

TESIS DOCTORAL



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA (ò ʘ)  
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Medicina  
Programa de Doctorado de Medicina 3139

Estudio prospectivo multicéntrico de precisión  
diagnóstica de los biomarcadores de imagen  
en las hepatopatías crónicas difusas



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

David Martí Aguado

2021

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
David Martí Aguado

Dirigida por:  
Dr. Luis Martí Bonmatí  
Dr. Miguel Ángel Serra Desfilis

Tutora:  
Dra. María Desamparados Escudero García

Valencia, febrero 2021





Departamento de Medicina

Programa de Doctorado de Medicina 3139 (R. D. 99/2011)

**Estudio prospectivo multicéntrico de precisión  
diagnóstica de los biomarcadores de imagen en las  
hepatopatías crónicas difusas**

**TESIS DOCTORAL**

Presentado por:

**David Martí Aguado**

Dirigida por:

Dr. Luis Martí Bonmatí

Dr. Miguel Ángel Serra Desfilis

Tutora:

Dra. María Desamparados Escudero García

Valencia, febrero 2021

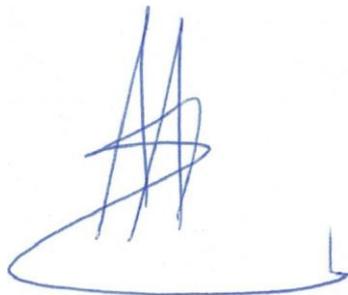


**Don Luis Martí Bonmatí**, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Profesor Titular de la Universidad adscrito al Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral titulada **Estudio prospectivo multicéntrico de precisión diagnóstica de los biomarcadores de imagen en las hepatopatías crónicas difusas** presentada por Don. David Martí Aguado, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos para que su autor pueda obtener con ella el título de Doctor por la Universidad de Valencia.

Para que conste, firmo el presente certificado, en Valencia, a 8 de febrero de 2021.



Fdo. D. Luis Martí Bonmatí



**Don Miguel Ángel Serra Desfilis**, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Catedrático de la Universidad adscrito al Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral titulada **Estudio prospectivo multicéntrico de precisión diagnóstica de los biomarcadores de imagen en las hepatopatías crónicas difusas** presentada por Don. David Martí Aguado, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos para que su autor pueda obtener con ella el título de Doctor por la Universidad de Valencia.

Para que conste, firmo el presente certificado, en Valencia, a 8 de febrero de 2021.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'M' followed by a cursive 'A' and 'S'.

Fdo. D. Miguel Ángel Serra Desfilis

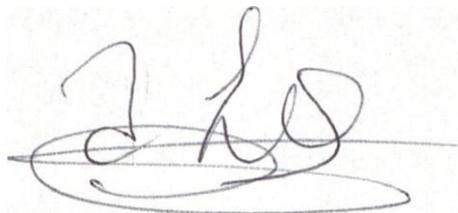


**Dña. María Desamparados Escudero García**, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Contratada Doctora de la Universidad adscrita al Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral titulada **Estudio prospectivo multicéntrico de precisión diagnóstica de los biomarcadores de imagen en las hepatopatías crónicas difusas** presentada por Don. David Martí Aguado, ha sido realizada bajo mi tutorización y cumple los requisitos para que su autor pueda obtener con ella el título de Doctor por la Universidad de Valencia.

Para que conste, firmo el presente certificado, en Valencia, a 8 de febrero de 2021.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Desamparados', written over a horizontal line.

Fdo. Dña. María Desamparados Escudero García



“Where there is no vision, the people disappear”  
King Solomon Proverbs.



*A mi familia: María, Nicolás, Cristina y Luis.*

*A quienes les robé el tiempo y la energía necesaria para llevar a cabo esta  
Tesis Doctoral.*

*Porque son una luz y no juzgan, son un modelo y no critican, son una parte de  
la solución y no parte del problema.*



# AGRADECIMIENTOS

## *Mi agradecimiento a:*

Luís Martí Bonmatí, por su capacidad para convertir talento en conocimiento.

Miguel Ángel Serra, por incitarme a la acción y alimentar el progreso científico.

Amparo Escudero, por su forma de trabajar, siempre con respeto mutuo para beneficio mutuo.

Miguel Mínguez, por tratarme como lo que puedo y debo ser.

Josep Redón, por enseñarme que la curiosidad no tiene obligaciones, solo oportunidades.

Alejandro Rodríguez-Ortega, gran compañero de viaje. Tu plenitud no individualista puso de relieve nuestras mejores dotes.

Ángel Alberich-Bayarri, por su capacidad de analizar, describir y anticiparse.

Antonio Ferrández, Claudia Mestre, Clara Alfaro, Judith Pérez; por no quedarse en la superficie macroscópica y permitirme profundizar hasta lo microscópico.

Salvador Benlloch, por su optimismo resiliente y su sincera ayuda.



# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>29</b>
1.1. Magnitud del problema: las enfermedades hepáticas crónicas.....	29
1.2. Patrón de referencia no siempre perfecto: la biopsia hepática.....	30
1.3. Toda limitación conlleva una oportunidad: biomarcadores no invasivos..	34
1.4. Profundizando en el sustrato biológico de la imagen: patología digital y RM multiparamétrica.....	36
1.5. Finalidad del estudio: la precisión en la estimación.....	47
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>51</b>
<b>3. Metodología</b>	<b>57</b>
3.1. Diseño del proyecto de investigación.....	57
3.2. Población de pacientes.....	58
3.3. Anatomía patológica.....	59
3.4. Patología digital.....	65
3.5. Evaluación clínica y biomarcadores no invasivos de primera línea.....	69
3.6. Protocolo de imagen RM.....	74
3.7. Análisis de la imagen RM.....	76
3.8. Estadística.....	86
<b>4. Resultados</b>	<b>93</b>
4.1. Características de la población basal.....	93
4.2. Histología: correlación con la patología digital.....	96
4.3. Biomarcadores no invasivos de primera línea.....	108
4.4. Imagen RM: precisión diagnóstica multiparamétrica.....	115

5. <b>Discusión</b> .....	131
5.1. Patología digital.....	133
5.2. Biomarcadores no invasivos de primera línea.....	140
5.3. RM multiparamétrica.....	143
5.4. Árbol de decisión: algoritmos de empleo de los biomarcadores de imagen en la práctica clínica habitual.....	151
5.5. Limitaciones y líneas de futuro.....	155
6. <b>Conclusiones</b> .....	161
7. <b>Referencias</b> .....	165
8. <b>Anexos</b> .....	191
8.1. <b>Anexo 1:</b> Tablas de estudios publicados sobre la precisión diagnóstica de la Patología Digital (Tabla 1) y la Resonancia Magnética (Tablas 2-6)..	199
8.2. <b>Anexo 2:</b> Aprobaciones de los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) en las instituciones sanitarias que han participado en el desarrollo del estudio.....	237
8.3. <b>Anexo 3:</b> Lista de comprobación de la guía STARD ( <i>Standards for Reporting Diagnostic accuracy studies</i> ) para la presentación de los datos de investigación en los estudios de precisión de pruebas diagnósticas.	243
8.4. <b>Anexo 4:</b> Artículos científicos derivados de la Tesis Doctoral.....	247
8.5. <b>Anexo 5:</b> Proyectos de investigación relacionados con la Tesis Doctoral. ....	253

## ABREVIATURAS

- $\alpha$ : índice de heterogeneidad de la difusión molecular del agua intracelular
- ADC: Coeficiente de Difusión Aparente
- ALT: ALanina aminoTransferasa
- APC: Área Proporcional de Colágeno
- APFe: Área Proporcional de hierro
- APG: Área Proporcional de Grasa
- API: Área Proporcional de Inflamación
- AST: ASpartato aminoTransferasa
- AUC: Área debajo de la Curva
- CBP: Colangitis Biliar Primaria
- CEP: Colangitis Esclerosante Primaria
- CHH: Concentración de Hierro en Hígado
- D: coeficiente de difusión pura
- D\*: coeficiente de pseudoperfusión
- Dapp: coeficiente de difusión aparente
- DDC: coeficiente de difusión corregido sobre heterogeneidad microestructural
- DM: Diabetes Mellitus
- DS: Desviación estándar
- EG: Eco de Gradiente
- EHNA: Esteatohepatitis No Alcohólica

