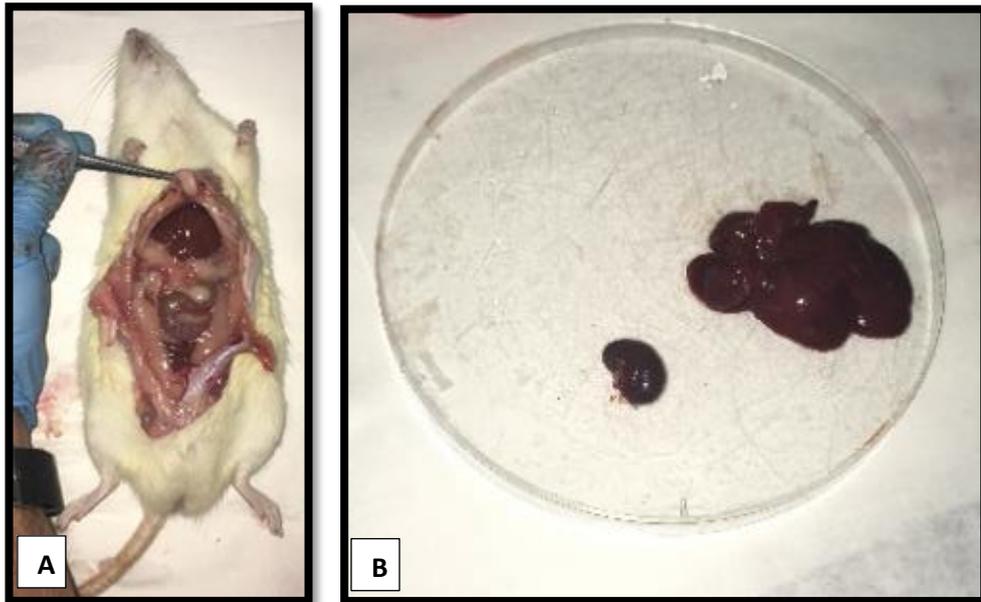


**Figura 6.7.** Corte coronal ecográfico con exposición de parénquima renal. PS: polo superior; RI: región interpolar; PI: polo inferior.

#### 6.4.1.2 Modelo ex vivo

- **Sacrificio animal y elaboración de fantoma ecográfico**

Una vez sacrificados los animales, tras la inyección del pentobarbital sódico y la realización del estudio ecográfico *in vivo*, se procedió a la disección de los animales para la extracción del parénquima hepático y renal a fin de realizar un estudio ecográfico *ex vivo*. Los explantes fueron colocados en un bote con suero fisiológico antes de su estudio ecográfico (Figura 6.8).



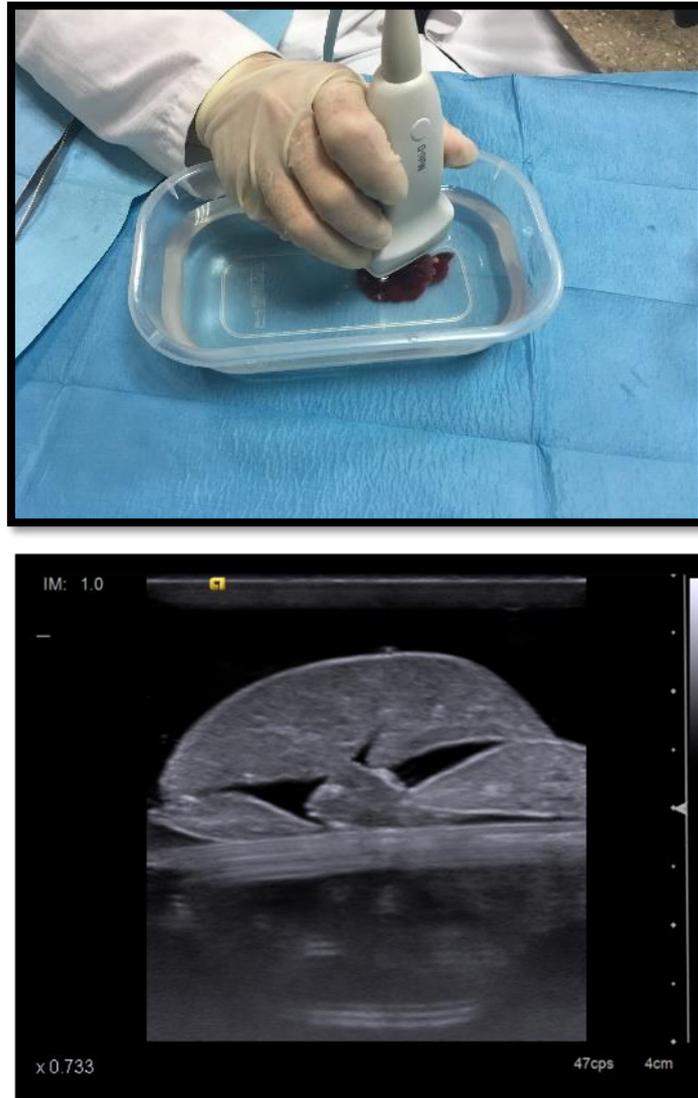
**Figura 6.8.** Disección anatómica a través de laparotomía media (A) y extracción de especímenes de hígado y riñón (B)

Los especímenes hepático y renal fueron colocados en dos fantomas ecográficos distintos para su estudio por ultrasonido, con el fin de evaluar la elasticidad parenquimatosa de la forma más precisa posible, evitando fuentes de artefacto anatómicos y fisiológicos, así como para conseguir establecer RDIs de mayor calidad al tener la posibilidad de manipular la orientación de los explantes.

El explante hepático se introdujo en un recipiente de plástico con suero fisiológico a temperatura ambiente para llevar a cabo un estudio ecográfico por inmersión. En cuanto al explante renal, se introdujo en un recipiente de plástico con gel ecográfico, con el fin de fijar correctamente la pieza para su estudio.

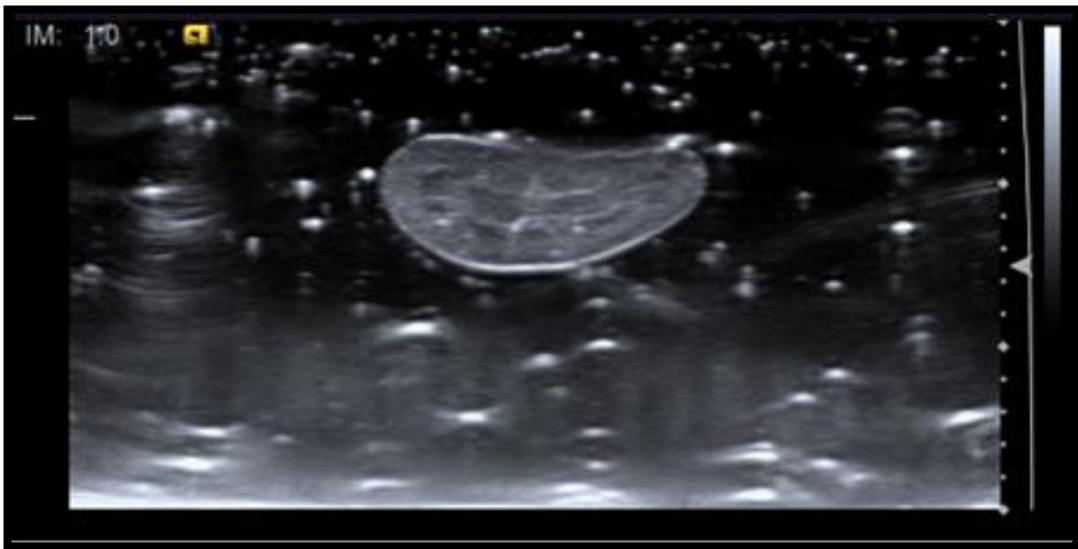
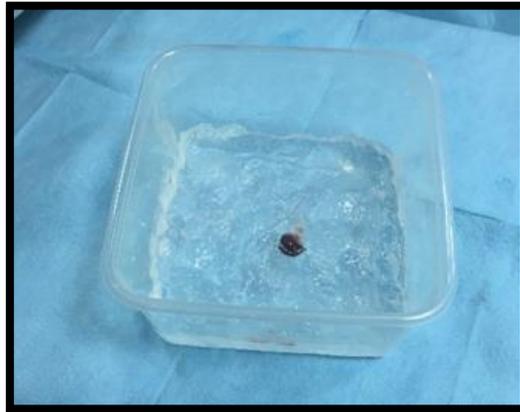
- **Realización del estudio ecográfico convencional *ex vivo***

Para el estudio del parénquima hepático se llevó a cabo la exploración ecográfica mediante una técnica de inmersión, colocando el transductor en el interior del recipiente con suero fisiológico, sin contactar con la cápsula hepática con el fin de evitar la compresión extrínseca de la muestra (Figura 6.9).



**Figura 6.9.** Técnica ecográfica de inmersión en suero salino. El espécimen es situado en un recipiente de plástico con suero salino. La exploración se realiza sin tocar la pieza para evitar la compresión extrínseca.

En cuanto al estudio del parénquima renal, se comprobó que el riñón presentase una orientación paralela a la superficie del recipiente y se cubrió por completo con gel ecográfico, eliminando el aire residual que se localizase entre la cápsula renal y el transductor a fin de generar una buena ventana acústica. El estudio ecográfico se realizó evitando el contacto entre el transductor y el parénquima renal para eliminar artefactos secundarios a la compresión extrínseca (Figura 6.10).



**Figura 6.10.** Preparación de recipiente con gel de ultrasonidos para estudio renal ex vivo.

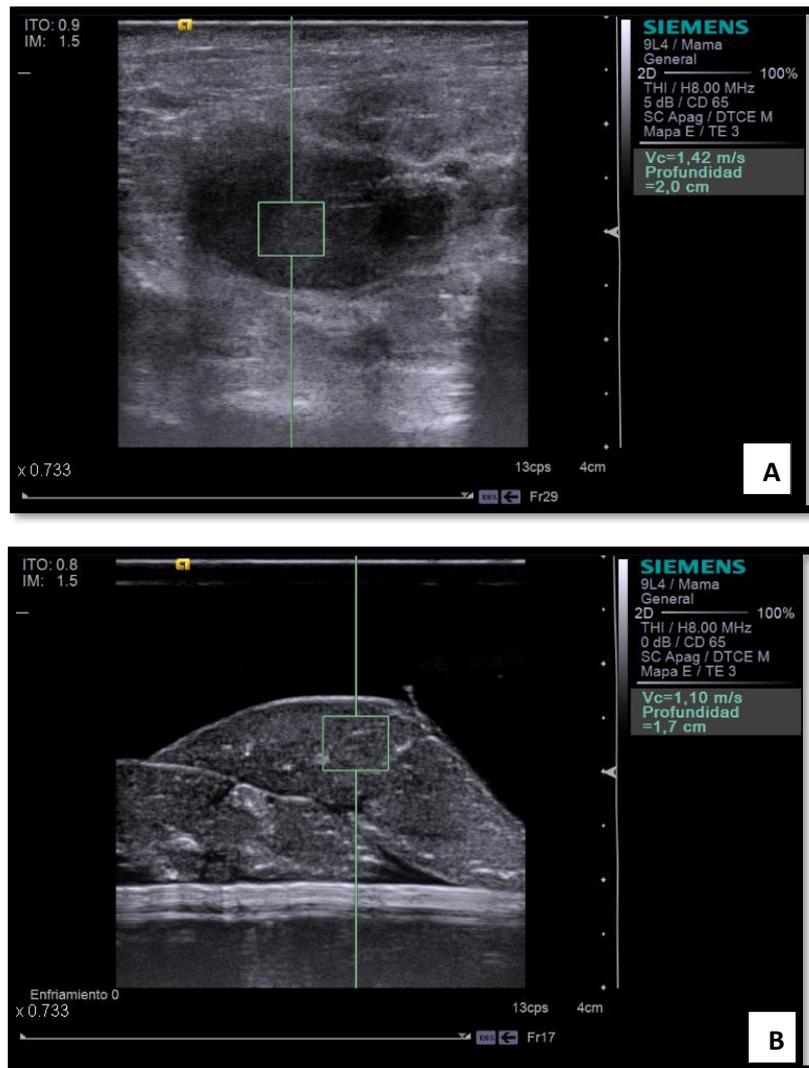
#### 6.4.2 Evaluación mediante técnica ARFI

Para la determinación de los valores de ARFI en hígado, tanto en el modelo *in vivo* como en el *ex vivo*, se establecieron tres regiones de interés (RDI) de morfología rectangular preestablecida mediante el transductor 9L4, en los lóbulos hepáticos derechos (medial y lateral) de las ratas. Estas regiones habían sido estudiadas previamente mediante el estudio ecográfico convencional. Para establecer las RDI en parénquima hepático, se cumplieron los siguientes requisitos en todos los casos:

- Profundidad de 1-2cm en parénquima hepático, evitando la región capsular y grandes estructuras vasculares intrahepáticas.
- Mínima compresión extrínseca con el transductor sobre pared abdominal en el estudio *in vivo*, y ausencia de contacto entre el transductor y la superficie hepática en el estudio *ex vivo*, con interposición de suero fisiológico como conector.
- Disposición paralela de las RDI con respecto a la superficie capsular.
- Adquisición de cinco medidas para cada RDI para evitar errores de variabilidad.

El resultado ARFI, expresado como velocidad corte (Vc) medida en metros/segundo, se expresó como la media y desviación típica de todos los valores obtenidos durante el examen.

La adquisición de los resultados fue exitosa tanto en el estudio *in vivo* como en el *ex vivo* (Figura 6.11). No obstante, se consiguieron establecer RDI de mayor calidad en el modelo *ex vivo* debido a la ausencia de artefactos de movimiento respiratorio y por posibilidad de movilizar y orientar el explante hepático para conseguir una mejor ventana ecográfica.



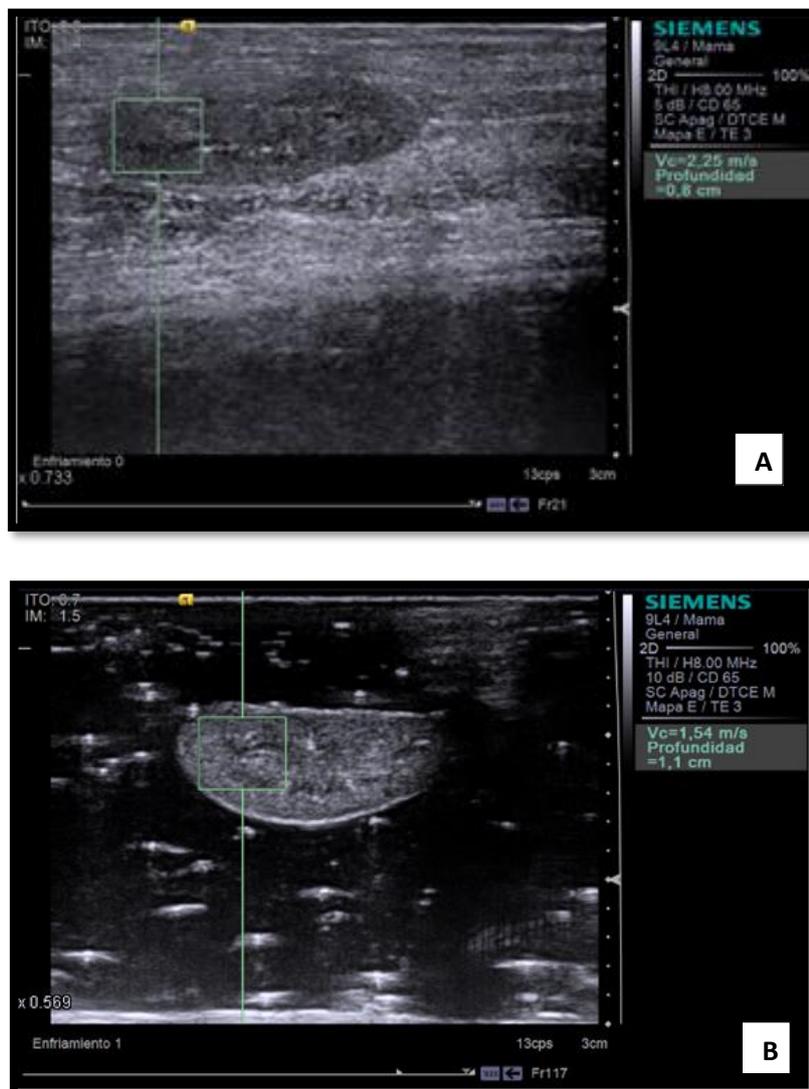
**Figura 6.11.** Determinación de RDI en lóbulo hepático derecho. Estudio *in vivo* (A) y *ex vivo* (B)

En cuanto a la adquisición de los valores ARFI en riñón, tanto en el modelo *in vivo* como en el *ex vivo* (Figura 6.12), se expuso el parénquima renal en el plano longitudinal posible y seleccionaron tres RDI en corteza y unión córtico-medular renal, una para cada polo renal y otra en la región interpolar, evaluando el parénquima. Para la estimación de resultados en cada RDI, se siguieron los siguientes criterios:

- Mínima compresión extrínseca sobre pared abdominal en el estudio *in vivo* y ausencia de contacto entre el transductor y la cápsula renal en el *ex vivo*, con interposición de gel de ultrasonido entre ambas superficies, evitando la acumulación de aire.
- Disposición paralela a cápsula renal de las RDI para minimizar el efecto de la anisotropía.
- Adquisición de tres medidas en cada RDI para evitar errores de variabilidad.

Al igual que en el estudio hepático, el resultado de las Vc fue expresado como la media y desviación típica de los valores obtenidos en el estudio.

La correcta colocación de las RDI resultó más dificultosa en los estudios *in vivo*, debido a los obstáculos anatómicos que presentaban los animales y los movimientos respiratorios del animal, mientras que, en el estudio *ex vivo*, la ausencia de artefactos de movimiento respiratorio y la posibilidad de manipular la posición de los explantes facilitó la correcta valoración parenquimatosa.



**Figura 6.12.** Determinación de la RDI en riñón. Estudio *in vivo* (A) y *ex vivo* (B)

En el caso de medidas no válidas, tanto en parénquima hepático como renal, el ecógrafo indicó en la pantalla el fallo con el rótulo “XXX” y esta medida fue desestimada para el cálculo de la media. Posteriormente, se repitieron las medidas en la misma localización hasta obtener un valor válido. Además, se procedió a la eliminación de los datos espurios, alterados por excesivo artefacto de movimiento u obtenidos con una ventana ecográfica deficiente. En cada animal se estimaron todas las medidas válidas, repitiendo aquellas que resultaron inválidas hasta obtener resultados válidos. La adquisición de resultados fue más dificultosa en la exploración in vivo que en la *ex vivo*, obteniendo con una mayor frecuencia resultados nulos y debiendo repetir las mediciones hasta conseguir valores válidos.

## 6.5 Estudio histopatológico, histoquímico e inmunohistoquímico

Finalizados los estudios ecográficos, se procedió a la toma de muestras de hígado y riñón de los animales estudiados. Tanto en el caso del hígado (lóbulo medio), como en el riñón izquierdo (corte sagital medio), se tomaron muestras de 2-3 mm de espesor. Las muestras así obtenidas fueron introducidas en cassetes histológicos de inclusión convenientemente rotulados para estudio ciego (Labolan, Navarra, España) y sumergidas en formalina comercial al 4% tamponada en PBS (pH 7.0, Panreac química, Barcelona, España) en un volumen mínimo de fijador de 10 veces el volumen total de las muestras obtenidas.

Tras un tiempo de fijación de 48 horas, se procedió a su procesado mediante el uso de un procesador histológico multifunción por microondas (Milestone KOS Histostation, Milestone, Bergamo, Italia), de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Lavado de los cassetes en agua corriente: 20 minutos.
2. Enjuague en agua destilada.
3. Inmersión de los cassetes en etanol 96º (Technisolv®, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Francia), durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Inmersión de los cassetes en etanol absoluto (Technisolv®) durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Colocación de los cassetes en el soporte. Inmersión del soporte en un baño especial resistente al microondas con etanol absoluto (Technisolv®). Tratamiento de las muestras por microondas a 55ºC durante 25 minutos.
6. Inmersión del soporte con los cassetes en un baño especial resistente al microondas con 2-propanol puro (Panreac). Tratamiento de las muestras por microondas a 55ºC durante 55 minutos.

7. Inmersión del soporte con los cassettes en un baño especial resistente al microondas con parafina líquida (Shandon Histowax<sup>®</sup>, Thermo Scientific., Madrid, España). Tratamiento de las muestras por microondas a 70°C durante 1 hora y 15 minutos.

Una vez finalizado el procesado de las muestras, se procedió a su inclusión en parafina utilizando un inclusor Thermo Histostar<sup>®</sup> (Thermo Scientific) para elaborar los bloques. Una vez realizados, se procedió al corte de las secciones. Así, tras el enfriado previo de los bloques en placa fría (Thermo Histostar), se cortaron secciones de parafina utilizando un micrótopo de rotación automático Thermo HM355S (Thermo Scientific), al que se acopló cuchillas desechables de perfil bajo (MxUltra<sup>®</sup> 34<sup>º</sup>, Thermo). El grosor del corte para el análisis histopatológico e histoquímico fue de 3 micrómetros. Los cortes así obtenidos se depositaron sobre la superficie del agua de un baño maría calentado a 40<sup>º</sup>-45C (Kunz Instruments, Nynasham, Suecia) para favorecer el estirado de los cortes, recogiénolos posteriormente en portaobjetos con carga electrostática (Superfrost<sup>®</sup>, Waldelmar Knittel, Braunschweig, Alemania). Por último, los cortes se introdujeron en una estufa a 60<sup>º</sup> durante 1 hora, y almacenados hasta el momento de su uso.

### 6.5.1 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se realizó en las muestras de hígado (valoración del infiltrado inflamatorio y esteatosis) mediante tinción de **hematoxilina-eosina (HE)**, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- Desparafinado en sustituto de xileno (Thermo) (2x5 min).
- 2- Rehidratación de los cortes usando concentraciones decrecientes de etanol:
  - Etanol absoluto (2 X 5 min).
  - Etanol 96% (5 min).
  - Etanol 70% (5 min).
- 3- Lavado en agua corriente (5 min).
- 4- Enjuague en agua destilada y contraste con Hematoxilina acidificada de Harris (Thermo) (2 min).
- 5- Lavado en agua corriente (5 min).
- 6- Deshidratación de las muestras en etanol 70<sup>º</sup> (5 min).
- 7- Contraste con Eosina alcohólica (Thermo) (2 min).

