



Gastroenterología y Hepatología

www.elsevier.es/gastroenterologia



DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA MEDIANTE MARCADORES SÉRICOS DIRECTOS (ELF)

Marcadores serológicos de fibrosis

Guillermo Fernández-Varo

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Departamento de Fisiología I, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

PALABRAS CLAVE

Fibrosis hepática;
Cirrosis;
Biopsia hepática;
Marcadores no
invasivos;
Marcadores serológicos
bioquímicos

Resumen La biopsia hepática se ha considerado clásicamente como el estándar de referencia para evaluar el grado de fibrosis, ya que permite una medida directa de la fibrosis. Sin embargo, el riesgo inherente de complicaciones, limitaciones técnicas que provocan errores de muestreo y la variabilidad en las apreciaciones entre diferentes observadores han estimulado la búsqueda de métodos no invasivos que puedan reemplazar a la biopsia en el futuro. Se ha investigado el uso de pruebas de laboratorio clínico de rutina, y se han desarrollado y validado diferentes índices que combinan estos marcadores serológicos indirectos como herramientas no invasivas útiles y de bajo coste para detectar fibrosis significativa o cirrosis. Los marcadores serológicos directos son los que reflejan cambios en la composición de la matriz extracelular. Se han realizado estudios que analizan su rendimiento de forma individual, o en combinación con otros marcadores directos e indirectos en la detección de la gravedad y progresión de la fibrosis hepática, y en el seguimiento de los cambios relacionados con el tratamiento antiviral. En los últimos años, técnicas de imagen basadas en la medición de la rigidez hepática, como Fibroscan o ARFI, se han convertido en métodos rápidos y reproducibles para evaluar la fibrosis hepática. Recientemente, los resultados obtenidos combinando diferentes marcadores serológicos y técnicas de imagen muestran un mayor rendimiento diagnóstico y aparecen como una estrategia prometedora. En este artículo se revisan los marcadores bioquímicos no invasivos más referenciados, las alternativas más recientes y las perspectivas para su uso en la práctica clínica.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Correo electrónico: guillermo.fernandez@ciberehd.org

KEYWORDS

Liver fibrosis;
Cirrhosis;
Liver biopsy;
Noninvasive markers;
Biochemical serological
markers

Serological markers of fibrosis

Abstract Liver biopsy has classically been considered the gold standard to evaluate the degree of fibrosis, since it allows direct measurement of this entity. However, this technique carries an inherent risk of complications and observer variability and technical limitations can provoke sampling errors, all of which has prompted the search for alternative, noninvasive methods. The use of routine clinical laboratory tests has been investigated and various indexes that combine indirect serological markers have been developed and validated. These indexes are useful, low-cost, noninvasive tests to detect significant fibrosis or cirrhosis. Direct serological markers are those that reflect changes in the composition of the extracellular matrix. Several studies have analyzed the utility of these markers (either individually or combined with other direct and indirect markers) in the detection of the severity and progression of liver fibrosis and in the follow-up of changes related to antiviral therapy. In the last few years, imaging tests based on the measurement of liver stiffness, such as FibroScan or acoustic radiation force impulse (ARFI), have been found to be rapid and reproducible methods to evaluate liver fibrosis. Recently, the results obtained by combining distinct serological markers and imaging techniques have shown a higher diagnostic yield and this strategy seems promising. The present article reviews the most widely discussed noninvasive markers, the most recent alternatives, and the perspectives for their use in clinical practice.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El conocimiento de la magnitud de la fibrosis hepática es esencial para determinar la progresión de la enfermedad hepática, para establecer un pronóstico y para tomar decisiones en el tratamiento. En la actualidad, la biopsia hepática es el estándar de referencia para la detección de la fibrosis hepática. El examen histológico de la biopsia hepática permite la clasificación en etapas diferentes en función del grado de fibrosis. Sin embargo es un método invasivo que implica riesgos y está sujeto a error de muestreo debido al pequeño tamaño de la biopsia y la distribución heterogénea de la fibrosis en el hígado. Se ha descrito que en el 33% de los casos existía una diferencia de al menos un estadio histológico comparando 2 lóbulos en los pacientes con hepatitis crónica por virus C (VHC)¹⁻⁵. Además, los resultados varían según el observador y este procedimiento no permite una evaluación dinámica de la progresión de la fibrosis^{5,6}.