## *Abreviaturas*

EHGNA: Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica

ERM: Espectroscopía por Resonancia Magnética

F, grado de Fibrosis

*f*: fracción vascular

Fe: hierro

FGDP: Fracción Grasa por Densidad Protónica

H/G ratio de señal relativo entre el Hígado y la Grasa del tejido celular subcutáneo

H&E: tinción Hematoxilina - Eosina

HAI: Hepatitis Autoinmune

HH: Hemocromatosis Hereditaria

IHQ: inmunohistoquímica

IMC: Índice de Masa Corporal

IVIM: *Intravoxel Incoherent Motion*

Kapp: valor de Kurtosis

$\rho$ : coeficiente de correlación de Spearman (rho)

r: coeficiente de correlación Pearson

RM: Resonancia Magnética

ROI: Región de Interés

S: grado de esteatosis

STIR: *Short inversion Time Inversion Recovery*

T: Tesla

TE: Tiempos de Eco

TG: Triglicéridos

TI: Tiempo de Inversión

TR: Tiempo de Repetición

VHB: Virus Hepatitis B

VHC: Virus Hepatitis C

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo



# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## Tablas

<b>Tabla 1:</b> Resumen de biomarcadores séricos de primera línea empleados en la práctica clínica habitual para el diagnóstico no invasivo de fibrosis y esteatosis hepática.....	72
<b>Tabla 2:</b> Protocolo de adquisición de las secuencias de Resonancia Magnética. .....	75
<b>Tabla 3:</b> Características basales de la población estudiada.....	94
<b>Tabla 4:</b> Distribución de los grados histológicos de colágeno, grasa, inflamación y hierro con respecto a sus correspondientes áreas proporcionales de patología digital.....	97
<b>Tabla 5:</b> Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de colágeno para los diferentes estadios de fibrosis.....	98
<b>Tabla 6:</b> Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de grasa para los diferentes grados de esteatosis.....	100
<b>Tabla 7:</b> Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de inflamación para los diferentes grados de inflamación lobular y portal.....	102
<b>Tabla 8:</b> Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de hierro para los diferentes grados de sobrecarga de hierro.....	104
<b>Tabla 9:</b> Distribución de los valores obtenidos con Patología Digital entre las categorías de esteatosis simple y esteatohepatitis.....	106
<b>Tabla 10:</b> Precisión diagnóstica de los diferentes biomarcadores de fibrosis hepática.....	109

<b>Tabla 11:</b> Precisión diagnóstica de los diferentes biomarcadores de esteatosis hepática.....	111
<b>Tabla 12:</b> Distribución de los valores de transaminasas según el grado de inflamación.....	113
<b>Tabla 13:</b> Distribución de distintos parámetros clínico-analíticos entre las categorías de esteatosis simple y esteatohepatitis.....	114
<b>Tabla 14:</b> Análisis univariante de correlación entre la fibrosis y parámetros de RM.....	116
<b>Tabla 15:</b> Análisis multivariante para distintos sustratos patológicos de interés relacionados con la fibrosis hepática.....	118
<b>Tabla 16:</b> Análisis de Obuchowski para fibrosis.....	118
<b>Tabla 17:</b> Análisis univariante de correlación entre la inflamación y parámetros de RM.....	122
<b>Tabla 18:</b> Análisis multivariante para distintos sustratos patológicos de interés relacionados con la inflamación hepática.....	124
<b>Tabla 19:</b> Análisis multivariante para el diagnóstico de esteatohepatitis. Las variables clínica y analíticas no obtuvieron significación estadística. Abreviaturas: OR, Odds ratio; FGDP, fracción grasa por densidad protónica...	126

*Figuras*

**Figura 1:** La escala METAVIR para estadificar la fibrosis hepática se basa en cambios morfológicos (imágenes 1-4).....33

**Figura 2:** Evaluación diagnóstica de la historia natural de la fibrosis hepática.33

**Figura 3:** Las pruebas de primera línea (biomarcadores séricos y elastográficos) presentan un bajo valor predictivo positivo y una amplia zona gris indeterminada que no permite estadificar la fibrosis hepática con precisión.....35

**Figura 4:** Imagen de patología digital que permite identificar y calcular el área ocupada por el sustrato histopatológico analizado.....38

**Figura 5:** Las imágenes A-B muestran esteatosis difusa en el parénquima hepático. Las imágenes C-D muestran sobrecarga de hierro en el parénquima hepático.....39

**Figura 6:** Correlación entre  $R2^*$  y la concentración de hierro hepático (CHH).  
.....43

**Figura 7:** Representación de las figuras múltiples de la grasa.....43

**Figura 8:** Imágenes paramétricas de la fracción grasa (FGDP) y de la ratio de relajación  $R2^*$  (expresión de la concentración de hierro) del hígado.....44

**Figura 9:** Biopsia virtual hepática que permite abordar la cuantificación de los componentes tisulares implicados en los cambios patológicos principales de la hepatopatía crónica difusa.....47

**Figura 10:** Diagrama de flujo del proyecto de Tesis Doctoral Biopsia Hepática Virtual.....51

**Figura 11:** Muestra hepática teñida con Rojo Sirio.....61

**Figura 12:** La imagen de la izquierda muestra una sección histológica teñida con H&E mientras que la imagen de la derecha está teñida con inmunohistoquímica adipofilina.....61

<b>Figura 13:</b> Muestra hepática teñida con la tinción inmunohistoquímica CD45.....	62
<b>Figura 14:</b> Gráfica de puntuación NASH-CRN ( <i>Non-alcoholic Steatohepatitis - Clinical Research Network</i> ).....	64
<b>Figura 15:</b> Escáner Ventana iScan HT (Roche, Ventana Medical Systems).....	67
<b>Figura 16:</b> Diagrama de flujo empleado en el análisis de las imágenes digitalizadas.....	68
<b>Figura 17:</b> Preprocesado de las imágenes digitales para la eliminación de áreas que no deben de ser incluidas en el análisis computacional.....	69
<b>Figura 18:</b> Selección de regiones de interés (ROI) para el análisis radiómico..	77
<b>Figura 19:</b> Proceso de obtención de imágenes y análisis radiómico.....	78
<b>Figura 20:</b> Mapa paramétrico del tiempo de relajación T1 como expresión de la concentración del colágeno en el parénquima hepático.....	83
<b>Figura 21:</b> Segmentación automática de todo el abdomen.....	85
<b>Figura 22:</b> Aplicación del modelo estadístico Obuchowski en la clasificación de fibrosis.....	89
<b>Figura 23:</b> Diagrama de flujo del estudio.....	95
<b>Figura 24:</b> Diagrama sectorial que muestra la distribución de las distintas etiologías de las hepatopatías crónicas incluidas en el estudio.....	95
<b>Figura 25:</b> Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de colágeno según el estadio de fibrosis.....	98
<b>Figura 26:</b> Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de grasa teñida con IHQ adipofilina según el grado de esteatosis.....	100
<b>Figura 27:</b> Distribución de los valores del área proporcional de grasa (media e IC95%) obtenidos con inmunohistoquímica adipofilina y tinción hematoxilina-eosina.....	101
<b>Figura 28:</b> Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de inflamación según el grado de actividad necroinflamatoria....	103

**Figura 29:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de hierro según el grado de sobrecarga de hierro.....104

**Figura 30:** Gráfico de líneas múltiples que muestra la distribución del área proporcional de colágeno, grasa, inflamación y hierro entre las categorías de EHGNA.....106

**Figura 31:** Gráfico de dispersión lineal del área proporcional de grasa frente a la clasificación histológica NASH-CRN.....107

**Figura 32:** Distribución de los valores del área proporcional de grasa e inflamación (media con su IC95%) respecto a los estadios de fibrosis.....107