- 8- Lavado rápido en agua corriente (10 seg).
- 9- Deshidratación en etanol en concentración creciente:
  - Etanol 96º (2x1min.).
  - Etanol absoluto (2 x 5 min).
- 10- Aclarado en sustituto de xileno (Thermo) (2 x 5 min).
- 11- Montaje en medio no acuoso (Neo-Mount (Merck, Madrid, España)).

El patrón de tinción de esta técnica permite diferenciar las estructuras tisulares con características ácidas (basófilas, ácidos nucleicos, por ejemplo) de un color azul intenso, mientras que las estructuras con características básicas (acidófilas, gránulos intracitoplasmáticos, por ejemplo).

Para el examen de las secciones, se utilizó un microscopio óptico de luz emitida Zeiss Axio Scope A.1 (Carl Zeiss, Jenna, Alemania), equipado con un sistema de cámara digital (AxioCam IcC3, Carl Zeiss), y un sistema de captura y toma de imágenes (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss).

**6.5.1.1. Valoración de la actividad necroinflamatoria del parénquima hepático.**

La actividad necroinflamatoria en parénquima hepático fue graduada en función de la escala utilizada por Hao et al. (2016) en su estudio experimental con ratas, que analiza el grado de infiltración linfocitario, la localización en el lobulillo hepático y el grado de necrosis. Esta escala se divide en cinco grados (Figura 6.13).

ACTIVIDAD NECRO-INFLAMATORIA	CARACTERÍSTICAS
G0	No células inflamatorias
G1	Ligero infiltrado celular en área portal o centrolobulillar
G2	Infiltración celular inflamatoria en área portal, centrolobulillar, sinusoides o interlobulillar
G3	Infiltración celular inflamatoria focal con degeneración y necrosis hepatocitaria
G4	Infiltración celular inflamatoria difusa con importante componente de degeneración y necrosis

**Figura 6.13.** Escala de actividad necroinflamatoria hepática

### 6.5.1.2. Valoración histopatológica del grado de esteatosis hepática.

El grado de esteatosis se determinó mediante el examen histopatológico de secciones teñidas con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E). Para la determinación del grado de esteatosis se utilizó la escala definida por Brunt et al. (1999) basada en 4 grados (0: no esteatosis, 1: 0-33%, 2: 33-66% y 3: >66% de hepatocitos afectados) (Figura 6.14).

GRADO DE ESTEATOSIS	CARACTERÍSTICAS
F0	No sobrecarga grasa
E1	Sobrecarga grasa leve (<33%)
E2	Sobrecarga grasa moderada (33-66%)
E3	Sobrecarga grasa severa (>66%)

**Figura 6.14.** Escala de Brunt para valoración de la esteatosis hepática

### 6.5.2. Análisis histoquímico.

Para realizar el estudio morfométrico de la superficie de fibrosis en cortes de hígado y riñón, se utilizó un método tinción tricrómica (tricrómico según Masson). Esta técnica aprovecha las características químicas de los componentes tisulares para, en función del tipo de tejido o estructura, colorearse de un modo u otro. Así, en el caso concreto del tricrómico de Masson, los núcleos celulares se colorean de negro, el tejido conectivo de azul y el tejido muscular de color rojo-ladrillo. Para realizar la tinción, se utilizó un kit comercial (Biooptica, Milán, Italia), de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Desparafinado y rehidratación.
2. Tinción con hematoxilina férrica de Weigert (10 min).
3. Sin lavado, tinción con ácido pícrico (4 min.).
4. Lavado rápido en agua destilada (5 seg.).
5. Tinción con fucsina ácida de Ponceau (4 min).
6. Lavado rápido en agua destilada (5 seg.).
7. Tinción con ácido fosfomobdílico (10 min).
8. Sin lavar, tinción con azul de anilina (5 min).
9. Deshidratación rápida en etanol en concentración creciente:
  - Etanol 96º (2x20 seg).
  - Etanol absoluto (2 x 1 min).
10. 10- Aclarado en sustituto de xileno (Thermo) (2 x 5 min).

11. Montaje en medio no acuoso (Neo-Mount (Merck)).

Las secciones así teñidas, se examinaron con un microscopio de luz emitida (Zeiss Axio Scope A.1). La valoración de la superficie de fibrosis se calculó mediante un análisis histomorfométrico usando un software específico (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss), calculando la superficie de tejido conectivo (de color azul) en 10 campos aleatorios en secciones de hígado y riñón de cada animal, expresando el resultado como la media  $\pm$  desviación típica de la superficie de fibrosis de los 10 campos considerados.

Complementariamente, y dado que existen publicaciones que establecen una relación directa entre el grado de fibrosis hepática (no así el renal), y las pruebas ecográficas, se utilizó una escala semicuantitativa, la escala METAVIR, para la valoración de dicha fibrosis. La escala METAVIR es la escala histológica más utilizada para evaluar el grado de fibrosis hepática. Se encuentra ampliamente validada en pacientes con hepatopatía crónica VHC y se divide en cuatro grados en función de la severidad y la distribución de la fibrosis en el parénquima hepático (Bedossa, 1994) (Figura 6.15).

<i>METAVIR</i>	<i>CARACTERÍSTICAS</i>
F0	No fibrosis
F1	Fibrosis portal sin septos
F2	Fibrosis portal con algún septo
F3	Múltiples septos/puentes fibróticos
F4	Cirrosis

**Figura 6.15.** Escala METAVIR para la valoración de fibrosis

**6.5.3. Análisis inmunohistoquímico:**

La determinación cuantitativa del infiltrado inflamatorio crónico (linfocitos T-CD3) se realizó mediante determinación inmunohistoquímica sobre secciones en parafina de hígado y riñón, utilizando una técnica colorimétrica indirecta basada en el **complejo avidina-biotina-peroxidasa** (técnica ABC), basada en el siguiente protocolo común:

- 1- Desparafinado en sustituto de xileno (Thermo) (2x5 min).
- 2- Rehidratación de los cortes usando concentraciones decrecientes de etanol:

Etanol absoluto (2 X 5 min).

Etanol 96% (5 min).

Etanol 70% (5 min).

- 3- Lavado en agua corriente (5 min).
- 4- Desenmascaramiento antigénico. Debido a que la fijación en formalina induce la formación de puentes metileno(*cross-linking*) entre proteínas vecinas (Pearse, 1968), provocando la deformación de la estructura terciaria de las proteínas y la formación de una densa maraña que deforma los epítomos antigénicos e impide el acceso a los mismos a los anticuerpos específicos frente a ellos, se sometió a las muestras a una técnica de desenmascaramiento antigénico para destruir dichos puentes y reestablecer en la medida de lo posible dicha estructura terciaria. Con este objetivo, se sometió a las muestras a un método de desenmascaramiento antigénico por calor (98°C) e inmersión de las secciones en una disolución comercial de citrato sódico a pH 6.0 (Dako Diagnostics, Barcelona, España) durante 30 minutos en olla presurizada (Dako Pascal®). Finalizado el pretratamiento, las secciones se enfriaron a temperatura ambiente durante 10 min.
- 5- Lavado de las secciones en una solución comercial de TBS-Tween 20 (Dako). (3x5 min).
- 6- Delimitado de las secciones en portaobjetos mediante lápiz graso (Dako).
- 7- Inhibición de la peroxidasa endógena mediante incubación de las secciones con una solución comercial de agua oxigenada al 10% en TBS-Tween 20 (Dako) durante 5min.
- 8- Incubación con suero normal de conejo en TBS en dilución 1:100 (20 minutos a 30°C en cámara húmeda).
- 9- Incubación de las secciones con el anticuerpo primario (anti-CD3, Dako), en un diluyente comercial (Dako, 2 horas a 30°C).
- 10- Lavado en TBS-Tween 20 (3x5min).
- 11- Incubación con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo unido a un polímero de moléculas de peroxidasa (sistema EnVision de Dako Diagnostics, 25min a 30°C en cámara húmeda).
- 12- Lavado en TBS-Tween 20 (3x5 min).
- 13- Revelado de las secciones en una solución comercial de 2-2'-Diaminobencidina (DAB) y agua oxigenada (Dako). Las áreas positivas aparecen de un color marrón claro.
- 14- Lavado en agua corriente (10 min).

- 15- Contraste en hematoxilina acidificada de Mayer (30 seg).
- 16- Deshidratación en etanol en concentración creciente:
  - Etanol 96º (2x20 seg).
  - Etanol absoluto (2 x 5 min).
- 17- Aclarado en sustituto de xileno (Thermo) (2 x 5 min).
- 18- Montaje en medio no acuoso (Neo-Mount (Merck)).

La inmunoreacción positiva (linfocitos T-CD3<sup>+</sup>) se identificó como un halo pericelular de color marrón oscuro. Para establecer posibles diferencias en infiltrado de linfocitos T-CD3<sup>+</sup> en función de la técnica, se calculó la media ponderada  $\pm$  desviación estándar del recuento del número de células positivas en un mínimo de 10 campos aleatorios a alto aumento (x400) de las secciones de hígado y riñón de cada animal.

## 6.6 Análisis estadístico

En la primera parte del estudio llevado a cabo en modelo rata Wistar y en el modelo de rata Sprague-Dawley, se realizó una estadística descriptiva obteniéndose medias, desviación típica, error estándar y rangos de las variables cuantitativas estudiadas. Las medias fueron expresadas junto con la desviación típica.

Usando el test de Kolmogorov-Smirnov se verificó que las variables cuantitativas seguían una distribución normal. De esta forma, se aplicaron test estadísticos paramétricos debido a su mayor potencia estadística.

Se aplicó el estadístico t de student para la determinación de diferencias entre las medias intergrupales de las variables cuantitativas (peso, superficie de fibrosis hepática por campo, número de linfocitos CD3 hepáticos por campo, superficie de fibrosis renal por campo, número de linfocitos CD3 en parénquima renal, velocidades de corte con ARFI en parénquima hepático y en parénquima renal) y para establecer diferencias entre variables cuantitativas y variables dicotómicas (grupos 1 y 2 de METAVIR y de la clasificación de Brunt).

Para el análisis del grado de correlación entre los valores obtenidos mediante ARFI y las variables histológicas cuantitativas (parámetros analíticos, superficie de fibrosis hepática y renal por

campo, número de linfocitos CD3 en parénquima hepático y renal por campo y porcentaje de esteatosis) se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson.

El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS for Windows, Chicago, IL, USA). La significación estadística se definió como  $p < 0.05$ .

# CAPÍTULO VII

## RESULTADOS

### 7.1 Estudio Wistar. Comparación entre modelo *in vivo* y *ex vivo*.

Para determinar las posibles diferencias en los valores de ARFI con el órgano mantenido en cavidad (*in vivo*) o fuera de la misma (*ex vivo*), y realizar una correlación con las variables analíticas e histológicas de parénquima hepático y renal, se usaron un total de 17 ratas Wistar macho de 2 años.

Los animales se dividieron en dos grupos: grupo control (n=6) no obesos y un grupo de intervención obeso (n=11) con obesidad natural, no inducida. El peso medio del grupo control fue de  $510 \pm 198$  gramos mientras que el grupo obeso mostró una media de  $881 \pm 125$  gramos, un incremento de peso estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

#### 7.1.1 Hígado

##### 7.1.1.1 Características clínicas

Las variables del perfil lipídico y los niveles de alanina transaminasa (ALT) de los animales de los grupos control y obeso se reflejan en la tabla 7.1.

**Tabla 7.1.** Perfil lipídico y niveles de ALT en grupo control y grupo obeso.

VARIABLE	GRUPO CONTROL (n=6)	GRUPO OBESO (n=11)
HDL (mg/dl)	$44,9 \pm 1,3$	$42,2 \pm 0,9$
LDL (mg/dl)	$91,8 \pm 5,7$	$87,4 \pm 0,9$
Triglicéridos (mg/dl)	$1005,0 \pm 47,0$	$937,0 \pm 0,5$
ALT (U/ml)	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,9$

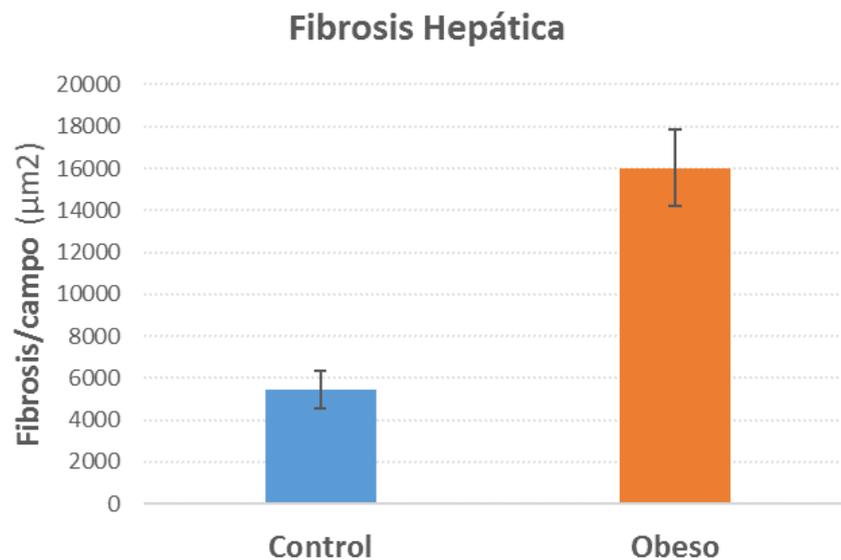
Medias  $\pm$  Desviación estándar

Los valores de HDL, LDL y triglicéridos no mostraron diferencias significativas entre los animales del grupo control y los del grupo obeso. Al igual que el perfil lipídico, los valores de ALT no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos.

### 7.1.1.2 Características histopatológicas hepáticas

- **Fibrosis hepática**

El análisis histopatológico reveló que la fibrosis se circunscribía exclusivamente a zona periportal, sin afectar a la vena centrolobulillar. La media de superficie de fibrosis hepática por campo en los animales del grupo control fue de  $5423 \pm 893 \mu\text{m}^2$ , un resultado que contrasta con el obtenido en el grupo obeso, con una media de  $16006 \pm 1818 \mu\text{m}^2$ , diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Figuras 7.1 y 7.3).



**Figura 7.1.** Superficie media de fibrosis hepática del grupo control y obeso. Las líneas indican la DE.

Atendiendo a la escala METAVIR, ninguna de las ratas del grupo control presentó fibrosis de distribución portal o periportal significativa (F0), mientras que todas las ratas obesas mostraron una distribución de fibrosis portal y periportal, sin formar septos (F1) (Tabla 7.2).

**Tabla 7.2.** Distribución de fibrosis hepática en función de la escala METAVIR.

METAVIR	CONTROL (n=6)	OBESAS (n=11)
F0 (no fibrosis)	6	-
F1 (fibrosis portal y periportal sin septos)	-	11
F2 (fibrosis portal y periportal con escasos septos)	-	-
F3 (fibrosis portal y periportal en puente)	-	-
F4 (cirrosis)	-	-

- **Esteatosis hepática**

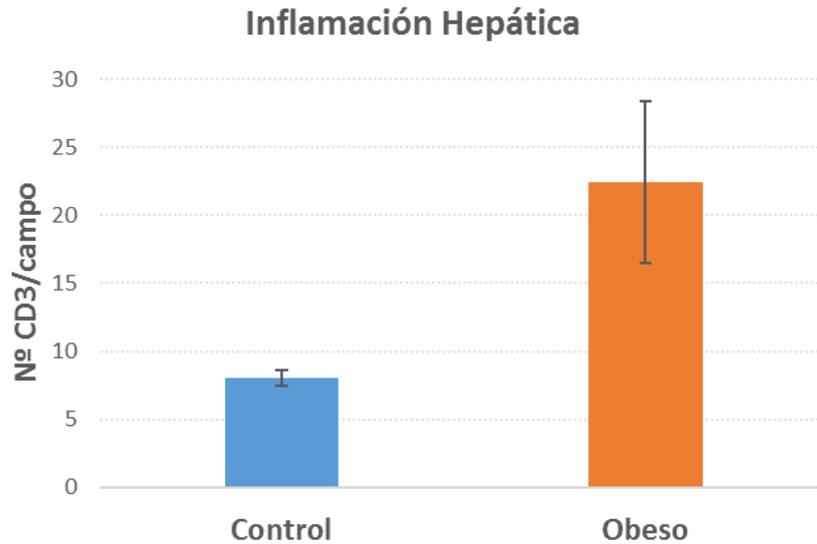
El análisis del grado de esteatosis hepática (de patrón mixto macro y microgotular), reveló que los animales del grupo control no mostraban esteatosis significativa (E0 en la escala de Brunt) a excepción de una de las ratas que mostró una sobrecarga lipídica moderada (E2), mientras que los animales del grupo obeso si presentaron un aumento significativo de la esteatosis ( $p < 0,002$ ), en su mayoría con un grado medio (E2) o severo (E3) de sobrecarga grasa (Tabla 7.3).

**Tabla 7.3.** Distribución de esteatosis en función de la escala de Brunt.

GRADO DE ESTEATOSIS	CONTROL (n=6)	OBESAS (n=11)
E0 (no sobrecarga grasa)	5	-
E1 (sobrecarga grasa leve)	-	2
E2 (sobrecarga grasa moderada)	1	6
E3 (sobrecarga grasa severa)	-	3

- **Inflamación hepática (infiltrado de linfocitos T-CD3<sup>+</sup>)**

En lo referente al grado de infiltrado de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, el grupo control obtuvo un recuento de  $8,1 \pm 0,6$  linfocitos/campo, mientras que el grupo obeso mostró un valor claramente más elevado ( $22,4 \pm 5,9$  linfocitos/campo), un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ). (Figuras 7.2 y 7.3).

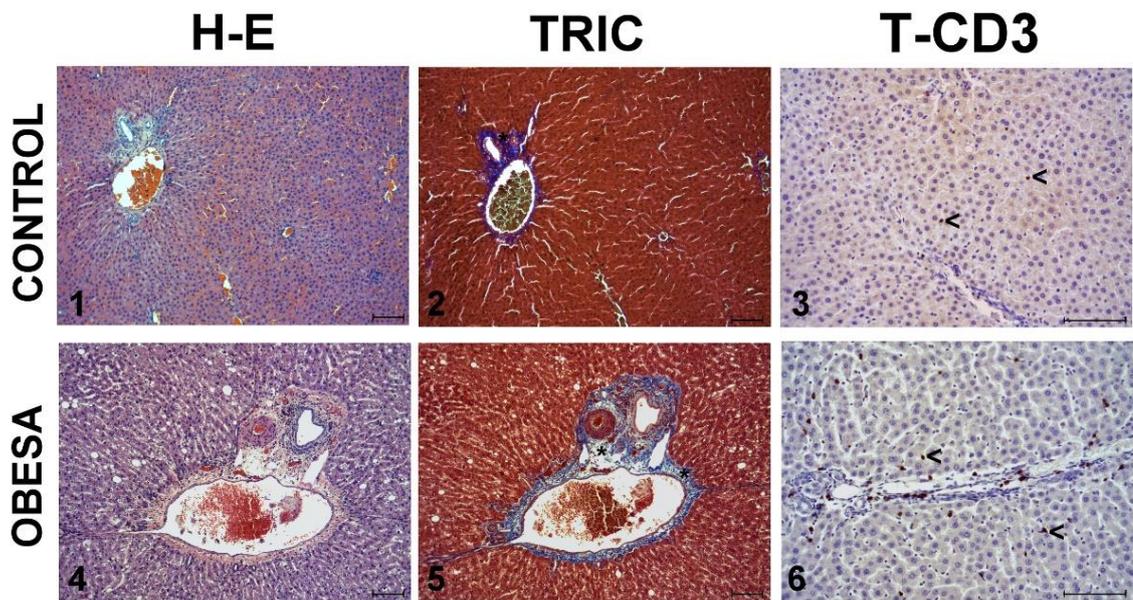


**Figura 7.2.** Valor medio del recuento de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en parénquima hepático en el grupo control y grupo obeso. Las líneas indican la DE.

En cuanto al grado de inflamación hepática en función de la localización del infiltrado celular lobulillar, en el grupo control se observaron grados de inflamación no significativos o leves (G0 y G1) y en el grupo obeso se apreció un aumento significativo de infiltrado linfocitario de diversa graduación (G1, G2 y G3) (Tabla 7.4).

**Tabla 7.4.** Distribución del grado de inflamación en función de la distribución lobulillar.

GRADO DE INFLAMACIÓN	CONTROL (n=6)	OBESAS (N=11)
G0 (no células)	3	-
G1 (área portal o centrolobulillar)	3	1
G2 (área portal, centrolobulillar, sinusoides o interlobulillar)	-	6
G3 (degeneración y necrosis hepatocitaria)	-	4

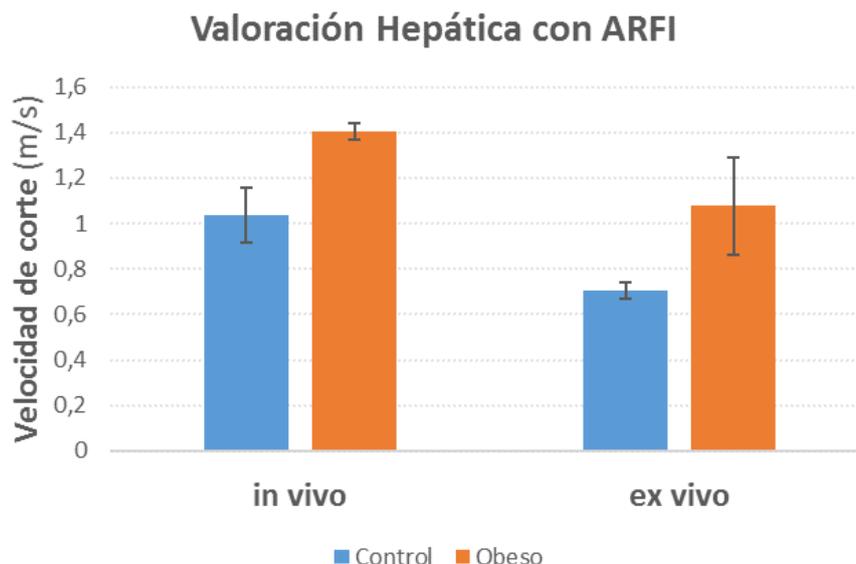


**Figura 7.3.** Imágenes representativas del examen histopatológico hepático (1 y 4), superficie de fibrosis (2 y 5, asteriscos), e infiltrado de linfocitos T CD3 (3 y 6, cabezas de flecha) en grupo control (1-3) y obeso (4-6). Técnica de hematoxilina-eosina (1 y 4), tricrómico de Masson (2 y 5) y ABC anti-linfocitos T CD3 (3 y 6). Escala: 100 micrómetros.