Estas limitaciones y la necesidad creciente de métodos para predecir con precisión la fase inicial de la enfermedad y la progresión de la fibrosis a lo largo del tiempo, han aumentado en los últimos años el interés en el desarrollo de métodos alternativos para el análisis no invasivo del grado de fibrosis hepática (tabla 1).

Marcadores serológicos de fibrosis hepática

Los marcadores serológicos tratan de establecer el grado de fibrosis y la actividad inflamatoria equivalente a la información proporcionada por la biopsia hepática. Estos biomarcadores son parámetros bioquímicos, que en unos casos aportan información sobre las alteraciones en la función hepática, denominados marcadores indirectos, y en otros

detectan modificaciones en el recambio de la matriz extracelular (MEC), llamados marcadores directos.

Un marcador ideal debería ser específico del hígado, sencillo y rápido de realizar, reproducible en cualquier laboratorio e independiente de cambios metabólicos y de alteraciones en la excreción urinaria y biliar. Además, debería estar estrechamente correlacionado con el contenido de la MEC, ser eficaz en todo el abanico de enfermedades hepáticas crónicas y ser suficientemente sensible para discriminar los diferentes estadios de la fibrosis, permitiendo el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta a las terapias antifibróticas. Actualmente, no hay ningún marcador serológico de fibrosis hepática que cumpla todos estos requisitos. Cuando se usan individualmente estos marcadores son útiles para el diagnóstico o la exclusión de la cirrosis, pero tienen una precisión limitada para el diagnóstico de fibrosis clínicamente significativa⁷. Ninguno es específico del hígado, y todos ellos se ven afectados por cambios en el metabolismo y la excreción. Para mejorar el rendimiento diagnóstico se han diseñado índices que combinan marcadores directos e indirectos (tabla 2).

Hasta hace pocos años, la utilización de los marcadores serológicos de fibrosis hepática se circunscribía a pacientes con VHC. Debido a los prometedores resultados obtenidos, el interés en el rendimiento diagnóstico de estos marcadores no invasivos de fibrosis se ha extendido a enfermedades hepáticas de diferente etiología.

Marcadores serológicos indirectos

Los marcadores indirectos son los clásicos marcadores serológicos bioquímicos obtenidos en el laboratorio clínico a partir de los análisis de rutina que reflejan las alteraciones en la función hepática y hematológica. Entre ellos encontramos la albúmina, las aminotransferasas, el recuento de

Tabla 1 Ventajas e inconvenientes de la biopsia hepática y de los marcadores serológicos de fibrosis en la enfermedad hepática crónica

	Ventajas	Inconvenientes
Biopsia hepática	Medición directa de la fibrosis Sistema de clasificación bien establecido Análisis de las alteraciones estructurales relacionadas con la fibrosis Evaluación de lesiones asociadas (inflamación, esteatosis, hierro) Variabilidad de muestreo (1/50.000 del hígado completo) Infravaloración del estadio de fibrosis (20% de los casos)	Invasiva y dolorosa (10-30%) Difícil de repetir Riesgo potencial para la vida debido a complicaciones (0,03%) incluyendo mortalidad (0,01%) Contraindicada en presencia de coagulopatía, trombocitopenia y ascitis
Marcadores serológicos	No invasivos Sin riesgos para el paciente Sin contraindicaciones Fáciles de repetir Reflejan potencialmente el estado del hígado completo Distinguen los rangos extremos de fibrosis Su combinación aumenta la precisión diagnóstica	Medición indirecta (marcadores indirectos de rutina) Baja sensibilidad en estadios iniciales de fibrosis Falta de especificidad por el hígado

Tabla 2 Índices que combinan marcadores de rutina en el laboratorio clínico y marcadores serológicos directos en el análisis de la fibrosis hepática en las enfermedades hepáticas crónicas más prevalentes

