

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 357**

51 Int. Cl.:

G01R 33/56 (2006.01)

G06T 7/00 (2007.01)

A61B 5/055 (2006.01)

G01R 33/561 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016 PCT/EP2016/055806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016 E 16710221 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3271738**

54 Título: **Métodos de análisis óptico computarizado de imágenes de MR (resonancia magnética) para cuantificar o determinar lesiones hepáticas**

30 Prioridad:

17.03.2015 EP 15382118

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

10.02.2020

73 Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)

Avda. de la Constitución, 18

41071 Sevilla, ES;

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (33.3%) y

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN

RED (CIBER) (33.3%)

72 Inventor/es:

ROMERO GÓMEZ, MANUEL;

GÓMEZ GONZÁLEZ, EMILIO;

GALLEGO DURÁN, ROCÍO y

CERRO SALIDO, PABLO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 741 357 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

Métodos de análisis óptico computarizado de imágenes de MR (resonancia magnética) para cuantificar o determinar lesiones hepáticas

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo del diagnóstico hepático y de manera más precisa a métodos de análisis óptico computarizado de imágenes de MR (*magnetic resonance*, resonancia magnética) para cuantificar o determinar lesiones hepáticas, especialmente debidas a o relacionadas con una insuficiencia hepática, esteatosis hepática, esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD por sus siglas en inglés) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés).

10

Antecedentes de la invención

15

La FLD (*fatty liver disease*, enfermedad del hígado graso o esteatosis hepática) describe una amplia gama de estados potencialmente reversibles que implican al hígado, en los que grandes vacuolas de grasa de triglicéridos se acumulan en los hepatocitos a través del proceso de esteatosis (es decir, retención anómala de lípidos dentro de una célula). La FLD se asocia comúnmente con alcohol o síndromes metabólicos (diabetes, hipertensión, dislipidemia, abetalipoproteinemia, glucogenosis, enfermedad de Weber-Christian, enfermedad de Wolman, esteatosis hepática aguda gravídica, lipodistrofia). Sin embargo, también puede deberse a causas nutricionales (desnutrición, nutrición parenteral total, pérdida de peso intensa, síndrome de realimentación, derivación yeyuno-ileal, derivación gástrica, diverticulosis yeyunal con proliferación bacteriana), así como diversos fármacos y toxinas (amiodarona, metotrexato, diltiazem, terapia antirretroviral de gran actividad, glucocorticoides, tamoxifeno, hepatotoxinas ambientales) y otras enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria del intestino o el VIH.

20

25

Ya se trate de una AFLD (*alcoholic fatty liver disease*, esteatosis hepática alcohólica) o NAFLD (esteatosis hepática no alcohólica), la FLD abarca un espectro morfológico que va desde la "esteatosis hepática" (hígado graso) del tipo más leve, denominado NAFL, hasta la "esteatohepatitis" de tipo potencialmente más grave, denominada NASH, que se asocia con una inflamación perjudicial para el hígado y, a veces, la formación de tejido fibroso. De hecho, la esteatohepatitis tiene la propensión inherente a evolucionar hacia el desarrollo de una fibrosis y luego una cirrosis que puede producir una cicatrización patológica del hígado progresiva e irreversible o hacia un carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado).

30

Debido a que estas enfermedades pueden revertirse potencialmente si se diagnostican a tiempo, o al menos pueden limitarse sus consecuencias, es crucial poder proporcionar al campo médico herramientas que permitan tal diagnóstico de manera temprana, rápida y precisa.

35

Durante mucho tiempo, el diagnóstico de esteatosis hepática se ha logrado habitualmente midiendo marcadores tales como g-glutamyl-transpeptidasa (GGT) y alanina aminotransferasa (ALT) mientras se realizaban al mismo tiempo biopsias de hígado con el fin de confirmar el FLD y determinar la graduación y estadificación de la enfermedad. Aunque las biopsias pueden proporcionar información importante referente al grado de daño en el hígado, en particular, la gravedad de la actividad necroinflamatoria, fibrosis y esteatosis, el procedimiento también presenta varias limitaciones, tales como un error de muestreo, la invasividad, el coste, el dolor para los pacientes que trae consigo a su vez una cierta renuencia a someterse a un procedimiento de este tipo; y, finalmente, pueden surgir complicaciones a partir de tal procedimiento, lo que en algunos casos pueden conducir incluso a mortalidad. La ecografía también se usa para diagnosticar la esteatosis hepática. Sin embargo, este método es subjetivo ya que se basa en la intensidad de eco (ecogenicidad) y patrones especiales de ecos (textura). Como resultado, no es lo suficientemente sensible y a menudo es inexacto en pacientes con fibrosis avanzada. Por último, se admite generalmente que aproximadamente la mitad de todos los casos de FLD se detectan mediante análisis de sangre habituales y alrededor de la mitad mediante una ecografía, lo que da como resultado alrededor de una cuarta parte de diagnósticos erróneos cuando se usan ambos.

40

45

50

En los últimos años, el uso de biomarcadores no invasivos ha adquirido importancia en el campo del diagnóstico hepático. De hecho, ya se han desarrollado varias pruebas que usan biomarcadores no invasivos y se han propuesto para el diagnóstico de fibrosis (véase por ejemplo el documento WO 2005/116901). La prueba se refiere a un método para diagnosticar la presencia y/o gravedad de una patología hepática y/o para monitorizar la eficacia de un tratamiento curativo frente a una patología hepática en un individuo, mediante el establecimiento de al menos una puntuación de diagnóstico no invasivo, en particular una puntuación de diagnóstico para la fibrosis portal y septal y/o una estimación de la cantidad de fibrosis (el área de fibrosis) y/o una estimación de la arquitectura de la fibrosis (dimensión fractal). Además, Poynard *et al.* (documento WO 2006/082522) han demostrado que puede usarse un solo biomarcador o un panel de biomarcadores como alternativa a la biopsia de hígado para el diagnóstico de esteatosis, ya sea inducida por alcohol, hepatitis viral o NAFLD, las causas más comunes de esteatosis. En particular, este documento prevé un nuevo panel de biomarcadores conocido como SteatoTest (ST) con valores predictivos para el diagnóstico de esteatosis debida a alcohol, NAFLD y hepatitis C y B. Se consideraron la GGT y ALT en suero como los marcadores bioquímicos convencionales. Sin embargo, según la Agencia Nacional de Salud

60

65

(HAS) francesa, actualizado en diciembre de 2008, y la opinión internacional actual, el rendimiento de este tipo de prueba puede ser insuficiente, especialmente debido a la referencia basada en una graduación subjetiva de la esteatosis hepática con una deficiente reproducibilidad entre observadores. Además, esta graduación es una variable semicuantitativa que implica un reflejo impreciso y limitado del patrón original.

