

“Estudio Multicéntrico: Evaluación de la asociación de fibrosis hepática significativa en pacientes con esteatosis hepática y diabetes tipo II ”

Investigadores

- Diego Arufe
- Maria Pia Raffa
- Marcelo Silva

Introducción

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DBT 2) representa un problema mayor para la salud publica a nivel mundial. Según datos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en 2017 la prevalencia ajustada de diabetes en la región (latinoamérica) era de 9,2% en adultos entre 20-79 años (1). El crecimiento del número de casos esperado (62%) para 2045 es mayor en los países de latinoamérica que el pronosticado en otras regiones (1). Según el mismo documento, en Argentina la prevalencia es del 6,2%, provocando 15.545 muertes/año en adultos (20-79 años)(1). La esteatosis hepática es el resultado de la acumulación de triglicéridos en el hígado provenientes de la dieta, de los ácidos grasos derivados de la lipólisis periférica y de la *nov*o lipogénesis como consecuencia de la ingesta excesiva de hidratos de carbono. El Hígado graso no alcohólico (HGNA) se define como la presencia de esteatosis (>5% de hepatocitos por histología) en ausencia de causas secundarias que puedan generarlo como, consumo crónico de alcohol, infección crónicas por hepatitis virales, consumo de medicamentos (ej. corticoides, metrotexate, Valproato, etc.) o enfermedades hepáticas autoinmunes(2). Representa la enfermedad hepática crónica mas frecuente con una prevalencia a nivel mundial que oscila entre el 24-25%(3). En Estados Unidos, la cirrosis asociada a la esteatohepatitis es la segunda causa de indicación de trasplante hepático (4). Se estima que el gasto en salud asociado a HGNA es cercano a los 103 billones de dólares anuales (5). El HGNA comprende un amplio espectro clínico e histológico; desde esteatosis simple hasta la presencia esteatohepatitis y fibrosis. Los pacientes con esteatosis simple tienen buen pronóstico, sin embargo aquellos que desarrollan esteatohepatitis tienen mayor riesgo de progresar a enfermedad hepática crónica (6). El evento de mayor relevancia clínica en la historia natural del HGNA es la aparición de fibrosis hepática (6–10). El desarrollo de fibrosis se relaciona con aumento de en la mortalidad global y por enfermedad hepatica específicamente. Se estima que el estadio temprano de fibrosis hepatica ($\geq$ F2) aumenta la mortalidad con respecto a los pacientes sin fibrosis, independientemente de la presencia o no de EHNA (7,10). La DBT2 ha sido identificada como uno de los principales factores de riesgo de progresión hacia la esteatohepatitis y la fibrosis hepática (11–13). Se conocen ampliamente los distintos órganos blanco que afecta la

diabetes. La retina, los riñones y el aparato cardiovascular son algunos de los parénquimas conocidamente afectados por la DBT2. En general, en la comunidad médica, no se reconoce la asociación entre la DBT2 y HGNA. Mas aún, se desconoce que la presencia de DBT2 sea un factor de riesgo vinculado a la progresión de HGNA a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)(12). En pacientes con DBT2 la prevalencia de HGNA y EHNA es del 22,5% y 43,6%, respectivamente(3). En distintos trabajos se ha reportado que la prevalencia de fibrosis avanzada es de un 17-18 % en pacientes con DBT2 (14,15) (diagnostico por métodos no invasivos)

Por lo antes mencionado resulta relevante estudiar la presencia de fibrosis en los pacientes con diabetes 2 y evaluar cuales son los factores que favorecen su aparición. La detección de fibrosis hepática en pacientes con DBT2 podría ser el marcador clínico que impulse el inicio de una terapéutica farmacológica específica para evitar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto el objetivo del estudio es estimar la prevalencia de fibrosis hepática significativa ($\geq F2$) en pacientes con DBT2. A su vez, intentaremos identificar factores asociados al desarrollo de fibrosis.

1. Objetivos

Objetivo primario:

- Evaluar la asociación entre diabetes II y fibrosis significativa ($\geq F2$)

Objetivos secundarios

- Identificar factores de riesgo asociados al desarrollo de fibrosis hepática.
- Evaluar la correlación de la pruebas de fibrosis no invasivas séricas con la elastografía

2. Relevancia clínica del estudio

Establecer la relación entre la dbt2 y el desarrollo de fibrosis hepática resulta relevante, ya que si se comprueba esta relación se podría establecer un nuevo paradigma en el cuidado de los pacientes con diabetes 2, incluyendo al hígado en la lista de órganos afectados por la diabetes. Esto ayudaría a implementar medidas higiénico-dietéticas y farmacológicas que eviten la progresión hacia la cirrosis. En la actualidad no se cuenta con estudios locales que hayan abordado este tema

3. Materiales y Métodos

Población

Se incluirán pacientes entre 35-75 años con esteatosis hepática detectada con ecografía, tomografía computada o resonancia magnética y al menos 1 factor de riesgo cardiovascular con y sin diagnóstico de DBT2. Se toma la edad de 35 años porque la prevalencia reportada de EHNA con fibrosis en pacientes < 35 años es muy baja.