FibroTest®	α 2-macroglobulina, γ GT, apolipoproteína-A1, haptoglobina, bilirrubina, edad, sexo ^{8,9}	VHC/VHB//EGHNA
Índice Forns	Edad, recuento plaquetas, colesterol, γ GT ¹⁰	VHC/VHB
APRI	AST, recuento plaquetas ¹¹	VHC/VHB/EHA
FIB-4	Edad, AST, ALT, recuento plaquetas ¹²	VHC-VIH/VHB
HGM1/HGM2	Recuento plaquetas y AST (1/2), glucosa sérica (1), INR y fosfatasa alcalina (2) ¹³	VHC-VIH
Índice Benlloch	Tiempo protrombina, albúmina/proteínas totales, AST, tiempo desde trasplante ¹⁴	TH
Virahep-C	AST, recuento plaquetas, fosfatasa alcalina, edad ¹⁵	VHC
FibroIndex	Recuento plaquetas, AST, gamma-globulina ¹⁶	VHC
PGAA	Tiempo protrombina, γ GT, apolipoproteína A1, α 2-macroglobulina ¹⁷	EHA
Índice NFS	Edad, hiperglucemia, IMC, recuento plaquetas, albúmina, AST/ALT ¹⁸	EGHNA
BAA	TIMC, edad, ALT, triglicéridos ¹⁹	EGHNA/EHNA
FibroSpect®	α 2-macroglobulina, HA, TIMP-1 ³¹	VHC
SHASTA	HA, AST, albúmina ³²	VHC-VIH
Hepascore®	Bilirrubina, γ GT, HA, α 2-macroglobulina, edad, sexo ³³	VHC/EHA
Fibrometer®	Plaquetas, tiempo protrombina, AST, α 2-macroglobulina, HA, urea, edad ³⁴	VHC/VHB/EHA
ELF®	Edad, HA, PIIINP, TIMP-1 ^{35-41,44,53}	VHC/EHA/EGHNA/CBP/TH

γ GT: gamma glutamil transpeptidasa; ALT: alanino aminotransferasa; APRI: índice ratio aspartato/plaquetas; AST: aspartato aminotransferasa; EGHNA: enfermedad grasa del hígado no alcohólica; EHA: enfermedad hepática alcohólica; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; ELF®: índice European Liver Fibrosis; HA: ácido hialurónico; VHC: virus de la hepatitis C; VHC-VIH: coinfección hepatitis virus C y virus de la inmunodeficiencia humana; IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; MMP: metaloproteína de la matriz; PIIINP: propéptido aminoterminal del procolágeno III; TH: trasplante hepático y recurrencia hepatitis virus C; TIMP: inhibidor tisular de metaloproteinasas; VHB: virus de la hepatitis B.

plaquetas, la gamma glutamil transpeptidasa (γ GT), el colesterol, los triglicéridos, la bilirrubina total y la fosfatasa alcalina, el tiempo de protrombina y los tradicionales mar-

cadore séricos bioquímicos de inflamación, como la haptoglobina, α 2-macroglobulina y apolipoproteína-A1. Se han desarrollado marcadores indirectos de la fibrosis hepática

utilizando diferentes combinaciones de análisis clínicos de rutina. A continuación se mencionan algunos de los índices más referenciados.