El solicitante ha observado ahora que los métodos de análisis óptico computarizado de imágenes de MR (resonancia magnética) sin contraste convencionales del hígado permiten la detección de esteatohepatitis mediante NASH-MRI y de fibrosis significativa mediante Fibro-MRI en pacientes que padecen NAFLD. Estos métodos eluden las limitaciones mencionadas anteriormente y son más precisos y fiables que los métodos citados en la técnica anterior, tal como se muestra por su alto rendimiento de diagnóstico. Los métodos de la invención reducen considerablemente la necesidad de biopsias, ya que capturan más información que en la técnica anterior acerca de las lesiones evaluadas, garantizan la reproducibilidad y el rendimiento, al tiempo que atenúan las causas de resultados falsos (en general, las fuentes de resultados falsos se contraponen en una puntuación que incluye varios marcadores siempre que se incluyan algunas precauciones).

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona métodos de análisis óptico computarizado de imágenes de MR (resonancia magnética) del hígado, permitiendo dichos métodos la detección de esteatohepatitis mediante NASH-MRI y la fibrosis significativa mediante Fibro-MRI en pacientes que padecen NAFLD. Usando los métodos de la presente invención es posible predecir la tasa de progresión de la enfermedad, apoyar la toma de decisiones terapéuticas y monitorizar potenciales efectos terapéuticos.

En particular, un primer aspecto de la invención se refiere a un método no invasivo para cuantificar las lesiones del hígado de un sujeto que se sospecha que padece una esteatosis hepática no alcohólica abordando la esteatohepatitis como diana de diagnóstico. Las etapas del método se exponen en la reivindicación 1.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método no invasivo para cuantificar las lesiones del hígado de un sujeto que se sospecha que padece una esteatosis hepática no alcohólica abordando la fibrosis como diana de diagnóstico. Las etapas del método se exponen en la reivindicación 2.

Además, se observa adicionalmente que el método de la invención puede usarse en un método de tratamiento para tratar a aquellos pacientes que padecen o tienen probabilidades de padecer cualquiera de las dianas de diagnóstico. Tal terapia de tratamiento, en particular para NASH, puede seleccionarse de, pero no se limita a, cualquiera de los siguientes: OCA, elafibranor, Aramchol, simtuzumab, IMM-124E, cernicriviroc, Emricasan, GS-4997 + simtuzumab, Px-104, BMS-986036, SHP626, ZGN839, GR-MD-02, NDI-010976, GLP-01 semaglutida, NGM282, MSDC-0602, VK2809, MN-001, GS4998, RG-125, DUR-928, CER-209, solitromicina y PXS-4728A.

La invención también se refiere a un método de análisis óptico computarizado según la reivindicación 3.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un programa informático según la reivindicación 4 para implementar el método de análisis óptico computarizado del párrafo anterior y a un dispositivo que comprende el programa informático.

Por tanto, la presente invención ofrece una solución clara a los problemas citados anteriormente puesto que se centra en un método *in vitro* para identificar o detectar sujetos humanos que corren el riesgo de padecer esteatohepatitis o fibrosis.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis comparativo de la exactitud de diagnóstico entre NASH-MRi (AUROC: 0,86; IC del 95%: 0,76-0,96), CK-18 (AUROC: 0,44; IC del 95%: 0,29-0,60); $p < 0,0001$.

Figura 2. Análisis comparativo de la exactitud de diagnóstico entre Fibro-MRI (AUROC: 0,95; IC del 95%: 0,88-1,00) y elastografía transitoria (AUROC: 0,91; IC del 95%: 0,81-1,00), $p = ns$.

Figura 3. Análisis comparativo de la exactitud de diagnóstico entre FibroMRi (AUROC: 0,89; IC del 95%: 0,79-0,98), índice de Sydney (AUROC: 0,64; IC del 95%: 0,47-0,82) y puntuación de fibrosis de NAFLD (AUROC: 0,61; IC del 95%: 0,43-0,79); $p < 0,001$.

Descripción de la invención

- Lista de abreviaturas:

NAFLD: Esteatosis hepática no alcohólica

MRI: Imágenes de resonancia magnética

FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21

5 CK-18: Citoqueratina 18

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

Puntuación NAS: Puntuación de actividad de NAFLD

10 SAF: Puntuación de esteatosis, actividad y fibrosis

HOMA-IR: Evaluación mediante modelo homeostático de resistencia a la insulina

15 ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

ECLIA: Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia

20 IMC: Índice de masa corporal

WL: Nivel de ventana

25 WW: Anchura de ventana

FoV: Campo de visión

ROC: Características operativas del receptor

30 AUROC: Área bajo la característica operativa del receptor

AUC: Área bajo la curva

35 PPV: Valor predictivo positivo

NPV: Valor predictivo negativo

MRS: Espectroscopía de resonancia magnética

40 MRE: Elastografía por resonancia magnética

Definiciones

45 En el contexto de la presente invención E3: media armónica se entiende como la media armónica HH de un conjunto de nn números $\{xx1, xx2, \dots, xxnn\}$ como un tipo específico de promedio. En este caso, $\{xx1,2, \dots, xxnn\}$ representa el conjunto completo de valores de píxel de cada muestra de imagen.

$$H = \frac{n}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{x_i}}$$

50 En el contexto de la presente invención E6: moda significa la moda de un conjunto de nn números $\{xx1,2, \dots, xxnn\}$, concretamente la moda es el valor que aparece con mayor frecuencia.

En el contexto de la presente invención E22: asimetría de moda de Pearson es la asimetría de moda de Pearson, también denominada primer coeficiente de asimetría de Pearson, es una manera de entender la asimetría de una distribución. Indica cuánto se aparta la distribución de la simetría.

55

$$P = \frac{\text{media} - \text{moda}}{\sigma}$$

60 En el contexto de la presente invención E31: media de columnas en una matriz de coocurrencia multiorientada se entiende tal como sigue. En el procesamiento de imágenes, se usan matrices de coocurrencia para analizar la textura de una imagen. Una matriz multiorientada calcula la magnitud y la orientación del vector de gradiente local en

cada posición de píxel, de modo que cada píxel lleva su valor de gris, su magnitud de gradiente y su orientación de gradiente.

En el contexto de la presente invención E57: contraste de orden 2-2 se entiende como el atributo de textura de una muestra dada, calculado como una variación local de nivel de gris en la matriz de coocurrencia de nivel de gris. Puede considerarse como una dependencia lineal de niveles de gris de píxeles vecinos. Si los píxeles vecinos son muy similares en sus valores de nivel de gris, entonces el contraste en la imagen es muy bajo. En el caso de la textura, las variaciones de nivel de gris muestran la variación de la propia textura. Se esperan altos valores de contraste para texturas gruesas y bajos para texturas lisas y suaves. Los detalles específicos de este parámetro se facilitan en *Texture Characterization based on Grey-Level Co-occurrence Matrix*. Huertas, R. y Gebejes, A. 2013. *Conference of Informatics and Management Sciences*. 375-378.

En el contexto de la presente invención E73: curvatura media promediada es un valor que representa la media de las curvaturas en cada píxel dentro de la muestra de imagen. La curvatura es una característica usada para describir la superficie de la imagen.

En el contexto de la presente invención E75: máximo de curvaturas primarias es el valor máximo de todas las curvaturas primarias (curvatura primaria de cada píxel de la muestra) que se usa como descriptor de atributo de superficie.