### 7.1.1.3 Evaluación con técnica ARFI

Los estudios ecográficos convencionales y las medidas mediante técnica ARFI fueron realizados de forma satisfactoria en todos los animales incluidos en el estudio.

La media de las Vc obtenidas en parénquima hepático del grupo control reflejó una media *in vivo* de  $1,0 \pm 0,2$ m/s mientras que el grupo obeso mostró una media mayor en la valoración *in vivo*  $1,4 \pm 0,1$ m/s, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,008$ ). En cuanto a las exploraciones *ex vivo*, se obtuvieron unas Vc en el grupo control de  $0,7 \pm 0,1$ m/s, identificando una media significativamente elevada de  $1,1 \pm 0,2$ m/s en los animales del grupo obeso ( $p < 0,001$ ) (Figura 7.4). La gráfica demuestra un claro aumento de las Vc en las determinaciones en el estudio *in vivo* en comparación con el *ex vivo*, tanto en el grupo control como en el grupo obeso ( $p < 0,004$ ).



**Figura 7.4.** Valores comparativos medios de Vc con ARFI en parénquima hepático *in vivo* y *ex vivo* en grupo control y obeso. Las líneas indican la DE.

El análisis de correlación de Pearson entre las Vc de ARFI y los parámetros del perfil lipídico (HDL, LDL y TG) y la ALT, no mostraron valores de correlación significativos.

Atendiendo a la correlación para las variables histológicas cuantitativas hepáticas (Tabla 7.5) se apreció, para toda la muestra del estudio, una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la media de Vc obtenida mediante ARFI y la superficie de fibrosis por campo, tanto en el estudio *in vivo* ( $r=0,623$ ,  $p<0,008$ ) como en el estudio *ex vivo* ( $r=0,706$ ,  $p<0,002$ ), siendo el valor más elevado en el estudio *ex vivo* que en el *in vivo*. En cuanto a la correlación entre la Vc con ARFI y el número de linfocitos T-CD3<sup>+</sup>, fue positiva y estadísticamente significativa en el estudio *in vivo* ( $r=0,670$ ,  $p<0,003$ ), sin ser estadísticamente significativa en el *ex vivo* ( $r=0,471$ ,  $p<0,056$ ).

Si atendemos al grado de correlación obtenido entre la Vc con ARFI y el grado de esteatosis hepática, apreciamos una correlación positiva no estadísticamente significativa en el estudio *ex vivo* ( $r=0,530$ ,  $p=0,029$ ) y una ausencia de correlación en el estudio *in vivo* ( $r=0,120$ ,  $p<0,647$ ).

**Tabla 7.5.** Correlaciones de variables cuantitativas con ARFI en hígado (n=17).

ARFI HEPÁTICO		FIBROSIS POR CAMPO	Nº LINFOCITOS CD3	ESTEATOSIS
ARFI in vivo	Correlación Pearson	,623	,670	,120
	Sig. (bilateral)	,008	,003	,647
ARFI ex vivo	Correlación Pearson	,706	,471	,530
	Sig. (bilateral)	,002	,056	,029

El estudio de las diferencias de medias intergrupales mediante T de student, permitió detectar un aumento significativo de las Vc en animales que presentaron una fibrosis portal y periportal leve (F1) en comparación con aquellos que no mostraron fibrosis en la escala METAVIR (F0), tanto en el modelo *in vivo* ( $p < 0,008$ ) como en el *ex vivo* ( $p < 0,001$ ).

Por otra parte, detectamos un aumento estadísticamente significativo de las Vc en los animales que presentaron algún grado de esteatosis en la escala de Brunt (E1, E2 y E3) respecto a aquellos que no mostraron sobrecarga lipídica significativa (E0) tanto en el estudio *in vivo* ( $p < 0,021$ ) como en el *ex vivo* ( $p < 0,004$ ).

Además, en nuestro modelo animal, el análisis comparativo de las Vc en animales que presentan algún grado de inflamación (G1, G2 y G3) con respecto a los que no muestran inflamación (G0) también demostró un aumento estadísticamente significativo de las Vc en animales con algún grado de inflamación con respecto a los que no mostraron inflamación significativa, tanto en el estudio *in vivo* ( $p < 0,001$ ) como en el *ex vivo* ( $p < 0,001$ ).

## 7.1.2 Riñón

### 7.1.2.1 Características clínicas

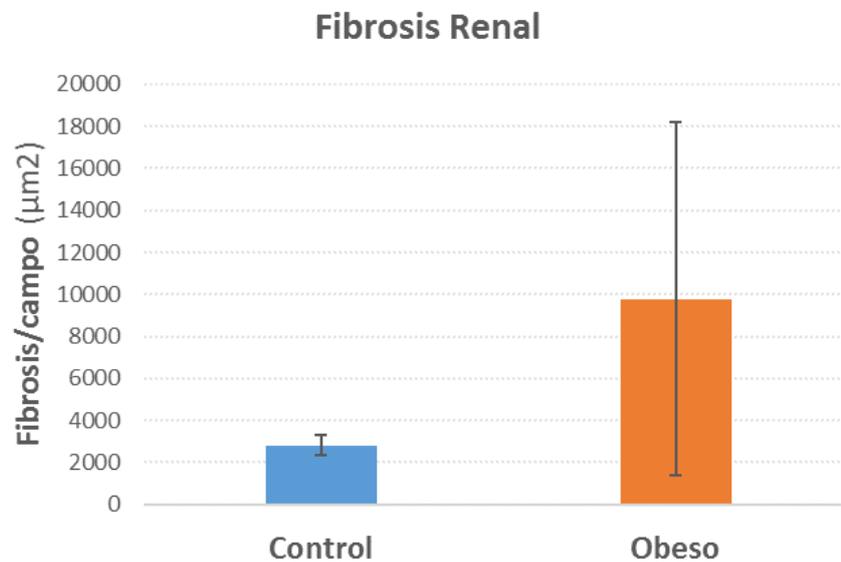
- **Tasa de filtración glomerular**

La media de TFG en el grupo control fue de  $1,2 \pm 0,2$  mL/min/100gr, mientras que el grupo obeso mostró unos valores inferiores, con una media de  $0,9 \pm 0,2$  mL/min/100gr, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,002$ ).

### 7.1.2.2 Características histopatológicas renales

- **Fibrosis renal**

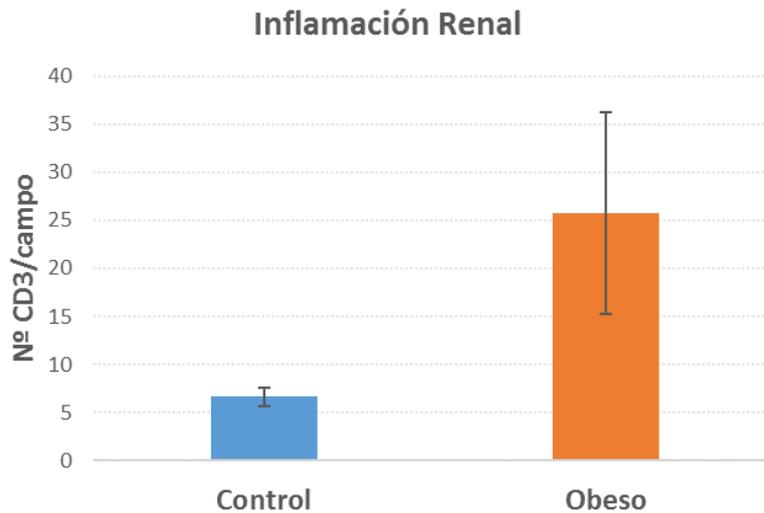
El análisis de la fibrosis intersticial reveló una media de fibrosis renal en función de la superficie por campo de  $2818 \pm 465$   $\mu\text{m}^2$  en el grupo control, un valor claramente inferior al obtenido tras el análisis del grupo obeso, con una media de  $9787 \pm 8428$   $\mu\text{m}^2$  ( $p < 0,021$ ) (Figuras 7.5 y 7.7).



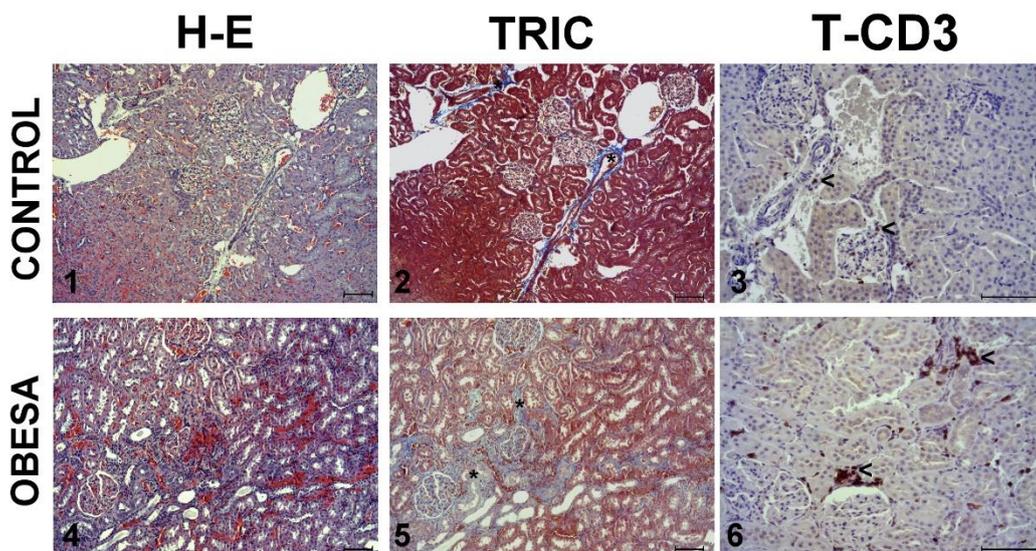
**Figura 7.5.** Valor medio de superficie de fibrosis por campo en riñón de grupo control y obeso. Las líneas indican el DE.

- **Inflamación renal (infiltrado de linfocitos T-CD3<sup>+</sup>)**

El análisis del grupo control mostró una media de  $6,7 \pm 0,9$  linfocitos T CD3<sup>+</sup>/campo, apreciando un aumento significativo en los valores del grupo obeso, con una media de  $25,8 \pm 10,5$  células/campo ( $p < 0,001$ ) (Figuras 7.6 y 7.7).



**Figura 7.6.** Valor medio del recuento de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en parénquima hepático en grupo control y grupo obeso. Las líneas indican la DE.

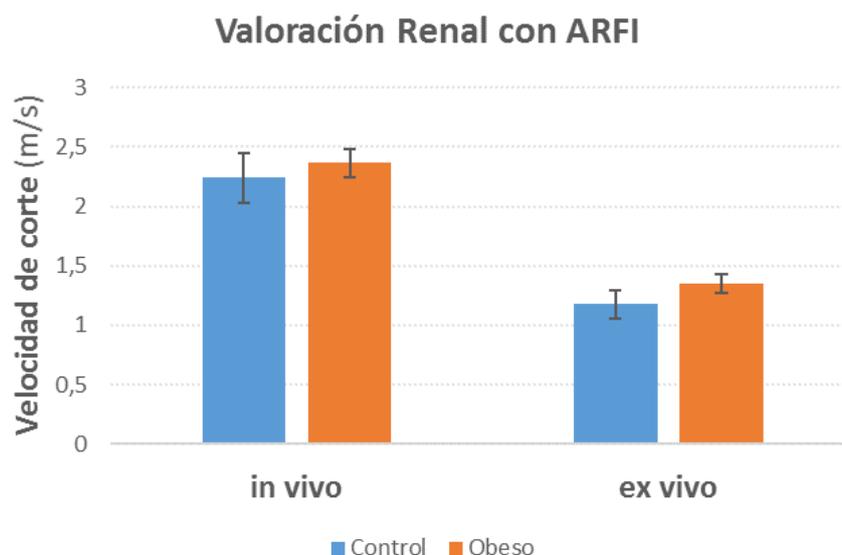


**Figura 7.7.** Imágenes representativas del grado de fibrosis (1-2 y 4-5, asteriscos) e infiltrado de linfocitos T-CD3<sup>+</sup> (3 y 6, cabezas de flecha) en riñones de grupo control (1-3) y obeso (4-6). Técnica de hematoxilina eosina (1,4), tricrómico de Masson (2,5) y ABC anti-Linfocitos T-CD3 (3,6). Escala: 100 micrómetros.

### 7.1.2.3 Evaluación con técnica ARFI

Los estudios ecográficos convencionales y las medidas mediante técnica ARFI renales resultaron exitosas en todos los animales.

La media de las Vc obtenida en el grupo de ratas control de forma *in vivo* fue de  $2,2 \pm 0,3$ m/s, con unas velocidades discretamente mayores en el grupo obeso de  $2,4 \pm 0,2$ m/s, pero sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. En cuanto al estudio *ex vivo*, el grupo control presentó una media de Vc de  $1,2 \pm 0,1$ m/s, mientras que el grupo obeso mostró una media discretamente más elevada de  $1,4 \pm 0,1$ m/s *ex vivo*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,002$ ) (Figura 7.8). Al igual que ocurría en el estudio hepático, las determinaciones renales presentaron unas medias significativamente mayores en el estudio *in vivo* en comparación al *ex vivo* ( $p < 0,001$ ).



**Figura 7.8.** Valores comparativos medios de Vc renal *in vivo* y *ex vivo* en grupo control y obeso. Las líneas representan la DE.

El análisis de correlación de Pearson de las Vc de ARFI con la TFG no mostró valores de correlación estadísticamente significativo.

En cuanto a la correlación con las variables histológicas renales (Tabla 7.6) evidenció, para toda la muestra del estudio, una correlación positiva y estadísticamente significativa entre las Vc obtenidas mediante ARFI y la superficie de fibrosis por campo en el estudio *in vivo* ( $r=0,705$ ,

$p < 0,002$ ), sin identificar correlación estadísticamente significativa en el estudio *ex vivo* ( $r = 0,466$ ,  $p = 0,059$ ).

Por otra parte, la correlación obtenida entre la Vc con ARFI y el número de linfocitos T CD3+ por campo, fue positiva y estadísticamente significativa en el estudio *ex vivo* ( $r = 0,608$ ,  $p < 0,010$ ), sin apreciar correlación significativa en la experiencia *in vivo* ( $r = 0,394$ ,  $p = 0,117$ ).

**Tabla 7.6.** Correlaciones de variables cuantitativas con ARFI en riñón ( $n = 17$ ).

ARFI RENAL		FIBROSIS POR CAMPO	Nº LINFOCITOS CD3
ARFI in vivo	Correlación Pearson	,705	,394
	Sig. (bilateral)	,002	,117
ARFI ex vivo	Correlación Pearson	,466	,608
	Sig. (bilateral)	,059	,010

## 7.2 Estudio *ex vivo* en modelos de rata Sprague-Dawley.

En esta segunda experiencia, se realizó un estudio de correlación entre las Vc obtenidas con ARFI obtenidas de forma *ex vivo* y los hallazgos analíticos e histológicos encontrados en parénquima hepático y renal en un modelo experimental de rata Sprague-Dawley compuesto por 27 animales divididos en dos grupos de 4 meses ( $n = 12$ ) y 9 meses ( $n = 15$ ) respectivamente. Cada grupo se dividió en otros cuatro grupos: control, obeso, hipertenso (HTA) y obeso-hipertenso (mixto).

Los pesos medios de los animales a los 4 meses fueron de  $433 \pm 21$  gramos en el grupo control,  $527 \pm 21$  gramos en el grupo obeso;  $447 \pm 24$  gramos en el grupo HTA y  $490 \pm 30$  gramos en el grupo mixto. En el caso de los animales a los 9 meses, el peso medio de los animales control fue de  $506 \pm 34$  gramos y el de los animales del grupo HTA fue de  $504 \pm 42$  gramos, con un incremento estadísticamente significativo del peso de los animales del grupo obeso ( $690 \pm 49$  gramos,  $p < 0,001$ ) y del grupo mixto ( $629 \pm 68$  gramos,  $p < 0,012$ ).

## 7.2.1 Hígado

### 7.2.1.1 Características clínicas

El perfil lipídico y lo niveles de ALT de los animales de 4 y 9 meses de tratamiento se reflejan en las tablas 7.7 y 7.8.

**Tabla 7.7.** Perfil lipídico y valores de ALT en animales de 4 meses

VARIABLE 4 MESES	GRUPO CONTROL (n=3)	GRUPO OBESO (n=3)	GRUPO HTA (n=3)	GRUPO MIXTO (n=3)
HDL (mg/dl)	27 ± 5	14 ± 3*	24 ± 4	10 ± 3*
LDL (mg/dl)	107 ± 4	104 ± 5	100 ± 3	115 ± 5
Triglicéridos (mg/dl)	1094 ± 39	1075 ± 30	964 ± 30	1040 ± 105
ALT (U/ml)	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,10 ± 0,03

\* Diferencias significativas con respecto a grupo control (p<0,05)

**Tabla 7.8.** Perfil lipídico y valores de ALT en animales de 9 meses

VARIABLE 9 MESES	GRUPO CONTROL (n=5)	GRUPO OBESO (n=4)	GRUPO HTA (n=3)	GRUPO MIXTO (n=3)
HDL (mg/dl)	44 ± 1	36 ± 3*	47 ± 3	32 ± 4*
LDL (mg/dl)	103 ± 4	95 ± 6	103 ± 4	108 ± 7
Triglicéridos (mg/dl)	1005 ± 47	924 ± 45	1055 ± 45	1068 ± 56
ALT (U/ml)	0,09 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,10 ± 0,04

\* Diferencias significativas con respecto a grupo control (p<0,05)

- **Perfil lipídico**

En los análisis obtenidos a los 4 meses de tratamiento, identificamos una disminución de los valores de HDL en el grupo obeso (14 ± 3mg/dl) y mixto (10 ± 3mg/dl) con respecto a los animales del grupo control (27 ± 5mg/dl), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p<0,005). El resto de valores del perfil lipídico no mostraron diferencias entre los distintos grupos (Tabla 7.7).

En cuanto al análisis a los 9 meses, apreciamos unos resultados similares a los presentes a los 4 meses, con una disminución estadísticamente significativas ( $p < 0,005$ ) de los valores de HDL del grupo obeso ( $36 \pm 3 \text{ mg/dl}$ ) y del mixto ( $32 \pm 4 \text{ mg/dl}$ ), con respecto al grupo control ( $44 \pm 1 \text{ mg/dl}$ ). Los valores de LDL y TG no presentaron diferencias entre los distintos grupos (Tabla 7.8).

- **Transaminasas**

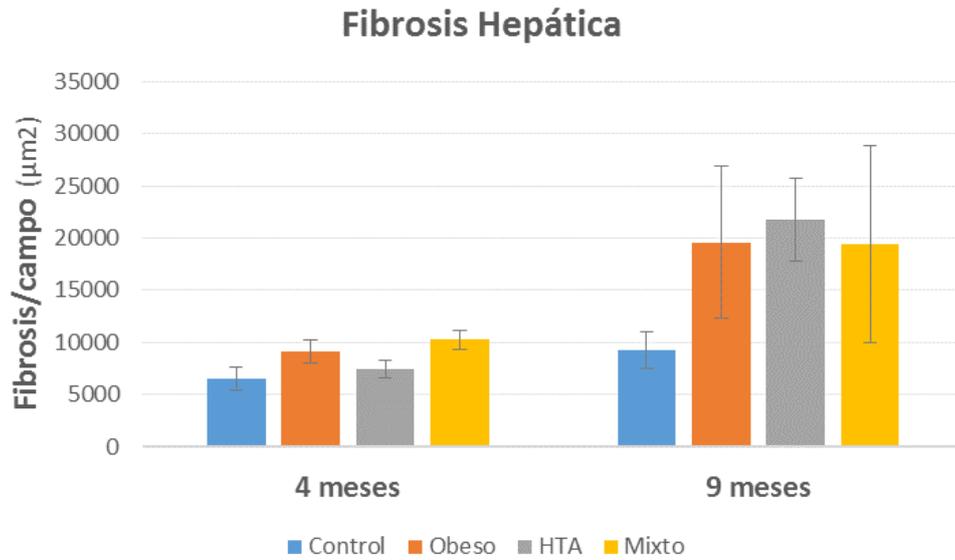
Los valores de ALT obtenidos a los 4 y 9 meses (tablas 7.7 y 7.8) no reflejaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

### 7.2.1.2 Características histopatológicas hepáticas

- **Fibrosis hepática**

La media de superficie de fibrosis hepática por campo en los animales a los 4 meses (Figuras 7.9 y 7.11) varió en función del grupo estudiado. En los animales control obtuvimos una media de  $6593 \pm 1108 \mu\text{m}^2$  (Figura 7.11; 1-2), y apreciamos un discreto aumento estadísticamente significativo con respecto al control en el grupo obeso ( $9143 \pm 1092 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,047$ )) (Figura 7.11; 4-5), en el grupo HTA ( $7455 \pm 819 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,001$ )) (Figura 7.11; 7-8) y en el grupo mixto ( $10262 \pm 94 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,012$ ))(Figura 7.11; 10-11).

Estas diferencias se acentúan en los animales de 9 meses (Figura 7.9 y 7.12), en donde observamos un incremento significativo de la fibrosis portal en los distintos grupos en comparación con el grupo control ( $9266 \pm 1779 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 7.12; 1-2), tanto en los animales obesos ( $19577 \pm 7283 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,017$ )) (Figura 7.12; 4-5); HTA ( $21776 \pm 3936,2 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,001$ )) (Figura 7.12; 7-8), ; y en los animales con tratamiento mixto ( $19446 \pm 9438 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,048$ )) (Figura 7.12; 10-11).