Ámbito

Estudio multicéntrico de pacientes con esteatosis hepática y factores de riesgo cardiovasculares con o sin diabetes. Será dirigido por el servicio de Hepatología del Hospital Universitario Austral.

Diseño

Es un estudio Multicéntrico, observacional, prospectivo y longitudinal en pacientes con factores de riesgo cardiovasculares con o sin diabetes tipo 2. Período del estudio 30/09/2020 hasta 1/10/2021.

Criterios de inclusión

- 1) Pacientes que puedan comunicarse y comprender las indicaciones del investigador y que otorgue el consentimiento para llevarlo a cabo.

- 2) Pacientes entre 35 -75 años
- 3) Esteatosis Hepática detectada por ecografía, tomografía computada o resonancia magnetica.
- 4) Los pacientes con diabetes 2 que se encuentran en tratamiento con hipoglucemiantes orales (metformina, sulfonilureas, Inhibidores de DPP-4, Inhibidores de SGLT-2 o insulina) deben presentar dosis estables en los últimos 2 meses antes del enrolamiento.
- 5) Los niveles de hemoglobina deben ser al menos de 11 g/l (hombres) o 10 gr/l (mujeres), recuento leucocitario de al menos 3000 cells/L, Neutrofilos al menos de 1.500 cells/L, plaquetas al menos de 100.000 cells/L, Albumina >2,5 gr/L, Creatinina menor a 2,5 mg/dl, TGO y TGP no mayor a 8 veces el limite superior normal.

Criterios de exclusión

- 1) Paciente que tengan un consumo de alcohol mayor a 21 drinks/semana (hombres) o 14 drinks/semana (mujeres).
- 2) Pacientes con diagnostico de otra enfermedad hepática crónica como hepatitis virales, hepatitis autoinmune, Colangitis Biliar Primaria, Colangitis Esclerosante Primaria, Enf. De Wilson, Déficit de alfa1 antitripsina, Hemocromatosis)
- 3) Paciente con enfermedad oncológica activa
- 4) Paciente con dispositivo medico implantable (cardiodesfibrilador o marcapasos)
- 5) Pacientes con serología positiva HIV.
- 6) Pacientes que consuman fármacos que generen esteatosis (corticoides, metotrexate, tamoxifeno, amiodarona, Ac valproico)
- 7) Antecedentes de enfermedad cardiaca, pulmonar o renal clínicamente significativa.
 - a. Enfermedad cardiaca: Insuficiencia cardiaca (clasificación New York Heart Association- NYHA)
 1. Clase funcional III: Pacientes con enfermedad cardiaca que produce una marcada limitación de la actividad física. No presentan síntomas en reposo.

Una actividad menor a lo normal causa fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.

2. Clase funcional IV: Pacientes con enfermedad cardiaca que resulta en la incapacidad de realizar cualquier actividad física sin molestias. Los síntomas de insuficiencia cardiaca o angina pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza algún actividad física aumenta la incomodidad

b. Enfermedad Pulmonar Obstructiva crónica (EPOC) (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease).

1. Gold 4: VEF 1: < 30% del predicho

c. Insuficiencia Renal Cronica (Kidney Improving Global Outcomes)

1. Clearance de creatinina de 24 hs < 30 ml/min

8) Pacientes que estén bajo tratamiento con pioglitazona o Análogo GLP-1

9) Pacientes con insuficiencia cardiaca derecha diagnosticado por ecoardiograma (TAPSE < 16 mm, dilatación del ventrículo derecho, movimiento paradójico del septum).

10) Presencia de diabetes tipo 1 u otro tipo de diabetes 2

11) Antecedentes de cirugía bariátrica

12) Requerimiento de nutrición parenteral total en los últimos 6 meses

13) Mujeres cursando embarazo (de cualquier edad gestacional)

14) BMI $\geq$ 50 Kg/m²

Metodología

Se enrolarán pacientes consecutivos que concurren a consultorios externos con diagnostico de esteatosis + 1 factor de riesgo cardiovascular (Tabaquismo, Hipertensión Arterial, Dislipemia, Sobrepeso, Obesidad, Sedentarismo, Diabetes).