En el contexto de la presente invención, los protocolos de MRI mostrados a continuación pueden seguirse con el fin de obtener la información necesaria para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Sin embargo, se observa que los protocolos mostrados a continuación en el presente documento son especialmente adecuados para la adquisición de MRI usando sistemas de cuerpo completo de 1,5 Teslas de General Electric (Milwaukee, CT., EE.UU.) (podrían ser necesarios otros protocolos para diferentes sistemas):

Protocolo de SSFSE-T2 MRI	Protocolo de FAST STIR MRI	Protocolo de DYNAMIC MRI
- FOV: 450 mm. - RFOV: 80%. - TR/TE: Mínimo/100 ms. - GROSOR/ SEPARACIÓN: 8/1 mm. - NSA: 2. - MATRIZ: 320/129. - CORTES: 24. - TIEMPO DE ADQUISICIÓN: 40 s.	- FOV: 400 mm. - RFOV: 75%. - TR/TE: 1800/30 ms. - TI: 165 ms. - GROSOR/SEPARACIÓN: 7/1 mm. - NSA: 2. - MATRIZ: 320/320. - CORTES: 24. - TIEMPO DE ADQUISICIÓN: 7:27 min.	- FOV: 400 mm. - RFOV: 90%. - TR/TE: En fase. - ÁNGULO DE INCLINACIÓN: 10 ms. - GROSOR: 5,0 mm. - NSA: 1. - MATRIZ: 128/256. - CORTES: 128. - TIEMPO DE ADQUISICIÓN: 17,5 s. - FASES: BASAL

Descripción detallada de la invención

En esta invención, los autores de la presente invención demuestran que un análisis óptico computarizado de imágenes de MR (resonancia magnética) sin contraste convencionales del hígado permite la detección de esteatohepatitis mediante NASH-MRI y de fibrosis significativa mediante Fibro-MRI en pacientes que padecen NAFLD. Mediante el uso de los métodos de la presente invención, es posible predecir la tasa de progresión de la enfermedad, apoyar la toma de decisiones terapéuticas y monitorizar potenciales efectos terapéuticos.

El diagnóstico de enfermedades hepáticas ha dependido durante mucho tiempo de la biopsia de hígado, a pesar de la alta variabilidad intra e interobservador y el error de muestreo. Un panel de biomarcadores séricos para confirmar o descartar, la esteatohepatitis no se concretó. Una prueba de NASH, incluida en Fibromax®, es una puntuación semicuantitativa con una amplia zona gris; Owl-liver® predice con exactitud la esteatohepatitis pero requiere que se analice en un laboratorio centralizado, lo que socava la accesibilidad; una combinación de CK-18 y FGF-21 no pudo confirmar la utilidad en el diagnóstico de NASH.

El diagnóstico no invasivo de fibrosis significativa en NAFLD también es un desafío. La puntuación de fibrosis de NAFLD se desarrolló específicamente en NAFLD pero en el proceso de validación, mostró una amplia zona gris sin capacidad predictiva. Se han probado marcadores no invasivos importados de la hepatitis C en NAFLD como el índice de Sydney, FIB-4, el índice de Forns y APRI. Sin embargo, se notificó una correlación deficiente entre biomarcadores séricos de fibrosis hepática (APRI, FIB 4, razón AST/ALT, panel europeo hepático y medición de rigidez hepática) en pacientes diabéticos. La concordancia fue buena en ausencia de una enfermedad hepática avanzada, pero la concordancia fue deficiente con la presencia de enfermedad avanzada.

Por otra parte, hay un interés creciente en métodos no invasivos basados en imágenes. La ecografía, la elastografía

transitoria, el impulso de fuerza de radiación acústica, la espectroscopía de resonancia magnética o la elastografía por resonancia magnética se han usado para el diagnóstico de NASH. La ecografía ha mostrado el 60-94% de sensibilidad y el 84-95% de especificidad en la detección de esteatosis hepática, que es aceptable para la detección de esteatosis de primera línea en la práctica clínica, pero no puede distinguir NASH de esteatosis simple. La elastografía transitoria (FibroScan®; Echosens, París, Francia) ha mostrado una buena exactitud de diagnóstico en la estratificación de la fibrosis avanzada en NAFLD. Sin embargo, la elastografía transitoria no se ha encontrado útil para el diagnóstico de NASH. Sin embargo, más del 10% de los pacientes no pueden evaluarse por fallos de procedimiento debidos, principalmente, a un alto índice de masa corporal (IMC). Por tanto, el umbral que define el estadio de fibrosis avanzada sigue siendo controvertido y requiere mayores puntuaciones de kPa para definir la cirrosis, en comparación con los puntos de corte aceptados para la hepatitis viral. La espectroscopía de resonancia magnética (MRS por sus siglas en inglés) permite la evaluación, *in vivo*, de la composición molecular del hígado y la detección de esteatosis con alta exactitud, siendo un método de referencia para la esteatosis aunque falla en la detección de NASH. La elastografía por resonancia magnética (MRE por sus siglas en inglés) ha demostrado ser exacta en la estadificación de la fibrosis, pero su disponibilidad es baja en la mayoría de los centros y requiere una validación externa adicional. La principal limitación de estos métodos basados en imágenes ha sido la incapacidad de detectar la esteatohepatitis. Los nuevos desarrollos en el campo de la MR tales como sondas de gadolinio dirigidas a colágeno tipo 1 han mostrado buenos resultados preliminares, pero tienen que trasladarse a un entorno clínico convencional.

En cambio, tal como se muestra en el presente documento, la NASH-MRI y la Fibro-MRI pueden predecir con exactitud la estadificación de esteatohepatitis y fibrosis. La MRI puede acceder a tejido profundo, y permite el análisis del hígado completo. Es útil en la toma de decisiones con respecto a la gestión de hígados de donantes antes de un trasplante de hígado, o en el cálculo de la velocidad de progresión de fibrosis en las enfermedades hepáticas que comparten la esteatosis como una característica importante, tales como, por ejemplo, la hepatitis viral o enfermedades hepáticas relacionadas con el alcohol. Dado que se evita la radiación ionizante, el sistema propuesto es adecuado para monitorizar la progresión de la esteatohepatitis y la fibrosis a lo largo del tiempo.

Además, la NASH-MRI y la Fibro-MRI son independientes del fabricante del sistema de MR (Philips frente a GE, en el presente estudio). Los datos de puntuación se relacionan con la presencia de esteatohepatitis o fibrosis; cuanto menor sea la puntuación, menor es la probabilidad de padecer esteatohepatitis o fibrosis significativa. Lo contrario también es válido, es decir, cuanto mayor sea la puntuación, mayor es el riesgo de presentar esteatohepatitis o fibrosis significativa.

La limitación técnica es un error de segmentación. Esto es porque el método se basa en un análisis óptico de características de imagen para cuantificar diferencias bastante delicadas que no son visibles a simple vista. Los vasos u otras estructuras en la muestra podrían ser factores de confusión que dan como resultado sub o sobreestimar el grado de fibrosis o inflamación. Esto se ha resuelto (en el presente análisis) mediante la exclusión de áreas que contienen vasos sanguíneos, vías biliares o lesiones focales y, también, todas las muestras con >30% de píxeles fuera del área segmentada.