**Figura 7.9.** Superficie media de fibrosis portal por campo en los diferentes grupos de animales de 4 y 9 meses. Las líneas indican la DE.

Con respecto a la clasificación de la fibrosis hepática en función de la escala METAVIR, los animales de los grupos control y de HTA a los 4 meses no mostraron fibrosis de distribución portal o periportal significativa (F0), las ratas obesas no presentaron fibrosis o mostraron una discreta fibrosis portal y periportal (F0 y F1), y todos los animales del grupo mixto presentaron un grado leve de fibrosis portal y periportal, sin formar septos (F1) (Tabla 7.9).

**Tabla 7.9.** Escala METAVIR en el grupo animal de 4 meses.

METAVIR 4 MESES	CONTROL (n=3)	OBESO (n=3)	HTA (n=3)	MIXTO (n=3)
F0 (no fibrosis)	3	1	3	-
F1 (fibrosis portal y periportal sin septos)	-	2	-	3
F2 (fibrosis portal y periportal con escasos septos)	-	-	-	-
F3 (fibrosis portal y periportal en puente)	-	-	-	-
F4 (cirrosis)	-	-	-	-

Sin embargo, en los 9 meses se observó un discreto aumento de la graduación de fibrosis en todos los grupos con respecto a los animales de 4 meses. De esta forma, mientras que los animales del grupo control mostraron una ausencia de fibrosis o un grado leve de fibrosis portal

y periportal sin formación de septos (F0 y F1), todos los animales del grupo HTA presentaron un grado leve de fibrosis portal y periportal sin septos (F1), y los animales obesos y mixtos presentaron grados de fibrosis leve de distribución portal y periportal, algunas de ellas desarrollando escasos septos (F1 y F2) (Tabla 7.10).

**Tabla 7.10.** Escala METAVIR en el grupo animal de 9 meses.

METAVIR 9 MESES	CONTROL (n=5)	OBESO (n=4)	HTA (n=3)	MIXTO (n=3)
F0 (no fibrosis)	2	-	-	-
F1 (fibrosis portal y periportal sin septos)	3	3	3	2
F2 (fibrosis portal y periportal con escasos septos)	-	1	-	1
F3 (fibrosis portal y periportal en puente)	-	-	-	-
F4 (cirrosis)	-	-	-	-

- **Esteatosis hepática**

Los hallazgos observados en el análisis de la esteatosis hepática en los animales de 4 meses demostraron que las ratas de los subgrupos control y HTA no presentaron sobrecarga lipídica significativa (E0), mientras que los animales de los subgrupos obeso y mixto mostraron un grado de sobrecarga lipídica leve en la escala de Brunt (E1) (Tabla 7.11).

**Tabla 7.11.** Escala de Brunt en grupo animal de 4 meses.

GRADO DE ESTEATOSIS 4 MESES	CONTROL (n=3)	OBESO (n=3)	HTA (n=3)	MIXTO (n=3)
E0 (no sobrecarga grasa)	3	-	3	-
E1 (sobrecarga grasa leve)	-	3	-	3
E2 (sobrecarga grasa moderada)	-	-	-	-
E3 (sobrecarga grasa severa)	-	-	-	-

En cuanto a los animales de 9 meses, identificamos un discreto aumento de la esteatosis con respecto a los de 4 meses. Los animales del grupo control no presentaron esteatosis significativa (E0) a excepción de uno de los individuos que mostró sobrecarga leve (E1). El grupo HTA no presentó esteatosis significativa (E0), los animales del grupo obeso desarrollaron diversos

grados de esteatosis (E0, E1 y E2), y todos los animales del grupo mixto mostraron un grado leve de sobrecarga lipídica (E1) (Tabla 7.12).

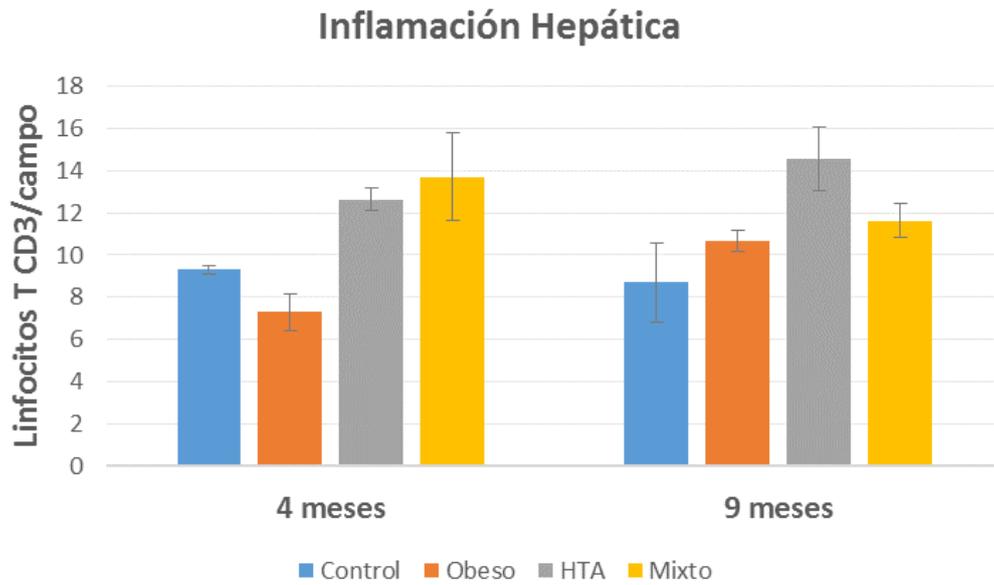
**Tabla 7.12.** Escala de Brunt en grupo animal de 9 meses.

GRADO DE ESTEATOSIS 9 MESES	CONTROL (n=5)	OBESO (n=4)	HTA (n=3)	MIXTO (n=3)
E0 (no sobrecarga grasa)	4	1	3	-
E1 (sobrecarga grasa leve)	1	1	-	3
E2 (sobrecarga grasa moderada)	-	2	-	-
E3 (sobrecarga grasa severa)	-	-	-	-

- **Inflamación hepática (Infiltrado de linfocitos T<sup>CD3+</sup>)**

En el grupo animal de 4 meses (Figuras 7.10 y 7.11), identificamos un escaso infiltrado de células T-CD3<sup>+</sup> por campo en los distintos grupos, apreciando en los animales control una media de  $9,3 \pm 0,2$  células/campo (Figura 7.11; 3), un descenso estadísticamente significativo en el grupo obeso ( $7,3 \pm 0,9$  células/campo (Figura 7.11; 6;  $p=0,018$ ), y un aumento estadísticamente significativo con respecto al grupo control en los animales de los grupos HTA ( $12,6 \pm 0,6$  células/campo (Figura 7.11; 9;  $p=0,004$ ) y mixto ( $13,7 \pm 2,1$  células/campo (Figura 7.11; 12;  $p=0,022$ ).

En cuanto a los animales de 9 meses de tratamiento (Figuras 7.10 y 7.12), apreciamos unos valores similares en cuanto al infiltrado de esta subpoblación linfocitaria con respecto a los animales de 4 meses. En el grupo control detectamos una media de  $8,7 \pm 1,9$  células/campo (Figura 7.12; 3), observando un aumento estadísticamente significativo en el grupo HTA ( $14,6 \pm 1,5$  células/campo;  $p=0,004$ ) (Figura 7.12; 9) y en el grupo mixto ( $11,6 \pm 0,8$  células/campo;  $p=0,023$ ) (Figura 7.12; 12), sin apreciar diferencias con el grupo obeso ( $10,7 \pm 0,5$  células/campo;  $p>0,05$ ) (Figura 7.12; 6).



**Figura 7.10.** Valores medios/campo de infiltrado de linfocitos T CD3 en el parénquima hepático de los diferentes grupos. Las líneas indican la DE.

Atendiendo a la escala de valoración del infiltrado inflamatorio en función de su localización en el lobulillo hepático, en los animales de 4 meses se identificó una ausencia de inflamación en los grupos control, obeso y HTA (G0), y ausencia de inflamación o grados leves, con infiltrados de distribución portal o centrolobulillar, en el grupo mixto (G0 y G1) (Tabla 7.13).

**Tabla 7.13.** Escala de inflamación en función de la distribución lobulillar en el grupo animal de 4 meses.

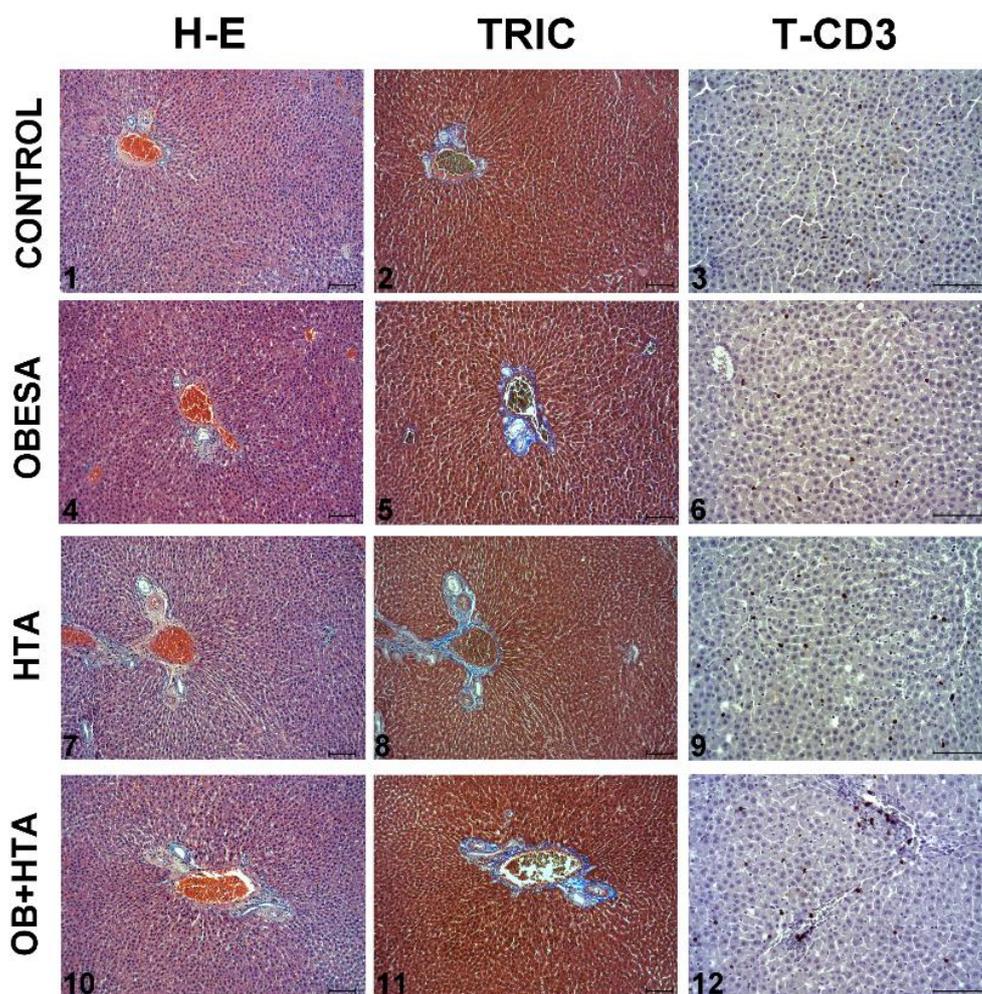
GRADO DE INFLAMACIÓN 4 MESES	CONTROL (n=3)	OBESO (n=3)	HTA (n=3)	MIXTO (n=3)
G0 (no células)	3	3	3	1
G1 (área portal o centrolobulillar)	-	-	-	2
G2 (área portal, centrolobulillar, sinusoides o interlobulillar)	-	-	-	-
G3 (degeneración y necrosis hepatocitaria)	-	-	-	-

Sin embargo, en los animales de 9 meses, se observó un leve incremento del grado de inflamación en los grupos control, obeso, y HTA (Tabla 7.14). El grupo mixto mantuvo individuos sin inflamación significativa o con grados leves (G0 y G1).

**Tabla 7.14.** Escala de inflamación en función de la distribución lobulillar en el grupo animal de 9 meses.

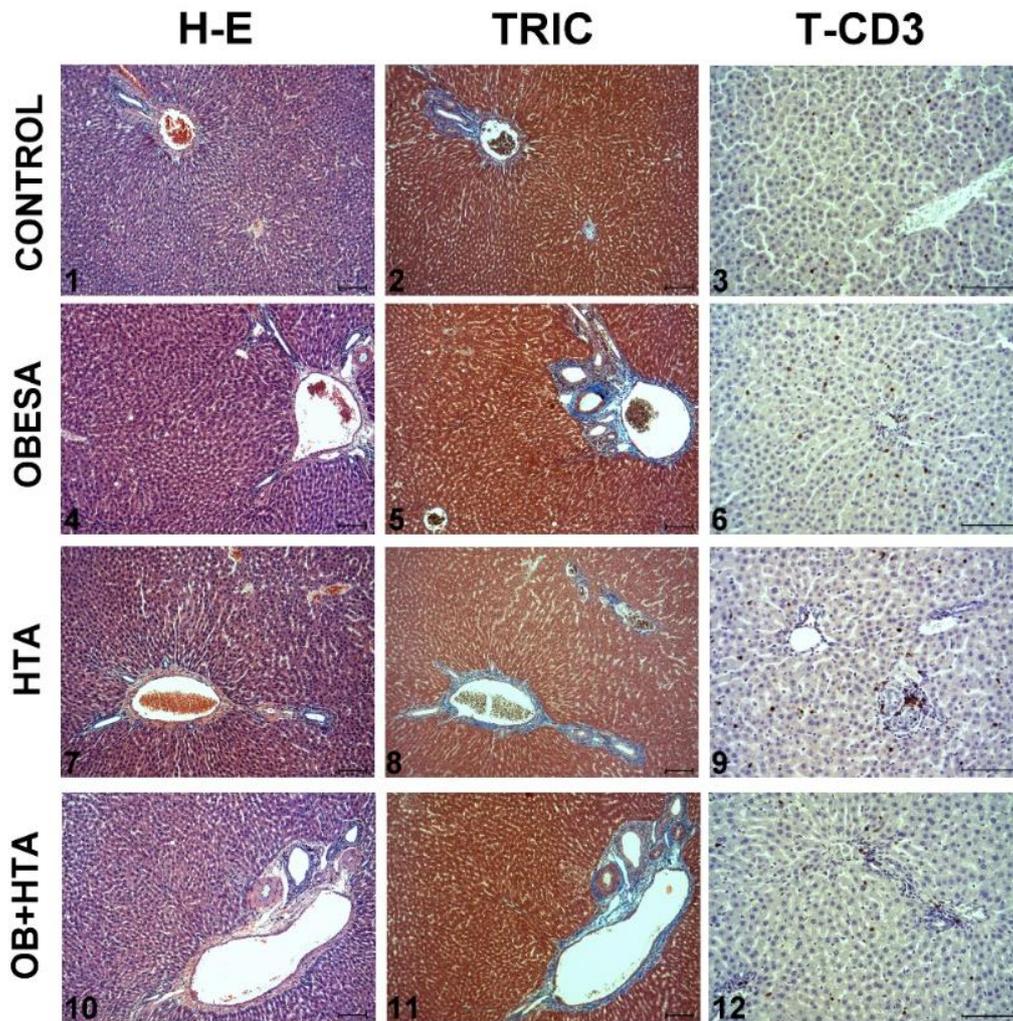
GRADO DE INFLAMACIÓN 9 MESES	CONTROL (n=5)	OBESO (n=4)	HTA (n=3)	MIXTO (n=3)
G0 (no células)	2	2	-	1
G1 (área portal o centrolobulillar)	3	2	3	2
G2 (área portal, centrolobulillar, sinusoides o interlobulillar)	-	-	-	-
G3 (degeneración y necrosis hepatocitaria)	-	-	-	-

#### 4 MESES HIGADO



**Figura 7.11.** Imágenes representativas del examen histopatológico hepático en animales con 4 meses de tratamiento (1, 4, 7 y 9), superficie de fibrosis (2, 8, 5 y 11) e infiltrado de linfocitos T CD3 (3, 6, 9 y 12) en grupo control (1-3), grupo obeso (4-6), grupo HTA (7-9) y grupo mixto (10-12). Técnica de hematoxilina-eosina (1 y 4), tricrómico de Masson (2 y 5) y ABC anti-linfocitos T CD3 (3 y 6). Escala: 100 micrómetros.

9 MESES HIGADO

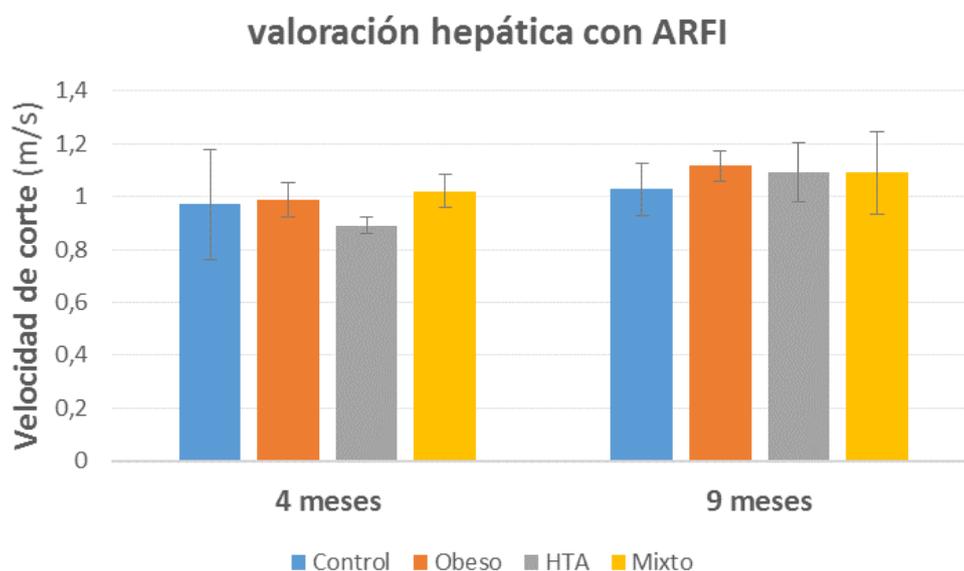


**Figura 7.12.** Imágenes representativas del examen histopatológico hepático en animales con 9 meses de tratamiento (1, 4, 7 y 9), superficie de fibrosis (2, 8, 5 y 11) e infiltrado de linfocitos T CD3 (3, 6, 9 y 12) en grupo control (1-3), grupo obeso (4-6), grupo HTA (7-9) y grupo mixto (10-12). Técnica de hematoxilina-eosina (1 y 4), tricrómico de Masson (2 y 5) y ABC anti-linfocitos T CD3 (3 y 6). Escala: 100 micrómetros.

### 7.2.1.3 Evaluación con técnica ARFI

Los estudios ecográficos convencionales y las medidas mediante técnica ARFI fueron realizados de forma satisfactoria en todos los animales incluidos en el experimento.

En los animales de 4 meses no se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos analizados (Figura 7.13). Así, el grupo control mostró una media de Vc de  $1,0 \pm 0,2$  m/s, en el grupo obeso de  $1,0 \pm 0,1$  m/s, en el grupo HTA de  $0,9 \pm 0,0$  m/s y en el grupo mixto de  $1,0 \pm 0,6$  m/s. De forma análoga, el análisis de los valores de Vc de los animales de 9 meses tampoco reflejaron diferencias estadísticamente significativas, con unos valores en el grupo control de  $1,0 \pm 0,1$  m/s, el obeso de  $1,1 \pm 0,1$  m/s, el HTA de  $1,1 \pm 0,1$  m/s y el mixto de  $1,1 \pm 0,2$  m/s.



**Figura 7.13.** Valores medios de Vc medidos por ARFI en los diferentes grupos a 4 y 9 meses post tratamiento.

El análisis de correlación de Pearson de las Vc con ARFI y los parámetros analíticos (HDL, LDL, triglicéridos y ALT), no resultaron significativos en ninguno de los dos grupos animales.

En cuanto a la correlación de ARFI con las variables histológicas (Tabla 7.15), demostró, tanto para el grupo de animales de 4 meses como para el de 9 meses, una fuerte correlación positiva entre la velocidad media de la onda de corte (Vc) obtenida mediante ARFI y la superficie de

fibrosis por campo, siendo estos resultados estadísticamente significativos ( $r=0,607$ ;  $p=0,036$  en el grupo de 4 meses y  $r=0,572$ ;  $p<0,026$  el de 9 meses).

Por otro lado, no se identificó correlación entre los valores de Vc de ARFI con el grado de esteatosis ni con el número de linfocitos CD3 por campo en parénquima hepático, ni en el grupo de animales de 4 meses ni en el de 9 meses (Tabla 7.15).

**Tabla 7.15.** Correlaciones de variables cuantitativas con ARFI en hígado en animales de 4 meses ( $n=12$ ) y de 9 meses ( $n=15$ ).

ARFI HEPÁTICO		FIBROSIS POR CAMPO	Nº LINFOCITOS CD3	ESTEATOSIS
4 meses	Correlación Pearson	,607	-,161	,351
	Sig. (bilateral)	,036	,616	,263
9 meses	Correlación Pearson	,572	,256	,083
	Sig. (bilateral)	,026	,357	,769

Atendiendo a la relación entre las Vc obtenidas con ARFI en parénquima hepático y los grados de la escala METAVIR, no se consiguen identificar diferencias estadísticamente significativas entre aquellos animales que no muestran fibrosis significativa (F0) y aquellas que muestran algún grado de fibrosis ( $F\geq 1$ ) en el grupo animal de 4 meses. No obstante, en el grupo animal de 9 meses, que muestran un mayor grado de fibrosis, sí que conseguimos establecer diferencias estadísticamente significativas entre aquellos animales que no muestran fibrosis en la escala METAVIR (F0) y las que presentan algún grado de fibrosis ( $F\geq 1$ ) ( $p<0,027$ ).

