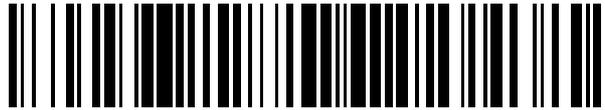


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 775**

51 Int. Cl.:

G01N 21/35 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/EP2012/069276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045670**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12766107 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2761271**

54 Título: **Método para medir un valor biológico de un hígado**

30 Prioridad:

29.09.2011 EP 11306256

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.03.2019

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
SYNCHROTRON SOLEIL (33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11 (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LE NAOUR, FRANÇOIS;
DUMAS, PAUL y
GUETTIER, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 705 775 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para medir un valor biológico de un hígado

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para medir un nivel de lípidos en el hígado.

10 **Estado de la técnica**

10 La enfermedad del hígado graso abarca un amplio espectro de condiciones clínicas tales como el alcoholismo, ingesta de drogas, cirugía de by-pass del intestino delgado o síndrome metabólico y también se asocia con frecuencia con la hepatitis C crónica. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) que se sabe está asociada con la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, hipertrigliceridemia, hipertensión arterial en el síndrome metabólico es probablemente la causa más común de la enfermedad hepática crónica en los países occidentales. La enfermedad del hígado graso es también una complicación potencial a largo plazo del trasplante de hígado.

20 El espectro clínico-histológico de NAFLD incluye hígado graso no alcohólico (NAFL), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y esteatofibrosis. Las estimaciones obtenidas a partir de series clínicas, estudios de autopsia y muestras de conveniencia de la población general sugieren que hasta un 30 % de las personas en los países occidentales podrían tener hígado graso no alcohólico (Neuschwander-Tetri de 2003, Torres, 2008). La NASH se ha estimado que afecta a un 5 % -7 % de la población general. La NASH puede progresar a cirrosis en hasta el 15 % de los pacientes con un riesgo potencial de progresión a la insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular. Por lo tanto, la NAFLD es ahora reconocida como una de las principales causas de cirrosis en los países occidentales.

25 Mientras que la esteatosis es reversible y que actualmente se considera inocua en su forma pura, algunos pacientes con esteatosis pura pueden progresar a la NASH (Wong, 2010) y lo más importante, algunos pacientes con NASH pueden también progresar a carcinoma hepatocelular sin pasar por la fase de cirrosis.

30 Los mecanismos responsables de la evolución de la esteatosis a la esteatohepatitis no se entienden completamente evitando así el pronóstico de la enfermedad a nivel individual.

35 A pesar del importante problema de salud pública de la NAFLD, es actualmente imposible de identificar, en una fase temprana, los pacientes que van a progresar a NASH y fibrosis de los pacientes que se mantendrán en la fase de esteatosis.

40 Por lo tanto, existe una necesidad urgente de marcadores de diagnóstico y de pronóstico de las enfermedades hepáticas graso, en particular, para la identificación del nivel de esteatosis y predecir si la esteatosis evolucionará a la esteatohepatitis.

La cuantificación del nivel de la esteatosis es también un problema importante en el trasplante de hígado (LT).

45 De hecho, hay un número significativo de casos de trasplante de hígado que conducen a la no función primaria o a la función retardada del injerto debido principalmente a la mala calidad del injerto y especialmente a la presencia de esteatosis.

50 La esteatosis es uno de los factores más importantes que afectan a la función del aloinjerto hepático. Aunque, la esteatosis puede retroceder en semanas después del trasplante de hígado, la capacidad de recuperación y regeneración funcional temprana se deterioran significativamente con los aloinjertos esteatóticos, principalmente debido a una lesión por isquemia-reperusión más grave.

55 La esteatosis del injerto no solo es una causa de disfunción del injerto primario, sino también un tipo de evolución más pobre a largo plazo del injerto. En los pacientes trasplantados por cirrosis VHC, la supervivencia de los injertos fue inversamente proporcional a la esteatosis hepática del donante (72 % a los 3 años post-OLT en ausencia de esteatosis frente al 43 % con esteatosis moderada) y la recurrencia del VHC es más frecuente y más temprana en los receptores de hígados moderada y gravemente esteatóticos. La evolución de la fibrosis es mayor cuando la esteatosis del injerto es superior al 30 % (Briceno, 2009). El problema es que no existe un marcador objetivo y cuantificable para el control de la calidad del injerto. El único control realizado en el hígado del donante se basa en la sección de examen congelado. La evaluación del nivel de esteatosis en secciones histológicas es fuertemente dependiente del observador y no es reproducible (El Badry, 2009).

60 La cuantificación de la esteatosis es el todo más importante, puesto que una limitación principal del trasplante de hígado es la escasez de injertos. Esta situación ha llevado a los equipos de trasplante a la utilización de injertos marginales de donantes con criterios expandidos. Uno de estos criterios expandidos es la presencia de esteatosis.

65

El uso de injertos con esteatosis moderada (30 % -60 %) sigue siendo una cuestión desafiante. En este grupo, la incidencia de la no funcionalidad primaria puede alcanzar el 15 %, y la tasa de la función retardada del injerto se aproxima al 35 %. Debido a la combinación de criterios expandidos, la cuantificación de biopsia hepática de grado de esteatosis debe ser lo más precisa posible.

5 La falta de injertos también ha llevado a la utilización de órganos procedentes de donantes con corazón no latente que acaban de fallecer. El trasplante de hígado de donantes con corazón no latente implica una estrategia particular y estandarizada. Recientemente, un protocolo específico de la recolección y trasplante de hígado de donantes con corazón no latente fue redactado por los médicos de trasplante franceses invitados por la Agencia de la Biomedicina. 10 En este protocolo, se sugirieron criterios importantes, en particular, el examen histológico de una biopsia sistemática con recomendación para seleccionar hígados que exhiben no más del 20 % de esteatosis. Esta recomendación drástica contrasta con la incapacidad de los métodos histológicos habituales para proporcionar una rigurosa evaluación no sesgada de la esteatosis.

15 De hecho, hoy en día, los métodos histológicos habituales utilizados para evaluar la calidad de un injerto antes del LT son solo cualitativos. Los mismos se basan en la evaluación óptica de los hepatocitos que contienen inclusiones de grasa en una sección de tejido por un médico. El Badry *et al.* (2009) han demostrado que esta evaluación es altamente dependiente de la interpretación del médico y, por lo tanto, subjetiva.

20 Además, este enfoque cualitativo no se adapta en caso de microsteatosis debido al tamaño extremadamente pequeño de vacuolas que los hacen difíciles de detectar por un médico.

El único método fiable para evaluar cuantitativa y objetivamente la esteatosis en un hígado es extraer químicamente los lípidos de una muestra del injerto y determinar el contenido de lípidos por cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (Rebouissou *et al.*, 2007). Este método es muy largo puesto que toma unos 25 días. Además, no es apropiado en caso de LT, donde una decisión del cirujano a proceder al injerto debe ser tomada en 15 minutos como máximo desde el momento en que la biopsia hepática del injerto hepático llega al servicio de patología para su examen histológico.

30 La Patente de Estados Unidos nº. 5.038.039 divulga un método para detectar la presencia de anomalías en los tejidos biológicos mediante espectroscopia de infrarrojos. En este método, un rayo de luz infrarroja se dirige a una muestra de tejido biológico, y detecta la anomalía en al menos un intervalo de frecuencias mediante la determinación de si los cambios en la absorción de infrarrojos se han producido en comparación con una muestra de tejido de control, sana.

35 **Objeto de la invención**

El solicitante ha encontrado ahora que el uso de radiación infrarroja ha permitido la evaluación cuantitativa y objetiva de un nivel de lípidos en el hígado. Esta evaluación permite un diagnóstico rápido y fiable de este hígado, en particular de la capacidad que se va a injertar.