En conclusión, la NASH-MRI y la Fibro-MRI son útiles en el diagnóstico de esteatohepatitis y fibrosis significativa en pacientes con NAFLD. Los métodos ofrecen claras ventajas con respecto a la biopsia de hígado, ya que son inocuos; habilitan la detección de un gran número de pacientes, y el análisis del hígado completo usando un software fácil de usar. La enfermedad podría estadificarse con respecto a la gravedad, y podría proporcionar información sobre el pronóstico, apoyando la toma de decisiones clínicas y monitorizando la respuesta a la terapia.

Los siguientes ejemplos sirven meramente para ilustrar la invención y, por tanto, no limitan la misma.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

- Diseño del estudio y pacientes

Se trató de un estudio de cohortes prospectivo y multicéntrico que incluyó a pacientes con NAFLD bien caracterizada, demostrada mediante biopsia. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para el estudio de MRI y la biopsia de hígado. Los criterios de inclusión fueron:

- a. adultos (>18 años de edad) que mostraron hígado hiperecogénico difuso en la ecografía;
- b. deterioro en el perfil hepático bioquímico;
- c. características de síndrome metabólico, incluyendo un aumento de HOMA-IR.

Los criterios de exclusión fueron alcoholismo significativo (>30 g/día en hombres y >20 g/día en mujeres) y evidencia de hepatitis viral o autoinmunitaria, VIH, esteatosis hepática inducida por fármacos u otras enfermedades hepáticas

metabólicas (tales como hemocromatosis o enfermedad de Wilson), junto con el embarazo y nutrición parenteral.

Los pacientes incluidos en el estudio se clasificaron en función del sexo, la edad, el estadio de fibrosis y la presencia esteatohepatitis. Los pacientes se sometieron a una historia clínica completa, examen físico, análisis de sangre, biopsia de hígado y estudio de obtención de imágenes. Se extrajo una muestra de sangre en estado de ayuno durante la noche (12 h) para análisis de rutina que incluyeron ALT, AST, fosfatasa alcalina, γ GT, colesterol y triglicéridos. Se almacenaron las muestras de suero obtenidas en estado de ayuno después de la centrifugación en alícuotas a -80°C hasta que se sometieron a ensayo. Se midieron los niveles de insulina en suero mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia, usando un autoanalizador Elecsys 1010/2010 (Elecsys MODULAR ANALYTICS E170; Roche, Basilea, Suiza). Se midió CK-18 usando un kit de ELISA para humanos (Abnova, Walnut, CA, EE.UU.). Se midió la elastografía transitoria usando FibroScan®, Echosens, Francia. Se determinaron la altura y el peso en el nivel inicial, y se calculó el índice de masa corporal (IMC) como el peso (en kg) \div la altura (en m^2).

- Graduación y estadificación histológica

Se realizaron biopsias de hígado percutáneas con anestesia local y ecodirigida. Se obtuvieron muestras de hígado, después de estado de ayuno durante la noche, mediante aguja "Tru-cut" (longitud/diámetro de muestra = 20/1,2 mm) usando una pistola para biopsia y, al menos, se extrajo una muestra por cada paciente. Se registró la longitud de las muestras de hígado y, junto con el número de espacios porta, la muestra se consideró útil, o no, para el diagnóstico histológico y la estadificación de fibrosis. Se excluyeron las muestras que presentaron <10 mm o <10 espacios porta.

Se procesaron las biopsias de manera rutinaria, se fijaron en formalina y se incrustaron en parafina. Un único patólogo, a quien era ciego con respecto a la procedencia de las muestras, evaluó las tinciones con hematoxilina-eosina, reticulina y tricrómica de Masson para determinar las asignaciones de graduación y estadificación. Este sistema de puntuación comprende cuatro características semicuantitativas: esteatosis, inflamación lobular, degeneración vacuolar hepatocelular y fibrosis. Se calculó la presencia de esteatohepatitis según la puntuación de actividad de NAFLD de Kleiner (puntuación NAS) y una puntuación adicional para fibrosis. La puntuación NAS proporciona una puntuación compuesta que comprende el grado de esteatosis (puntuación de 0-3), inflamación lobular (puntuación de 0-3) y degeneración vacuolar de hepatocitos (puntuación de 0-2).

Una puntuación NAS >5 sugiere NASH, mientras que una puntuación NAS <3 indica esteatosis simple.

Se cuantificó la esteatosis hepática como el porcentaje de hepatocitos que contenían gotitas de grasa, graduado en una escala de 0-3 a través de una estimación visual subjetiva de células que contienen vacuolas de grasa.

Los grados de esteatosis se categorizaron ampliamente según la gravedad: grado 0 o normal (hasta el 5% de los hepatocitos afectados), grado 1 o leve (el 5-33% de las células afectadas), grado 2 o moderada (el 33-66% que mostraban esteatosis) y grado 3 o grave ($>66\%$ de los hepatocitos mostraban almacenamiento de grasa).

Se evaluó la inflamación lobular como de grado 0 (sin inflamación), grado 1 (<2 focos/campo $\times 200$), grado 2 (2-4 focos/campo $\times 200$) y grado 3 (>4 focos/campo $\times 200$).

Se evaluó la degeneración vacuolar como estadio 0 (ninguna), estadio 1 (unas pocas células vacuoladas) y estadio 2 (muchas células o degeneración vacuolar prominente).

Por último, se realizó la estadificación de la fibrosis según una escala de 5 niveles: F0 = ausencia; F1 = perisinusoidal o periportal; F2 = perisinusoidal y portal/periportal, F3 = fibrosis en puentes, F4 = cirrosis. Se aplicó una escala adicional de 2 niveles de fibrosis: fibrosis leve (F0-F1) y avanzada (F2-F3-F4).

- Adquisición de imágenes por resonancia magnética (MRI por sus siglas en inglés)

Se adquirieron MRI en los seis hospitales universitarios usando sistemas de cuerpo completo de 1,5 Teslas de General Electric (Milwaukee, CT., EE.UU.) o Philips (Best, NL.). Los pacientes se examinaron mientras estaban en posición de decúbito supino usando una bobina para torso convencional centrada sobre el hígado sin contraste, atendidos por el técnico según la capacidad para aguantar la respiración individual. Las MRI se enviaron al centro de derivación para su procesamiento. Se obtuvieron imágenes de hígado completo y se seleccionaron 6 secciones. Los protocolos seleccionados para este estudio se realizaron en un plano axial, SSFSE-T2 (eco de espín rápido de disparo único potenciado en T2), FAST-STIR (inversión-recuperación rápida con un tiempo de inversión corto), en FASE-fuera de FASE (en y fuera de fase) y DYNAMIC (véase la tabla 1, Parámetros de obtención de imágenes, a continuación).