Por otra parte, relacionando las Vc con ARFI en hígado con la escala de Brunt et al. para la esteatosis hepática y con la escala de Hao et al. para inflamación hepática, no conseguimos diferencias estadísticamente significativas entre los animales con ausencia de esteatosis o de inflamación (E0 y G0) con respecto a los animales con algún grado de esteatosis o inflamación según dichas escalas ( $E\geq 1$  y  $G\geq 1$ ), ni en el grupo de 4 meses ni en el de 9 meses.

## 7.2.2 Riñón

### 7.2.2.1 Características clínicas

- **Tasa de filtración glomerular**

La determinación de la TFG en los animales con 4 meses de tratamiento (Tabla 7.16) mostró unos valores disminuidos en el grupo HTA con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) y el grupo mixto con respecto al resto de grupos ( $p < 0,05$ ). En cuanto a las ratas de 9 meses de tratamiento, identificamos unos resultados similares a los animales de 4 meses, con una disminución de la TFG en el grupo HTA con respecto al control ( $p < 0,05$ ) y en el grupo mixto con respecto a todos los demás ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 7.16.** Tasa de filtración glomerular en animales de 4 y 9 meses.

VARIABLE	EDAD	GRUPO CONTROL	GRUPO OBESO	GRUPO HTA	GRUPO MIXTO
TFG (mL/min/100gr)	4 meses	1,08 ± 0,08	1,22 ± 0,09	0,80 ± 0,04*	0,53 ± 0,07**
	9 meses	1,01 ± 0,04	0,90 ± 0,07	0,70 ± 0,07*	0,43 ± 0,04**

\* Diferencias significativas con respecto a grupo control ( $p < 0,05$ )

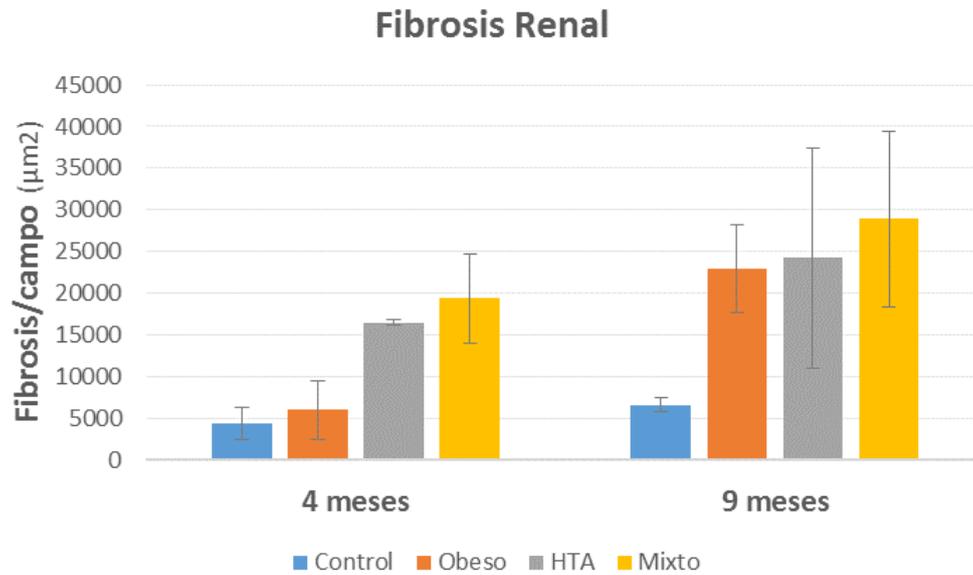
\*\*Diferencias significativas con respecto a grupos obeso y HTA ( $p < 0,05$ )

### 7.2.2.2 Características histopatológicas renales

- **Fibrosis renal**

Tras estudiar el grupo de animales de 4 meses (Figuras 7.14 y 7.16), se identificó un importante aumento de la fibrosis renal en el grupo HTA ( $16444 \pm 324 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 7.16; 7-8) y en el mixto ( $19341 \pm 5386 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 7.16; 10-11) con respecto al grupo control ( $4342 \pm 1879 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 7.16; 1-2) con una significación de  $p < 0,02$  y  $p < 0,01$  respectivamente, sin identificar diferencias estadísticamente significativas entre grupo control y obeso ( $6021 \pm 3519 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 7.16; 4-5).

A los 9 meses (Figuras 7.14 y 7.17), se apreció un severo aumento estadísticamente significativo de la fibrosis renal en el grupo obeso ( $22966 \pm 5293 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 7.17; 4-5); en el subgrupo HTA ( $24215 \pm 13177 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,020$ ) (Figura 7.17; 7-8) y en el grupo mixto ( $28893 \pm 10516 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,002$ ) (Figura 7.17; 10-11) con respecto al grupo control ( $6606 \pm 776 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 7.17; 1-2).

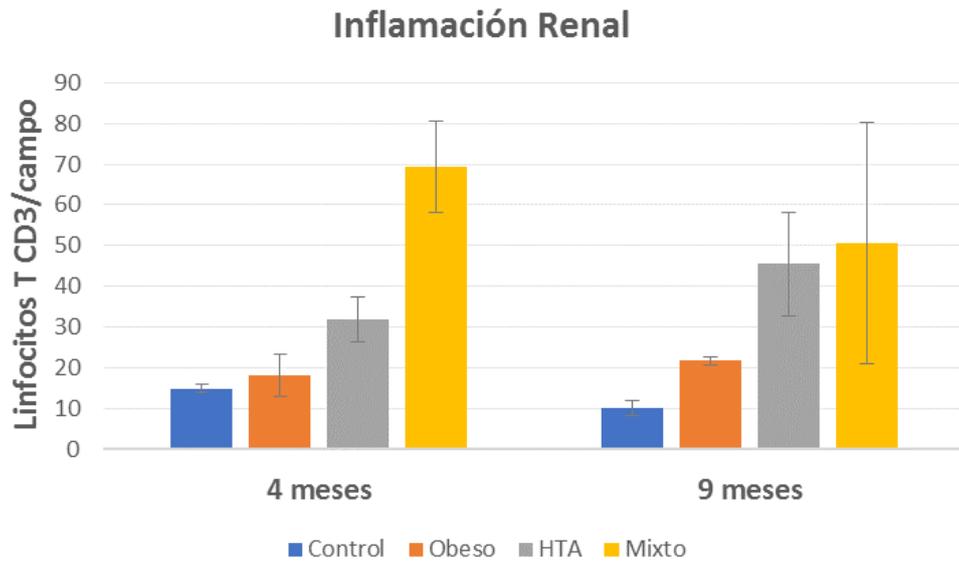


**Figura 7.14.** Superficie media de fibrosis renal por campo en los diferentes grupos de animales de 4 y 9 meses. Las líneas indican la DE.

- **Inflamación renal (Infiltrado de linfocitos T CD3<sup>+</sup>)**

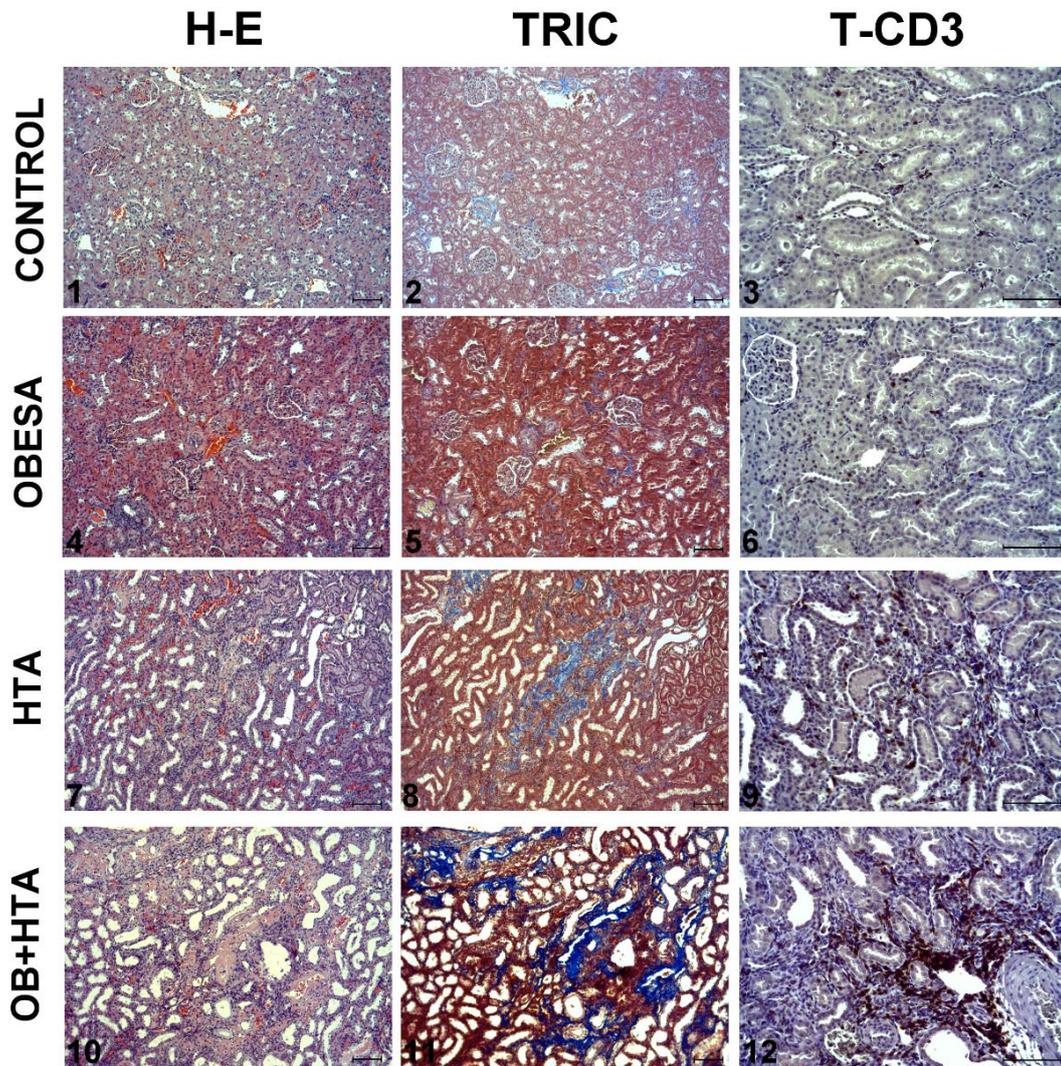
El análisis de los animales de 4 meses (Figuras 7.15 y 7.16) mostró una media de linfocitos T-CD3<sup>+</sup> por campo en el grupo control de  $14,9 \pm 1,0$  células/campo (Figura 7.16; 3), apreciando un moderado aumento estadísticamente significativo en el grupo HTA, con una media de  $31,9 \pm 5,7$  células/campo ( $p < 0,001$ ) (Figura 7.16; 9) y en el grupo mixto, con  $69,3 \pm 11,2$  células/campo ( $p < 0,001$ ) (Figura 7.16; 12). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el obeso, con una media de  $18,2 \pm 5,1$  células/campo ( $p = 0,325$ ) (Figura 7.16; 6).

En los animales de 9 meses (Figuras 7.15 y 7.17) identificamos una media linfocitos T-CD3<sup>+</sup> por campo en el grupo control de  $10,1 + 1,7$  células/campo (Figura 7.17; 3), con un aumento estadísticamente significativo del número de células de esta subpoblación linfocitaria en el resto de grupos con respecto al control, observando en el grupo obeso una media de  $21,8 + 1,0$  células/campo ( $p < 0,000$ ) (Figura 7.17; 6); en el grupo HTA, de  $45,5 + 12,6$  células/campo ( $p < 0,001$ ) (Figura 7.17; 9) y en el grupo mixto, de  $50,6 + 29,6$  células/campo ( $p < 0,018$ ) (Figura 7.17; 12).



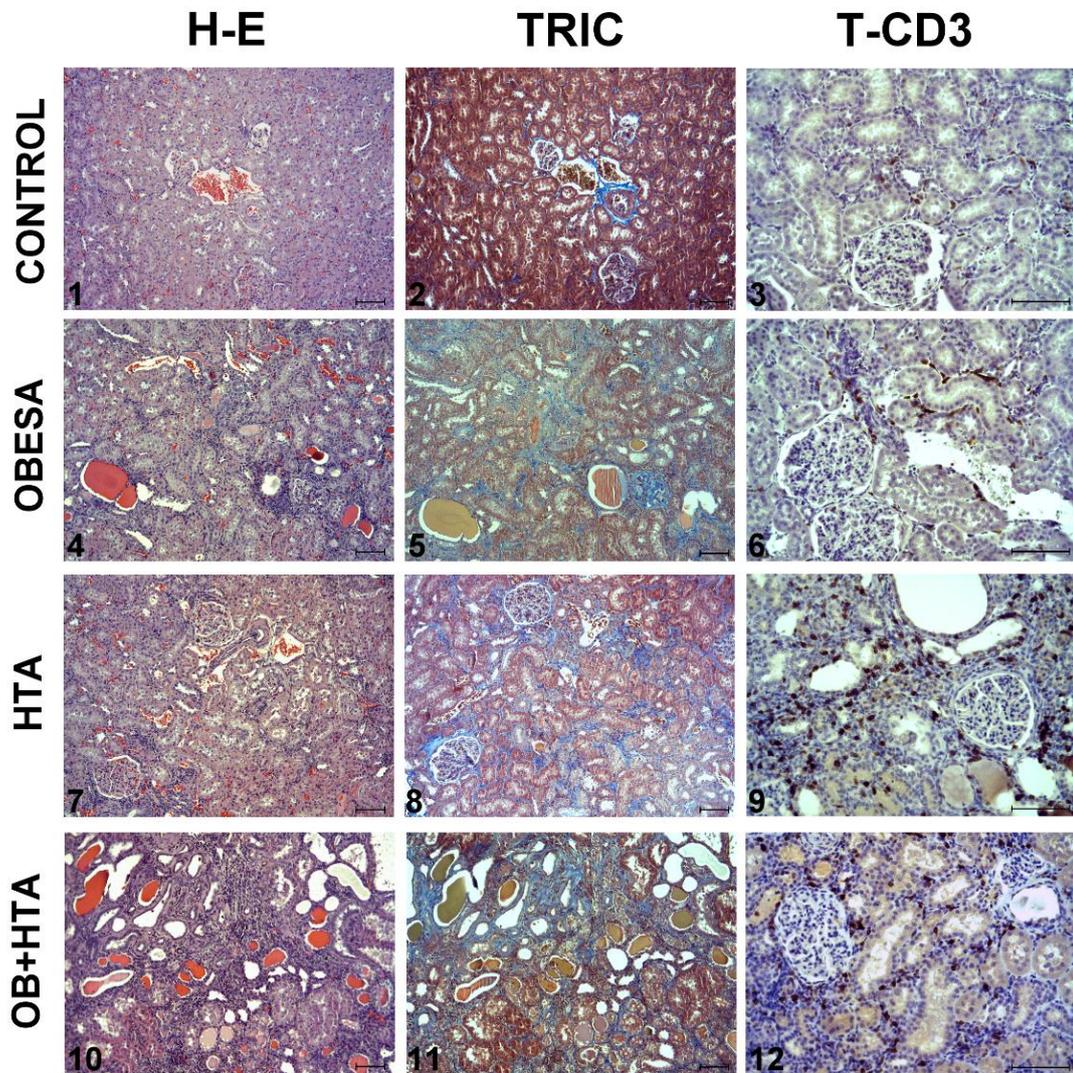
**Figura 7.15.** Valores medios/campo de infiltrado de linfocitos T CD3 en el parénquima renal de los diferentes grupos. Las líneas indican la DE.

4 MESES RIÑÓN



**Figura 7.16.** Imágenes representativas del grado de fibrosis renal en animales de 4 meses de tratamiento (1-2, 4-5, 7-8, 10-11) asteriscos) e infiltrado de linfocitos T-CD3<sup>+</sup> (3, 6, 9, 12, cabezas de flecha) en riñones del grupo control (1-3), obeso (4-6), HTA (7-9) y mixto (10-12). Técnica de hematoxilina eosina (1, 4, 7 y 10), tricrómico de Masson (2, 5, 8, 11) y ABC anti-Linfocitos T-CD3 (3, 6, 9, 12). Escala: 100 micrómetros.

9 MESES RIÑÓN



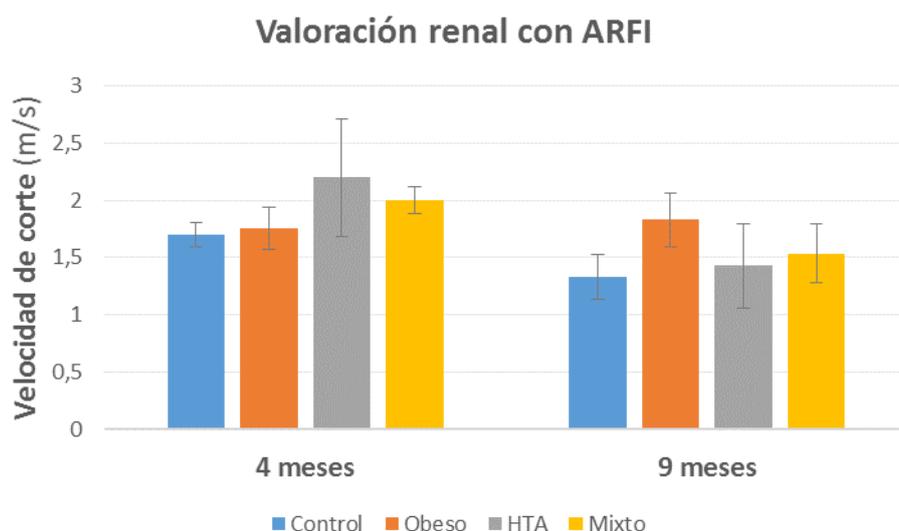
**Figura 7.17.** Imágenes representativas del grado de fibrosis renal en animales de 9 meses de tratamiento (1-2, 4-5, 7-8, 10-11) asteriscos) e infiltrado de linfocitos T-CD3<sup>+</sup> (3, 6, 9, 12, cabezas de flecha) en riñones del grupo control (1-3), obeso (4-6), HTA (7-9) y mixto (10-12). Técnica de hematoxilina eosina (1, 4, 7 y 10), tricrómico de Masson (2, 5, 8, 11) y ABC anti-Linfocitos T-CD3 (3, 6, 9, 12). Escala: 100 micrómetros.

### 7.2.2.3 Evaluación con técnica ARFI

Al igual que en el hígado, los estudios ecográficos convencionales y las medidas mediante técnica ARFI en parénquima renal resultaron exitosas en todos los animales.

En el grupo de 4 meses (Figura 7.18) observamos que la media de las Vc adquiridas mediante ARFI en parénquima renal en el grupo control fue de  $1,7 \pm 0,1$  m/s, en el grupo obeso de  $1,8 \pm 0,2$  m/s, en el grupo HTA de  $2,2 \pm 0,5$  m/s y en el grupo mixto de  $2,0 \pm 0,1$  m/s. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En cuando a las mediciones realizadas en el grupo de 9 meses (Figura 7.18), apreciamos una media de Vc en el grupo control de  $1,3 \pm 0,2$  m/s, con un discreto aumento estadísticamente significativo en el grupo obeso con respecto al control, con una media de  $1,8 \pm 0,2$  m/s ( $p < 0,011$ ), pero sin identificar diferencias con el grupo HTA, con una media de  $1,4 \pm 0,4$  m/s, ni con el grupo mixto, de  $1,5 \pm 0,3$  m/s.



**Figura 7.18.** Valores medios de Vc medidos por ARFI en los diferentes grupos a 4 y 9 meses post tratamiento. Las líneas indican la DE.

En cuanto al análisis de correlación de Pearson de las variables cuantitativas, no identificamos una correlación significativa entre las Vc de ARFI renales con los valores de TFG, ni en el grupo de 4 meses ni en el de 9 meses.

Estableciendo una correlación con las variables histológicas (Tabla 7.17) se detectaron, para el grupo animal de 4 meses, una correlación positiva pero no estadísticamente significativa entre la Vc obtenida mediante ARFI y la superficie de fibrosis por campo ( $r=0,504$ ;  $p=0,094$ ). Por otra parte, estudiando el grupo animal de 9 meses, detectamos una fuerte correlación positiva entre las Vc y la superficie de fibrosis por campo ( $r=0,658$ ;  $p<0,008$ ).

Si analizamos de la misma forma la correlación entre las Vc de ARFI en parénquima renal y el número de linfocitos CD3 por campo, obtenemos una correlación positiva pero no significativa en el grupo animal de 4 meses ( $r=0,403$ ;  $p=0,194$ ), sin apreciar correlación significativa en el grupo de 9 meses ( $r=0,104$ ;  $p=0,711$ ) (Tabla 7.17).

**Tabla 7.17.** Correlaciones de variables cuantitativas con ARFI en riñón en animales de 4 meses ( $n=12$ ) y 9 meses ( $n=15$ ).

	ARFI RENAL	FIBROSIS POR CAMPO	Nº LINFOCITOS CD3
<b>4 meses</b>	Correlación Pearson	,504	,403
	Sig. (bilateral)	,094	,194
<b>9 meses</b>	Correlación Pearson	,658	,104
	Sig. (bilateral)	,008	,711

# CAPÍTULO VIII

## DISCUSIÓN

### 8.1 Estudio Wistar. Comparación entre modelo *in vivo* y *ex vivo*.

La técnica sonoelastográfica ARFI representa un método de diagnóstico no invasivo emergente para la valoración de la hepatopatía y la nefropatía crónica. Además de evaluar la elasticidad parenquimatosa, nos permite realizar un estudio ecográfico convencional en tiempo real. Debido a las ventajas que presenta, el uso de sonoelastografía ARFI se ha erigido como una prometedora técnica diagnóstica, especialmente para la determinación de la fibrosis hepática en pacientes que sufren hepatopatía crónica, como los pacientes que se encuentran dentro del espectro de la NAFLD. También se han realizado estudios que indican su potencial utilidad en el diagnóstico de fibrosis renal en la ERC, aunque existe un mayor grado de controversia en este aspecto. Se han descrito numerosos factores que pueden alterar las mediciones obtenidas con técnica ARFI y disminuir su precisión, motivo por el cual resulta interesante explorar estas posibles fuentes de artefacto.