Más precisamente, los inventores han descubierto que la señal de infrarrojos de una muestra de hígado en un intervalo de número de onda específica puede proporcionar, cuantitativamente, un nivel de lípidos de un hígado, proporcionando así datos cuantitativos precisos sobre el hígado y, por lo tanto, un rápido diagnóstico de relevancia 45 clínica.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es un método para medir un nivel de lípidos Vb en un hígado en el que dicho método comprende las etapas de:

50 a/ dividir una muestra sólida de hígado en dos o más porciones, p_i ,
b/ utilizar un espectrómetro de infrarrojos para aplicar una radiación infrarroja que tiene al menos un primer intervalo de número de onda entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} a cada una de las dos o más porciones, p_i , de dicha muestra de dicho hígado,

c/ detectar la intensidad de la radiación después de que ha pasado a través de cada una de las dos o más porciones, p_i , y generar una señal relacionada con cada intensidad detectada,

55 d/ procesar las señales generadas para calcular un valor medio V_a ; al:

– calcular, para cada una de las dos o más porciones, p_i , un primer valor V_{w1p_i} relacionado con el primer intervalo de número de onda, y

60 – calcular el valor medio V_a basándose en los primeros valores de todas las porciones,
o

– calcular la media de las señales generadas para cada porción p_i para generar una señal media, y

– calcular un primer valor medio V_{w1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de onda, en el que V_{w1a} es igual al valor medio V_a , y

65 e/ comparar dicho valor medio V_a con un patrón para obtener el nivel de lípidos Vb.

En ciertas realizaciones, en el método de acuerdo con la invención, la fase de procesar las señales generadas para calcular un valor medio comprende las etapas de:

- 5
- calcular, para cada una de las dos o más porciones, p_i , un primer valor V_{w1pi} relacionado con el primer intervalo de número de onda y
 - calcular un valor medio V_a basándose en los primeros valores de todas las porciones.

En ciertas realizaciones, las etapas de procesar de las señales generadas para calcular un valor medio comprende las etapas de:

- 10
- calcular la media de las señales generadas por cada porción p_i para generar una señal media, y
 - calcular un primer valor de V_{w1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de onda, en el que V_{w1a} es igual al valor medio V_a .

15 En ciertas realizaciones:

- la radiación infrarroja tiene además un segundo intervalo de número de onda entre 1450 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} , y
- las etapas de procesar las señales generadas para calcular un valor medio V_a comprenden además las etapas de:

- 20
- calcular, para cada una de las dos o más porciones, p_i , un primer valor V_{w2pi} relacionado con el segundo intervalo de número de onda, y en el que el valor medio V_a es la relación media V_{w1pi}/V_{w2pi}
 - calcular la media de las señales generadas por cada porción p_i para generar una señal media,
 - calcular un segundo valor medio V_{w2a} relacionado con la señal media en el segundo intervalo de número de onda, en el que el valor medio V_a es la relación media V_{w1a}/V_{w2a}
- 25

Por ejemplo, la etapa de procesar las señales generadas para calcular un valor medio V_a puede comprender las etapas de:

- 30
- calcular para cada uno de las dos o más porciones, P_i , un segundo valor V_{w2pi} relacionado con el segundo intervalo de número de onda.

Como alternativa, la etapa de procesar las señales generadas para calcular un valor medio V_a comprende las etapas de:

- 35
- calcular la media de las señales generadas por cada porción p_i para generar una señal media,
 - calcular un segundo valor medio V_{w2a} relacionado con la señal media en el segundo intervalo de número de onda.

40 El segundo intervalo de número de onda puede estar entre 1450 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} .

Como alternativa, el segundo intervalo de número de onda es entre 1660 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} .

La presente invención se refiere también a un método *in vitro* para diagnosticar un hígado graso que comprende las etapas de:

- 45
- medir un nivel de lípidos V_b de acuerdo con el método de la presente invención y
 - comparar el nivel de lípidos V_b con un valor umbral,

50 en el que un nivel de lípidos V_b superior al valor umbral es indicativo de un hígado graso.

La presente invención se refiere también a un método *in vitro* para determinar el nivel de esteatosis del hígado que comprende las etapas de:

- 55
- medir un nivel de lípidos V_b de acuerdo con el método de la presente invención y
 - comparar el nivel de lípidos V_b con los valores umbral,

en el que:

- 60
- un nivel de lípidos V_b entre un primer valor umbral y un segundo valor umbral es indicativo de una esteatosis leve,
 - un nivel de lípidos V_b entre el segundo valor umbral y un tercer valor umbral es indicativo de una esteatosis moderada,

- un nivel de lípidos Vb superior al tercer valor umbral es indicativo de una esteatosis grave.

Preferentemente, el primer valor umbral es inferior al segundo valor umbral y el segundo valor umbral es inferior al tercer valor umbral.

5 La presente invención se refiere también a un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar esteatofibrosis, hepatocarcinoma o cirrosis que comprende las etapas de:

- medir un nivel de lípidos Vb de acuerdo con el método de la presente invención y
- comparar el nivel de lípidos Vb con los valores umbral,

en el que:

- un nivel de lípidos Vb superior a un primer valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar esteatofibrosis,
- un nivel de lípidos Vb superior a un segundo valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar hepatocarcinoma,
- un nivel de lípidos Vb superior a un tercer valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar cirrosis.

20 La presente invención se refiere también a un método *in vitro* para determinar si un hígado es adecuado para ser injertado, comprendiendo las etapas de:

- medir un nivel de lípidos Vb de acuerdo con el método de la presente invención y
- comparar el nivel de lípidos Vb con los valores umbral,

en el que

- un nivel de lípidos Vb inferior a un primer valor umbral es indicativo de que el hígado es adecuado para ser injertado con un bajo riesgo de no funcionar
- un nivel de lípidos Vb entre el primer y un segundo valor umbral es indicativo de que el hígado es adecuado para ser injertado con un riesgo moderado de no funcionar,
- un nivel de lípidos Vb superior a un tercer valor umbral es indicativo de que el hígado no es adecuado para ser injertado.

35 Preferentemente, el primer valor umbral es inferior al segundo valor umbral y el segundo valor umbral es inferior o igual que el tercer valor umbral.

40 También se describe en la presente memoria un aparato para medir un valor biológico Vb, tal como un nivel de lípidos, en una muestra, que comprende:

- un sitio para someter una muestra a la radiación infrarroja
- una fuente de radiación infrarroja para proporcionar un haz de radiación infrarroja que tiene un primer intervalo de número de onda específico entre 2800 cm⁻¹ y 3000 cm⁻¹ y un segundo intervalo de número de onda específico entre 1450 cm⁻¹ y 1710 cm⁻¹,
- un detector para detectar las intensidades de la radiación en el primer y segundo intervalos de número de onda específicos después de que se hace pasar a través de la muestra y
- medios para generar una señal relacionada con las intensidades detectadas.

50 Descripción detallada de la invención

Método

55 Un método para medir un valor biológico Vb en un hígado se describe en la presente memoria, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a/ aplicar una radiación infrarroja que tiene al menos un primer intervalo de número de onda entre 2800 cm⁻¹ y 3000 cm⁻¹ a una o más porciones, p_i, de una muestra de dicho hígado,
- b/ detectar la intensidad de la radiación después de que se ha hecho pasar a través de cada una de una o más porciones, p_i, y generar una señal relacionada con la intensidad detectada,
- c/ procesar la una o más señales generadas para calcular un valor medio V_a; al:

- calcular, para cada una de la una o más porciones, p_i, un primer valor V_{w1pi} relacionado con el primer intervalo de número de onda,

- o
- calcular la media de la una o más señales generadas para cada porción pi para generar una señal media,
- calcular un primer valor medio V_{W1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de onda,

5 y calcular un valor medio V_a ,
d/ comparar dicho valor medio V_a con un patrón para obtener el valor biológico V_b .

Muestra de hígado

10 La invención se realiza sobre una muestra sólida de hígado.

El hígado puede haber sido retirado de un animal, particularmente un mamífero, por ejemplo, con el fin de ser injertado. El hígado es preferentemente un hígado humano.

15 La muestra puede estar provista de una biopsia hepática.

La muestra puede preservarse en una solución convencional para la preservación del injerto, por ejemplo, la solución de la Universidad de Wisconsin.

20 La muestra se puede preparar preferentemente por microtomía.

Se destaca que la muestra es una muestra sólida, y más preferentemente una sección congelada de tejido.

25 Por ejemplo, películas gruesas de 20-100 μm se pueden preparar a partir de una muestra sólida de hígado obtenida mediante la congelación de la muestra.

La muestra tiene un tamaño de preferentemente 1 mm X 1 mm a 5 mm X 5 mm, más preferentemente de 3 mm X 3 mm a 5 mm X 5 mm, lo más preferentemente de 5 mm X 5 mm y un espesor entre 2 μm y 10 μm , más preferentemente entre 4 μm y 6 μm .

30 La muestra se puede utilizar inmediatamente o almacenarse hasta su uso.

Preferentemente, antes de estudiarse con un espectrómetro de infrarrojos, la muestra se seca a pocos minutos a temperatura ambiente.