INSTRUCCIONES:

- Subir los brazos si es posible
- Debe aguantarse la respiración de manera constante
- Posición de decúbito supino
- Contraste: ninguno

Parámetros de obtención de imágenes	Nombre de la secuencia			
	SSFSE-T2	FAST-STIR	En y fuera de FASE	DYNAMIC
Plano de exploración	Axial	Axial	Axial	Axial
Opciones de obtención de imágenes	Aguantar la respiración	Aguantar la respiración	Aguantar la respiración	Aguantar la respiración
Tiempo (s)	29,76 ± 10,05	340,98 ± 104,10	38,10 ± 6,66	35,44 ± 90,33
FOV (mm)	450	400	410	375
Tamaño de matriz (px)	512x512	448x448	432x432	192x192

s: segundos; FoV: campo de visión; mm: milímetros; px: píxeles

Se configuraron archivos DICOM, campo de visión (FoV) y tamaños de matriz específicamente para cada protocolo de MR; se calcularon los valores de ventana mínimos y máximos, con el fin de poder convertir cada corte en una matriz numérica de píxeles dentro de ese rango de ventana. Procesamiento de generación de imágenes por MR para la definición de biomarcadores de obtención de imágenes de NASH-MRi y Fibro-MRi

- Desarrollo o selección de biomarcadores de obtención de imágenes

Se incluyeron los pacientes seleccionados según el estadio de esteatohepatitis y fibrosis. Las imágenes de MR se segmentaron con una cuadrícula cuadrada. El tamaño de muestra osciló desde 10x10 hasta 23x23 píxeles, dependiendo de la resolución de imagen, para asemejarse al área óptima de biopsia de hígado. Todas las regiones que contenían artefactos, tales como vasos, vías hepatobiliares o con >30% de los píxeles fuera del área segmentada, se descartaron y sólo se analizaron los cuadrados que comprendían parénquima hepático. Se procesaron las MRI tanto de Philips como de G&E.

Las características de MRI, los procedimientos de extracción y la implementación se desarrollaron en lenguaje de programación MATLAB® (Matrix Laboratory, MathWorks, Natick, MA, EE.UU.). La herramienta de software desarrollada importa archivos DICOM y los analiza, extrayendo toda la información necesaria tal como datos demográficos del paciente, denominación y número de evaluaciones de MRI realizadas, número de cortes y fecha de las imágenes.

- a. El conjunto completo de cortes que corresponden a una nueva evaluación se muestra en una cuadrícula. Deben elegirse hasta 6 cortes consecutivos, preferentemente aquellos que muestren la sección del hígado más grande.
- b. Los cortes seleccionados se muestran de forma secuencial por separado. El usuario debe trazar el contorno de los límites del hígado para segmentar el hígado completo. Una vez segmentado, se superpone una cuadrícula automáticamente sobre el área segmentada. Para lograr un tamaño de muestra equivalente a 20 mm de tejido, se calcula el número de píxeles de las muestras usando el valor de FoV y el número de filas y columnas de la matriz de imagen. Por tanto, el número de muestras varía para diferentes secuencias de MRI.
- c. El software descarta automáticamente las muestras con >30% de la superficie fuera de la línea de segmentación. El usuario también debe descartar muestras que no representen tejido hepático homogéneo.
- d. Un total de 84 parámetros matemáticos diferentes se calcularon a partir de cada muestra. La naturaleza de estos parámetros va desde descriptores estadísticos simples tales como la media y desviación estándar, hasta características de energía como la entropía, propiedades geométricas tales como la curvatura de superficie media, y características espectrales.
- e. Esta gran cantidad de datos se procesaron mediante redes neurales arquitectónicas y regresión logística. Se seleccionó la combinación de parámetros de los diferentes protocolos capaces de definir dos biomarcadores de obtención de imágenes para predecir NASH (NASH-MRi) y fibrosis (Fibro-MRi).

- Validación de biomarcadores de obtención de imágenes

Se validaron los biomarcadores de obtención de imágenes desarrollados. No se observaron diferencias según la edad, el sexo, la distribución de fibrosis o esteatohepatitis. Estaba presente NASH en 44 casos (51%) y fibrosis significativa en 33 pacientes (38%). La distribución de fibrosis entre los pacientes fue: F0, n = 39, F1, n = 17, F2, n =

18, F3, n = 9, F4: n = 4. Se requirieron tres protocolos para detectar con exactitud la esteatohepatitis y dos para la detección de fibrosis. El tiempo promedio consumido fue de 11,23 + 3,4 minutos.

- Comparación con biomarcadores bioquímicos

5 La NASH-MRi se comparó con los niveles de CK-18 y FGF-21 y la Fibro-MR con FIB-4, el índice de Sydney y la puntuación de fibrosis de NAFLD usando el área bajo las curvas ROC (AUC).

- Análisis de datos y estadística

10 Se usó un paquete de software SPSS® 22.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.) para registrar los datos y realizar un análisis estadístico detallado. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se usó un análisis de regresión lineal múltiple para comparar las variables continuas.

15 Se usaron curvas de características operativas del receptor (ROC), que representan el equilibrio entre la tasa de verdaderos y falsos positivos, para diferenciar los datos mal clasificados entre el estado normal y el de enfermedad. La AUROC puede variar desde 0,5 (exactitud de discriminación aleatoria) hasta 1,0 (exactitud de discriminación perfecta).

20 Se generó una AUROC con el fin de evaluar la exactitud de diagnóstico de las herramientas, así como el nivel de competencia predictiva con respecto a la presencia de fibrosis leve (F0-F1), fibrosis significativa (F2-F3-F4) y esteatohepatitis. La NASH-MRI y la Fibro-MRI fueron las salidas del análisis óptico y se definen como modelos predictivos usados para predecir esteatohepatitis y fibrosis significativa. La concordancia entre los valores de NASH-MRI y Fibro-MRI calculados numéricamente y la esteatohepatitis y fibrosis definidas histopatológicamente se comparó mediante un análisis de coeficiente de regresión de Spearman. Se calculó el tamaño de muestra para mostrar una diferencia significativa entre parámetros histológicos y NASH-MRI y Fibro-MRI usando el software nQuery Advisor v7.0.

30 Tabla 2. Características de nivel inicial de la población de pacientes: resultados de demografía, análisis clínico e histología. Los valores se presentan como una media \pm D.E., a menos que se indique de otro modo

Parámetro	Cohorte global (N=126)
Edad; a	51 \pm 12
Sexo masculino; %	66
Índice de masa corporal; kg/m ²	30,59 \pm 4,84
Perímetro de cintura; cm	101,8 \pm 11,11
Etnia hispana; %	100
Hipertensión arterial; %	36,4
Diabetes; %	37,5
Colesterol; mmol/l	8,53 \pm 10,9
Triglicéridos; mmol/l	5,87 \pm 11,71
ALT; U.I./l	73 \pm 44
AST; U.I./l	46 \pm 39
GGT; U.I./l	101 \pm 101
Cifra de plaquetas; $\times 10^9$	233 \pm 57
Glucosa en estado de ayuno; mmol/l	8,06 \pm 15,72
Insulina; mg/dl	14,88 \pm 9,29
Grado de esteatosis; %	
0	17,9
1	42,3
2	24,4
3	15,4
NASH; %	51,2
Estadio de fibrosis; %	
F0-F1	60
F2-F3-F4	40
Puntuación NAS (%)	
<4	37,1
≥ 4	62,9

Notas de la tabla 2: AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma-glutamil-transferasa; NASH: esteatohepatitis no alcohólica; puntuación NAS: puntuación de actividad de NAFLD

Ejemplo 1. Desarrollo y normalización de NASH-MRI para la detección de esteatohepatitis

Se encontró que el estimador E3 (media armónica) del protocolo SSFSE-T2 de MRI, el estimador E57 (contraste de orden 2-2) a partir del protocolo DYNAMIC de MRI y el estimador E73 (curvatura media ponderada) a partir del protocolo FAST-STIR de MRI se asociaron de forma independiente con NASH.