Visita:

El día de la primera visita se le explicará al paciente en forma detallada el propósito del estudio y los resultados que esperamos del mismo. Luego se le

dará para firmar el consentimiento informado. Se realizará interrogatorio acerca hábitos como tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol. La valoración del consumo de alcohol se realizará a través del cuestionario AUDIT. En caso que el resultado del AUDIT sea positivo se cuantificará el nivel de consumo semanal de alcohol en drinks/UBE (*ver en definiciones*). Otros datos que se recabarán en el interrogatorio son acerca de la medicación habitual y antecedentes médicos. A su vez se tomarán medidas antropométricas (*ver definiciones*)

En caso de disponer con equipamiento se realizará parámetro de atenuación grasa (**CAP**-Controlled Attenuation Parameter).

Elastografía:

Se realizará elastografía transicional con equipo fibroscan o livtouch. Se requerirán al menos 6 hs de ayuno. La elastografía es un procedimiento no invasivo que no implica ningún riesgo ni incomodidad para el paciente. El estudio se realiza de acuerdo a las recomendaciones internacionales (16). Se coloca al paciente en decúbito supino, se solicita que coloque el brazo derecho por encima de su cabeza y que mantenga la respiración al momento de las mediciones. El tiempo que lleva el estudio es de 10-20 minutos. Se informará como resultado final la mediana de 10 determinaciones. El resultado se informa en Kilopascuales (kPa). Para que la calidad de la estudio sea adecuada la relación IQR/mediana deberá ser menor al 30%. La valoración de la esteatosis se realiza con la misma sonda que la elastografía y también se informará como resultado final la mediana de 10 determinaciones. El resultado se informa como decibeles/metro (db/m). Para que la calidad del estudio sea adecuada la relación IQR/mediana deberá ser menor al 30%. La elastografía mide el grado de rigidez hepática (fibrosis) y el CAP el grado de esteatosis hepática.

En los pacientes con DBT2 se evaluará si tienen compromiso microvascular según la practica estandarizada y recomendada (17). La retinopatía con historia clínica y con un examen oftalmológico realizado por un oftalmólogo, idealmente dentro de los 3 meses del enrolamiento. Se solicitará microalbuminuria para evaluar la nefropatía diabética. La neuropatía será evaluada por el investigador a través de la historia clínica y examen físico. La enfermedad cardiovascular será evaluada con la historia clínica, examen físico

y la revisión de la historia clínica. Si el paciente cuenta con ECG y con evaluación del espesor de intima media será incorporado a la ficha del estudio de investigación.

Si el paciente tiene una ecografía dentro de los 3 meses previos a la inclusión se usará esa Ecografía. En caso de no contar con la misma se realizará el mismo día por un operador distinto al que realizó la elastografía y el CAP.

Se realizará biopsia hepática percutánea según criterios clínicos y de acuerdo con los algoritmos de diagnóstico de HGNA se realizará. La valoración de la misma se llevará a cabo de acuerdo al NASH Clinical Research Network system(18)

Una vez completada la entrevista se entregará orden para extracción de sangre (*ver definiciones*).

4. Análisis estadístico

El análisis de los datos estará a cargo de los investigadores del estudio. Se tomará un valor estadístico a dos colas, tipo I de 5% (valor de $p < 0,05$) y un error tipo II de 0,20 (poder 80%). Las variables binarias o dicotómicas se expresarán en frecuencias o proporciones y se compararán mediante test de Chi cuadrado o test de Fisher, según corresponda. Para las variables numéricas discretas y continuas se expresarán de acuerdo a su distribución como medias (desvío estándar) o medianas (rango intercuartilo), y se compararán mediante T-student o Wilcoxon, según corresponda. En caso de comparaciones múltiples, para variables continuas, se realizará un test paramétrico de ANOVA, con corrección por Bonferroni. Se realizará un análisis multivariado de regresión Cox, con cálculo de Hazards Ratios y respectivos intervalos de confianza del 95%, para la identificación de variables de riesgo desarrollo de del evento primario con el fin de evaluar potenciales variables confundidoras y/o modificadores del efecto. Todos los análisis estadísticos antes mencionados se realizarán mediante STATA version 13.0.

Tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral para una prevalencia esperada del 17% según lo antes mencionado en la literatura (14). Se tomó un valor estadístico

a dos colas, tipo I de 5% (valor de $p < 0,05$), un poder tipo II de 0,10 (poder 90%). Se estimó un tamaño muestral mínimo de 217 pacientes.

5. Ética y Buenas Practicas Clínicas

Este estudio ha sido planeado y se llevará a cabo de acuerdo a los principios de la Buena Práctica Clínica, la declaración de Helsinki, y la legislación nacional y las regulaciones existentes para la realización de los estudios clínicos. El estudio no puede ser iniciado sin la aprobación escrita del Comité de Ética Institucional /Comité de Ética Independiente.