35 El método es no destructivo. Por tanto, la muestra se puede utilizar para análisis de tinción, inmuno-etiquetado o espectroscopia de masas adicional.

Además, la muestra puede ser heterogénea.

40 Por ejemplo, si el valor biológico que se va a medir es el nivel de lípidos, los lípidos pueden ser no distribuirse homogéneamente en toda la muestra.

45 Además, una vez que la biopsia se ha realizado, la muestra puede prepararse en solo unos pocos minutos a temperatura ambiente.

Espectroscopia de IR y tratamiento de datos

50 La muestra se coloca en un espectrómetro de infrarrojos.

El espectrómetro de infrarrojos que puede utilizarse en el método puede ser cualquier espectrómetro de infrarrojos disponible en el mercado, por ejemplo de Bruker Optics, Perkin Elmer, Thermo Scientific, o Varian-Agilent. En particular, el espectrómetro de infrarrojos puede ser un espectrómetro FTIR.

55 La muestra utilizada para realizar el método descrito en la presente memoria se divide en una o más porciones, generalmente denominadas píxeles.

Cada porción corresponde a un área a la que se aplica una radiación infrarroja. Preferentemente, la muestra se divide completamente en porciones que tienen el mismo tamaño.

60 Cada porción tiene preferentemente entre 20 μm X 20 μm y 1000 μm X 1000 μm , más preferentemente entre 50 μm X 50 μm y 500 μm X 500 μm y más preferentemente aproximadamente 50 μm X 50 μm .

La elección del número de porciones y el tamaño de las porciones depende del tiempo deseado de adquisición.

Por ejemplo, una muestra dividida en porciones de 100 μm X 100 μm será analizado cuatro veces más rápido que la misma muestra dividida en porciones de 50 μm X 50 μm .

65 Una radiación infrarroja se aplica a una primera porción.

La radiación infrarroja tiene un primer intervalo de número de onda entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} .

Se pueden utilizar números de onda o longitudes de onda equivalentes.

Por ejemplo, el número de onda varía de 2.800-3.000 cm^{-1} y 1450-1710 cm^{-1} corresponden a longitudes de onda de 3,57-3,33 micrómetros y 6,89-5,85 micrómetros, respectivamente.

La intensidad de la radiación después de que ha pasado a través de la primera porción se detecta y se genera una señal relacionada con la intensidad detectada.

Por ejemplo, la señal puede ser el espectro correspondiente a la absorbancia en función del número de onda.

En una primera alternativa, la etapa de procesamiento de la una o más señales generadas para calcular un valor medio comprende las etapas de calcular, para cada una de las una o más porciones, p_i , un primer valor V_{w1pi} relacionado con el primer intervalo de número de onda, y calcular un valor medio V_a .

La señal se procesa, a continuación, para calcular un primer valor para la primera porción (V_{w1p1}).

La intensidad integrada de una banda de vibración específica es proporcional a la cantidad de las especies sondadas, siempre y cuando la trayectoria exacta del haz de IR a través de la muestra sea conocida (ley de Beer-Lambert en J.D.J. Ingle y S.R. Crouch, Análisis Espectroquímico, Prentice Hall, Nueva Jersey (1988)).

Por lo tanto, para cada porción, p_i , el cálculo del primer valor V_{w1pi} se puede realizar mediante la integración de la intensidad de la banda correspondiente al primer intervalo de número de onda determinando de este modo el área de pico de los espectros en el primer intervalo de número de onda.

La medida de la intensidad y del área de pico puede relacionarse con una referencia.

Las etapas realizadas en la primera porción de la muestra se repiten, de la misma manera, en todas las otras porciones de la muestra; de ese modo un primer valor V_{w1pi} se calcula para cada porción, p_i .

Después, un valor medio V_a de la muestra se puede calcular basándose en los primeros valores de todas las porciones.

Preferentemente, todas las porciones tienen el mismo tamaño.

Preferentemente, los primeros valores V_{w1pi} correspondientes a los valores atípicos son rechazados (artefactos, vasos sanguíneos, daños hepáticos durante la biopsia).

Por lo tanto, el valor medio de los primeros valores V_{w1pi} restantes se calcula.

En esta primera alternativa, V_a puede ser igual a la media de V_{w1pi} o a la media de V_{w1pi} normalizado donde V_{w1pi} de los valores atípicos se han rechazado o no.

Este valor medio V_a se compara con un patrón para obtener el valor biológico V_b .

El patrón puede ser un valor, un conjunto de valores, una curva de calibración o curva patrón.

Preferentemente, el patrón es una curva de calibración o curva patrón.

Por ejemplo, cuando el valor biológico V_b es un nivel de lípidos, el patrón es una curva patrón de valores medios V_a de muestras de control en función de la concentración de lípidos obtenidos por extracción y análisis cuantitativo (por ejemplo, utilizando cromatografía en fase gaseosa - espectrometría de masas) de estas muestras de control.

En una segunda alternativa, la etapa de procesamiento de la una o más señales generadas para calcular un valor medio V_a comprende las etapas de

- calcular de la media de la una o más señales generadas para cada porción p_i para generar una señal media,
- calcular un primer valor medio V_{w1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de onda,

y

- calcular un valor medio V_a .

Las señales generadas para cada porción, p_i , se añaden para generar una señal total que se divide entre el número de porciones.

Preferentemente, las señales generadas para p_i que corresponden a los valores atípicos son rechazadas (artefactos, vasos sanguíneos, daños hepáticos durante biopsia).

A continuación, la señal media se procesa para calcular un valor medio V_{w1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de onda.

El procesamiento de la señal media se realiza de la misma manera que se puso en práctica para una sola señal de una porción p_i .

Por tanto, para la señal media, la intensidad de la banda correspondiente al primer intervalo de número de onda determinando de este modo el área de pico de los espectros en el primer intervalo de número de onda.

A continuación, un valor medio V_a de la muestra se puede calcular basándose en el valor medio en el primer intervalo de número de onda V_{w1a} .

Esta alternativa permite reducir el número de cálculos y medir el valor biológico más rápido.

En las condiciones preferidas, la radiación infrarroja tiene además un segundo intervalo de número de onda entre 1450 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} .

En estas condiciones preferidas, la etapa de procesamiento de la una o más señales generadas para calcular un valor medio V_a comprende además las etapas de:

- calcular, para cada una de una o más porciones, p_i , un segundo valor V_{w2pi} relacionado con el segundo intervalo

de número de onda en una primera alternativa,

o

- calcular la media de las señales generadas para cada porción p_i para generar una señal media,
- calcular un segundo valor medio V_{W2a} relacionado con la señal media en el segundo intervalo de número de onda, en una segunda alternativa,

El valor medio V_a es la relación media V_{w1}/V_{w2} .

En la primera alternativa, el cálculo de los segundos valores V_{w2pi} se realiza en el segundo intervalo de número de onda de la misma manera que se puso en práctica para el primer valor V_{w1pi} en el primer intervalo de número de onda.

Por lo tanto, para cada porción, p_i , el cálculo del segundo valor V_{w2pi} se puede realizar mediante la integración de la intensidad de la banda correspondiente al segundo intervalo de número de onda determinando de este modo el área de pico de los espectros en el segundo intervalo de número de onda.

A continuación, en estas condiciones preferidas, la relación media V_{w1}/V_{w2} se calcula.

La relación media V_{w1}/V_{w2} puede ser la media aritmética de las relaciones individuales V_{w1pi}/V_{w2pi} , calculadas para cada porción p_i de la muestra.

Como alternativa, la relación media se puede calcular dividiendo el primer valor medio (media aritmética del V_{w1pi} individual para cada porción p_i de la muestra) entre el segundo valor medio (media aritmética del V_{w2pi} individual de la muestra).

En la segunda alternativa, el cálculo del segundo valor medio V_{W2a} se realiza en el segundo intervalo de número de onda de la misma manera que se puso en práctica para el primer valor medio V_{W1a} en el primer intervalo de número de onda.

A continuación, bajo estas condiciones preferidas, la relación media V_{w1}/V_{w2} se calcula.

En esta segunda alternativa, la relación media V_{w1}/V_{w2} es la relación V_{W1a}/V_{W2a} .

El segundo intervalo de número de onda puede ser de 1450-1575 cm^{-1} .

Este intervalo de número de onda se relaciona con las Amidas II.

Como alternativa, el segundo intervalo de número de onda puede ser entre 1660 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} .

Este intervalo de número de onda se relaciona con las Amidas I.