**Figura 33:** Análisis curva ROC de los biomarcadores no invasivos empleados para diagnosticar fibrosis.....110

**Figura 34:** Distribución de los puntos de corte del FibroScan para el diagnóstico de fibrosis.....110

**Figura 35:** Distribución de los puntos de corte del FibroScan para el diagnóstico de esteatosis.....112

**Figura 36:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores de DDC según el estadio de fibrosis.....117

**Figura 37:** Gráfico de dispersión lineal del valor conocido de área proporcional de colágeno (Patología Digital) frente al valor predicho por las variables RM..119

**Figura 38:** Análisis curva ROC de los biomarcadores empleados para diagnosticar esteatosis.....120

**Figura 39:** Gráficas de dispersión de los valores de FibroScan y FGDP con respecto al área proporcional de grasa.....120

**Figura 40:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores de *f* según la dicotomización de inflamación avanzada.....123

**Figura 41:** Gráfico de dispersión lineal del valor conocido de área proporcional de inflamación (Patología Digital) frente al valor predicho por las variables RM.  
.....125

<b>Figura 42:</b> Análisis digital de una biopsia con lesiones histológicas compatibles con esteatohepatitis.....	137
<b>Figura 43:</b> Tinción inmunohistoquímica adipofilina en una biopsia con lesiones histológicas compatibles con esteatohepatitis.....	138
<b>Figura 44:</b> Semáforo de correlaciones entre los biomarcadores no invasivos de primera línea y la Patología Digital.....	141
<b>Figura 45:</b> Gráfico de dispersión lineal que muestra en su serie la correlación entre FibroScan y el área proporcional de colágeno.....	142
<b>Figura 46:</b> Las hepatopatías crónicas presentan con frecuencia una afectación difusa pero heterogénea en su distribución, por lo que los parámetros mejor empleados para describirlas han sido las medidas de localización central y las de dispersión.....	144
<b>Figura 47:</b> Análisis de los distintos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de la fibrosis avanzada.....	147
<b>Figura 48:</b> Algoritmo diagnóstico para la fibrosis hepática.....	152
<b>Figura 49:</b> Algoritmo diagnóstico para la esteatosis, esteatohepatitis y el hierro hepático.....	153

# **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Magnitud del problema: las enfermedades hepáticas crónicas

Las enfermedades crónicas del hígado representan un importante problema de salud pública por su prevalencia e impacto social. Las estimaciones actuales muestran que 844 millones de personas tienen una hepatopatía crónica con una alta mortalidad asociada, como se evidencia por causar 2 millones de muertes/año, 3,7% de las muertes mundiales, y ser la quinta causa de muerte en el mundo si consideramos el efecto aditivo de la cirrosis hepática y el hepatocarcinoma sobre cirrosis [1,2]. En general, puede considerarse que no se ha prestado la suficiente atención al estudio de las hepatopatías crónicas a pesar de la elevada carga médica asistencial en comparación con otros problemas importantes de salud pública globales relacionados con enfermedades crónicas, tales como la diabetes (422 millones, 1,6 millones muertes/año) o las enfermedades cardiovasculares (540 millones, 17,7 millones muertes/año). [3,4].

Las hepatopatías crónicas difusas están relacionadas con un amplio espectro de etiologías subyacentes, entre las que destacan la infección por virus hepatotropos, el consumo excesivo de alcohol y la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA), recientemente considerada como hepatopatía metabólica grasa [5]. En ellas, la agresión hepatocitaria, cursa con un proceso inflamatorio mantenido en el tiempo que finalmente desencadena una fibrosis con acúmulo extracelular de fibras de colágeno, proteoglicanos y macromoléculas [6].

La prevalencia de fibrosis varía según la población estudiada (población general vs. población de riesgo), el método evaluado (marcadores séricos vs. métodos de imagen vs. biopsia hepática) y el escenario de implementación (atención primaria vs. asistencia especializada). Por ejemplo, en la población general la presencia de fibrosis avanzada medida por medio de la elastografía de transición (>9 Kpa) es

del 3,6%, mientras que en la población diabética esta cifra aumenta hasta el 17,1% [7,8]. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que las enfermedades crónicas del hígado inducen cirrosis en 633000 pacientes/año con una prevalencia de entre el 4,5 al 9% [9]. Sin embargo, esta prevalencia está probablemente infraestimada debido a que estos pacientes permanecen asintomáticos en los estadios iniciales de esta enfermedad lentamente progresiva. Dado que el grado de fibrosis es el principal marcador pronóstico en las enfermedades hepáticas crónicas, es importante detectar de forma precoz y fiable estas alteraciones tisulares para poder impactar en la historia natural de esta enfermedad silente [10,11].

Hoy en día, se estima que el 25% de la población mundial padece EHGNA, la mayoría de ellos en su forma leve de esteatosis simple [12]. Debido a su paralelismo con la obesidad y diabetes, existen modelos predictivos que pronostican que la EHGNA se convertirá en la principal causa de hepatopatía crónica con gran impacto clínico y económico en los años venideros [13]. A pesar de que el determinante pronóstico con mayor impacto en la supervivencia es la fibrosis, esta enfermedad nos muestra como la presencia y el grado de otros sustratos patológicos, tales como la esteatosis, esteatohepatitis y los depósitos de hierro también tienen un valor pronóstico [14-16]. Por todo ello, se hace necesaria una caracterización fiable e incruenta de las distintas alteraciones tisulares que acontecen en el parénquima hepático para poder tipificar adecuadamente a los pacientes y realizar un manejo individualizado y preciso de las enfermedades hepáticas.

### **1.2. Patrón de referencia no siempre perfecto: la biopsia hepática**

La biopsia hepática representa el patrón de referencia diagnóstica para la evaluación de las enfermedades hepáticas. Su uso está disminuyendo por diversos motivos, entre los que destaca el hecho de ser una técnica invasiva y cruenta que en algunos casos produce efectos no deseados y complicaciones en el

paciente [17]. La biopsia presenta, además, limitaciones de exactitud y precisión, debidas a su inherente sesgo de muestreo ya que obtiene una muestra limitada y poco representativa del estado del órgano dada la distribución heterogénea de las alteraciones [18.]. A ello, se ha de añadir la alta variabilidad intra e inter-observador y la baja aceptabilidad del paciente cuando se pretende evaluar los cambios dinámicos en el tiempo [19,20]. Por todo ello, su aplicabilidad en el diagnóstico y seguimientos de las hepatopatías crónicas representa un tema de debate.

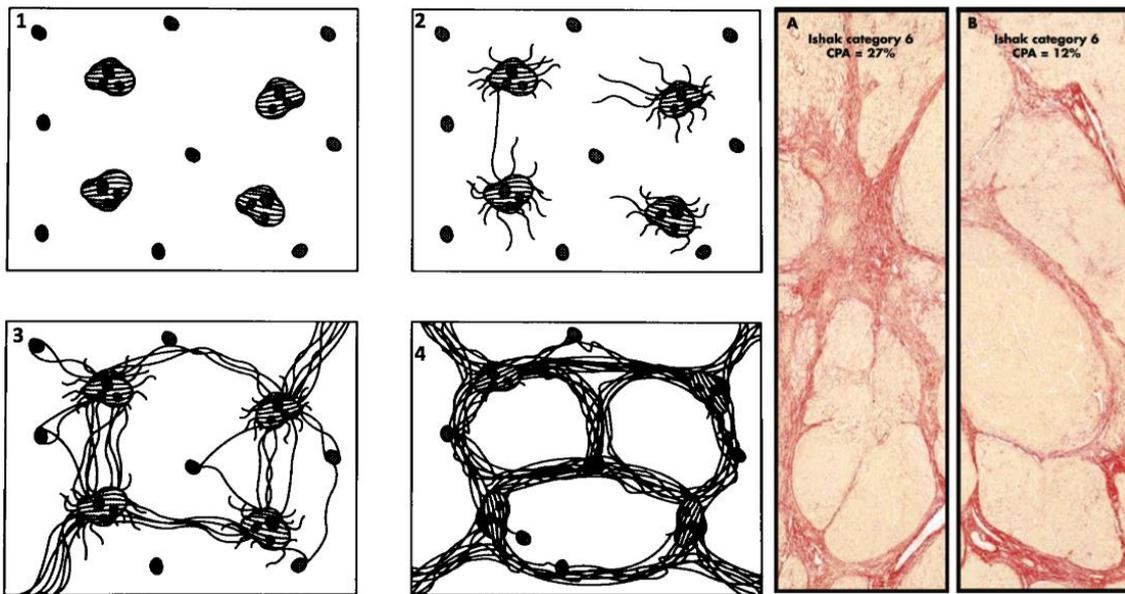
Como consecuencia de estos aspectos diagnósticos con las limitaciones de la biopsia hepática y la aparición de nuevas dianas terapéuticas, se plantea la necesidad de desarrollar biomarcadores no invasivos y de uso sencillo en las hepatopatías crónicas. Estos biomarcadores deben aspirar a diagnosticar y cuantificar los distintos sustratos patológicos, estadificar la enfermedad, establecer su perfil pronóstico e intervenir en la indicación y monitorización de terapias sistémicas [21]. Sin embargo, se ha de tener en cuenta los siguientes aspectos al evaluar el rendimiento diagnóstico de nuevos biomarcadores frente a un patrón de referencia imperfecto como la biopsia hepática:

- La evaluación histológica se basa en un sistema de puntuación semicuantitativo que se relaciona con la severidad de enfermedad hepática subyacente. Estas escalas son subjetivas, categóricas y se fundamentan en los diferentes cambios morfológicos y arquitecturales observados en las preparaciones [22,23]. Dado que la puntuación histológica del estadio de enfermedad hepática no es una medición numérica lineal sino categórica, es esencial conocer: (I) las distintas estrategias existentes que permitan limitar la variabilidad interindividual; (II) las técnicas estadísticas más adecuadas que no consideren los datos categóricos como datos de distribución de frecuencias; y que (III) la puntuación histológica de la enfermedad (por ejemplo, estadio de fibrosis) no es lo mismo que la medición objetiva de su componente principal (por ejemplo, la cantidad o fracción total de colágeno) (Figura 1).
- La precisión diagnóstica de la anatomía patológica para diagnosticar los estadios intermedios de la enfermedad hepática es baja, limitándose de

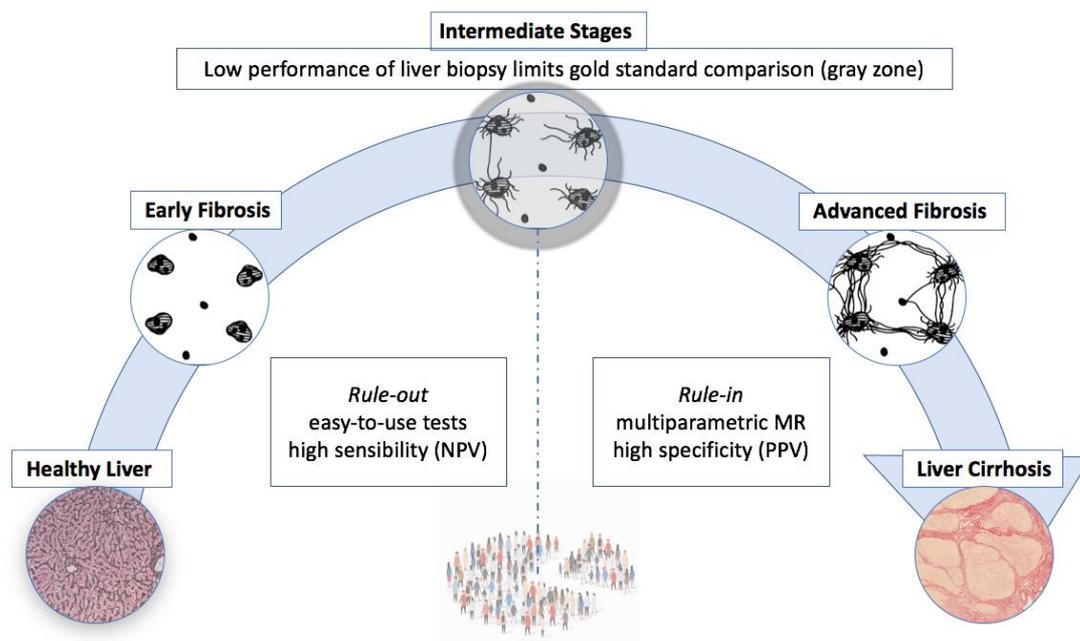
esta forma la evaluación experimental de biomarcadores no invasivos [24]. Por ello, se reconoce la existencia de áreas grises por el solapamiento entre estadios patológicos cercanos. Esto implica que, en la práctica clínica habitual, los pacientes con hepatopatía crónica están dicotomizados en aquellos con enfermedad temprana vs. avanzada (Figura 2).

- Diferenciar entre esteatosis simple y esteatohepatitis, así como determinar el estadio o grado de fibrosis hepática, representan hoy en día las indicaciones más comunes de biopsia en estos pacientes [25].

La Agencia Europea del Medicamento indica que los ensayos clínicos diseñados para la aprobación de nuevos tratamientos para la EHGNA deben de incluir sujetos con fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ) [26]. Por ello, y dadas las limitaciones de la biopsia que limitan su aplicabilidad en práctica clínica habitual, el uso de este patrón de referencia queda restringido principalmente a las etapas tardías de la enfermedad hepática. Esto conlleva un sesgo de selección y de espectro ya que: (I) los estudios de investigación solamente incluyen los pacientes a los que se les realiza una biopsia hepática para disponer del patrón de referencia como método comparativo; y (II) estos pacientes a los que se les realiza una biopsia tienen principalmente grados más avanzados de enfermedad hepática y no representan pues el espectro completo de la enfermedad.



**Figura 1:** La escala METAVIR para estadificar la fibrosis hepática se basa en cambios morfológicos (imágenes 1-4). Esta evaluación categórica descriptiva es una calificación subjetiva no lineal que no equivale a la cantidad de colágeno (imágenes A, B).



**Figura 2:** Evaluación diagnóstica de la historia natural de la fibrosis hepática. Los biomarcadores no invasivos de primera línea (analítica y elastografía) son fiables para excluir fibrosis avanzada con alta sensibilidad y valor predictivo negativo. Las imágenes de Resonancia Magnética (RM) no son aplicables en este escenario donde se necesitan pruebas accesibles y de uso fácil. Diferenciar los casos con fibrosis avanzada del resto de la población no excluida con las pruebas de primera línea representa el escenario de implementación de la RM

multiparamétrica. Esta prueba de segunda línea debe tener alta especificidad y valor predictivo positivo para diagnosticar la fibrosis avanzada. La etapa intermedia de la fibrosis hepática representa una zona gris donde la interpretación de la biopsia hepática tiene una precisión diagnóstica baja.