- *FibroTest*[®]. Este índice está basado en la asociación, determinada mediante regresión logística, de 5 parámetros bioquímicos, la edad y el sexo, con la fibrosis⁸. Ha sido validado en cohortes de pacientes con VHC, identificando correctamente fibrosis leve o severa en el 46% de los pacientes. Asimismo, en pacientes con enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA), *FibroTest*[®] predijo eficazmente la existencia de fibrosis hepática avanzada⁹.
- *Índice Forns*. Es un modelo matemático que incluye los valores de colesterol, γ GT, recuento de plaquetas y la edad. Este índice predice con precisión la ausencia de fibrosis significativa y puede hacer innecesaria la biopsia hepática en más de un tercio de los pacientes con VHC¹⁰.
- *APRI*. Este marcador utiliza un cálculo simple que requiere únicamente 2 variables bioquímicas de rutina, aspartato aminotransferasa (AST) y el recuento de plaquetas¹¹, y se basa en la asociación existente entre fibrosis progresiva y una disminución del aclaramiento de AST y trombocitopenia.
- *FIB-4*. Incluye la edad, los valores de transaminasas y el recuento de plaquetas. Este índice puede predecir con exactitud la fibrosis hepática y reducir la necesidad de la biopsia hepática en la mayoría de los pacientes coinfectados por VHC y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, no ha sido validado para predecir F2, un estadio de fibrosis hepática con utilidad clínica significativa¹².
- *HGM1* y *HGM2*. Se diseñaron en el Hospital Gregorio Marañón para predecir fibrosis significativa (HGM1) y fibrosis avanzada (HGM2) en 296 pacientes coinfectados con VHC y VIH que no habían recibido previamente tratamiento anti-VHC¹³. En pacientes coinfectados, los autores confirmaron que HGM2 predecía fibrosis avanzada, pero HGM1 era menos preciso en la predicción de la ausencia de fibrosis significativa.
- *Índice Benlloch*. Es un modelo predictivo utilizado para calcular la probabilidad de fibrosis hepática significativa en pacientes receptores de trasplante hepático (TH) con recurrencia de VHC. El modelo está basado en la combinación de 3 parámetros disponibles en el laboratorio y de una variable clínica, el tiempo transcurrido desde el TH. Es un índice sencillo que ha demostrado buenos porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativos¹⁴.

Se han propuesto muchos otros índices que combinan parámetros clínicos de rutina en VHC, EHA y EGHNA¹⁵⁻¹⁹. Los resultados obtenidos en diferentes cohortes de pacientes con VHC crónica indican que los índices que combinan parámetros indirectos pueden confirmar o excluir la presencia de fibrosis significativa en aproximadamente el 35% de pacientes, pero no pueden distinguir los diferentes estadios de fibrosis con precisión^{20,21}. Aunque en algunos casos este porcentaje puede ser superior al 50%, el mayor inconveniente de los marcadores indirectos es su falta de sensibilidad para identificar a los pacientes con grados leves de fibrosis, pero con riesgo de progresar a estadios más avanzados.

Marcadores serológicos directos

La fibrosis hepática progresa cuando se produce un desequilibrio entre la degradación y la producción de la MEC²². Los marcadores directos reflejan el metabolismo de la MEC y los cambios cuantitativos y cualitativos en sus macromoléculas. Algunos de estos marcadores reflejan fibrogénesis y otros fibrólisis. Cuando se produce una lesión hepática crónica se incrementa la expresión de citocinas profibrogénicas y la síntesis de los constituyentes de la MEC, glucoproteínas y polisacáridos como el ácido hialurónico (HA), elastina y fibronectina. Además se incrementa la producción de enzimas involucradas en la síntesis de la MEC (lisil oxidasa, prolil hidroxilasa y lisil hidroxilasa) y en su degradación, como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP). Este proceso provoca un aumento de los productos de la maduración y de la degradación de colágeno y de sus precursores, los propéptidos generados por el proceso de maduración de estas moléculas y su incorporación en el tejido fibrótico, como los propéptidos del colágeno tipos I y III y del colágeno tipo IV.

Marcadores directos como HA, TIMP-1 y el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) han demostrado ser muy prometedores. HA es un componente integral de la MEC. Existe una buena correlación entre los valores de HA y la gravedad de la enfermedad hepática. Sin embargo, mientras que HA tiene una excelente capacidad para identificar el estadio de fibrosis F4, es menos útil para la diferenciación de las primeras etapas de la fibrosis²³⁻²⁸. Por otro lado, TIMP-1 es uno de los 4 inhibidores tisulares de las MMP. Se ha descrito que valores elevados de MMP y TIMP se correlacionan bien con cirrosis²⁷⁻³⁰. El PIIINP es un buen predictor de la fibrosis en pacientes con VHC, pero su capacidad para diferenciar el estadio F4 y las primeras etapas de la fibrosis es menor que la del HA²⁶⁻²⁹. Para intentar mejorar la precisión en la identificación de fibrosis significativa y cirrosis se han diseñado índices que combinan marcadores bioquímicos directos e indirectos. Algunos de los más relevantes se detallan a continuación.