Definiciones:

- **Diabetes:** Se tomara para el diagnostico de diabetes la guías de practica clínica de la sociedad americana de diabetes. **Diagnostico de Diabetes** de acuerdo a las guías de Asociación Americana de Diabetes 2017: Glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl o Glucemia ≥ 200 mg/dl 2 hs luego de PTOG o Hb Glicosilada $> 6,5\%$ o paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o glucemia al azar ≥ 200 mg/dl:
- **Esteatosis:** Aumento difuso de la ecogenicidad en comparación con la ecogenicidad del parénquima renal. La valoración del grado de esteatosis (leve, moderada o severa) quedará a consideración del medico ecografista.
- Fórmula para el calculo de **DRINKS** : **Mililitros de OH consumidos x % graduación alcohólica / 17,7 /100:** Drinks/día.
- **Medidas Antropométricas:** altura (cm), peso (Kg), perímetro abdominal (cm) (*Punto medio entre el margen inferior de la ultima costilla y la*

cresta iliaca), Tensión Arterial (en ambos brazos luego de 15 minutos de reposo) y Body mass index (BMI). **(ver anexo 1)**

- **Determinaciones de laboratorio:** Hemograma, glucemia (mg/dl), hemoglobina glicosilada (%), creatinina (mg/dl), Urea (mg/dl), Sodio (mEq/l), Potasio (mEq/l), Acido Urico (mg/dl), LDL (mg/dl), HDL (mg/dl), Triglicéridos (mg/dl), Ferritina (mg/dl), Saturación de transferrina (%), TIBC, Ferremia, TGO UI/l. TGP UI/l, FAL UI/l, GGT UI/l, Proteína C reactiva. Eritrosedimentación, Albumina g/dl, Proteínas totales g/dl, proteinograma (gr/dl), Insulinemia, HOMA, Acidos Grasos, HCV, Ag HBs, Ac Hbc, HIV, proteinuria de 24 hs, microalbuminuria y clearance de creatinina. Se obtendrán score de fibrosis (fib-4, NAFLD score, APRI, FAST).

- **Elastografía:** Elastografía Transicional. Método no invasivo para la estimación de fibrosis hepática.

- No fibrosis: <7,3 kPa
- Fibrosis significativa: 7,4-9,7 kPa
- Fibrosis Avanzada: >9,8 kPa
- Cirrosis: >17,5 kPa

Se definirá como **fibrosis ≥2** cuando el valor de elastografía sea superior a 7,4 kPa.

- **Fibrosis significativa:** Se definirá como fibrosis grado 2
- **Atenuación Grasa:** La atenuación grasa cuantifica la cantidad de esteatosis de forma no invasiva. La misma se obtiene en el mismo momento en el que se realiza la elastografía. Se informa en db/m. Los grados de esteatosis.
 - NO esteatosis: <240 db/m
 - Esteatosis Leve: 240-265 db/m

- Esteatosis moderada: 266-295 db/m
- Esteatosis severa: > 296 db/m

Bibliografía

1. Diabetes AL de. Guías ALAD sobre diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia. Rev la Asoc Latinoam Diabetes. 2013;17–128.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018;67(1):328–57.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. Hepatology. 2016;64(1):73–84.
4. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. Gastroenterology [Internet]. 2011;141(4):1249–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.061>
5. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. Hepatology. 2016;64(5):1577–86.
6. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review. JAMA - J Am Med Assoc. 2015;313(22):2263–73.
7. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology. 2015;149(2):389–397.e10.
8. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. Hepatology. 2015;61(5):1547–54.
9. Albhaisi S, Sanyal A. Recent advances in understanding and managing non-alcoholic fatty liver disease [version 1; referees: 2 approved].

F1000Research. 2018;7(0):1–11.

10. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017 May 1;65(5):1557–65.
11. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol* [Internet]. 2015;62(5):1148–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.034>
12. Bril F, Cusi K. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The New Complication of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2016;45(4):765–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.005>
13. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, Nader F, Srishord M, Rafiq N, et al. Independent Predictors of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2009;7(11):1224-1229.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2009.06.007>
14. Koehler EM, Plompen EPC, Schouten JNL, Hansen BE, Darwish Murad S, Taimr P, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. *Hepatology*. 2016;63(1):138–47.
15. Kwok R, Choi KC, Wong GLH, Zhang Y, Chan HLY, Luk AOY, et al. Screening diabetic patients for non-Alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: A prospective cohort study. *Gut*. 2016;65(8):1359–68.
16. Ferraioli G, Filice C, Castera L, Choi BI, Sporea I, Wilson SR, et al. WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 3: Liver. *Ultrasound Med Biol*. 2015 May 1;41(5):1161–79.
17. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*. 2019 Jan 1;42:S90–102.
18. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–21.

Pacientes que concurren a la unidad cardiometabólica con factores de riesgo cardiovasculares. 2 grupos de pacientes

a. Pacientes con factores de riesgo cardiovasculares *y diabetes 2*

b. Pacientes con factores de riesgo cardiovasculares *sin diabetes 2*