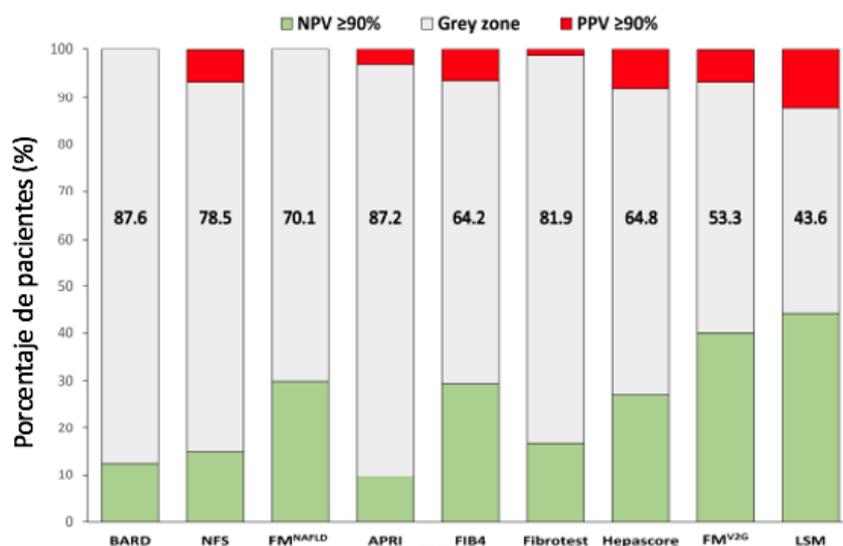
### **1.3. Toda limitación conlleva una oportunidad: biomarcadores no invasivos**

Dada la carga sanitaria creciente de las enfermedades hepáticas crónicas, se considera necesario emplear como alternativa a la biopsia hepática otras pruebas diagnósticas que sean incruentas, con aplicabilidad en estadios iniciales y que presenten una elevada precisión diagnóstica. La disponibilidad de obtener biomarcadores subrogados no invasivos de las principales alteraciones histológicas asociadas a la hepatopatía crónica se alinea con la medicina no invasiva y más personalizada que se está desarrollando con la intención de establecer un manejo más individualizado y preciso de las enfermedades hepáticas. Entre los biomarcadores no invasivos destacan los séricos (obtenidos de un análisis sanguíneo), elastográficos (como el FibroScan y la ecografía ARFI) y los de imagen (como los obtenidos por el análisis de las imágenes de RM).

El empleo de biomarcadores séricos y elastográficos como pruebas de primera línea para descartar la enfermedad avanzada está ampliamente extendido. Su utilidad práctica se basa en su elevado valor predictivo negativo (VPN > 90%) que permite descartar la presencia de fibrosis avanzada. [27]. Su uso permite establecer protocolos de derivación de pacientes desde atención primaria a las unidades de hepatología basados en estratificación del riesgo de presentar una enfermedad avanzada, [28]. Sin embargo, su bajo valor predictivo positivo (VPP) con hasta un 30% de casos mal clasificados como fibrosis avanzada y la presencia de una amplia zona gris indeterminada (entre el 40-70% de los resultados, dependiendo del tipo de prueba empleada, no se pueden clasificar), limitan su uso más allá de ser empleados como técnicas de primera línea (Figura 3) [29]. La baja fiabilidad se debe a la existencia de diversos factores de confusión que

influyen en estos marcadores, como es el caso de la obesidad, la inflamación y la colestasis [30,31].

Entre estos biomarcadores no invasivos destaca el FibroScan, el cual ofrece un rango de valores (2,5-75 kPa) que se correlaciona con la gravedad de la fibrosis hepática (FO-4). Entre los puntos de corte establecidos para diagnosticar o excluir cada grado de fibrosis existe una amplia zona gris intermedia donde se encuentran la mayoría de los pacientes estudiados con esta prueba (Figura 3) [32]. En el ámbito de la atención médica especializada, las unidades de hepatología necesitan métodos más sofisticados con una alta especificidad y VPP que permitan diagnosticar e identificar de manera fiable los casos con enfermedad hepática avanzada (Figura 2). Dado que la RM se está convirtiendo en el estándar de referencia para la cuantificación de la grasa y el hierro en el parénquima hepático, es necesario establecer si la imagen tiene además algún otro papel en la evaluación concomitante de los diferentes sustratos patológicos que también acontecen en las hepatopatías crónicas y que definen con mayor precisión la gravedad de la enfermedad [33].



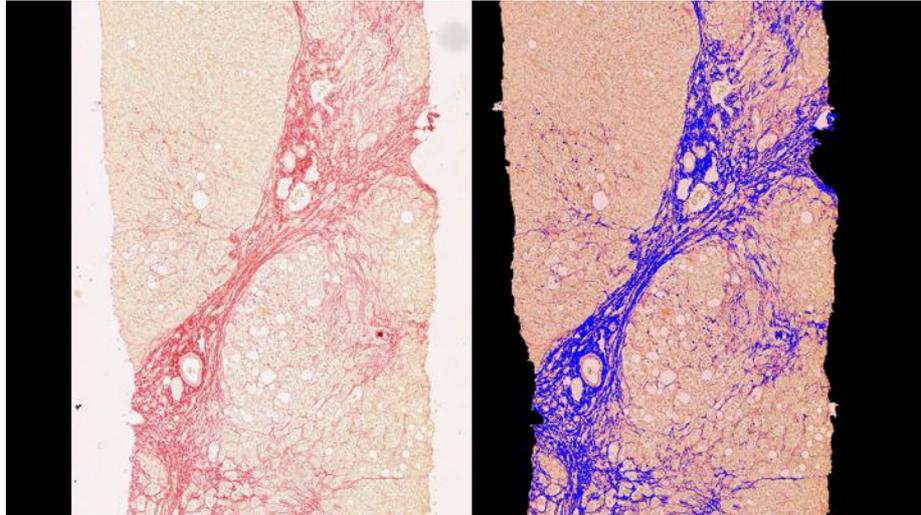
**Figura 3:** Las pruebas de primera línea (biomarcadores séricos y elastográficos) presentan un bajo valor predictivo positivo y una amplia zona gris indeterminada que no permite estadificar la fibrosis hepática con precisión [29,32].

#### **1.4. Profundizando en el sustrato biológico de la imagen: patología digital y RM multiparamétrica**

En la actualidad, los problemas mencionados de la biopsia hepática y los biomarcadores no invasivos de primera línea representan sesgos en el diagnóstico, monitorización terapéutica y seguimiento adecuados de los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas difusas. Gracias a los avances tecnológicos producidos en los últimos años, algunos de estos problemas pueden abordarse mediante la imagen computacional y la generación de “biopsias virtuales”. Estos nuevos estándares deben aprender de los datos obtenidos de la patología digital y validarse como datos radiómicos reproducibles y fiables generados tras el procesamiento de las imágenes de RM. Estos dos aspectos, la patología digital y la radiómica computacional, forman la base de esta Tesis Doctoral.

En la evaluación anatomopatológica, la variabilidad interobservador y la subjetividad de los sistemas de gradación, enfatizan la necesidad de analizar las principales alteraciones histológicas relacionadas con las enfermedades hepáticas crónicas de una manera objetiva, fiable, cuantitativa y reproducible. La patología digital es una técnica emergente basada en el procesamiento computacional de las muestras histológicas. Consiste en el empleo de un escáner para la captura digital de las preparaciones del tejido hepático (laminillas) y su conversión en imagen digital. Esta digitalización permite un análisis objetivo y computacional de la imagen, eludiendo la subjetividad del patólogo al microscopio [34]. Además, la patología digital es una herramienta interactiva que permite un análisis cuantitativo normalizado mediante el cálculo del área proporcional de los distintos sustratos histopatológicos con respecto al total de la muestra (Figura 4). La Tabla 1 de la sección Anexos resumen los estudios que han evaluado la correlación entre diferentes sustratos patológicos medidos con patología digital y su correspondiente sistema de puntuación semicuantitativo usado por los patólogos [19,24,35-62]. De esta tabla, es importante que se destaquen los siguientes aspectos:

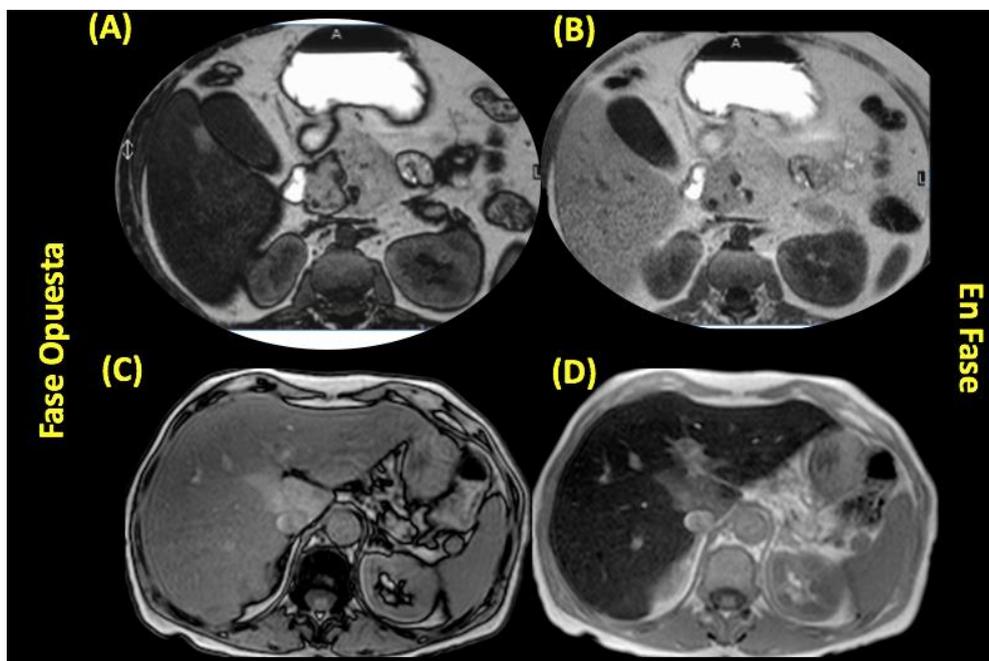
- La mayoría de las investigaciones realizadas analizan el área proporcional de colágeno (APC) en pacientes con VHC (60% de los estudios incluidos).
- Solamente el 36% de los estudios cumplen con los criterios de calidad de una muestra de biopsia hepática requeridos para una adecuada evaluación histológica (>20 mm de tamaño y >11 espacios porta) [63]. El 23% de los estudios no recogen esta información en sus datos.
- Los diferentes resultados observados en la distribución del área proporcional de colágeno pueden deberse a una falta de estandarización en el tipo de tinción histológica y en la metodología de análisis digital.
- A pesar de que los valores de patología digital aumentan con los grados histológicos, existe un solapamiento de valores en los estadios intermedios debido a que la evaluación realizada por los patólogos se basa en cambios arquitecturales y morfológicos (Figura 1) y no es una medida de cantidad (a excepción de la esteatosis).
- Existe un bajo grado de concordancia entre distintos patólogos para la gradación de los sustratos patológicos, con una sobrestimación de lo estimado visualmente con respecto a lo medido digitalmente [50,58].
- El bajo rendimiento de la biopsia para el diagnóstico de los estadios intermedios refuerza la idea de un enfoque práctico basado en la dicotomización del daño hepático en enfermedad temprana vs. avanzada [24] (Figura 2).



**Figura 4:** Imagen de patología digital que permite identificar y calcular el área ocupada por el sustrato histopatológico analizado. Se representa una muestra con los tractos de fibrosis teñidos con Rojo Sirio (imagen izquierda). Al aplicar la técnica de análisis digital (imagen derecha) se identifican las fibras de colágeno (marcadas en azul) y permite cuantificar el área proporcional de colágeno con respecto al total de la muestra.

La RM se considera una técnica de imagen para excelente el estudio de las enfermedades hepáticas dada su alta sensibilidad y especificidad para detectar las alteraciones parenquimatosas con respecto a otras técnicas de imagen [64]. Las adquisiciones de RM se solicitan habitualmente para detectar y cuantificar la esteatosis y la sobrecarga de hierro en el hígado. Su uso se basa en los cambios de señal que la grasa y el hierro provocan en la imagen adquirida con respecto al órgano sano. Las secuencias más extendidas que permiten la observación de los depósitos de grasa y de hierro utilizan el análisis del desplazamiento químico y la desintegración de la señal de las imágenes Eco de Gradiente (EG). Con tan solo dos ecos para obtener imágenes en fase opuesta (FO, primer eco) y en fase (EF, segundo eco) se puede reconocer la presencia de grasa y de hierro. La esteatosis hepática se reconoce como una disminución de la intensidad de la señal hepática en las imágenes FO en comparación con las imágenes EF. La ratio de pérdida de señal en FO frente a EF, normalizando la señal con la del bazo, se correlaciona con los grados de esteatosis hepática [65]. Sin embargo, en los hígados con sobrecarga de hierro se produce una disminución de la intensidad de la señal hepática en las imágenes EF en comparación con las imágenes FO al estar las

imágenes del segundo eco más potenciadas en T2\*, siendo ello un factor de confusión para la detección de grasa (Figura 5). En las secuencias EG con más de dos ecos se utiliza la ratio de intensidad de señal entre el hígado y los músculos paraespinales (SIR H/M) para la cuantificación del hierro hepático. No obstante, la coexistencia de esteatosis aumenta la intensidad de la señal hepática siendo un factor de confusión que subestima la detección de hierro. Estos ejemplos nos demuestran como la cuantificación precisa de cada sustrato patológico en las hepatopatías crónicas se ve dificultada por la coexistencia e interacción de los distintos componentes principales de daño hepático.



**Figura 5:** Las imágenes A-B muestran esteatosis difusa en el parénquima hepático. La señal es menor en la imagen potenciada en T1 en Fase Opuesta (A) que En Fase (B). Las imágenes C-D muestran sobrecarga de hierro en el parénquima hepático. Se observa la pérdida de la señal en las imágenes Eco de Gradiente con el aumento del tiempo de eco. La imagen en Fase Opuesta (C) se adquiere con un tiempo de eco menor que la imagen En Fase (D) donde la señal decae por el acortamiento del T2\*.

Para corregir este sesgo de incertidumbre por la señal en RM y generar unas estimaciones más precisas y fiables, las investigaciones más recientes se ha

centrado en la integración de diversos parámetros cuantitativos extraídos de las imágenes de RM obtenidas con el control adecuado de la señal para que se pueda evaluar de forma simultánea la fracción de grasa hepática y la concentración de hierro en cada vóxel del hígado. Esta aproximación permite incorporar además otras secuencias específicas para la valoración multiparamétrica de la fibrosis y la inflamación hepática. Recientemente, diversos estudios han demostrado la capacidad de las imágenes adquiridas con secuencias EG multiecho con desplazamiento químico (MECSE, *MultiEcho Chemical Shift Encoded*) para cuantificar de forma precisa la esteatosis del hígado, empleando como estándares de referencia en su validación técnicas como la espectroscopía RM (ERM) o la anatomía patológica (Anexo 1 Tabla 2). El hierro puede estimarse de forma precisa también por su efecto sobre las imágenes de RM potenciadas en T2\* mediante la valoración del tiempo de relajación T2\* y su ratio R2\* (Anexo 1 Tabla 3). Para evitar mediciones sesgadas, las secuencias MECSE deben estimar de forma independiente la fracción grasa por densidad protónica (FGDP), evitando la influencia del colágeno sobre el tiempo de relajación T1, y el R2\* del tejido hepático, permitiendo así de forma simultánea analizar la grasa y el hierro hepático.

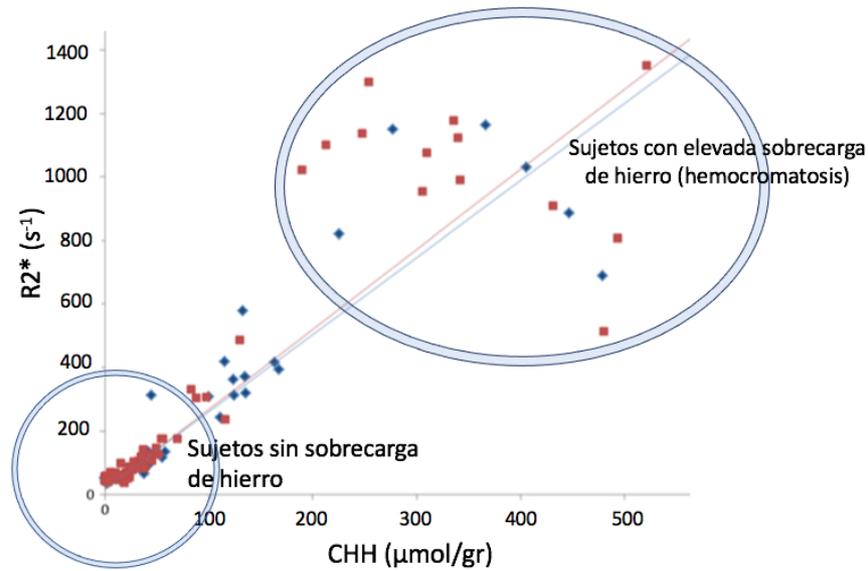
Las Tablas 2 y 3 de la sección Anexos, resumen los estudios que han evaluado la correlación entre distintas secuencias RM con los grados histológicos de esteatosis (I) [57,66-101] y hierro (II), respectivamente [71,72,85,93,102-115]. De estas tablas, es importante que se destaquen los siguientes aspectos:

- Grado de evidencia y recomendación basado en el sistema GRADE (*Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation*) empleado por la EASL (*European Association for the Study of the Liver*) [116]: (I) respecto a la esteatosis, existe una adecuada metodología científica con estudios prospectivos de elevado tamaño muestral (A1); (II) en cuanto a la sobrecarga de hierro, solamente se dispone de 18 estudios con menor rigor metodológico (43% retrospectivos, sólo uno multicéntrico -correspondiente a las cohortes de los ensayos clínicos FLINT y CyNCh- y con tamaño muestral medio de 68 casos) (B2).
- Patrón de referencia: (I) para la esteatosis, solamente el 55% de los estudios que analizan la FGDP se comparan contra grados histológicos

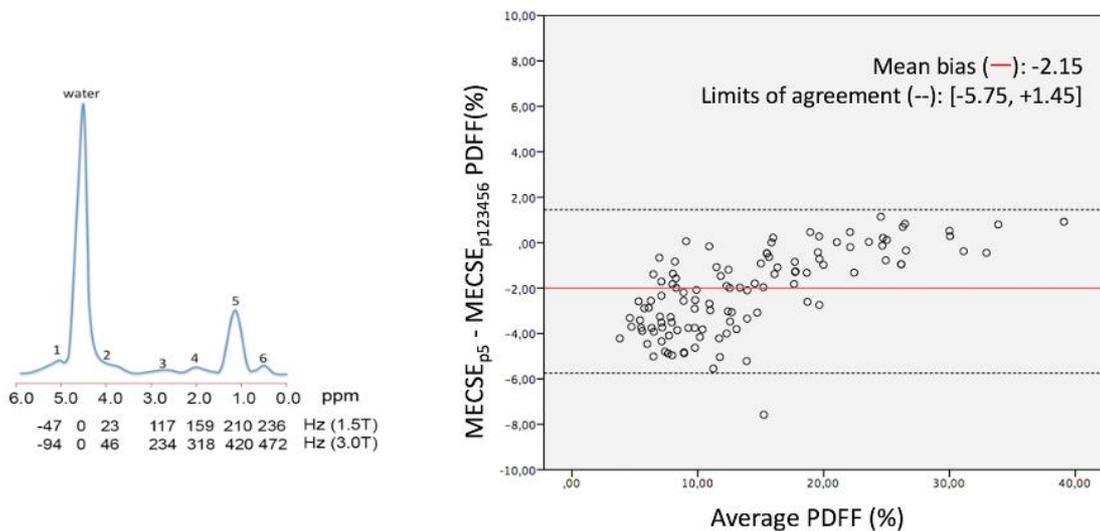
- (45% restante toma la ERM como referencia); (II) el 50% de los estudios que analizan la sobrecarga de hierro se comparan contra la concentración de hierro hepático (CHH), la cual: (a) requiere de espectrofotometría de absorción atómica para su cuantificación, técnica que solo está disponible en centros muy especializados y (b) no se correlaciona adecuadamente con los grados de hierro basados en el sistema de puntuación Scheuer de amplio uso diario en práctica clínica [103].
- Sesgo por espectro enfermedad: (I) para la esteatosis, la mayoría de los estudios se han realizado en población con EHGNA avanzada y comorbilidades añadidas, siendo de gran interés la cuantificación de grasa en todo el espectro de estos sujetos por su correlación con distintos desenlaces incluida la mortalidad [14,16,117], además de otras etiologías donde su impacto clínico también ha sido descrito (por ejemplo, hepatitis virales) [118]; (II) en cuanto al hierro, solamente el 61% de los estudios incluyen sujetos con hepatopatía crónica (principalmente VHC) como causa secundaria de sobrecarga férrica (el 39% restante estudia el hígado como un marcador subrogado de las reservas de hierro corporal total en sujetos con anemia o hemosiderosis transfusional). En los estudios de cuantificación del hierro que han incluido sujetos con hepatopatía crónica, la EHGNA está infrarrepresentada (410 casos en total entre los 18 estudios) a pesar de: (a) su prevalencia mundial [12]; (b) la relación que existe entre los depósitos de hierro y la gravedad de la EHGNA [15]; (c) la necesidad considerar la coexistencia de esteatosis como un factor de confusión en la determinación de hierro [119]. Además, existe un sesgo del espectro de la enfermedad con estudios cuya población bien representan en exceso la ausencia de hierro [112] o bien sobrerrepresentan la hemocromatosis [107]. La comparación entre condiciones extremas (sujetos sin y con elevada sobrecarga de hierro) tiende a maximizar las diferencias estadísticamente significativas en cualquier estudio de correlación (Figura 6).
  - Sesgos asociados al procesamiento de la imagen. La secuencia MECSE ha de considerar y minimizar los distintos factores de confusión que pueden presentarse. Entre ellos cabe destacar: (I) la complejidad espectral de la grasa (solamente el 47% de los estudios emplean la combinación de 6 picos

de frecuencia grasa para cuantificar la FGDP), evitando los errores de clasificación debidos a la infraestimación por haber realizado un análisis de grasa espectral más simple (Figura 7) [120]; (II) el sesgo  $T2^*$ , ya que ambos la grasa y el hierro interfieren en la caída de la señal  $T2^*$  pero solamente el 44% de los estudios ajustan exponencialmente la curva de decaimiento considerando la esteatosis para medir adecuadamente el ratio de relajación  $R2^*$ .

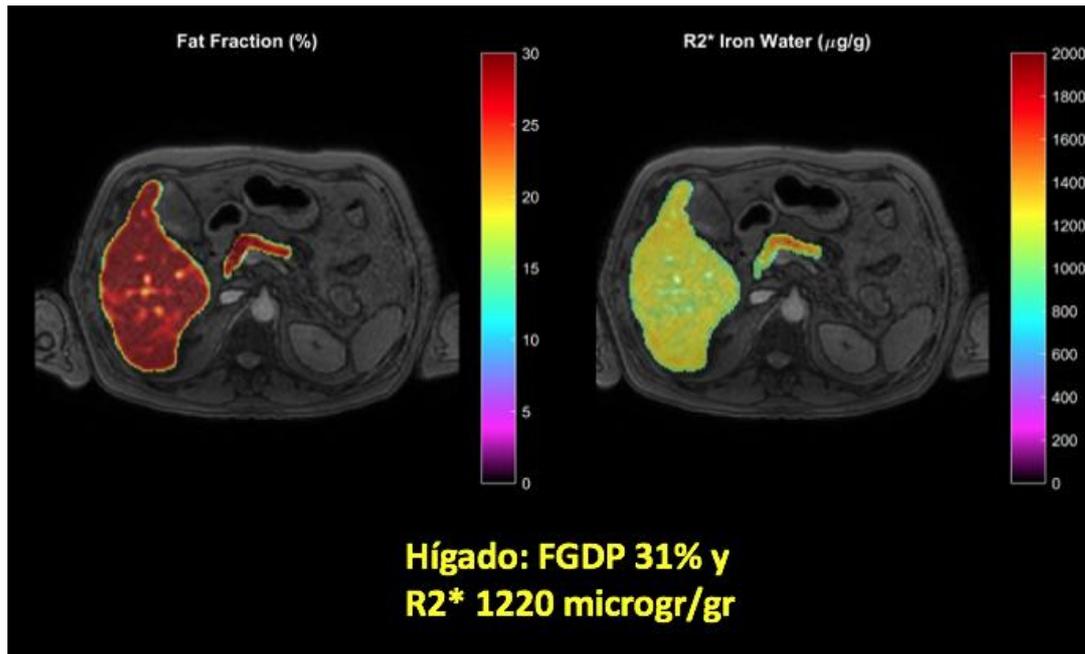
- Se necesitan más datos observacionales sobre los mejores puntos de corte para la FGDP y  $R2^*$  y así poder indicar la presencia de esteatosis y sobrecargar de hierro significativas, respectivamente [121,122]. La existencia de pequeñas diferencias en los puntos de corte obtenidos puede explicarse por los diferentes protocolos de adquisición en las imágenes EG, los algoritmos de ajuste en el procesado de la imagen, la intensidad de campo RM (1.5T o 3.0T), el sesgo de muestreo relacionado con la biopsia hepática y el procesamiento no estandarizado de la muestra histológica (CHH vs gradación semicuantitativa) [102].
- La precisión diagnóstica observada para diagnosticar y correlacionar la severidad de la esteatosis y los depósitos de hierro es elevada. Cabe mencionar que el análisis MECSE sin complejidad espectral para la esteatosis y la ratio intensidad señal hígado/músculo para el hierro subestiman la cuantificación de dichos sustratos patológicos y, por lo tanto, deben evitarse. La secuencia de mayor precisión para la cuantificación simultánea de grasa y hierro es la EG MECSE multiplico independiente del  $T1$  y corregida por  $T2^*$  (Figura 8).