El segundo intervalo de número de onda puede también estar entre 1450 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} junto con entre 1660 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} . Preferentemente, el valor biológico V_b es un nivel de lípidos, por ejemplo, el nivel de triglicéridos.

De hecho, sin estar limitado por la teoría, el intervalo de número de onda entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} se asigna a las funciones químicas $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$ que están principalmente relacionadas con la contribución de las cadenas de carbono largas de lípidos.

Por lo tanto, el análisis de la muestra en este número de onda permite medir el nivel de lípidos de la muestra y, en particular, el nivel de triglicéridos.

Los inventores han demostrado que este intervalo de número de onda es particularmente relevante para la medición del nivel de lípidos y, en particular, del nivel de triglicéridos. De hecho, los inventores han demostrado que el valor medio de una muestra calculada basándose en el análisis infrarrojo en este intervalo de número de onda se correlaciona directamente con el nivel de lípidos de esta muestra medido por extracción de lípidos y ensayo cromatográfico con un muy buen coeficiente de correlación, como se evidencia en la sección experimental.

Además, el método descrito en la presente memoria permite el uso de una muestra con alta salinidad.

Diagnóstico o pronóstico de enfermedades hepáticas

Los métodos descritos en la presente memoria tienen cualidades muy valiosas.

Se permite la evaluación de los valores biológicos V_b de un hígado, tales como el nivel de lípidos, y más particularmente el nivel de triglicéridos.

Por lo tanto, se pueden utilizar, en particular, para el diagnóstico o pronóstico de una serie de enfermedades hepáticas.

En particular, los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para el diagnóstico *in vitro* de un hígado graso.

Con este fin, un valor biológico V_b , preferentemente el nivel de los lípidos, en un hígado se mide de acuerdo con el método descrito y se compara con un valor umbral.

Un valor biológico V_b superior al valor umbral es indicativo de un hígado graso. El hígado graso es preferentemente un hígado esteatósico, por ejemplo, un hígado con NASH, un hígado con esteatofibrosis, un hígado con

hepatocarcinoma, o un hígado con cirrosis.

El método descrito en la presente memoria puede utilizarse también para determinar el nivel de esteatosis del hígado.

5 Para este fin, un valor biológico Vb, preferentemente el nivel de los lípidos, de un hígado se mide de acuerdo con el método descrito y se compara con un patrón.

El patrón puede ser una concentración de lípidos, en particular los triglicéridos, medidos a partir de biopsias de injertos hepáticos esteatósicos.

10 El patrón puede ser también una concentración de lípidos, en particular triglicéridos, medida a partir de biopsias de injertos hepáticos.

A continuación, el valor biológico Vb, preferentemente el nivel de lípidos, se compara con varios valores umbral y un valor biológico Vb entre un primer valor umbral y un segundo valor umbral es indicativo de una esteatosis leve, un valor biológico Vb entre el segundo valor umbral y un tercer valor umbral es indicativo de una esteatosis moderada, un valor biológico Vb superior al tercer valor umbral es indicativo de una esteatosis grave.

15 Otro uso del método descrito en la presente memoria es pronosticar esteatofibrosis, hepatocarcinoma o cirrosis.

Para este fin, un valor biológico Vb, preferentemente el nivel de los lípidos, en un hígado se mide de acuerdo con el método descrito en la presente memoria y se compara con valores umbral.

20 Un valor biológico Vb superior a un primer valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar esteatofibrosis.

Un valor biológico Vb superior a un segundo valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar hepatocarcinoma.

Un valor biológico Vb superior a un tercer valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar cirrosis.

25 El método descrito en la presente memoria se puede utilizar también para determinar si un hígado es adecuado para ser injertado.

Para este fin, el ejemplo proporcionado es una muestra de un injerto hepático y el valor biológico Vb, preferentemente el nivel de los lípidos, en un hígado se midió de acuerdo con el método descrito en la presente memoria y se comparó con valores umbral.

30 Un valor biológico Vb inferior a un primer valor umbral es indicativo de que el hígado es adecuado para ser injertado con un bajo riesgo de no funcionar.

Un valor biológico Vb entre el primer y un segundo valor umbral es indicativo de que el hígado es adecuado para ser injertado con un riesgo moderado de no funcionar.

35 Un valor biológico Vb superior a un tercer valor umbral es indicativo de que el hígado no es adecuado para ser injertado.

Un hígado con un nivel esteatósico superior al 60 % no es adecuado para ser injertado.

Un hígado con un nivel esteatósico entre 30 % -60 % es adecuado para ser injertado pero presentar un riesgo de no funcionar.

40 Un hígado con un nivel esteatósico inferior al 30 % es adecuado para ser injertado y presenta un bajo riesgo de no funcionar.

Para estas diversas aplicaciones, el método descrito en la presente memoria puede estar acoplado con un método cualitativo tal como un método histológico o espectroscopia cualitativa para proporcionar un diagnóstico o pronóstico más completo.

45 La evaluación del valor biológico Vb de acuerdo con un método descrito en la presente memoria es cuantitativa, objetiva y no depende de la interpretación de un médico.

El método descrito en la presente memoria es rápido. Se tarda menos de 15 minutos en medir el valor biológico Vb, mientras que la medición de un valor biológico Vb por extracción de un compuesto y análisis por cromatografía puede durar 2 días.

50 La rapidez para determinar si un hígado es adecuado para ser injertado es crucial. En efecto, un injerto hepático de un donante solo está disponible durante 15 horas. Este período de tiempo incluye el tiempo de transporte y preparación. Por lo tanto, la decisión de injertar un hígado tiene que ser tomada muy rápidamente. El método es fácil de aplicar, incluso en el hospital y es barato. Un espectrómetro de IR convencional se puede utilizar.

55 El método se adapta a las condiciones utilizadas para la preparación de un injerto, en particular, las condiciones de salinidad de las soluciones conservantes.

El método descrito en la presente memoria es muy sensible.

La sensibilidad del método es aproximadamente 10^{-4} M o 10^{-12} g de molécula.

60 En los intervalos de número de onda utilizados en el método descrito en la presente memoria solo hay una dispersión pobre, en contraste con otros intervalos de número de onda, tales como los utilizados en la espectroscopia de infrarrojo cercano.

Además, no hay ninguna combinación de muchas funciones químicas.

65 Los inventores han demostrado que el nivel de esteatosis se correlaciona bien con el valor biológico Vb medido de acuerdo con el método descrito en la presente memoria si el nivel de esteatosis es alto o bajo.

Debido al tamaño pequeño de las vacuolas en microsteatosis, la microsteatosis no es a menudo mal diagnosticada con los métodos histológicos.

El método descrito en la presente memoria ser un método cuantitativo, los resultados no dependen del tamaño de las vacuolas.

5 Por tanto, el método se adapta bien en el caso de macrosteatosis, exhibiendo grandes vacuolas, así como en el caso de microsteatosis.

Además, el intervalo de número de onda entre 1450 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} se asigna al dominio de la energía de la Amida I o Amida II correspondiente a la una o más vibraciones de amidas, en particular los enlaces peptídicos en proteínas y, por lo tanto, se relaciona con el nivel de proteínas.

10 Los inventores han demostrado que el cálculo de la relación del primer valor relacionado con los lípidos/segundo valor relacionado con las proteínas conduce a normalizar la intensidad evitando así variaciones relacionadas con las variaciones locales en el espesor de la muestra.

Aparato

15 Los inventores han diseñado adicionalmente un nuevo aparato para implementar el proceso anterior. Por lo tanto, también se describe en la presente memoria un aparato para medir un valor biológico V_b en una muestra, que comprende:

- 20
- un sitio para someter una muestra a una radiación infrarroja,
 - una fuente de radiación infrarroja para proporcionar un haz de radiación infrarroja que tiene un intervalo de número de onda entre 1450 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} ,
 - un detector para detectar las intensidades de la radiación en un primer intervalo de número de onda específica entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} y en un segundo intervalo de número de onda específica entre 1450 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} después de que se hace pasar a través de la muestra y
 - medios para generar una señal relacionada con las intensidades detectadas.
- 25

El sitio para someter una muestra a una radiación infrarroja es adecuado para una muestra sólida.

30 El sitio para someter la muestra a una radiación infrarroja puede comprender además una máscara para ajustar el área en la que se proporciona la radiación a la muestra.

Preferentemente, solo una radiación se proporciona en el área no enmascarada de modo que solo hay una adquisición para las dos regiones de frecuencia de interés.