En la presente tesis doctoral realizamos un estudio comparativo entre la valoración del parénquima hepático y renal mediante técnica sonoelastográfica ARFI en experimentos *in vivo*, con el animal fijado en decúbito supino y bajo fuerte sedación para evitar en la medida de lo posible los artefactos cardiacos y respiratorios, y en experimentos *ex vivo*, tras el sacrificio del animal y con la inclusión de los explantes hepático y renal en diferentes fantomas ecográficos para simular unas condiciones de medida ideales en las que los valores de  $V_c$  obtenidos dependan, predominantemente, de la elasticidad tisular. Realizando el estudio de las muestras *ex vivo*, somos capaces de eliminar o limitar gran parte de los factores que pueden interferir en la adquisición de las  $V_c$ .

- **Potenciales fuentes de artefacto de las velocidades de corte obtenidas mediante ARFI**

Se han descrito múltiples factores capaces de artefactar las Vc adquiridas con ARFI. De acuerdo con publicaciones de Bruno et al. (2016), al llevar a cabo las exploraciones mediante técnica ARFI, el radiólogo ha de tener en cuenta todos estos factores físicos, geométricos, anatómicos y fisiológicos que pueden alterar las mediciones, dando lugar a errores de interpretación diagnósticos que podrían conllevar posibles tratamientos erróneos.

Uno de los más relevantes es la profundidad a la que se establecen las mediciones. Este factor influye, sobre todo, en el estudio de órganos voluminosos como el hígado. Estudios independientes llevados a cabo por D'Onofrio, Gallotti y Mucelli (2010) y por Kamimura et al. (2011) demuestran diferencias significativas en función de la profundidad a la que se establece la RDI en parénquima hepático, apreciando unas Vc menores cuanto más profundo se sitúe la RDI en el parénquima a explorar. Además, en el estudio realizado por Chang, Kim, Kim & Lee (2013) se describe un importante aumento de la variabilidad de las mediciones en función de la profundidad de la RDI, estableciendo una profundidad ideal para situar la RDI de 2-3cm por debajo de la cápsula hepática utilizando sondas de alta frecuencia, y de 4-5cm al usar sondas de baja frecuencia, con el objetivo de minimizar la dispersión en los resultados. En nuestro estudio, dado el pequeño tamaño de los órganos, seleccionamos una RDI que incluya únicamente parénquima hepático, evitando cápsula hepática y grandes estructuras intrahepáticas. En el caso del análisis renal, las exploraciones se realizaron en áreas que incluyeran únicamente parénquima renal independientemente de la profundidad, debido al pequeño tamaño de los órganos.

Otro de los factores descritos en la literatura es la diferencia entre frecuencias de ultrasonido utilizadas para la determinación de las Vc, siendo éste un aspecto controvertido. Algunos estudios aseguran que existen diferencias en cuanto al tipo de sonda utilizada, como en el estudio llevado a cabo por Kamimura et al. (2011), mientras que otros documentos defienden que este fenómeno no afecta significativamente a las mediciones (Dillman et al., 2014). En nuestro experimento, siempre utilizamos una sonda 9L4, con una frecuencia de 4.00MHz para todos los animales, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

En cuanto a la influencia de la compresión extrínseca del tejido con el transductor, existen varios estudios como el de Syversveen et al. (2012) que muestran cambios significativos en las mediciones en función del grado de compresión que se produce. En el modelo *in vivo*, realizamos una mínima compresión sobre la pared abdominal del animal, tanto en el rastreo hepático como renal, para conseguir una buena ventana exploratoria. En cuanto al estudio *ex vivo*, minimizamos este factor debido a que la buena transmisión del haz de ultrasonidos a través del suero o gel ecográfico utilizado en los fantasmas elaborados para los estudios hepático y renal nos permite evitar compresiones excesivas para adquirir los datos.

La disposición de las RDI de forma paralela a la cápsula, tanto hepática como renal, también ha demostrado tener relevancia en la determinación de los valores ARFI. Autores como Chang et al. (2013), hacen hincapié en este factor como una forma de evitar la variabilidad entre mediciones y debido a que, de esta forma, los haces de ultrasonido interactúan con un mayor número de interfases y recogen una mayor cantidad de información. En los estudios *ex vivo*, la posibilidad de manipular la posición de los órganos, sobre todo en el caso del riñón debido a su menor tamaño, hicieron más fácil la correcta orientación de las RDI.

También se ha descrito la influencia que los factores fisiológicos, como el latido cardíaco, los movimientos respiratorios o el ayuno, presentan en la precisión de la toma de  $V_c$  con ARFI. No obstante, existe cierta controversia en torno al papel de cada uno. En el estudio publicado por Kamimuma et al. (2011), en el que se analiza el parénquima hepático mediante ARFI, se postula que la adquisición de mediciones durante inspiraciones profundas o tras la ingesta de alimentos no artefactan las mediciones, mientras que otras publicaciones como la de Mederacke et al. (2009) describen diferencias significativas entre el estado de ayuno y el de post-ingesta. En cuanto al parénquima renal, un estudio realizado por Gennisson et al. (2012) en riñones de cerdo *in vivo* mediante una variante de la técnica ARFI que también detecta velocidades de las ondas transversales o de cizallamiento, demostró diferencias significativas en función del grado de presión vascular y urinaria. En el modelo *ex vivo* que hemos desarrollado, limitamos todas las potenciales fuentes de artefacto fisiológico que pueden afectar a la rigidez tanto hepática como renal, analizando únicamente la elasticidad parenquimatosa.

La anisotropía es otro de los factores más documentados como fuente de posible artefacto ante mediciones con técnica ARFI. Juega un papel muy importante en el estudio del parénquima renal

ya que, en el hígado, al ser un órgano más voluminoso y homogéneo, no muestra tantas limitaciones para su correcta exploración. El estudio llevado a cabo por Gennisson et al. (2012) en riñones de cerdo demostró importantes diferencias de Vc en función de si la medida se llevaba a cabo en corteza o medula. Mientras que la corteza presenta una estructura más o menos homogénea, la médula, a consecuencia de las asas de Henle y los *vasa recta*, muestra una arquitectura lineal, hecho que puede interferir en las mediciones y aumentar en gran medida su variabilidad. Por ello, resulta interesante realizar las mediciones únicamente en la corteza renal. En nuestro estudio, este apartado resultó difícil debido al pequeño tamaño de los riñones y a la superficie fija de la RDI. No obstante, la obtención de RDI de calidad resultó más fácil debido en los estudios *ex vivo* que en los *in vivo* debido a la posibilidad de manipular la orientación del explante renal además de la del transductor.

Después de realizar todas las exploraciones en los dos modelos de medición, observamos que la media de Vc obtenidas en los estudios *in vivo* ha resultado significativamente mayor a las adquiridas en los estudios *ex vivo*, tanto en parénquima hepático como en renal. La inclusión de los explantes hepático y renal en un medio homogéneo, isotrópico, sin artefactos a causa de procesos fisiológicos y con la posibilidad de orientar correctamente los órganos para establecer las RDI de una forma óptima parece disminuir las Vc en la valoración mediante ARFI. La minimización de múltiples factores que pueden alterar las mediciones daría lugar a medidas más precisas y cercanas a la elasticidad parenquimatosa real.

Estos hallazgos sugieren que, además de los artefactos fisiológicos, como el latido cardiaco y la respiración, y de aquellos relacionados con la correcta realización de las mediciones, la propia cavidad abdominal y las estructuras adyacentes a los órganos podrían resultar factores que sobreestimen las mediciones. Este hecho podría ser interesante en la valoración de los grados de fibrosis leve e intermedia, donde la técnica ARFI muestra considerables limitaciones debido a la existencia de gran solapamiento de resultados. Si se pudiese aplicar un factor de corrección que asemejase los valores obtenidos en clínica con los valores obtenidos en estudios *ex vivo*, en condiciones ideales y eliminando la mayor cantidad de fuentes de artefacto posibles, podríamos ajustar los valores de velocidad de corte para intentar diferenciar grados de fibrosis con importante solapamiento de información. Son, por tanto, necesarios más estudios para poder resolver esta cuestión en detalle.

- **Correlación entre el estudio analítico hepático y renal con medidas ARFI**

En nuestro modelo animal con rata Wistar, no encontramos diferencias significativas en los resultados del perfil lipídico ni en los niveles de ALT entre el grupo control y el grupo obeso, pero si somos capaces de obtener diferencias entre animales controles y animales obesos mediante ARFI, identificando una importante correlación con la histología. Este hecho es especialmente relevante, ya que, mediante técnica ARFI podríamos identificar de forma precoz alteraciones histológicas, sobre todo en estadios poco avanzados de NAFLD donde los parámetros analíticos resultan normales. Diversos estudios, como el de Guzmán et al. (2012), han obtenido resultados similares en pacientes que, sin presentar alteraciones analíticas significativas, sí que mostraban alteraciones histopatológicas a nivel hepático. De esta forma, no podemos excluir el diagnóstico de NAFLD y sus alteraciones histológicas en pacientes que no presenten alteraciones analíticas. En estos pacientes, el uso de sonoelastografía ARFI puede resultar diferencial a la hora de establecer un manejo adecuado para evitar la evolución de la enfermedad.

Además, varios estudios han puesto de manifiesto que la estimación de la elasticidad hepática mediante técnica sonoelastográfica ARFI puede verse alterada por el perfil bioquímico del paciente. La ALT, transaminasa que representa el proceso necroinflamatorio hepático, ha mostrado cierto grado de correlación con el grado de elasticidad hepática evaluada mediante ARFI en estudios transversales, con una tendencia a la sobreestimación de las Vc cuando los valores séricos de ALT son elevados (Yoon et al., 2012). De forma similar, Rizzo et al. (2011) documentó este fenómeno en estudios con técnica ARFI. De esta forma, la exclusión del posible factor de confusión ALT, realizando los estudios en pacientes con niveles séricos normales de esta transaminasa, nos permitiría unas medidas más precisas. En nuestro estudio, no apreciamos alteraciones analíticas significativas en la ALT, ni en el grupo control ni en el grupo obeso, presentando este último grupo un discreto aumento de los valores de ALT con respecto al grupo control. Este hecho añade credibilidad a los resultados obtenidos en parénquima hepático.

En cuanto a la TFG renal, se ha descrito una correlación significativa entre las Vc y TFG calculada en pacientes trasplantados de riñón, con una sensibilidad y especificidad del 72% y 86,5% respectivamente para el diagnóstico de disfunción renal (He et al., 2014). En nuestro estudio, pese a que encontramos una disminución estadísticamente significativa de la TFG en el grupo obeso con respecto al grupo control, no apreciamos correlación significativa entre los valores de filtración y las Vc obtenidas mediante técnica ARFI. Es necesario llevar a cabo un mayor número

de estudios para aclarar esta posible relación entre los valores de TFG y las velocidades de corte adquiridas mediante ARFI.

- **Correlación entre el estudio histológico hepático y renal con valores obtenidos con ARFI**

La técnica sonoelastográfica ARFI ha demostrado resultados muy prometedores para la detección y graduación de la fibrosis hepática en numerosos estudios (Fierbinteanu-Braticevici et al., 2009; Friedrich-Rust et al., 2009), siendo ésta la característica histológica mejor estudiada mediante técnica ARFI y un importante factor pronóstico en el desarrollo de la NAFLD.

En nuestro estudio con rata Wistar, encontramos una importante correlación entre la Vc y el grado de fibrosis hepática en función de la superficie afectada, tanto en el estudio *in vivo* como en el *ex vivo*. No obstante, los resultados obtenidos en el modelo *ex vivo* son superiores a los detectados en el modelo *in vivo*. Este hecho demuestra que, minimizando las posibles fuentes de artefacto para la detección y cuantificación de las Vc, conseguimos unos resultados más fiables en la caracterización de la fibrosis hepática.

Otro de los objetivos de la técnica sonoelastográfica ARFI se basa en la detección de fibrosis hepática en estadios precoces de la enfermedad, cuando el proceso fibrogénico se encuentra en estadios iniciales, a fin de establecer medidas para prevenir su progresión. Algunos estudios, como el llevado a cabo por Bota et al. (2013), defienden la capacidad de ARFI de diagnosticar estadios  $F \geq 2$  de fibrosis hepática con una sensibilidad del 74% y especificidad del 83%, alcanzando ambas un 87% cuando se trata de identificar F4. Estos resultados resaltan la capacidad de la técnica ARFI de discernir estadios de fibrosis moderados y avanzados de estadios sin fibrosis significativa o leve. Otro estudio, desarrollado por Sporea et al. (2012), indica una importante superposición de resultados en pacientes sin fibrosis (F0), y pacientes con fibrosis leve (F1) o moderada (F2). En nuestro estudio, aunque el grado de fibrosis desarrollado por los animales fue bastante bajo, encontramos diferencias significativas entre los sujetos que no muestran fibrosis hepática significativa (F0 en la escala METAVIR) y aquellos que presentan algún grado de fibrosis ( $F \geq 1$ ) tanto en el estudio *in vivo* como en el *ex vivo*. Estos resultados podrían indicar que, ajustando los parámetros correctamente y optimizando la toma de

mediciones de Vc, la técnica ARFI podría resultar una herramienta fundamental para diferenciar pacientes sanos de aquellos que presentan un estadio temprano de afectación hepática.

En cuanto a la capacidad de ARFI para la caracterización de la esteatosis hepática y de los procesos necroinflamatorios, características histológicas también presentes en la NAFLD y hepatopatía crónica de diversas etiologías, existe un mayor grado de controversia en la literatura.

Fierbinteanu-Braticevici et al. (2009), expusieron en su investigación que los valores de ARFI presentaron una importante correlación negativa con el grado de esteatosis hepática, con una progresiva disminución de las Vc cuanto mayor fuese el grado de esteatosis. Sin embargo, otro estudio llevado a cabo por Nishikawa et al. (2014), no encontró correlación significativa entre las Vc adquiridas mediante ARFI y el grado de esteatosis.

En nuestro modelo animal, no hemos detectado correlación significativa entre el grado de sobrecarga lipídica y las Vc, en el estudio *in vivo* ni en el *ex vivo*, pero si conseguimos detectar diferencias significativas entre animales sin sobrecarga lipídica significativa en la escala de Brunt et al. (E0) y animales con algún grado de esteatosis ( $E \geq 1$ ) tanto en el estudio *in vivo* como en el *ex vivo*. De esta forma, nuestros resultados sugieren que, la técnica ARFI podría resultar de utilidad para diferenciar la ausencia de sobrecarga lipídica del resto de grados de esteatosis hepática, de leve a severa tras una correcta optimización en la adquisición de las Vc.

En cuanto a la valoración de los procesos necroinflamatorios, al igual que ocurría en el caso de la esteatosis, existe cierto grado de controversia. Así que, mientras Palmeri et al. describió que el grado de balonización hepatocitaria y de inflamación hepática no afectaron a las determinaciones de Vc mediante sonoelastografía ARFI, los estudios realizados por Fierbinteanu-Braticevici et al. (2009) mostraron un cierto grado de correlación positiva con el grado de inflamación. Por otra parte, Yoneda et al. (2010), describió diferencias de Vc entre grupos con diversos grados de inflamación, sin conseguir identificar un cambio gradual de Vc entre los distintos grados de inflamación.

En nuestro experimento, sólo encontramos una correlación positiva y significativa entre los valores de Vc determinados de forma *in vivo* y el número de linfocitos T CD3 hepáticos obtenidos en el estudio histológico, sin ser capaces de detectar correlación en el estudio *ex vivo*. Por otra

parte, sí que somos capaces de detectar diferencias estadísticamente significativas entre aquellos animales que no presentaron inflamación significativa en la escala propuesta por Hao et al. (G0), y aquellos que mostraban algún grado de inflamación ( $G \geq 1$ ), tanto en el estudio *in vivo* ni en el *ex vivo*. Resulta necesaria la realización de un mayor número de estudios para comprobar la posible utilidad de la técnica ARFI en la valoración del infiltrado inflamatorio hepático.

Es necesario llevar a cabo un mayor número de estudios con técnica ARFI para verificar una posible utilidad para la detección y graduación de la esteatosis y de la inflamación hepática en pacientes con NAFLD. Una mejora en la selección de parámetros de ARFI y de la localización de las RDI, al igual que en el caso de la fibrosis, podría aumentar la precisión de la técnica en la valoración de la sobrecarga grasa hepática y del grado de inflamación.

Atendiendo a los excelentes resultados que ofrece la técnica sonoelastográfica ARFI en la detección y graduación de la fibrosis hepática, se han intentado reproducir estos resultados en parénquima renal, debido a que el proceso fisiopatológico de la ERC y de la disfunción de injertos renales trasplantados también muestran un proceso de fibrogénesis progresiva, con una pérdida de la función renal. Los datos obtenidos por el momento no son concluyentes y existe cierta controversia.

En un estudio centrado en pacientes con ERC realizado por Wang et al. (2014) no se obtuvo una correlación significativa entre las Vc y el grado de fibrosis intersticial, mientras que otro estudio desarrollado por Cui et al. (2014) sí que objetivó una correlación directa entre la elasticidad renal y los grados histológicos de fibrosis, con valores de sensibilidad y especificidad de 86% y 83% respectivamente. Otros estudios llevados a cabo sobre injertos renales, como el desarrollado por Syversveen et al. (2011), defienden que la técnica ARFI no es capaz de detectar la fibrosis intersticial en injertos renales. Sin embargo, otro experimento realizado por Lee J et al., mostró una ausencia de correlación entre las Vc determinadas con ARFI y la fibrosis intersticial determinada mediante examen histológico.

Además, existen hipótesis que defienden que este aumento de la Vc en pacientes con nefropatía crónica podría deberse a otros factores distintos de la fibrosis intersticial, tales como la disminución del flujo sanguíneo, secundario a la nefroangioesclerosis típica de la ERC (Gennison

et al., 2012; Asano et al., 2014), los estados de hiperfiltración progresiva en injertos renales (Lee et al., 2015) o la región sobre la que se establecen las mediciones.

En nuestro estudio, encontramos una importante correlación positiva entre la Vc y el grado de fibrosis renal en función de la superficie afectada, en el modelo *in vivo* sin apreciar una correlación clara en los animales del estudio *ex vivo*. Estos hallazgos no concuerdan con los resultados obtenidos en parénquima hepático, donde las determinaciones *ex vivo*, tras la minimización de posibles fuentes de artefacto y la selección de mejores RDIs, muestran mejores resultados que las determinaciones *in vivo*. El pequeño tamaño de los riñones de rata, sus características anatómicas propensas a generar artefactos de anisotropía y el tamaño fijo de la RDI para la adquisición de las Vc podrían limitar la precisión de las mediciones. Es necesario realizar estudios en animales de mayor tamaño, tanto en modelos *in vivo* como en *ex vivo*, para poder determinar con mayor exactitud la utilidad de ARFI en la caracterización de la fibrosis renal. Además, deberían explorarse en profundidad la posible influencia de otros factores independientes a la fibrosis en la adquisición de las mediciones, tal y como hemos descrito anteriormente.

Existen pocas publicaciones en la literatura que estudien la posible relación entre las medidas ARFI y el grado de inflamación renal. Un estudio llevado a cabo por Stock et al. (2010) resalta un discreto aumento en las medias de velocidades de corte en un grupo de pacientes con rechazo del injerto renal con respecto a pacientes trasplantados que no lo presentaban, aludiendo a la posible influencia de los procesos inflamatorios asociados al rechazo agudo del injerto sobre las velocidades de corte de ARFI. En nuestro estudio hemos obtenido unos fuertes valores de correlación entre las Vc en los estudios *ex vivo* y el número de linfocitos T CD3 identificado por campo en la muestra histológica. En cuanto de la experiencia *in vivo*, no apreciamos valores de correlación estadísticamente significativa. Aunque en este caso las determinaciones *ex vivo* consigan un mejor resultado que las *in vivo*, se deben realizar un mayor número de experimentos para comprobar esta posible relación entre el aumento de la rigidez parenquimatosa y un mayor grado de inflamación renal.

## 8.2 Estudio *ex vivo* en modelos de rata Sprague-Dawley.

Tras los resultados obtenidos en el experimento previo, constatando marcadas diferencias entre la adquisición de Vc en el modelo *in vivo* y el modelo *ex vivo*, con algunos resultados positivos y consistentes en la experiencia *ex vivo*, realizamos las determinaciones de ARFI en parénquima hepático y renal de forma *ex vivo*, con el propósito de averiguar qué resultado obtendríamos en otro grupo de animales con distintos grados de patología hepática y renal.

Escogemos como modelo experimental dos grupos de ratas Sprague-Dawley de 4 meses y 9 meses de edad. Cada grupo fue subdividido en otros cuatro grupos: control, obeso, hipertenso (HTA) y obeso-hipertenso (mixto); cada uno en función del tipo de dieta y tratamiento recibido por los animales, a fin de ocasionarles diferentes grados de hepatopatía y nefropatía y poder establecer una relación entre los hallazgos analíticos e histológicos encontrados con las mediciones llevadas a cabo mediante técnica sonoelastográfica ARFI.

- **Correlación entre el estudio analítico hepático y renal con medidas ARFI**

En nuestro modelo Sprague-Dawley, a diferencia del estudio Wistar descrito previamente, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre algunos elementos del perfil lipídico, con una disminución estadísticamente significativa entre los valores de HDL de los subgrupos obeso y mixto con respecto al control, tanto en el grupo de 4 meses como en el de 9 meses. No obstante, no conseguimos establecer correlación entre los valores del perfil lipídico y la ALT con las determinaciones con técnica ARFI. Además, al igual que ocurría en la experiencia con rata Wistar, constatamos que, aunque los valores analíticos no reflejen patología, los valores de ARFI sí que nos permiten identificar de forma precoz alteraciones histológicas a nivel hepático.

En cuanto a los valores de TFG renales, encontramos diferencias significativas entre valores de TFG en los grupos animales de 4 meses y 9 meses, con una disminución de la TFG en el grupo HTA con respecto al control y del grupo mixto con respecto al resto de grupos. Pese a estas diferencias descritas no apreciamos relación significativa con los valores de ARFI. Probablemente, el escaso número de muestra puede condicionar estos hallazgos, siendo necesaria una investigación más exhaustiva en este sentido.