- *FibroSpect*[®]. Este índice incluye HA, TIMP-1 y α 2-macroglobulina. Fue evaluado por el grupo de McHutchinson en un estudio retrospectivo de 696 pacientes con VHC³¹. El análisis permitió la diferenciación de los pacientes con fibrosis significativa, aunque sin distinguir entre las diferentes etapas de la fibrosis.
- *SHASTA*. Mediante la combinación de HA, AST y albúmina, este marcador clasificó de forma exacta fibrosis leve y significativa en pacientes coinfectados por VHC y VIH³².
- *Hepascore*[®]. Este índice considera la edad, el sexo y los valores séricos de bilirrubina total, γ GT, HA y α 2-macroglobulina. Permite discriminar entre fibrosis significativa y cirrosis en pacientes con VHC y con enfermedad hepática alcohólica (EHA)³³.
- *Fibrometer*[®]. Combina 5 parámetros bioquímicos indirectos, el HA y la edad. Se ha utilizado en pacientes con VHC y con EHA, obteniendo buenos resultados en la detección de fibrosis significativa³⁴.
- *ELF*[®]. Se han desarrollado varios algoritmos matemáticos que combinan únicamente marcadores bioquímicos directos. El Grupo Europeo de Fibrosis Hepática llevó a cabo un estudio multicéntrico internacional en una co-

horte de 1.021 pacientes con VHC, EGHNA y EHA. Se analizó el rendimiento del algoritmo ELF (*enhanced liver fibrosis*), que incluía la edad y combinaba los valores séricos de HA, PIIINP y TIMP-1. Se constató que este marcador puede identificar a los pacientes con fibrosis hepática significativa en una amplia gama de enfermedades crónicas del hígado. La exactitud de este algoritmo fue similar a la de los análisis de las biopsias realizadas por 3 patólogos expertos en hígado³⁵.

En 2008 se validó la puntuación obtenida por el algoritmo original ELF y el resultado obtenido por una versión simplificada de este marcador, que incluye los 3 parámetros mencionados pero no tiene en cuenta la edad, en una cohorte de pacientes con EGHNA. No se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos por los 2 algoritmos en cada una de las diferentes etapas de la fibrosis. Además, el rendimiento del marcador ELF fue mayor que el ofrecido por otros marcadores séricos, independientemente del estadio de fibrosis³⁶. En este sentido, los marcadores bioquímicos directos han sido validados en EGHNA pediátrica, cirrosis biliar primaria, EHA y en pacientes con VHC durante el tratamiento antiviral³⁷⁻⁴⁰.

Recientemente se ha validado y comparado el rendimiento diagnóstico de los índices Forns, APRI, FIB-4 y ELF para predecir la severidad y evaluar los cambios en la fibrosis hepática después del tratamiento antiviral⁴¹. Los resultados indicaron que los marcadores indirectos y el algoritmo ELF son precisos en la identificación de fibrosis significativa y cirrosis en pacientes con VHC. Por otra parte, la menor puntuación del algoritmo ELF después del tratamiento antiviral se asoció con la eliminación del virus en la MEC.

Los marcadores bioquímicos indirectos^{20,42} han demostrado limitaciones en el caso de pacientes que recibieron TH, puesto que algunas de las variables incluidas pueden ser alteradas por causas no relacionadas con la progresión de la fibrosis. Datos preliminares sugirieron que el uso de marcadores bioquímicos directos de fibrosis podría ser útil para identificar pacientes infectados con VHC con rápida progresión de la fibrosis después de TH⁴³. En 2010 se describió que los marcadores directos HA, TIMP-1 y PIIINP medidos 6 meses después del TH pueden discriminar con precisión a los pacientes con recurrencia de VHC leve y progresiva. Se constató que los valores del marcador ELF a los 6 meses podían predecir qué pacientes desarrollarían fibrosis hepática 1 año después del trasplante, permitiendo la adopción de decisiones terapéuticas en la fase inicial⁴⁴.