35 Como alternativa, la radiación infrarroja puede restringirse al primer intervalo de número de onda específica y al segundo intervalo de número de onda específica.

El segundo intervalo de número de onda específico puede estar entre 1450 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} .

Como alternativa, el segundo intervalo de número de onda puede estar entre 1660 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} .

40 El segundo intervalo de número de onda también puede estar entre 1450 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} junto con entre 1660 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} .

La restricción de la radiación infrarroja a los intervalos de números de onda específicos puede realizarse utilizando un filtro de paso de banda.

El detector puede ser, por ejemplo, un detector multicanal, un detector enfriado con nitrógeno líquido o un detector de temperatura ambiente.

45 El aparato descrito en la presente memoria puede comprender además un interferómetro.

El aparato utiliza solo un número de onda específico y restringido y no todo el intervalo de número de onda de infrarrojos. Por lo tanto, es más fácil de producir, y menos costoso.

Si se utiliza un interferómetro, solo hay una necesidad de un interferómetro pequeño, fácil de producir y menos costoso.

50 En condiciones preferidas, el aparato comprende además:

- un patrón y
- un procesador para procesar la señal generada para calcular:
- 55 – un primer valor V_{w1} obtenido mediante el uso del primer intervalo de número de onda específico,
- un segundo valor V_{w2} obtenido utilizando el segundo intervalo de número de onda específico, y
- la relación V_{w1}/V_{w2} y

para la comparación de la relación V_{w1}/V_{w2} con un patrón para obtener el valor biológico V_b .

60 El aparato descrito en la presente memoria es adecuado para el análisis macroscópico. El aparato de IR convencional es adecuado para el análisis microscópico. Para este objetivo, estos aparatos se acoplan a un microscopio para dirigirse a un área específica de interés.

En general, esta área responde a criterios morfológicos. Estos aparatos no analizan toda la muestra, sino solo una parte microscópica.

Los inventores han encontrado que con un método descrito en la presente memoria, el análisis de la muestra se puede realizar a nivel macroscópico, lo que permite la medida cuantitativa de un valor biológico de una muestra.

5 Para tales usos, el aparato no se acopla a un microscopio.

Una reflexión especializada creada se insertará en cualquier espectrómetro de Transformada de Fourier comercial.

Además, el aparato puede comprender un haz denominado macro-haz que tiene un tamaño entre 100 μm X 100 μm y 1 mm X 1 mm, más preferentemente entre 500 μm X 500 μm y 1 mm X 1mm, lo más preferentemente de 1 mm X 1mm.

10 El macro-haz puede estar restringido por una abertura si es necesario.

La manipulación de la muestra será más simple, y tardará unos segundos en lugar de los varios minutos en el modo microscópico. La muestra tendrá que depositarse sobre portaobjetos de vidrio revestidos de metal, que son el soporte de la muestra.

15 Todo el procesamiento de la señal se realiza por el aparato por lo que es fácil de manipular por cualquier persona no cualificada.

El aparato puede comprender también un dispositivo de memoria, tales como los valores calculados por el procesador y los valores convencionales.

20 Por lo tanto, el aparato puede memorizar los primeros valores y los segundos valores de las porciones de la muestra y después el procesador puede utilizar estos valores para calcular un valor medio.

Descripción de las figuras

25 La Figura 1 muestra la estimación histológica de la esteatosis y de los lípidos contenidos en varias muestras. La esteatosis estimada en la sección de tejido teñida después de HES se representó como una función de la concentración de triglicéridos (TG). A) esteatosis Macrovacuolar. B) Esteatosis macrovacuolar y microvesicular.

La Figura 2 muestra un espectro de IR por [(2800-3100)/(1485-1595)].

30 La Figura 3 muestra la relación de lípidos/proteínas calculada a partir de los espectros de IR que se han representado como una función de la concentración de TG para diversas muestras. La curva resultante se puede utilizar como un patrón.

La Figura 4 muestra la comparación entre el método de "Relación media" (AR) y el método de "Espectro medio" (AS).

35 Ejemplos

Materiales y métodos

Pacientes y muestras de hígado

40 Las muestras de hígado se obtuvieron del Centro de Recursos Biologiques Paris-Sud, Universidad Paris-Sud XI, Francia. Las muestras de tejido se obtuvieron de la parte no tumoral de 27 ejemplares de resección del hígado. Para todos los pacientes, el consumo diario de alcohol era inferior a 30 g para los hombres y 20 g para las mujeres. SE excluyeron la infección con virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (HCV), hemocromatosis genética, enfermedades autoinmunes del hígado, enfermedad de Wilson. Para la evaluación patológica de rutina, los tejidos se fijaron en formalina y un ejemplar de hígado no tumoral distante a tumor se congeló de golpe inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

45 En 6 pacientes, el hígado era histológicamente normal. Para otros 21 pacientes, el análisis microscópico reveló esteatosis macrovesicular y microvesicular suave sin abombamiento de los hepatocitos, inflamación lobular, fibrosis perinusoidal, ni cuerpos de Mallory.

50 Para la evaluación por espectroscopia de infrarrojos, las biopsias se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Perfiles de lípidos

55 El análisis de lípidos se realizó en la plataforma MetaToul en IFR150 (Toulouse, Francia). Las biopsias hepáticas (5-10 mg) se homogeneizaron en 2 ml de metanol/5 mM EGTA (2:1 v/v) con FAST-PREP® (MP Biochemicals). El equivalente de 0,5 mg de tejido se evaporó, los gránulos secos se disolvieron en 0,25 ml de NaOH (0,1 M) durante la noche y las proteínas se midieron con el ensayo Bio-Rad.

60 Ensayos de triglicéridos (TG) se realizaron como se ha descrito en Rebouissou *et al*, 2007. Brevemente, los lípidos que corresponden a un equivalente de 1 mg de tejido se extrajeron de acuerdo con Bligh y Dyer en diclorometano/metanol/agua (2,5: 2,5: 2,1, v/v/v) (Bligh y Dyer, 1959), en presencia de 15 g de triheptadecanoato de glicerilo como un patrón interno. La fase de diclorometano se evaporó hasta secarse y se disolvió en 20 μl de acetato de etilo. 1 μl del extracto de lípidos se analizó por cromatografía de gas-líquido en un sistema Thermo Electron FOCUS utilizando columnas capilares de sílice fusionadas con Zebron-1 Phenomenex® (5 x 0,32 mm de

diámetro interior, 0,50 µm de espesor de película) (Barrans *et al.*, 1994). La temperatura del horno se programó de 200 °C a 350 °C a una velocidad de 5 °C por minuto y el gas vehículo fue hidrógeno (0,5 bar). El inyector y el detector estaban a 315 °C y 345 °C, respectivamente.

5 Sección de tejido

Secciones en serie eran de 1 a 5 mm y se cortaron con un espesor de 4-6 µm a -20 °C con un criostato CM3050-S (Leica microsystemes SAS, Francia) y se depositaron alternativamente en portaobjetos de vidrio para el control histológico extemporánea y en portaobjetos de vidrio revestidos de oro mirriR (Tientascience, Indianapolis, IN) para micro-espectroscopía FTIR.

Las secciones para histología se tiñeron con hematoxilina eosina azafrán (HES). Las secciones para la micro-espectroscopía FTIR se secaron unos pocos minutos a temperatura ambiente.

15 Micro-espectroscopía FTIR y datos tratamiento

La micro-espectroscopía infrarroja se realizó en un microscopio IN10MX (ThermoFisher scientific).

Todos los espectros se recogieron mediante el modo ultra-rápido utilizando una apertura de 50 µm x 50 µm. Los espectros se recogieron en el intervalo infrarrojo medio de 4000 - 800 cm⁻¹ a una resolución de 16 cm⁻¹ con 1 espectro por píxel.

20 El análisis de datos de los espectros de IR e imágenes químicas se realizó utilizando un software OMNIC ® (ThermoFisher scientific).

Resultados

25 Ejemplo 1

La estimación histológica de la esteatosis hepática está escasamente correlacionada con el contenido de lípidos.