- 5 Los coeficientes de modelos asociados con cada una de estas variables independientes fueron $\beta_1 = 0,079$ (RP: 1,08; IC del 95%: 1,02-1,15; $p = 0,015$) y $\beta_2 = 0,22$ (RP: 1,14; IC del 95%: 1,3-1,26; $p = 0,015$).

Estos estimadores influyen en la ecuación predictiva para obtener la probabilidad de padecer esteatohepatitis:

10
$$\text{NASH-MRI} = 1 / (1 + e^{(1,654 - 0,079 \cdot E3_{T2} - 0,127 \cdot E57_{DYN} \cdot E73_{FAST})})$$

La AUROC obtenida fue de 0,88 (IC del 95%: 0,77-0,99) en la cohorte de estimación. Se obtuvieron valores de sensibilidad del 87%, especificidad del 74%, valor predictivo positivo (VPP) del 80% y valor predictivo negativo (VPN) del 82% a partir de una predicción basada en un punto de corte de 0,5 para NASH-MRI.

- 15 En la cohorte de validación, la AUROC de NASH-MRI fue de 0,84 (IC del 95%: 0,75-0,92). Usando el umbral definido de 0,5 para la predicción de NASH-MRI, los resultados obtenidos fueron: una sensibilidad del 87%, una especificidad del 60%, un VPP del 71% y un VPN del 81%.

20 *Ejemplo 2. Desarrollo y normalización de Fibro-MRI para la detección de fibrosis*

Se encontró que el estimador E22 (coeficiente de asimetría de Pearson) del protocolo SSFSE-T2 de MRI y los estimadores E3 (media armónica), E6 (moda), E31 (media de columnas de la matriz de coocurrencia multiorientada) y E75 (máximo de curvaturas principales) del protocolo DYNAMIC de MRI se asociaron de forma independiente con fibrosis. Los coeficientes de modelos asociados con cada una de estas variables independientes fueron: $\beta_1 = 1,101$ (RP: 3,01; IC del 95%: 1,25-7,25; $p = 0,014$); $\beta_2 = -1,105$ (RP: 0,33; IC del 95%: 0,14-0,77; $p = 0,010$); $\beta_3 = -115,737$ (RP: 0,08; IC del 95%: 0,02-0,14; $p = 0,046$) $\beta_4 = 0,696$ (RP: 2,00; IC del 95%: 1,19-3,38; $p = 0,009$); y $\beta_5 = -0,825$ (RP: 0,44; IC del 95%: 0,21-0,93; $p = 0,030$) deben introducirse en la ecuación predictiva para obtener el riesgo de padecer fibrosis como:

30
$$\text{Fibro-MRI} = 1 / (1 + e^{(-4,207 - 1,101 \cdot E3_{DYN} + 1,105 \cdot E6_{DYN} + 115,737 \cdot E22_{T2} - 0,696 \cdot E31_{DYN} + 0,825 \cdot E75_{DYN})})$$

En la cohorte de estimación, la AUROC fue de 0,94 (IC del 95%: 0,87-1,00), con una sensibilidad del 81%, una especificidad del 85%, un VPP del 77% y un VPN del 86% usando un punto de corte de 0,5 para la Fibro-MRI.

- 35 En la cohorte de validación, la AUROC de Fibro-MRI para fibrosis significativa fue de 0,85 (IC del 95%: 0,77-0,93). Usando el umbral definido en 0,5 para la predicción de Fibro-MRI, los resultados obtenidos fueron: una sensibilidad del 77%, una especificidad del 80%, un VPP del 67% y un VPN del 87%.

40 *Ejemplo 3. Normalización de NASH-MRI y Fibro-MRI a través de sistemas de MRI*

La NASH-MRI, calculada mediante un escáner de GE, mostró una exactitud de diagnóstico similar de AUROC = 0,76 (IC del 95%: 0,58-0,96) frente a AUROC = 0,83 (IC del 95%: 0,70-0,96); $p = ns$ en comparación con la NASH-MRI calculada en pacientes que se sometieron a MRI con el sistema de Philips. Con respecto a la Fibro-MRI, las evaluaciones realizadas usando un escáner de GE mostraron una AUROC = 0,81 (IC del 95%: 0,66-0,95) frente a AUROC = 0,86 (IC del 95%: 0,72-0,99) usando el sistema de Philips ($p = ns$).

- 50 El análisis comparativo con los marcadores bioquímicos no invasivos de la NASH-MRI para esteatohepatitis se comparó con FGF-21 y CK-18 en el diagnóstico de esteatohepatitis en una cohorte de 64 pacientes. La NASH-MRI ofreció la mejor exactitud de diagnóstico con una AUROC de 0,86 (IC del 95%: 0,76-0,96) para una presencia de esteatohepatitis significativamente mejor que la AUROC de los niveles de CK-18 de 0,56 (IC del 95%: 0,40-0,71; $p < 0,05$) (figura 1). La puntuación NAS se correlacionó tanto con la NASH-MRI ($r = 0,38$; $p < 0,001$) como con los niveles de CK-18 ($r = 0,29$; $p < 0,02$).

- 55 El análisis comparativo con los marcadores bioquímicos no invasivos de la Fibro-MRI para fibrosis significativa (AUROC: 0,85; IC del 95%: 0,74-0,97) fue significativamente superior a NFS (AUROC: 0,56; IC del 95%: 0,41-0,71) e índice de Sydney (AUROC: 0,69; IC del 95%: 0,50-0,87); $p < 0,05$ (figura 2). El estadio de fibrosis se correlacionó con la Fibro-MRI ($r = 0,61$; $p < 0,001$) y con NFS (0,52; $p < 0,001$). Además, se encontró una correlación entre NFS y Fibro-MRI ($r = 0,53$; $p < 0,001$). Por último, el rendimiento de la Fibro-MRI (AUROC: 0,95; IC del 95%: 0,88 a 1,00) fue similar al de la elastografía transitoria (AUROC: 0,91; IC del 95%: 0,81-1,00); $p = ns$ (figura 3).