Combinación de marcadores serológicos y técnicas de imagen

Como se ha descrito anteriormente, actualmente están disponibles muchos marcadores serológicos no invasivos de fibrosis hepática con similar potencial diagnóstico en la identificación de pacientes con enfermedad hepática avanzada. En los últimos años, técnicas de imagen como Fibroscan® y ARFI (*acoustic radiation force impulse*, Virtual Touch®, Siemens), basadas en la medición de la rigidez del hígado mediante ultrasonidos, se han convertido en métodos rápidos y reproducibles para evaluar la fibrosis hepática. Sus princi-

pales inconvenientes son una limitada disponibilidad en los centros de salud y la necesidad de formación de los profesionales que utilizan estos sistemas. Con el objetivo de mejorar la exactitud diagnóstica de los métodos no invasivos y reemplazar la biopsia hepática como técnica de referencia, recientemente se ha investigado el potencial de la combinación de diferentes marcadores serológicos y técnicas de imagen. Estudios recientes muestran los buenos resultados obtenidos individualmente por FibroScan® en la detección de la fibrosis hepática^{45,46} y en su combinación con marcadores serológicos⁴⁷. Sin embargo, la medición de la rigidez del hígado puede ser difícil en los pacientes obesos o con un espacio intercostal estrecho, y puede ser imposible en pacientes con ascitis^{48,49}. La precisión diagnóstica y utilidad clínica de FibroScan® y de varios marcadores séricos indirectos para predecir fibrosis hepática significativa y cirrosis en pacientes con VHC se evaluó en un estudio multicéntrico prospectivo⁵⁰. Este estudio estableció que las pruebas no invasivas, especialmente FibroScan®, pueden ser útiles en la predicción de la cirrosis, pero pobres en el caso de la fibrosis significativa. Diversos estudios han analizado el rendimiento del dispositivo ARFI^{51,52}, pero el primer trabajo publicado que comparó su rendimiento con los marcadores serológicos se llevó a cabo en el Hospital Clínic de Barcelona⁵³. Se evaluó el rendimiento del marcador ELF y de los métodos basados en ultrasonidos mencionados anteriormente en el análisis de la fibrosis hepática en pacientes trasplantados y no trasplantados utilizando la biopsia hepática como estándar de referencia. La combinación del algoritmo ELF con ARFI o FibroScan® aumentó los valores predictivos positivos y negativos obtenidos por las pruebas por separado en el diagnóstico de fibrosis significativa y cirrosis. Los resultados sugirieron que la combinación de ARFI o FibroScan® con el ELF podría ayudar a identificar mejor a los pacientes con o sin fibrosis significativa o cirrosis.

Los marcadores serológicos se convertirán en una herramienta importante en la práctica clínica. Aunque la biopsia hepática siga utilizándose en el diagnóstico y clasificación de los pacientes, es probable que en un futuro los marcadores serológicos cobren protagonismo en la detección de los pacientes con fibrosis y, junto con las técnicas de imagen, en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

Agradecimientos

El trabajo en nuestro laboratorio fue apoyado por becas de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF09-08839 a W. Jiménez) y de la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (SGR 2009/1496). El Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) está financiado por el Instituto de Salud Carlos III. El autor agradece a Siemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY) el generoso suministro de reactivos para medir los marcadores de fibrosis.

Conflicto de intereses

El autor declara haber recibido un Research Fellowship de Bayer Diagnostics entre 2005 y 2007.