30 La característica distintiva de la esteatosis es la acumulación intra-celular de triacilglicerol (TAG), resultando en la formación de vesículas en los hepatocitos. Por lo tanto la estimación de la esteatosis se basa en el examen histológico del número de células esteatóticas y el tamaño de las vesículas esteatóticas en secciones de tejido después de la tinción H&E. Esta estimación se considera que representa el nivel de esteatosis. Sin embargo, la correlación entre la estimación histológica de la esteatosis y el contenido de lípidos real no se ha investigado. El contenido en lípidos fue extraído de 27 biopsias hepáticas humanas que presentan diversos niveles de clasificación de esteatosis macrovacuolar y microvesicular entre el 0-90 %. Los triglicéridos (TG) se cuantificaron por análisis de lípidos utilizando cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). El porcentaje de esteatosis se representó como una función de la concentración de TG (Figura 1). El estudio se centró primero en la esteatosis macrovacuolar. Se observaron discrepancias importantes entre la estimación histológica de la esteatosis y la concentración de TG obtenida en la biopsia adyacente para cada paciente. Por ejemplo, se observó que la esteatosis baja tal como un 5 % correspondía a una muy amplia clasificación del contenido de lípidos entre 25 y 658 nmol/mg. Para una concentración dada de TG tal como 300-400 nmol/mg, enormes variaciones se observaron también en la estimación de la esteatosis. De hecho, la macroesteatosis se estimó en el 5 % al 40 % para este intervalo de concentraciones de TG. Curiosamente, se observó que el paciente que presentó el contenido de lípidos más alto con 5 % de macroesteatosis exhibió también un alto nivel de microesteatosis del 75 % lo que demuestra que la microesteatosis puede contribuir de manera espectacular con el contenido de lípidos. Por tanto, el estudio se centró más en la estimación completa de la macroesteatosis y microesteatosis combinadas. Discrepancias importantes se observaron también entre la estimación histológica de la esteatosis y la concentración de TG.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

50 Estas observaciones demuestran que la estimación histológica de la esteatosis está escasamente relacionada con el contenido de lípidos.

La evaluación cuantitativa del contenido de lípidos por espectroscopía de infrarrojos

55 La posibilidad de abordar el contenido de lípidos directamente en la sección de tejido se investigó utilizando micro-espectroscopía de infrarrojos. Por lo tanto, las adquisiciones por micro-espectroscopía de infrarrojos se realizaron en secciones de tejido de biopsias hepáticas humanas que presentaron diversos niveles de esteatosis. Las secciones de tejido en serie se realizaron utilizando biopsias congeladas. Algunas secciones de tejido fueron utilizadas para la tinción HES mientras que otras fueron utilizadas para experimentos de espectroscopía. La adquisición de los espectros de IR se realizó utilizando un tamaño de apertura de 50 µm x 50 µm con 1 segundo de tiempo de adquisición. El uso de un detector multi-matriz permitió trabajar 16 veces más rápido que mediante el uso de un único detector. Esta configuración permitió investigar las secciones de tejidos enteros en un tiempo muy corto. El tamaño de las secciones de tejido se clasificó entre 1 y 5 mm. Por tanto, la exploración de 1 mm² a 5 mm² correspondiente hasta 10.000 se realizó siempre en menos de 10 minutos.

65 No se observaron cambios importantes en los dominios de frecuencia de los lípidos, tales como la intensidad relativa del -CH₃ y -CH₂ (3000-2800 cm⁻¹), olefina (C=C, 3000-3060 cm⁻¹) y de las señales de éster (C=O, 1740 cm⁻¹) que

aumentaron significativamente con el nivel de esteatosis mientras que las bandas correspondientes a las proteínas, caracterizadas por las bandas de Amida I y II centradas respectivamente en 1650 y 1540 cm^{-1} , fueron similares (Figura 2).

La abundancia de los lípidos relacionados con las proteínas se investigó adicionalmente mediante el cálculo de la relación lípidos/proteínas $[(2800-3100)/(1485-1595 \text{ cm}^{-1})]$ Para cada espectro de IR en un mapa más grande de una sección del hígado. Este cálculo condujo a la normalización de la intensidad de cada píxel evitando así variaciones relacionadas con las variaciones locales en el espesor de la sección de tejido. La relación media de los lípidos/proteínas se obtuvo además de la media de los todos los píxeles analizados. La relación entre el contenido de lípidos dentro de las muestras de tejido de acuerdo con lo medido por la espectroscopia de FTIR se ha calculado y comparado con la cantidad relacionada de TG obtenida después de la extracción y cuantificación de lípidos. El valor medio de cada muestra se ha trazado como una función del valor de TG obtenido a partir del análisis de lípidos.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Hay una tendencia marcada para la linealidad entre la relación lípidos/proteínas con un coeficiente de correlación $r^2 = 0,92$ (Figura 3). La linealidad observada es el soporte de una gran promesa para hacer de la microscopía IR una herramienta de diagnóstico eficaz para el diagnóstico del contenido de esteatosis.

Tabla 1: Resumen de los resultados

# Paciente	% Macro	% Micro	Macro y micro Cumul	TG total	Relación lípidos/proteínas
1	0	0	0	17,97	0,832
2	0	0	0	30,51	0,876
3	5	30	35	254,49	1,41
4	10	10	20	185,75	1,2
5	30	40	70	580,52	2,48
6	30	40	70	443,77	1,79
7	30	50	80	288,34	1,53
8	20	40	60	337,65	1,4
9	0	20	20	130,37	1,2
10	0	0	0	37,68	0,885
11	0	0	0	15,68	0,97
12	1	20	21	61,38	1,26
13	5	25	30	115,51	1,23
14	5	10	15	25,48	0,838
15	0	5	5	120,68	1,08
16	0	0	0	25,77	0,913
17	40	50	90	331,02	1,6
18	5	25	30	141,32	1,15
19	5	50	55	81,38	1,32
20	15	60	75	386,82	1,68
21	25	60	85	405,11	1,79
22	10	50	60	266,28	1,33
23	15	40	55	741,88	2,41
24	20	0	20	45,74	0,856
25	5	75	80	658,93	2,12
26	10	40	50	541,22	2,03
27	5	10	15	284,65	1,26

Ejemplo 2

Comparación entre dos métodos alternativos

Se compararon dos alternativas de un método para medir el contenido de lípidos tal como se describe en la presente memoria.

La primera es el método descrito en el ejemplo anterior. En este método, la relación de lípidos/proteínas se calcula para cada píxel. Los píxeles son $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$. Por lo tanto, para analizar una sección de $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$, se utilizan 100 píxeles y 100 relaciones de lípidos/proteínas se calculan. A continuación, la relación media de lípidos/proteínas se obtiene más lejos de la media de los todos los píxeles analizados. Este método se denomina a continuación método de "Relación media" (AR).

En el segundo método, se calcula el espectro medio de 100 píxeles. La relación de lípidos/proteínas se calcula basándose en los espectros medios.

Este método se denomina a continuación método de "Espectro medio" (AS).

19 pacientes esteatósicos, incluyendo el paciente analizado en el ejemplo 1, se analizaron.

El estudio se realizó para cada paciente individualmente mediante la elección de 4 áreas independientes en una sección de tejido.

5

Los pacientes se clasificaron en tres grupos en función de su nivel de triglicéridos (TG).

Grupo		Número de pacientes
1 sano	[TG] <40 nmol/mg	5
2 ligeramente esteatósicos	40 nmol/mg <[TG] <200 nmol/mg	5
3 esteatósicos	200 nmol/mg <[TG] <500 nmol/mg	5
4 muy esteatósicos	[TG] > 500 nmol/mg	4

Se obtuvieron valores biológicos similares (véase Figura 4).

10 Por lo tanto, un aparato puede analizar una sección de tejido con pixeles de 500 µm X 500 µm permitiendo una rápida adquisición de los espectros de IR y medir el contenido de lípidos.

Referencias

15 A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

20 Ley de Beer-Lamber en J. D. J. Ingle y S. R. Crouch, Spectrochemical Analysis, Prentice Hall, Nueva Jersey (1988) Briceno J, Ciria R, Pleguezuelo M, de la Mata M, Muntane J, Naranjo A, Sanchez-Hidalgo J, Marchal T, Rufian S, Lopez-Cillero P Outcome and Viral Recurrence After Liver Transplantation for Hepatitis C Virus Cirrhosis. Liver Transplant 2009; 15:37-48,

Briceno J, Ciria R, de la Mata M, Rufian S, Lopez-Cillero P Prediction of Graft Dysfunction Based on Extended Criteria Donors in the Model for End-Stage Liver Disease Score Era Transplantation 2010;90: 530-539

25 El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, Washington K, Paradis V, Rubbia-Brandt L, Puhan MA, Slankamenac K, Graf R, Clavien PA. Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of a gold standard. Ann Surg. 2009, 250:691-7.