- 60

REIVINDICACIONES

1. Método no invasivo para cuantificar las lesiones del hígado de un sujeto que se sospecha que padece una esteatosis hepática no alcohólica que aborda la esteatohepatitis como diana de diagnóstico, que comprende:

a. realizar una obtención de imágenes por resonancia magnética de eco de espín rápido de disparo único potenciada en T2 (SSFSE-T2 MRI) y una obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI) y una obtención de imágenes por resonancia magnética con inversión-recuperación con un tiempo de inversión corto (STIR MRI) de eco de espín rápido (FAST-STIR MRI), en la totalidad o parte del hígado del sujeto,

b. medir una media armónica (E3) a partir del conjunto completo de valores de píxel de una imagen generada con dicha SSFSE-T2 MRI, un contraste de orden (E57) a partir de una imagen generada con dicha DYNAMIC MRI y la curvatura principal promediada (E73) a partir de una imagen generada con dicha FAST-STIR MRI; y

c. usar dichas mediciones en una función matemática útil como ecuación predictiva para obtener la probabilidad de padecer esteatohepatitis;

en el que la función matemática útil como ecuación predictiva es la siguiente:

$$\text{NASH-MRI} = 1 / (1 + e^{1,654 - 0,079 \cdot E3_T2 - 0,127 \cdot E57_DYN \cdot E73_FAST})$$

en la que:

E3_T2 = media armónica (E3) a partir de la imagen generada con la obtención de imágenes por resonancia magnética de eco de espín rápido de disparo único potenciada en T2 (SSFSE-T2 MRI);

E57_DYN = contraste de orden (E57) a partir de la imagen generada con la obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI);

E73_FAST = curvatura media promediada (E73) a partir de la imagen generada con la inversión-recuperación con un tiempo de inversión corto de eco de espín rápido (FAST-STIR MRI);

y en el que las imágenes de MRI se adquieren cada una usando un sistema de cuerpo completo de 1,5 Teslas de General Electric.

2. Método no invasivo para cuantificar las lesiones del hígado de un sujeto que se sospecha que padece una esteatosis hepática no alcohólica que aborda la fibrosis como diana de diagnóstico, que comprende:

a. realizar una obtención de imágenes por resonancia magnética de eco de espín rápido de disparo único potenciada en T2 (SSFSE-T2 MRI) y una obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI), en la totalidad o parte del hígado del sujeto,

b. medir el coeficiente de asimetría de Pearson (E22) a partir de una imagen generada con la SSFSE-T2 MRI y medir una media armónica (E3), una moda (E6), una media de columnas de una matriz de coocurrencia (E31) y el máximo de curvaturas principales (E75) a partir de una imagen generada con la DYNAMIC MRI; y

c. usar dichas mediciones en una función matemática útil como ecuación predictiva para obtener la probabilidad de padecer fibrosis

en el que la función matemática útil como ecuación predictiva es la siguiente:

$$\text{Fibro-MRI} = 1 / (1 + e^{-4,207 - 1,101 \cdot E3_DYN + 1,105 \cdot E6_DYN + 115,737 \cdot E22_T2 - 0,696 \cdot E31_DYN + 0,825 \cdot E75_DYN})$$

en la que:

E3_DYN = media armónica (E3) a partir de la obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI);

E6_DYN = moda (E6) a partir de la obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI);

E22_T2 = coeficiente de asimetría de Pearson (E22) a partir de la obtención de imágenes por resonancia

magnética de eco de espín rápido de disparo único potenciada en T2 (SSFSE-T2 MRI);

E31_DYN = media de columnas de una matriz de coocurrencia multiorientada (E31) a partir de la obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI);

5 E75_DYN = máximo de curvaturas principales (E75) a partir de la obtención de imágenes por resonancia magnética con contraste dinámica (DYNAMIC MRI);

10 y en el que las imágenes de MRI se adquieren cada una usando un sistema de cuerpo completo de 1,5 Teslas de General Electric.

3. Método de análisis óptico computarizado de las imágenes del hígado obtenidas en la etapa a) según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende usar medios configurados para realizar las etapas b) y c) según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 con el fin de obtener la probabilidad de padecer la diana de diagnóstico.

4. Programa informático capaz de implementar el método de análisis óptico computarizado según la reivindicación 3.

20 5. Dispositivo que comprende el programa informático según la reivindicación 4.