Bibliografía

1. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med.* 2001;344:495-500.
2. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol.* 2003;39:239-44.
3. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al; LIDO Study Group. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2005;128:1898-906.
4. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997;349:825-32.
5. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2614-8.
6. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:1449-57.
7. Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, et al. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005;41:1376-82.
8. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet.* 2001;357:1069-75.
9. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-Fibro-SURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:6.
10. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology.* 2002;36:986-92.
11. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple non-invasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:518-26.
12. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 2006;43:1317-25.
13. Berenguer M, Bellón JM, Miralles P, Álvarez E, Sánchez-Conde M, Cosín J, et al. Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. *J Viral Hepatitis.* 2007;14:859-69.
14. Benlloch S, Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, Aguilera V, Berenguer J. Prediction of fibrosis in HCV-infected liver transplant recipients with a simple noninvasive index. *Liver Transpl.* 2005;11:456-62.
15. Fontana RJ, Kleiner DE, Bilonick R, Terrault N, Afdhal N, Belle SH, et al. Modeling hepatic fibrosis in African American and Caucasian American patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2006;44:925-35.
16. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. Fibrolindex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2007;45:297-306.
17. Naveau S, Poynard T, Benattar C, Bedossa P, Chaput JC. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest. *Dig Dis Sci.* 1994;39:2426-32.
18. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45:846-54.
19. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology.* 2000;118:1117-23.
20. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006;44:462-74.
21. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, et al. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2007;46:775-82.
22. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:437-51.
23. Guechot J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboudeau J, Poupon R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol.* 1995;22:22-6.
24. Korner T, Kropf J, Gressner AM. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol.* 1996;25:684-8.
25. Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, Deydier R, Renou C, Botta-Fridlund D, et al. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol.* 2005;4:6.
26. Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem.* 1996;42:558-63.
27. Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadham D, Sterling RK et al. Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008;47:789-98.
28. Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2001;36:399-406.
29. Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, et al. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat.* 2006;13:643-51.
30. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta.* 2002;316:71-81.
31. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hézode C, Oh E, Smith KM, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate to advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol.* 2004;41:935-42.
32. Kelleher TB, Mehta SH, Bhaskar R, Sulkowski M, Astemborski J, Thomas DL, et al. Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV coinfected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *J Hepatol.* 2005;43:78-84.
33. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem.* 2005;51:1867-73.
34. Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology.* 2005;42:1373-81.
35. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al; European Liver Fibrosis Group. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2004;127:1704-13.
36. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in non-alcoholic fatty

- liver disease: validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008;47:455-60.
37. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136:160-7.
 38. Mayo MJ, Parkes J, Adams-Huet B, Combes B, Mills AS, Markin RS, et al. Prediction of clinical outcomes in primary biliary cirrhosis by serum enhanced liver fibrosis assay. *Hepatology*. 2008;48:1549-57.
 39. Lieber CS, Weiss DG, Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32:1031-9.
 40. Fontana RJ, Bonkovsky HL, Naishadham D, Dienstag JL, Sterling RK, Lok AS, et al. Serum fibrosis marker levels decrease after successful antiviral treatment in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:219-26.
 41. Martínez SM, Fernández-Varo G, González P, Sampson E, Bruguera M, Navasa M, et al. Assessment of liver fibrosis before and after antiviral therapy by different serum marker panels in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:138-48.
 42. Pungpapong S, Nunes DP, Krishna M, Nakhleh R, Chambers K, Ghabril M, et al. Serum fibrosis markers can predict rapid fibrosis progression after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl*. 2008;14:1294-302.
 43. Toniutto P, Fabris C, Bitetto D, Falletti E, Avellini C, Rossi E, et al. Role of AST to platelet ratio index in the detection of liver fibrosis in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1904-8.
 44. Carrión JA, Fernández-Varo G, Bruguera M, García-Pagán JC, García-Valdecasas JC, Pérez-Del-Pulgar S, et al. Serum fibrosis markers identify patients with mild and progressive hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2010;138:147-58.
 45. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*. 2003;29:1705-13.
 46. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut*. 2007;56:968-73.
 47. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;128:343-50.
 48. Foucher J, Castéra L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:411-2.
 49. Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, Häussinger D. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology*. 2008;47:592-5.
 50. Degos F, Pérez P, Roche B, Mahmoudi A, Asselineau J, Voitot H, et al. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: a multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *J Hepatol*. 2010;53:1013-21.
 51. Palmeri ML, Wang MH, Rouze NC, Abdelmalek MF, Guy CD, Mosser B, et al. Non-invasive evaluation of hepatic fibrosis using acoustic radiation force based shear stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2011;55:666-72.
 52. Rizzo L, Calvaruso V, Cacopardo B, Alessi N, Attanasio M, Petta S, et al. Comparison of transient elastography and acoustic radiation force impulse for non-invasive staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:2112-20.
 53. Crespo G, Fernández-Varo G, Mariño Z, Casals G, Miquel R, Martínez SM, et al. ARFI, FibroScan, ELF, and their combinations in the assessment of liver fibrosis: a prospective study. *J Hepatol*. 2012;57:281-7.