Le Naour F., Bralet M.P., Debois D., Sandt C., Guettier C., Dumas P., Brunelle A., Laprévote O.: Chemical imaging on liver steatosis using synchrotron infrared and Tof-SIMS microspectroscopies. PLoS ONE, 2009, 4:e7408.

30 Rebouissou S, Imbeaud S, Balabaud C, Boulanger V, Bertrand-Michel J, Tercé F, Auffray C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. HNF1alpha inactivation promotes lipogenesis in human hepatocellular adenoma independently of SREBP-1 and carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) activation. J Biol Chem. 2007, 282: 14437-14446.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir un nivel de lípidos Vb en un hígado, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 a/ dividir una muestra sólida de hígado en dos o más porciones, p_i ,
 b/ utilizar un espectrómetro de infrarrojos para aplicar una radiación infrarroja que tiene al menos un primer
 intervalo de número de onda entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} a cada una de las dos o más porciones, p_i , de dicha
 muestra de dicho hígado,
 10 c/ detectar la intensidad de la radiación después de que ha pasado a través de cada una de las dos o más
 porciones, p_i , y generar una señal relacionada con cada intensidad detectada,
 d/ procesar las señales generadas para calcular un valor medio V_a ; mediante:
- cálculo, para cada una de las dos o más porciones, p_i , de un primer valor V_{w1p_i} relacionado con el primer
 - 15 intervalo de número de onda, y
 - cálculo del valor medio V_a basándose en los primeros valores de todas las porciones,
- o
- cálculo de la media de las señales generadas para cada porción p_i para generar una señal media, y
 - 20 - cálculo de un primer valor medio V_{w1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de
 onda, en el que V_{w1a} es igual al valor medio V_a , y
- e/ comparar dicho valor medio V_a con un patrón para obtener el nivel de lípidos Vb.

25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de procesar las señales generadas para calcular
 un valor medio comprende las etapas de:

- calcular, para cada una de las dos o más porciones, p_i , un primer valor V_{w1p_i} relacionado con el primer intervalo
- 30 de número de onda y
- calcular un valor medio V_a basándose en los primeros valores de todas las porciones.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las etapas de procesar las señales
 generadas para calcular un valor medio comprenden las etapas de:

- 35 - calcular la media de las señales generadas por cada porción p_i para generar una señal media, y
- calcular un primer valor de V_{w1a} relacionado con la señal media en el primer intervalo de número de onda, en el
 que V_{w1a} es igual al valor medio V_a .

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

- 40 - la radiación infrarroja tiene además un segundo intervalo de número de onda entre 1450 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} , y
- las etapas de procesar las señales generadas para calcular un valor medio V_a comprenden además las etapas
 de:

- 45 - calcular, para cada una de las dos o más porciones, p_i , un segundo valor V_{w2p_i} relacionado con el segundo
 intervalo de número de onda, en el que el valor medio V_a es la relación media V_{w1p_i}/V_{w2p_i} ,

o

- 50 - calcular la media de las señales generadas por cada porción p_i para generar una señal media,
- calcular un segundo valor medio V_{w2a} relacionado con la señal media en el segundo intervalo de número de
 onda, en el que el valor medio V_a es la relación media V_{w1a}/V_{w2a} .

55 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa de procesar las señales generadas para calcular
 un valor medio V_a comprende las etapas de:

- calcular para cada una de las dos o más porciones, p_i , un segundo valor V_{w2p_i} relacionado con el segundo
 intervalo de número de onda.

60 6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa de procesar las señales generadas para calcular
 un valor medio V_a comprende las etapas de:

- calcular la media de las señales generadas por cada porción p_i para generar una señal media,
- 65 - calcular un segundo valor medio V_{w2a} relacionado con la señal media en el segundo intervalo de número de
 onda.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que segundo intervalo de número de onda es entre 1450 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} .

5 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que segundo intervalo de número de onda es entre 1660 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} .

9. Un método *in vitro* para diagnosticar un hígado graso que comprende las etapas de:

- 10
- medir un nivel de lípidos Vb de acuerdo con el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
 - comparar el nivel de lípidos Vb con valores umbral,

en el que un nivel de lípidos Vb superior al valor umbral es indicativo de un hígado graso.

15 10. Un método *in vitro* para determinar el nivel de esteatosis de un hígado que comprende las etapas de:

- 20
- medir un nivel de lípidos Vb de acuerdo con el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
 - comparar el nivel de lípidos Vb con los valores umbral,

en el que

- 25
- un nivel de lípidos Vb entre un primer valor umbral y un segundo valor umbral es indicativo de una esteatosis leve,
 - un nivel de lípidos Vb entre el segundo valor umbral y un tercer valor umbral es indicativo de una esteatosis moderada,
 - un nivel de lípidos Vb superior al tercer valor umbral es indicativo de una esteatosis grave.

30 11. Un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar esteatofibrosis, hepatocarcinoma o cirrosis que comprende las etapas de:

- 35
- medir un nivel de lípidos Vb de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
 - comparar el nivel de lípidos Vb con los valores umbral,

en el que

- 40
- un nivel de lípidos Vb superior a un primer valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar esteatofibrosis,
 - un nivel de lípidos Vb superior a un segundo valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar hepatocarcinoma,
 - un nivel de lípidos Vb superior a un tercer valor umbral es indicativo de un alto riesgo de desarrollar cirrosis.

12. Un método *in vitro* para determinar si un hígado es adecuado para ser injertado que comprende las etapas de:

- 45
- medir un nivel de lípidos Vb de acuerdo con el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
 - comparar el nivel de lípidos Vb con los valores umbral,

en el que

- 50
- un nivel de lípidos Vb inferior a un primer valor umbral es indicativo de que el hígado es adecuado para ser injertado con un bajo riesgo de no funcionar,
 - un nivel de lípidos Vb entre el primer y un segundo valor umbral es indicativo de que el hígado es adecuado para ser injertado con un riesgo moderado de no funcionar,
 - un nivel de lípidos Vb superior a un tercer valor umbral es indicativo de que el hígado no es adecuado para ser injertado.
- 55

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el nivel de lípidos Vb es un nivel de triglicéridos.