- **Correlación entre el estudio histológico hepático y renal con valores obtenidos con ARFI**

En nuestro experimento con ratas Sprague-Dawley, aunque no conseguimos animales con unos grados severos de fibrosis ni en el grupo animal de 4 meses (F0 y F1) ni en el de 9 meses (F0, F1 y F2), conseguimos establecer diferencias con técnica ARFI entre la ausencia de fibrosis hepática y la presencia de algún grado de fibrosis en los animales de 9 meses, que han sufrido un proceso fibrogénico más marcado que en las de 4 meses. Además, obtenemos una robusta correlación positiva entre los valores de Vc hepáticos obtenidos con ARFI y la cantidad de fibrosis por campo, tanto en el grupo animal de 4 meses como en el grupo de 9 meses. Estos datos son congruentes con los obtenidos en nuestro experimento con ratas Wistar y con los resultados obtenidos por otros autores (Fierbinteanu-Braticevici et al., *World J Gastroenterol* 2009; Friedrich-Rust M et al., *Radiology* 2009).

Estos resultados podrían indicar que, aunque el grado de fibrosis hepática no sea muy elevado, la técnica sonoelastográfica ARFI podría ayudarnos a diferenciar entre hígados sin fibrosis significativa e hígados con un desarrollo leve y moderado de fibrosis. La optimización de la técnica, con la minimización de fuentes de artefacto y la selección de RDIs de calidad, parece jugar un papel importante para lograr este objetivo.

Por otra parte, en este modelo animal, no detectamos diferencias entre los distintos grados de esteatosis ni de inflamación hepática utilizando sonoelastografía ARFI. La baja sobrecarga lipídica y el escaso proceso nefroinflamatorio desarrollado por los animales, tanto en el grupo de 4 meses como en el de 9 meses, así como las limitaciones ofrecidas por el bajo número de animales estudiado, podrían explicar estos resultados. No obstante, en nuestra experiencia con rata Wistar sí que conseguimos resultados positivos en la detección y caracterización de la esteatosis y del infiltrado necroinflamatorio. Además, tal y como argumentábamos en el estudio con rata Wistar, existe una importante controversia entre la utilidad de la técnica sonoelastográfica ARFI para la detección y caracterización de la sobrecarga lipídica hepática y del desarrollo de procesos necroinflamatorios. De este modo, resulta necesaria la realización de un mayor número de experimentos con un número de muestra más elevado y con una toma de mediciones optimizada para esclarecer este punto.

Atendiendo a la fibrosis renal, se ha apreciado una correlación positiva y estadísticamente significativa con los valores de Vc con ARFI en los animales de 9 meses de tratamiento, con un mayor grado de fibrogénesis renal, sin identificar correlación significativa en los animales de 4 meses. En este caso, al contrario de los resultados obtenidos en rata Wistar, las determinaciones *ex vivo* si consiguen establecer relación entre las Vc ARFI y la cantidad de fibrosis renal. Estos resultados coinciden con otros experimentos incluidos en la literatura, como el de Cui G et al. y el de Wang L et al. Por tanto, podemos decir que la técnica ARFI representa una técnica prometedora para el diagnóstico de fibrosis renal, pero resulta indispensable desarrollar un mayor número de estudios, con muestras de mayor tamaño, que confirmen estos hallazgos.

En cuanto al proceso inflamatorio asociado a la fibrogénesis renal, no conseguimos establecer una correlación significativa entre el grado de infiltrado linfocitario y los valores de ARFI. Son necesarios un mayor número de estudios, con muestras de mayor tamaño, para comprobar la capacidad de la técnica ARFI en este sentido.

### **8.3 Discusión conjunta de las experiencias con rata Wistar y Sprague-Dawley.**

El estudio comparativo entre modelos *in vivo* y *ex vivo* ha reflejado un importante aumento de Vc con ARFI en las mediciones *in vivo* con respecto a las *ex vivo*, tanto en el análisis del parénquima hepático como en el renal. Atendiendo a los mejores resultados de correlación encontrados en el modelo *ex vivo*, sobre todo en parénquima hepático, estos hallazgos podrían indicar la presencia de factores que produzcan una sobreestimación de las medidas en los estudios *in vivo*. En futuras investigaciones, se podría calcular un factor de corrección que asemejase los valores obtenidos en clínica con los valores obtenidos en estudios *ex vivo*, en condiciones ideales y eliminando la mayor cantidad de fuentes de artefacto posibles, con el fin ajustar los valores de velocidad de corte e intentar diferenciar grados de fibrosis con importante solapamiento de información.

No se han conseguido establecer correlaciones significativas entre los parámetros analíticos hepáticos y renales con las Vc obtenidas con ARFI en ninguna de las dos experiencias. No obstante, si que hemos conseguido detectar patología en parénquima hepático con ARFI en animales con parámetros analíticos normales, hecho que demuestra la posible utilidad de la

técnica en el diagnóstico precoz de hepatopatía. En el caso de la nefropatía crónica, se debe seguir investigando la utilidad de ARFI para una detección precoz de patología.

Nuestros resultados confirman la gran utilidad de la sonoelastografía ARFI en la detección y caracterización de la fibrosis hepática, con elevados resultados de correlación. La técnica también demuestra potencial en la detección de esteatosis y de infiltrado inflamatorio pero para definir estos aspectos se necesitan un mayor número de estudios, con modelos animales con distintos grados de hepatopatía, para poder confirmar su utilidad.

En cuanto al análisis de la fibrosis renal, apreciamos cierto potencial en las capacidades de detección y caracterización con técnica sonoelastográfica ARFI, pero se necesitan un mayor número de estudios, con tamaños muestrales superiores y animales con mayor tamaño para poder seleccionar RDIs de mayor calidad. La especial anatomía renal, con una arquitectura interna que puede acentuar los artefactos de anisotropía, pueden restar fiabilidad a la adquisición de valores.

#### **8.4 Limitaciones**

- El tamaño de la muestra resulta la limitación fundamental del estudio. Aumentando el número de animales podríamos corroborar con mayor precisión los resultados obtenidos.
- El pequeño tamaño de los órganos estudiados resultó un factor limitante, sobre todo en el caso del análisis renal. El tamaño fijo de la RDI y el pequeño tamaño de las áreas de estudio podrían haber disminuido la precisión de los hallazgos. En futuros proyectos se puede recurrir a un modelo animal de mayor tamaño para establecer una valoración mas completa del parénquima hepático y, sobre todo, del parénquima renal.
- La escasa patología desarrollada en los animales condiciona los resultados, sobre todo de la experiencia con modelos de rata Sprague-Dawley, donde las diferencias intergrupales de patología resultan, en ocasiones, muy escasa. Se necesitan modelos animales con un mayor tiempo de tratamiento o utilizar modelos animales con tratamientos alternativos.



# CAPÍTULO IX

## CONCLUSIONES

### **ESTUDIO ARFI COMPARATIVO IN VIVO - EX VIVO**

---

1. Se ha demostrado un aumento de las medidas ARFI en los modelos *in vivo* con respecto a los *ex vivo*, tanto en el estudio del parénquima hepático como en el renal. Este hecho sugiere que diversos factores pueden alterar las mediciones y, dados los excelentes resultados en el modelo *ex vivo*, que podría existir una sobreestimación en las medidas *in vivo*.

### **ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE VALORES ARFI Y PARÁMETROS ANALÍTICOS**

---

#### **HÍGADO**

2. Se han observado alteraciones en las mediciones con técnica ARFI en animales con alteraciones histopatológicas incipientes en parénquima hepático, pero con parámetros analíticos normales. Este resultado confirma la potencial capacidad de ARFI de detectar patología de forma precoz en animales sin alteraciones analíticas.

#### **RIÑÓN**

3. No se ha observado correlación entre los valores ARFI y la tasa de filtración glomerular.

---

## ESTUDIO DE CORRELACION ENTRE VALORES ARFI Y PARAMETROS HISTOLÓGICOS

---

### HÍGADO

4. Hemos detectado unos valores de correlación muy elevados entre las mediciones adquiridas con ARFI y el grado de fibrosis hepática en dos modelos experimentales de rata, de forma *in vivo* y *ex vivo*. Además, hemos identificado un grado de correlación mayor en el estudio *ex vivo*, hecho que confirma que, planificando y optimizando las determinaciones con ARFI para limitar fuentes de artefacto, podemos obtener resultados más fiables, precisos y reproducibles.
5. En ratas Wistar, se observó diferencias significativas en los valores ARFI entre animales del grupo control y animales con diferentes grados de inflamación y esteatosis.
6. En ratas SD, no se apreciaron diferencias significativas en los valores ARFI entre animales del grupo control y animales con diferentes grados de inflamación y esteatosis, posiblemente debido a la escasa patología desarrollada en estos animales y al pequeño tamaño muestral.

### RIÑÓN

7. La relación de ARFI con los parámetros histológicos renales sigue siendo controvertida. Aunque recogemos algunos resultados positivos, sobre todo en cuanto a la valoración de la fibrosis renal, siendo necesarios un mayor número de estudios para esclarecer la posible utilidad de ARFI en este aspecto.

En resumen, la técnica sonoelastográfica ARFI constituye un prometedor método diagnóstico alternativo para evaluar los cambios parenquimatosos que aparecen en los procesos de hepatopatía y nefropatía crónica, y un potencial sustituto de la biopsia hepática y renal en el futuro. No obstante, resultan necesarios establecer protocolos para optimizar la técnica y realizar un mayor número de estudios, tanto en animales como en humanos, para conseguir obtener resultados más precisos y reproducibles.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, L. A., Lymp, J. F., Sauver, J. S., Sanderson, S. O., Lindor, K. D., Feldstein, A., & Angulo, P. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, *129*(1), 113-121.
- Aller MA & Arias J (2009), *Microsurgery in Liver Research*, Madrid, España, Bentham Books.
- Angulo, P., Keach, J. C., Batts, K. P., & Lindor, K. D. (1999). Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, *30*(6), 1356-1362.
- Anstee, Q. M., McPherson, S., & Day, C. P. (2011). How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease?. *BMJ-British Medical Journal-Clinical Research Edition*, *343*(8), d3897.
- Argo, C. K., Northup, P. G., Al-Osaimi, A. M., & Caldwell, S. H. (2009). Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*, *51*(2), 371-379.
- Armstrong, M. J., Houlihan, D. D., Bentham, L., Shaw, J. C., Cramb, R., Olliff, S., ... & Newsome, P. N. (2012). Presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in a large prospective primary care cohort. *Journal of hepatology*, *56*(1), 234-240.
- Arogundade, F. A., & Barsoum, R. S. (2008). CKD prevention in Sub-Saharan Africa: a call for governmental, nongovernmental, and community support. *American Journal of Kidney Diseases*, *51*(3), 515-523.
- Asano, K., Ogata, A., Tanaka, K., Ide, Y., Sankoda, A., Kawakita, C., ... & Fukushima, M. (2014). Acoustic Radiation Force Impulse Elastography of the Kidneys. *Journal of ultrasound in medicine*, *33*(5), 793-801.
- Ascha, M. S., Hanouneh, I. A., Lopez, R., Tamimi, T. A. R., Feldstein, A. F., & Zein, N. N. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, *51*(6), 1972-1978.
- Asensio del Barrio, C., Polo de Santos, M. M., Luengo Matos, S., Sánchez-Gómez, L., & Alcázar Alcázar, R. (2009). Elastografía de Transición (FibroScan) en el diagnóstico de la fibrosis hepática: revisión sistemática y metaanálisis. *Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS). Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.*
- Ashton, C. W., & Duffie, D. (2011). Chronic kidney disease in Canada's First Nations: results of an effective cross-cultural collaboration. *Healthcare quarterly (Toronto, Ont.)*, *14*(3), 42-47.
- Bedossa, P. (1994). Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, *20*(1), 15-20.
- Bedossa, P. (2016). Histological assessment of NAFLD. *Digestive diseases and sciences*, *61*(5), 1348-1355.

- Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J. L., Basdevant, A., Paradis, V., ... & Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*, *56*(5), 1751-1759.
- Bergman, S., Key, B. O., Kirk, K. A., Warnock, D. G., & Rostand, S. G. (1996). Kidney disease in the first-degree relatives of African-Americans with hypertensive end-stage renal disease. *American journal of kidney diseases*, *27*(3), 341-346.
- Bota, S., Bob, F., Sporea, I., Şirli, R., & Popescu, A. (2015). Factors that influence kidney shear wave speed assessed by acoustic radiation force impulse elastography in patients without kidney pathology. *Ultrasound in medicine & biology*, *41*(1), 1-6.
- Bota, S., Herkner, H., Sporea, I., Salzl, P., Sirli, R., Neghina, A. M., & Peck-Radosavljevic, M. (2013). Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. *Liver International*, *33*(8), 1138-1147.
- Bota, S., Sporea, I., Sirli, R., Popescu, A., Danila, M., Jurchis, A., & Gradinaru-Tascau, O. (2014). Factors associated with the impossibility to obtain reliable liver stiffness measurements by means of Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) elastography—Analysis of a cohort of 1031 subjects. *European journal of radiology*, *83*(2), 268-272.
- Brea, A., & Puzo, J. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *International journal of cardiology*, *167*(4), 1109-1117.
- Browning, J. D., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R., Horton, J. D., Cohen, J. C., Grundy, S. M., & Hobbs, H. H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, *40*(6), 1387-1395.
- Bruno, C., Caliari, G., Zaffanello, M., Brugnara, M., Zuffante, M., Cecchetto, M., ... & Pozzi-Mucelli, R. (2013). Acoustic radiation force impulse (ARFI) in the evaluation of the renal parenchymal stiffness in paediatric patients with vesicoureteral reflux: preliminary results. *European radiology*, *23*(12), 3477-3484.
- Bruno, C., Minniti, S., Bucci, A., & Mucelli, R. P. (2016). ARFI: from basic principles to clinical applications in diffuse chronic disease—a review. *Insights into imaging*, *7*(5), 735-746.
- Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., & Bacon, B. R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology*, *94*(9), 2467-2474.
- Burt, A. D., Lackner, C., & Tiniakos, D. G. (2015, August). Diagnosis and assessment of NAFLD: definitions and histopathological classification. In *Seminars in liver disease* (Vol. 35, No. 03, pp. 207-220). Thieme Medical Publishers.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, *65*(8), 1038-1048.

- Bydder, G. M., Kreel, L., Chapman, R. W., Harry, D., Sherlock, S., & Bassan, L. (1980). Accuracy of computed tomography in diagnosis of fatty liver. *British medical journal*, *281*(6247), 1042.
- Caballería, L., Pera, G., Auladell, M. A., Torán, P., Muñoz, L., Miranda, D., ... & Aubà, J. (2010). Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *European journal of gastroenterology & hepatology*, *22*(1), 24-32.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., ... & Sanyal, A. J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, *55*(6), 2005-2023.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., ... & Sanyal, A. J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*, *142*(7), 1592-1609.
- Chang, S., Kim, M. J., Kim, J., & Lee, M. J. (2013). Variability of shear wave velocity using different frequencies in acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography: a phantom and normal liver study. *Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound*, *34*(03), 260-265.
- Charlton, M. R., Burns, J. M., Pedersen, R. A., Watt, K. D., Heimbach, J. K., & Dierkhising, R. A. (2011). Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*, *141*(4), 1249-1253.
- Chen, J., Talwalkar, J. A., Yin, M., Glaser, K. J., Sanderson, S. O., & Ehman, R. L. (2011). Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology*, *259*(3), 749-756.
- Chitturi, S., Farrell, G. C., Hashimoto, E., Saibara, T., Lau, G. K., & Sollano, J. D. (2007). Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia–Pacific region: Definitions and overview of proposed guidelines. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *22*(6), 778-787.
- Cobbold, J. F., Anstee, Q. M., & Thomas, H. C. (2010). Investigating mildly abnormal serum aminotransferase values. *BMJ*, *341*, c4039.
- Cui, G., Yang, Z., Zhang, W., Li, B., Sun, F., Xu, C., & Wang, K. (2014). Evaluation of acoustic radiation force impulse imaging for the clinicopathological typing of renal fibrosis. *Experimental and therapeutic medicine*, *7*(1), 233-235.
- Cusi, K. (2009). Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in liver disease*, *13*(4), 545-563.
- Cybulsky, A. V. (2000). Growth factor pathways in proliferative glomerulonephritis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, *9*(3), 217-223.

- Dam-Larsen, S., Franzmann, M., Andersen, I. B., Christoffersen, P., Jensen, L. B., Sørensen, T. I. A., ... & Bendtsen, F. (2004). Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut*, *53*(5), 750-755.
- Das, K., Das, K., Mukherjee, P. S., Ghosh, A., Ghosh, S., Mridha, A. R., ... & Dhali, G. K. (2010). Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. *Hepatology*, *51*(5), 1593-1602.
- De Ledinghen, V., & Vergniol, J. (2008). Transient elastography (fibroscan). *Gastroenterologie clinique et biologique*, *32*(6), 58-67.
- Debongnie, J. C., Pauls, C., Fievez, M., & Wibin, E. (1981). Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of liver ultrasonography. *Gut*, *22*(2), 130-135.
- Dhaun, N., Bellamy, C. O., Cattran, D. C., & Kluth, D. C. (2014). Utility of renal biopsy in the clinical management of renal disease. *Kidney international*, *85*(5), 1039-1048.
- Dillman, J. R., Chen, S., Davenport, M. S., Zhao, H., Urban, M. W., Song, P., ... & Carson, P. L. (2015). Superficial ultrasound shear wave speed measurements in soft and hard elasticity phantoms: repeatability and reproducibility using two ultrasound systems. *Pediatric radiology*, *45*(3), 376-385.
- Dixon, J. B., Bhathal, P. S., & O'brien, P. E. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*, *121*(1), 91-100.
- D'Onofrio, M., Gallotti, A., & Mucelli, R. P. (2010). Tissue quantification with acoustic radiation force impulse imaging: Measurement repeatability and normal values in the healthy liver. *American Journal of Roentgenology*, *195*(1), 132-136.
- Ebinuma, H., Saito, H., Komuta, M., Ojiro, K., Wakabayashi, K., Usui, S., ... & Kikuchi, M. (2011). Evaluation of liver fibrosis by transient elastography using acoustic radiation force impulse: comparison with Fibroscan®. *Journal of gastroenterology*, *46*(10), 1238.
- Efe, C., Gungoren, M. S., Ozaslan, E., Akbiyik, F., & Kav, T. (2015). Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) for Fibrosis Staging in Patients with Autoimmune Hepatitis. *Hepato-gastroenterology*, *62*(139), 670-672.
- Eguchi, Y., Hyogo, H., Ono, M., Mizuta, T., Ono, N., Fujimoto, K., ... & Saibara, T. (2012). Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *Journal of gastroenterology*, *47*(5), 586-595.
- Ekstedt, M., Franzén, L. E., Mathiesen, U. L., Thorelius, L., Holmqvist, M., Bodemar, G., & Kechagias, S. (2006). Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*, *44*(4), 865-873.
- El Nahas, A. M. (1988). Glomerulosclerosis: a form of atherosclerosis. *Nephrology*, *2*, 1206-20.

- El Nahas, A. M. (2003). Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney international*, 64(5), 1553-1563.
- El Nahas, A. M., & Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *The Lancet*, 365(9456), 331-340.
- Farrell, G. C., Wong, V. W. S., & Chitturi, S. (2013). NAFLD in Asia—as common and important as in the West. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(5), 307-318.
- Feehally, J. (2005). Ethnicity and renal disease. *Kidney international*, 68(1), 414-424.
- Fernández-Llama, P., & Bover, J. (2008). Is albuminuria a marker of arterial remodeling?. *Journal of hypertension*, 26(4), 633-635.
- Fierbinteanu-Braticevici, C., Andronescu, D., Usvat, R., Cretoiu, D., Baicus, C., & Marinoschi, G. (2009). Acoustic radiation force imaging sonoelastography for noninvasive staging of liver fibrosis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(44), 5525.
- Fishbein, M. H., & Stevens, W. R. (2001). Rapid MRI using a modified Dixon technique: a non-invasive and effective method for detection and monitoring of fatty metamorphosis of the liver. *Pediatric radiology*, 31(11), 806-809.
- Fishbein, M., Castro, F., Cheruku, S., Jain, S., Webb, B., Gleason, T., & Stevens, W. R. (2005). Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *Journal of clinical gastroenterology*, 39(7), 619-625.
- Friedrich–Rust, M., Ong, M. F., Martens, S., Sarrazin, C., Bojunga, J., Zeuzem, S., & Herrmann, E. (2008). Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134(4), 960-974.
- Friedrich-Rust, M., Wunder, K., Kriener, S., Sotoudeh, F., Richter, S., Bojunga, J., ... & Zeuzem, S. (2009). Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. *Radiology*, 252(2), 595-604.
- Gennisson, J. L., Grenier, N., Combe, C., & Tanter, M. (2012). Supersonic shear wave elastography of in vivo pig kidney: influence of blood pressure, urinary pressure and tissue anisotropy. *Ultrasound in medicine & biology*, 38(9), 1559-1567.
- Goertz, R. S., Amann, K., Heide, R., Bernatik, T., Neurath, M. F., & Strobel, D. (2011). An abdominal and thyroid status with Acoustic Radiation Force Impulse Elastometry—a feasibility study: Acoustic Radiation Force Impulse Elastometry of human organs. *European journal of radiology*, 80(3), e226-e230.
- Gores, G. J., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1990). Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology*, 11(4), 690-698.
- Gracia, S., Montañés, R., Bover, J., Cases, A., Deulofeu, R., Martín de Francisco, A. L., & Orte, L. M. (2006). Documento de consenso: Recomendaciones sobre la utilización de ecuaciones para la estimación del filtrado glomerular en adultos. *Nefrología*, 26(6), 658-65.