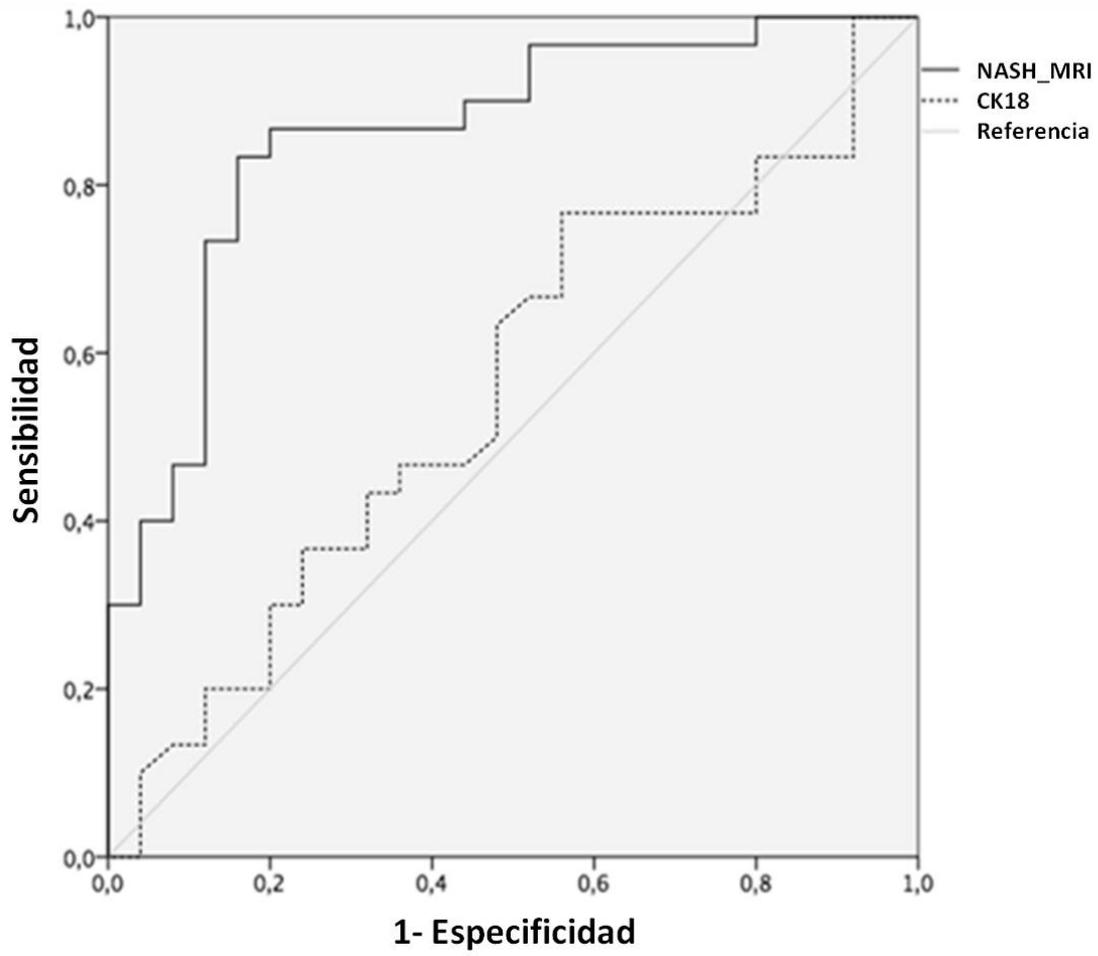


Fig. 1

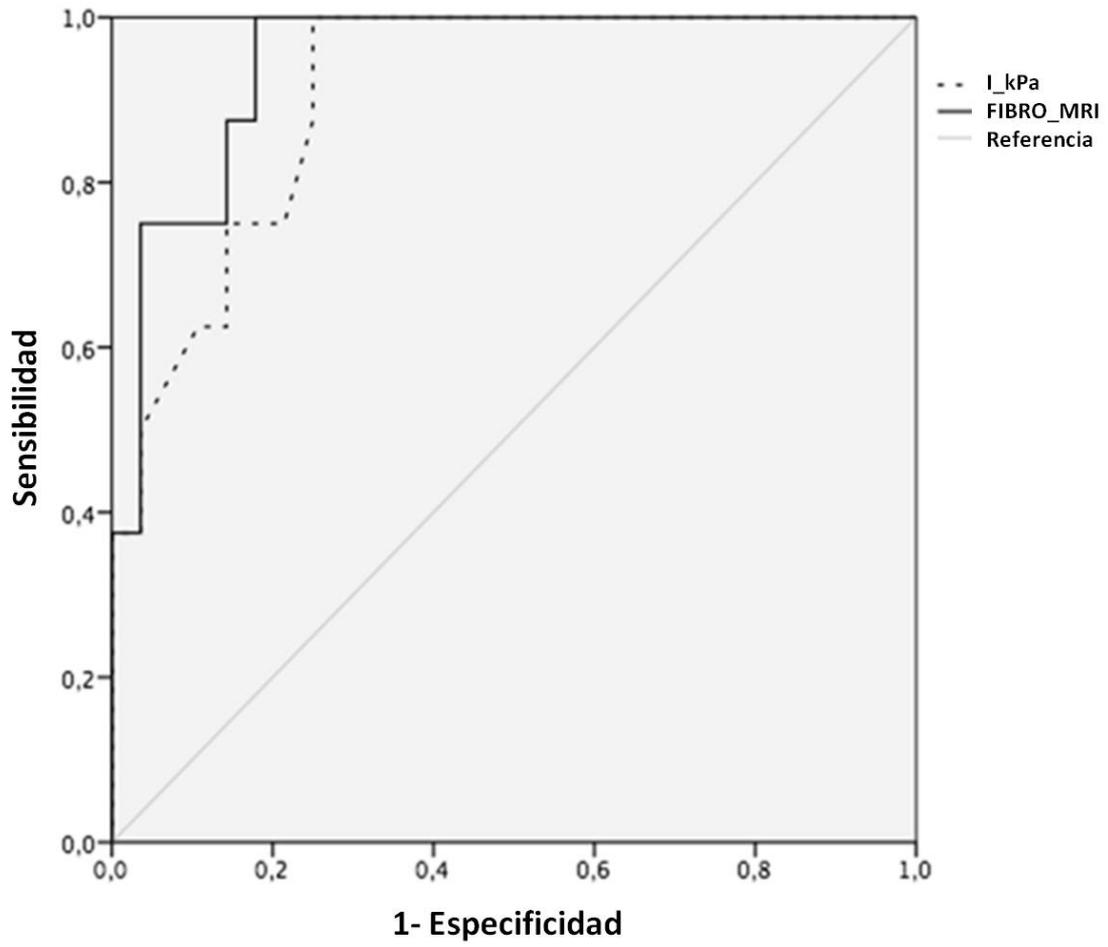


Fig. 2

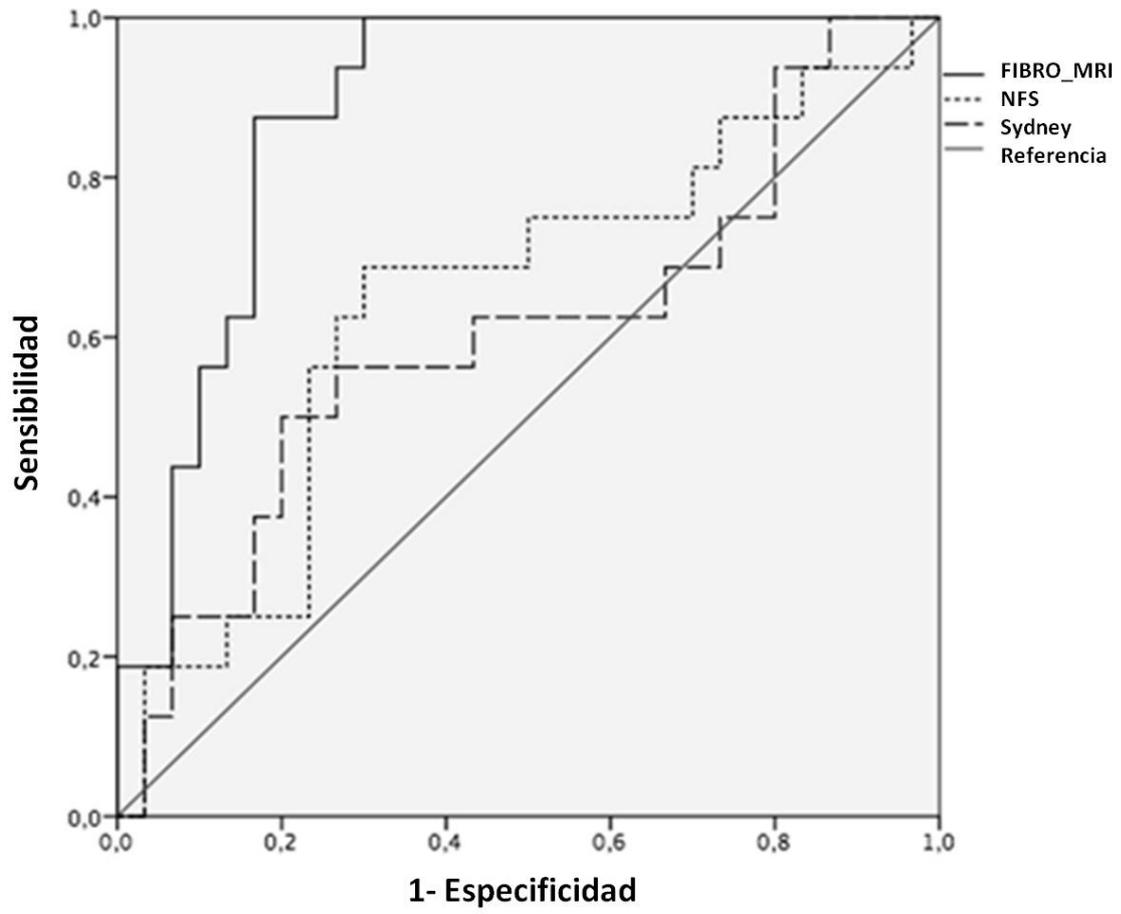


Fig. 3