60

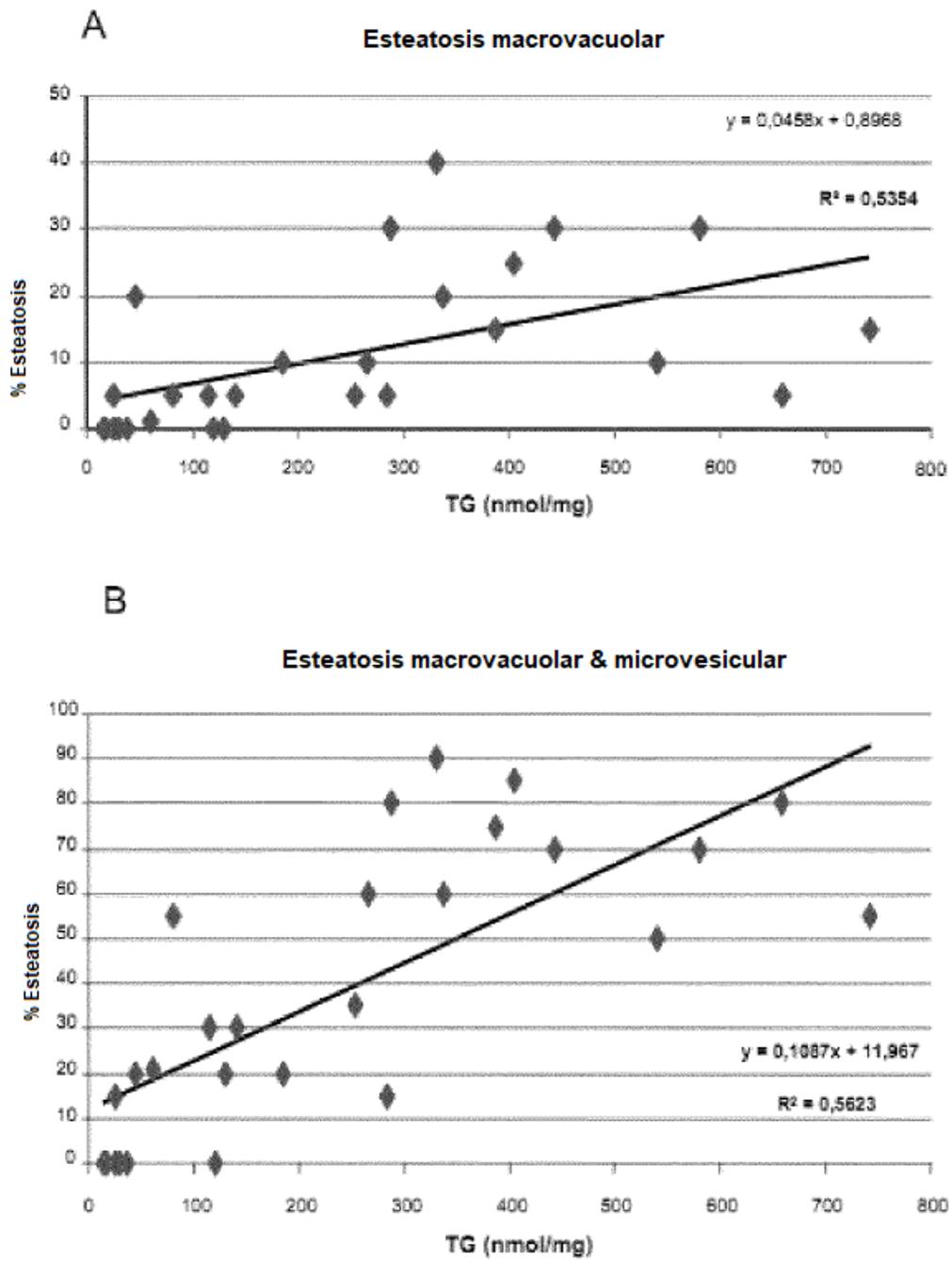


FIG. 1

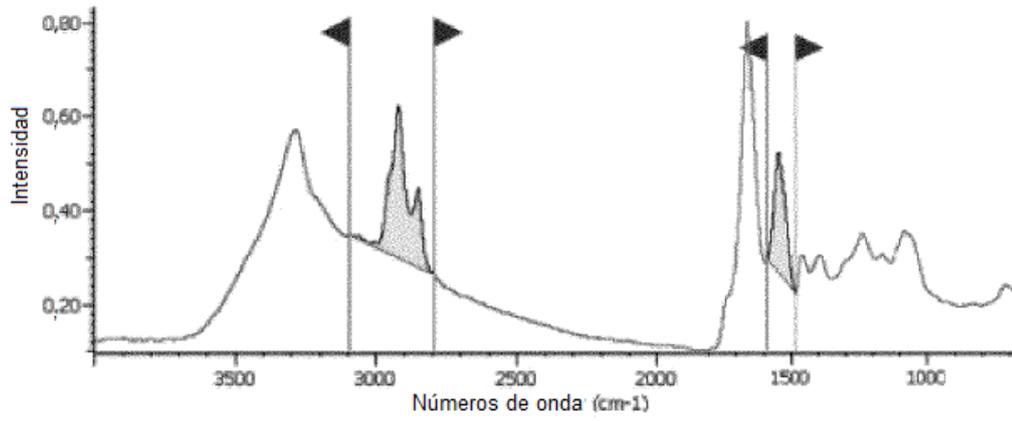


FIG. 2

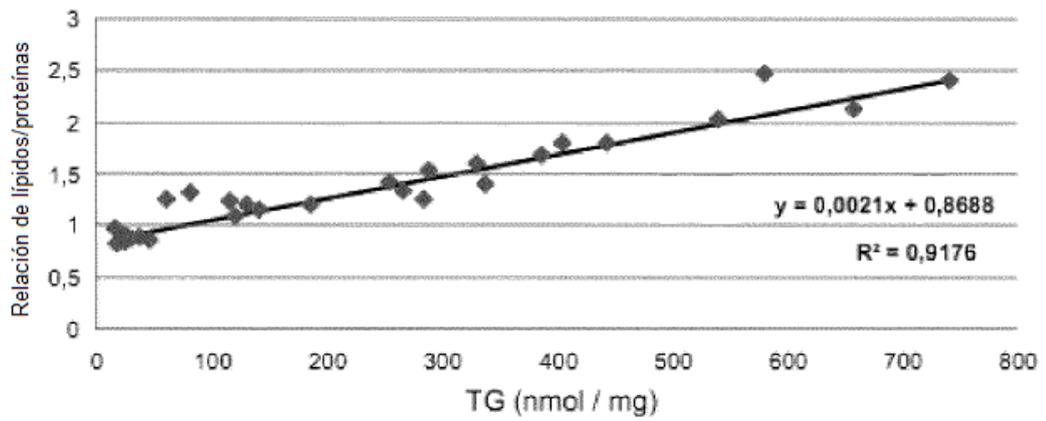


FIG. 3

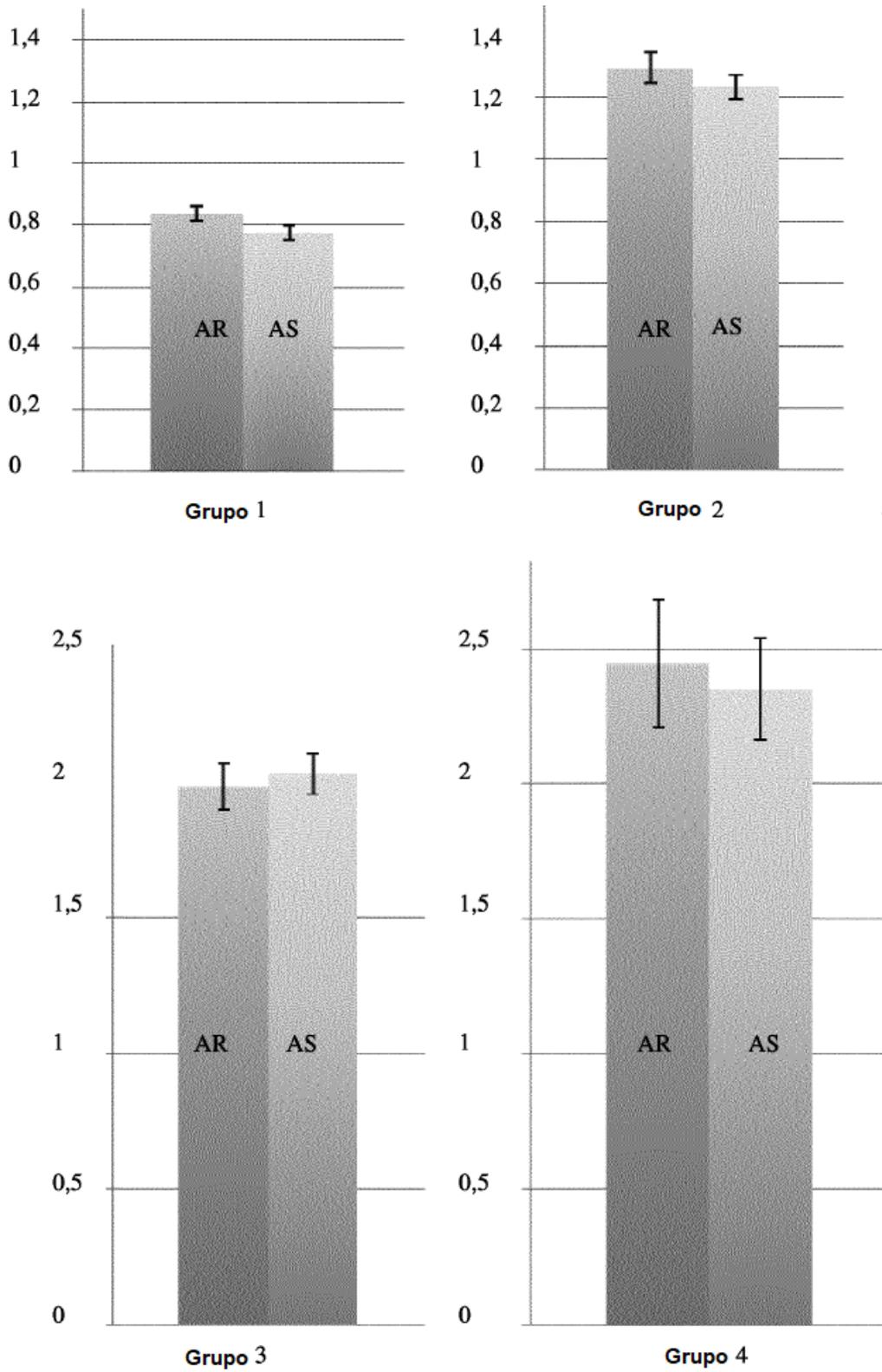


FIG. 4