- Gràcia-García, S., Montañés-Bermúdez, R., Morales-García, L. J., Díez-de los Ríos, M. J., Jiménez-García, J. Á., Macías-Blanco, C., ... & Ventura-Pedret, S. (2012). Estado actual de la implementación de las ecuaciones de estimación del filtrado glomerular en los laboratorios españoles. *Nefrología (Madrid)*, 32(4), 508-516.
- Guo, L. H., Xu, H. X., Fu, H. J., Peng, A., Zhang, Y. F., & Liu, L. N. (2013). Acoustic radiation force impulse imaging for noninvasive evaluation of renal parenchyma elasticity: preliminary findings. *PLoS one*, 8(7), e68925.
- Hanquinet, S., Courvoisier, D. S., Rougemont, A. L., Dhouib, A., Rubbia-Brandt, L., Wildhaber, B. E., ... & Anooshiravani, M. (2015). Contribution of acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography to the ultrasound diagnosis of biliary atresia. *Pediatric radiology*, 45(10), 1489-1495.
- Hao, L., Tu, J. Z., Wang, X. H., Shi, Y., Liu, X. L., & Zhang, H. H. (2016). Effect of Inflammation on Fibrosis Staging Measured by Quantitative Elasticity Parameters in Rats With Immune Hepatitis. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 35(6), 1223-1231.
- Harmon, R. C., Tiniakos, D. G., & Argo, C. K. (2011). Inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 5(2), 189-200.
- Haroun, M. K., Jaar, B. G., Hoffman, S. C., Comstock, G. W., Klag, M. J., & Coresh, J. (2003). Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(11), 2934-2941.
- Hashimoto, E., Taniai, M., & Tokushige, K. (2013). Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28(S4), 64-70.
- He, W. Y., Jin, Y. J., Wang, W. P., Li, C. L., Ji, Z. B., & Yang, C. (2014). Tissue elasticity quantification by acoustic radiation force impulse for the assessment of renal allograft function. *Ultrasound in medicine & biology*, 40(2), 322-329.
- Housman, A. E., & Shropshire Lad, A. Incidence and prevalence. United States Renal Data System. *2010 Annual Data Report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States*, 2.
- Iseki, K., Ikemiya, Y., Iseki, C., & Takishita, S. (2003). Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney international*, 63(4), 1468-1474.
- Iwasaki, M., Takada, Y., Hayashi, M., Minamiguchi, S., Haga, H., Maetani, Y., ... & Tanaka, K. (2004). Noninvasive evaluation of graft steatosis in living donor liver transplantation. *Transplantation*, 78(10), 1501-1505.
- Jaffer, O. S., Lung, P. F. C., Bosanac, D., Patel, V. M., Ryan, S. M., Heneghan, M. A., ... & Sidhu, P. S. (2012). Acoustic radiation force impulse quantification: repeatability of measurements in selected liver segments and influence of age, body mass index and liver capsule-to-box distance. *The British journal of radiology*, 85(1018), e858-e863.

- James, M. T., Hemmelgarn, B. R., & Tonelli, M. (2010). Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *The Lancet*, *375*(9722), 1296-1309.
- Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., ... & Yang, C. W. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*, *382*(9888), 260-272.
- Joseph, A. E. A., Saverymuttu, S. H., Al-Sam, S., Cook, M. G., & Maxwell, J. D. (1991). Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clinical radiology*, *43*(1), 26-31.
- Kalia, H. S., & Gaglio, P. J. (2016). The prevalence and pathobiology of nonalcoholic fatty liver disease in patients of different races or ethnicities. *Clinics in liver disease*, *20*(2), 215-224.
- Kaminuma, C., Tsushima, Y., Matsumoto, N., Kurabayashi, T., Taketomi-Takahashi, A., & Endo, K. (2011). Reliable measurement procedure of virtual touch tissue quantification with acoustic radiation force impulse imaging. *Journal of Ultrasound in Medicine*, *30*(6), 745-751.
- Kanth, V. V. R., Sasikala, M., Sharma, M., Rao, P. N., & Reddy, D. N. (2016). Genetics of non-alcoholic fatty liver disease: from susceptibility and nutrient interactions to management. *World journal of hepatology*, *8*(20), 827.
- Kanwar, P., & Kowdley, K. V. (2016). The metabolic syndrome and its influence on nonalcoholic steatohepatitis. *Clinics in liver disease*, *20*(2), 225-243.
- Karcaaltincaba, M., & Akhan, O. (2007). Imaging of hepatic steatosis and fatty sparing. *European journal of radiology*, *61*(1), 33-43.
- Karlas, T., Petroff, D., Garnov, N., Böhm, S., Tenckhoff, H., Wittekind, C., ... & Busse, H. (2014). Non-invasive assessment of hepatic steatosis in patients with NAFLD using controlled attenuation parameter and 1H-MR spectroscopy. *PloS one*, *9*(3), e91987.
- Kepler, J. (2010). International comparisons. United States Renal Data System. *2010 Annual Data Report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States*, 2.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., ... & Yeh, M. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *41*(6), 1313-1321.
- Kotronen, A., Peltonen, M., Hakkarainen, A., Sevastianova, K., Bergholm, R., Johansson, L. M., ... & Orho-Melander, M. (2009). Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*, *137*(3), 865-872.
- Lee, J., Oh, Y. T., Joo, D. J., Ma, B. G., Lee, A. L., Lee, J. G., ... & Kim, Y. S. (2015). Acoustic radiation force impulse measurement in renal transplantation: a prospective, longitudinal study with protocol biopsies. *Medicine*, *94*(39).

- Lee, M. J., Kim, M. J., Han, K. H., & Yoon, C. S. (2013). Age-related changes in liver, kidney, and spleen stiffness in healthy children measured with acoustic radiation force impulse imaging. *European journal of radiology*, *82*(6), e290-e294.
- Leung, C., Rivera, L., Furness, J. B., & Angus, P. W. (2016). The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *13*(7), 412-425.
- Levey, A. S., Atkins, R., Coresh, J., Cohen, E. P., Collins, A. J., Eckardt, K. U., ... & Powe, N. R. (2007). Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives—a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney international*, *72*(3), 247-259.
- Levey, A. S., Bosch, J. P., Lewis, J. B., Greene, T., Rogers, N., & Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Annals of internal medicine*, *130*(6), 461-470.
- Levey, A. S., De Jong, P. E., Coresh, J., Nahas, M. E., Astor, B. C., Matsushita, K., ... & Eckardt, K. U. (2011). The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney international*, *80*(1), 17-28.
- Levey, A. S., Stevens, L. A., Schmid, C. H., Zhang, Y. L., Castro, A. F., Feldman, H. I., ... & Coresh, J. (2009). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*, *150*(9), 604-612.
- Liao, L. Y., Kuo, K. L., Chiang, H. S., Lin, C. Z., Lin, Y. P., & Lin, C. L. (2015). Acoustic radiation force impulse elastography of the liver in healthy patients: test location, reference range and influence of gender and body mass index. *Ultrasound in medicine & biology*, *41*(3), 698-704.
- Liu, H., Fu, J., Hong, R., Liu, L., & Li, F. (2015). Acoustic radiation force impulse elastography for the non-invasive evaluation of hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease patients: a systematic review & meta-analysis. *PloS one*, *10*(7), e0127782.
- Liu, Y. (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney international*, *69*(2), 213-217.
- Loomba, R., & Sanyal, A. J. (2013). The global NAFLD epidemic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *10*(11), 686-690.
- Martínez-Castelao, A., Górriz, J. L., Bover, J., Segura-de la Morena, J., Cebollada, J., Escalada, J., ... & Hernández-Moreno, J. (2014). Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Atención primaria*, *46*(9), 501-519.
- MATER METHODS es 2012;2:113
- Matsuda, Y., Takada, A., Kanayama, R., & Takase, S. (1983). Changes of hepatic microtubules and secretory proteins in human alcoholic liver disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *18*, 479-482.

- Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., & McCullough, A. J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, *116*(6), 1413-1419.
- McDonald, S. P., Maguire, G. P., & Hoy, W. E. (2003). Renal function and cardiovascular risk markers in a remote Australian Aboriginal community. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *18*(8), 1555-1561.
- McPherson, S., Jonsson, J. R., Cowin, G. J., O'Rourke, P., Clouston, A. D., Volp, A., ... & Benson, M. (2009). Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered. *Journal of hepatology*, *51*(2), 389-397.
- McPherson, S., Stewart, S. F., Henderson, E., Burt, A. D., & Day, C. P. (2010). Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, *59*(9), 1265-1269.
- Mederacke, I., Wursthorn, K., Kirschner, J., Rifai, K., Manns, M. P., Wedemeyer, H., & Bahr, M. J. (2009). Food intake increases liver stiffness in patients with chronic or resolved hepatitis C virus infection. *Liver international*, *29*(10), 1500-1506.
- Mendler, M. H., Bouillet, P., Le Sidaner, A., Lavoine, E., Labrousse, F., Sautereau, D., & Pillegand, B. (1998). Dual-energy CT in the diagnosis and quantification of fatty liver: limited clinical value in comparison to ultrasound scan and single-energy CT, with special reference to iron overload. *Journal of hepatology*, *28*(5), 785-794.
- Mofrad, P., Contos, M. J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R. A., Luketic, V. A., ... & Sanyal, A. J. (2003). Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*, *37*(6), 1286-1292.
- Mohanty, S. R., Troy, T. N., Huo, D., O'Brien, B. L., Jensen, D. M., & Hart, J. (2009). Influence of ethnicity on histological differences in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, *50*(4), 797-804.
- Montañés Bermúdez, R., Bover Sanjuán, J., Oliver Samper, A., Ballarín Castán, J. A., & Gràcia Garcia, S. (2010). Valoración de la nueva ecuación CKD-EPI para la estimación del filtrado glomerular. *Nefrología (Madrid)*, *30*(2), 185-194.
- National, K. F. (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, *39*(2 Suppl 1), S1.
- Neuschwander-Tetri, B. A., & Caldwell, S. H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, *37*(5), 1202-1219.
- Nierhoff, J., Ortiz, A. A. C., Herrmann, E., Zeuzem, S., & Friedrich-Rust, M. (2013). The efficiency of acoustic radiation force impulse imaging for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *European radiology*, *23*(11), 3040-3053.

- Nishikawa, T., Hashimoto, S., Kawabe, N., Harata, M., Nitta, Y., Murao, M., ... & Nakaoka, K. (2014). Factors correlating with acoustic radiation force impulse elastography in chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *20*(5), 1289.
- Onyekwere, C. A., Ogbera, A. O., & Balogun, B. O. (2011). Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome in an urban hospital serving an African community. *Ann Hepatol*, *10*(2), 119-24.
- Orth, S. R., Stöckmann, A., Conradt, C., Ritz, E., Ferro, I. C. W. M., Kreusser, W., ... & Sieberth, H. G. (1998). Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney international*, *54*(3), 926-931.
- Palmentieri, B., De Sio, I., La Mura, V., Masarone, M., Vecchione, R., Bruno, S., ... & Persico, M. (2006). The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Digestive and Liver Disease*, *38*(7), 485-489.
- Panicek, D. M., Giess, C. S., & Schwartz, L. H. (1997). Qualitative assessment of liver for fatty infiltration on contrast-enhanced CT: is muscle a better standard of reference than spleen?. *Journal of computer assisted tomography*, *21*(5), 699-705.
- Paradis, V., & Bedossa, P. (2008). Definition and natural history of metabolic steatosis: histology and cellular aspects. *Diabetes & metabolism*, *34*(6), 638-642.
- Park, S. H., Kim, P. N., Kim, K. W., Lee, S. W., Yoon, S. E., Park, S. W., ... & Yu, E. S. (2006). Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment. *Radiology*, *239*(1), 105-112.
- Paschetta, E., Belci, P., Alisi, A., Liccardo, D., Cutrera, R., Musso, G., & Nobili, V. (2015). OSAS-related inflammatory mechanisms of liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Mediators of inflammation*, 2015.
- Pavenstädt, H., Kriz, W., & Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological reviews*, *83*(1), 253-307.
- Peveerill, W., Powell, L. W., & Skoien, R. (2014). Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *International journal of molecular sciences*, *15*(5), 8591-8638.
- Piekarski, J. G. H. I., Goldberg, H. I., Royal, S. A., Axel, L., & Moss, A. A. (1980). Difference between liver and spleen CT numbers in the normal adult: its usefulness in predicting the presence of diffuse liver disease. *Radiology*, *137*(3), 727-729.
- Piscaglia, F., Salvatore, V., Di Donato, R., D'Onofrio, M., Gualandi, S., Gallotti, A., ... & Sagrini, E. (2011). Accuracy of VirtualTouch Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) imaging for the diagnosis of cirrhosis during liver ultrasonography. *Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound*, *32*(02), 167-175.

- Powell, E. E., Jonsson, J. R., & Clouston, A. D. (2005). Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology*, 42(1), 5-13.
- Poynard, T., Ratziu, V., & Bedossa, P. (2000). Appropriateness of liver biopsy. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(6), 543-548.
- Rajapurkar, M. M., John, G. T., Kirpalani, A. L., Abraham, G., Agarwal, S. K., Almeida, A. F., ... & Pisharody, R. (2012). What do we know about chronic kidney disease in India: first report of the Indian CKD registry. *BMC nephrology*, 13(1), 10.
- Remuzzi, G. (1988). Bleeding in renal failure. *The Lancet*, 331(8596), 1205-1208.
- Remuzzi, G., Benigni, A., & Remuzzi, A. (2006). Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 288.
- Rizzo, L., Calvaruso, V., Cacopardo, B., Alessi, N., Attanasio, M., Petta, S., ... & Nunnari, G. (2011). Comparison of transient elastography and acoustic radiation force impulse for non-invasive staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *The American journal of gastroenterology*, 106(12), 2112-2120.
- Rockey, D. C., Caldwell, S. H., Goodman, Z. D., Nelson, R. C., & Smith, A. D. (2009). Liver biopsy. *Hepatology*, 49(3), 1017-1044.
- Roldan-Valadez, E., Favila, R., Martínez-López, M., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2008). Imaging techniques for assessing hepatic fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*, 7(3), 212-20.
- Saez, F., Reverte, V., Paliege, A., Moreno, J. M., Llinás, M. T., Bachmann, S., & Salazar, F. J. (2014). Sex-dependent hypertension and renal changes in aged rats with altered renal development. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 307(4), F461-F470.
- Sánchez, RM, (2016) *Medición de la Rigidez Hepática con Elastasonografía en Niños con Sobrepeso y Obesidad* (Tesis doctoral). Universidad de Murcia, España.
- Sandrin, L., Fourquet, B., Hasquenoph, J. M., Yon, S., Fournier, C., Mal, F., ... & Beaugrand, M. (2003). Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in medicine & biology*, 29(12), 1705-1713.
- Sanyal, A. J., Banas, C., Sargeant, C., Luketic, V. A., Sterling, R. K., Stravitz, R. T., ... & Contos, M. J. (2006). Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology*, 43(4), 682-689.
- Sanyal, A. J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Kowdley, K. V., Chalasani, N., Lavine, J. E., ... & McCullough, A. (2011). Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 54(1), 344-353.

- Sasso, M., Miette, V., Sandrin, L., & Beaugrand, M. (2012). The controlled attenuation parameter (CAP): A novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan®. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 36(1), 13-20.
- Satapathy, S. K., & Sanyal, A. J. (2015, August). Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. In *Seminars in liver disease* (Vol. 35, No. 03, pp. 221-235). Thieme Medical Publishers.
- Sayiner, M., Koenig, A., Henry, L., & Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clinics in liver disease*, 20(2), 205-214.
- Schaff, Z., & Lapis, K. (1990). Fine structure of hepatocytes during the etiology of several common pathologies. *Microscopy Research and Technique*, 14(3), 179-207.
- Schieppati, A., & Remuzzi, G. (2003). Proteinuria and its consequences in renal disease. *Acta Paediatrica*, 92(s443), 9-13.
- Schwenzer, N. F., Springer, F., Schraml, C., Stefan, N., Machann, J., & Schick, F. (2009). Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *Journal of hepatology*, 51(3), 433-445.
- Schwimmer, J. B., Middleton, M. S., Behling, C., Newton, K. P., Awai, H. I., Paiz, M. N., ... & Sirlin, C. B. (2015). Magnetic resonance imaging and liver histology as biomarkers of hepatic steatosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 61(6), 1887-1895.
- Shiina, T., Nightingale, K. R., Palmeri, M. L., Hall, T. J., Bamber, J. C., Barr, R. G., ... & Dietrich, C. F. (2015). WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 1: basic principles and terminology. *Ultrasound in medicine & biology*, 41(5), 1126-1147.
- Sporea, I., Bota, S., Peck-Radosavljevic, M., Sirli, R., Tanaka, H., Iijima, H., ... & Saito, H. (2012). Acoustic Radiation Force Impulse elastography for fibrosis evaluation in patients with chronic hepatitis C: an international multicenter study. *European journal of radiology*, 81(12), 4112-4118.
- Sporea, I., Sirli, R., Bota, S., Popescu, A., Sendroiu, M., & Jurchis, A. (2012). Comparative study concerning the value of acoustic radiation force impulse elastography (ARFI) in comparison with transient elastography (TE) for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C. *Ultrasound in medicine & biology*, 38(8), 1310-1316.
- Stevens, L. A., Coresh, J., Feldman, H. I., Greene, T., Lash, J. P., Nelson, R. G., ... & Levey, A. S. (2007). Evaluation of the modification of diet in renal disease study equation in a large diverse population. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(10), 2749-2757.
- Stevens, L. A., Schmid, C. H., Greene, T., Li, L., Beck, G. J., Joffe, M. M., ... & Levey, A. S. (2009). Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney international*, 75(6), 652-660.

- Stevens, P. E., & Levin, A. (2013). Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Annals of internal medicine*, *158*(11), 825-830.
- Stock, K. F., Klein, B. S., Cong, M. T., Regenbogen, C., Kemmner, S., Büttner, M., ... & Küchle, C. (2011). ARFI-based tissue elasticity quantification and kidney graft dysfunction: first clinical experiences. *Clinical hemorheology and microcirculation*, *49*(1-4), 527-535.
- Stock, K. F., Klein, B. S., Vo Cong, M. T., Sarkar, O., Römisch, M., Regenbogen, C., ... & Clevert, D. A. (2010). ARFI-based tissue elasticity quantification in comparison to histology for the diagnosis of renal transplant fibrosis. *Clinical hemorheology and microcirculation*, *46*(2-3), 139-148.
- Syversveen, T., Brabrand, K., Midtvedt, K., Strøm, E. H., Hartmann, A., Jakobsen, J. A., & Berstad, A. E. (2011). Assessment of renal allograft fibrosis by acoustic radiation force impulse quantification—a pilot study. *Transplant international*, *24*(1), 100-105.
- Syversveen, T., Midtvedt, K., Berstad, A. E., Brabrand, K., Strøm, E. H., & Abildgaard, A. (2012). Tissue elasticity estimated by acoustic radiation force impulse quantification depends on the applied transducer force: an experimental study in kidney transplant patients. *European radiology*, *22*(10), 2130-2137.
- Tanné, F., Gagnadoux, F., Chazouilleres, O., Fleury, B., Wendum, D., Lasnier, E., ... & Serfaty, L. (2005). Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology*, *41*(6), 1290-1296.
- Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R., Rodella, S., Tessari, R., Zenari, L., ... & Arcaro, G. (2007). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes care*, *30*(5), 1212-1218.
- Taylor, K. J., Gorelick, F. S., Rosenfield, A. T., & Riely, C. A. (1981). Ultrasonography of alcoholic liver disease with histological correlation. *Radiology*, *141*(1), 157-161.
- Thomas, E. L., Hamilton, G., Patel, N., O'dwyer, R., Doré, C. J., Goldin, R. D., ... & Taylor-Robinson, S. D. (2005). Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut*, *54*(1), 122-127.
- United States Renal Data System. Annual data report: incidence and prevalence of ESRD (2003). *Am J Kidney Dis* 2003; **42** (suppl 5): S37–173.
- Vuppalanchi, R., Gould, R. J., Wilson, L. A., Unalp-Arida, A., Cummings, O. W., Chalasani, N., ... & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN. (2012). Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology international*, *6*(1), 379-385.
- Wang, B., Gao, Z., Zou, Q., & Li, L. (2003). Quantitative Diagnosis of Fatty Liver With Dual-Energy CT. *Acta Radiologica*, *44*(1), 92-97.

- Wang, L., Xia, P., Lv, K., Han, J., Dai, Q., Li, X. M., ... & Jiang, Y. X. (2014). Assessment of renal tissue elasticity by acoustic radiation force impulse quantification with histopathological correlation: preliminary experience in chronic kidney disease. *European radiology*, 24(7), 1694-1699.
- White, S. L., Chadban, S. J., Jan, S., Chapman, J. R., & Cass, A. (2008). How can we achieve global equity in provision of renal replacement therapy?. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(3), 229-237.
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M., ... & Harrison, S. A. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140(1), 124-131.
- Williamson, R. M., Price, J. F., Glancy, S., Perry, E., Nee, L. D., Hayes, P. C., ... & Strachan, M. W. (2011). Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes care*, 34(5), 1139-1144.
- Wong, V. W. S., Vergniol, J., Wong, G. L. H., Foucher, J., Chan, H. L. Y., Le Bail, B., ... & Sung, J. J. Y. (2010). Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51(2), 454-462.
- Wong, V. W., Won, G. L., Chim, A. M., Chu, W. C., Yeung, D. K., Li, K. C., & Chan, H. L. (2013). Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol*, 12(2), 256-262.
- Yip, W. W., & Burt, A. D. (2006, November). Alcoholic liver disease. In *Seminars in diagnostic pathology* (Vol. 23, No. 3, pp. 149-160). WB Saunders.
- Yoneda, M., Suzuki, K., Kato, S., Fujita, K., Nozaki, Y., Hosono, K., ... & Nakajima, A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease: US-based acoustic radiation force impulse elastography. *Radiology*, 256(2), 640-647.
- Yoon, K. T., Lim, S. M., Park, J. Y., Ahn, S. H., Han, K. H., Chon, C. Y., ... & Kim, S. U. (2012). Liver stiffness measurement using acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography and effect of necroinflammation. *Digestive diseases and sciences*, 57(6), 1682-1691.
- Yoshioka, K., Hashimoto, S., & Kawabe, N. (2015). Measurement of liver stiffness as a non-invasive method for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research*, 45(2), 142-151.
- Zhang, D. K., Chen, M., Liu, Y., Wang, R. F., Liu, L. P., & Li, M. (2014). Acoustic radiation force impulse elastography for non-invasive assessment of disease stage in patients with primary biliary cirrhosis: A preliminary study. *Clinical radiology*, 69(8), 836-840.
- Zhang, L., Wang, F., Wang, L., Wang, W., Liu, B., Liu, J., ... & Chen, N. (2012). Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey. *The Lancet*, 379(9818), 815-822.