**Figura 6:** Correlación entre  $R2^*$  y la concentración de hierro hepático (CHH). La recta de regresión refleja un sesgo del espectro de la enfermedad al comparar principalmente sujetos sin sobrecarga de hierro vs. sujetos con elevada sobrecarga de hierro. El análisis de condiciones extremas tiende a maximizar las diferencias estadísticamente significativas. Figura base extraída del estudio de d'Assignies 2018 [104].



**Figura 7:** Representación de las figuras multipico de la grasa (imagen izquierda). Gráfico de dispersión (Bland-Altman) que muestra la complejidad espectral de la grasa (imagen derecha): no considerar los 6 picos de frecuencia grasa infraestimación el cálculo de la fracción grasa por densidad protónica (FGDP) [120].



**Figura 8:** Imágenes paramétricas de la fracción grasa (FGDP) y de la ratio de relajación R2\* (expresión de la concentración de hierro) del hígado. Se especifica los valores obtenidos como mediana de la distribución de la grasa y el hierro en el parénquima hepático en un paciente con síndrome metabólico.

Dado que la RM hepática se está convirtiendo en el patrón de referencia para la cuantificación de la grasa y el hierro, y dada su asociación con los desenlaces clínicos relevantes a largo plazo, parece adecuado y necesario evaluar si la imagen tiene algún cometido en la evaluación concomitante de la fibrosis y la inflamación [123]. La elastografía por RM juega un papel bien definido en la estimación de la fibrosis hepática con una elevada precisión diagnóstica (Figura 2) [124], aunque su uso no está disponible en la práctica clínica habitual y los puntos de corte para optimizar los valores de sensibilidad y especificidad muestran amplios intervalos de confianza [32]. Distintas secuencias de imagen RM ampliamente disponibles como las potenciadas en Difusión, STIR y las imágenes EG con ángulos de inclinación variables para obtener los tiempos de relajación T1 tratan de reflejar los cambios intersticiales y hemodinámicos que ocurren en la historia natural necroinflamatoria de las hepatopatías crónicas. En las imágenes STIR, un aumento de la ratio de señal relativo entre el hígado y la grasa del tejido celular subcutáneo (H/G) se ha relacionado con el contenido de agua-edema y, de forma subrogada, con la existencia y gravedad de los cambios relacionados con la

inflamación y la fibrosis hepática [125,126]. En las imágenes de Difusión, la restricción al movimiento del agua también se ha relacionado con la inflamación (edema e infiltración celular) y la fibrosis hepática. Las métricas derivadas de sus modelos están relacionadas con algunos aspectos biológicos dentro del tejido, incluida la celularidad, la composición del espacio intersticial y los cambios en la perfusión vascular. Por último, en cuanto a los mapas de los tiempos de relajación T<sub>1</sub>, los depósitos en la matriz extracelular (colágeno, fibrosis) afectan al movimiento relacionado con la composición macromolecular del tejido, alargando el tiempo de relajación T<sub>1</sub> del tejido [108,127].

Las Tablas 4 y 5 de la sección Anexos, resumen los estudios que han evaluado la correlación entre distintas secuencias RM y los grados histológicos de fibrosis [66,70,71,105,108-110,125,127-162] e inflamación [109,125-131,136-140,144-150,153,155,157,159,161,162], respectivamente. Se han revisado en profundidad diferentes parámetros radiómicos obtenidos a partir de secuencias convencionales sin la administración de un medio de contraste paramagnético, incluyendo la difusión de múltiples valores b (modelos IVIM *intravoxel incoherent motion*, *Stretched* y Kurtosis), mapas de relajación T<sub>1</sub> (obtenida con diferentes ángulos de inclinación  $\alpha$ ) e imágenes STIR (*short inversion time inversion recovery*). De estas tablas, es importante que se destaquen los siguientes aspectos:

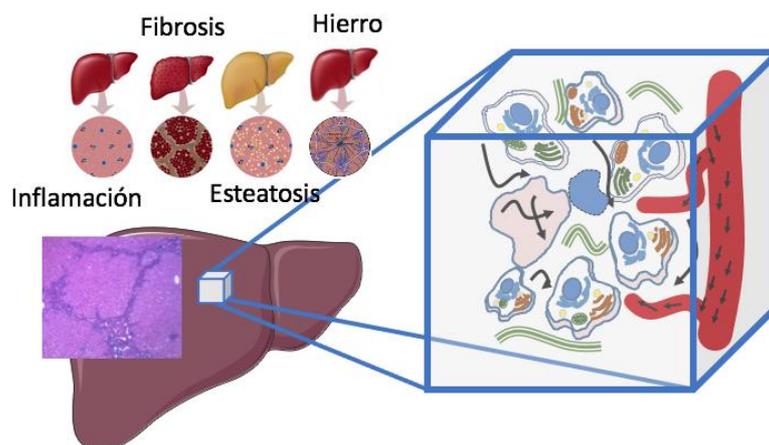
- Grado de evidencia y recomendación basado en el sistema GRADE (*Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation*) empleado por la EASL (*European Association for the Study of the Liver*) [116]: existe cierta limitación metodológica por tratarse principalmente de estudios retrospectivos con bajo tamaño muestral (ningún estudio supera los 115 casos) (GRADE B2 para fibrosis y C2 para inflamación).
- La inclusión de voluntarios sanos favorece las diferencias estadísticamente significativas con poco impacto clínico. ¿Dónde se encuentran las diferencias significativas que se obtienen en algunos estudios? Principalmente entre ausencia de enfermedad y presencia de enfermedad, pues existe un alto grado de solapamiento de valores entre los distintos grados de afectación histológica que no permite discriminar entre ellos. El

objetivo que se le debe de exigir a la RM hepática no es diferenciar entre enfermedad y ausencia de enfermedad (esta diferenciación se puede realizar con biomarcadores no invasivos de primera línea), sino entre los distintos grados de la enfermedad.

- La principal causa de daño hepático estudiada son las hepatitis virales (65% de los estudios incluidos en las Tablas). Dado que el foco de interés de la Hepatología ha cambiado hacia la EHGNA en la era de la obesidad y el síndrome metabólico, se hace necesario valorar el comportamiento y la interacción de la RM multiparamétrica en esta población [164].
- La influencia de las diferentes intensidades de campo (1,5 o 3 Teslas) y secuencias de RM con protocolos no estandarizados completamente limitan en cierta medida la reproducibilidad y las comparaciones entre diferentes estudios.
- La población incluida en los estudios presenta un sesgo de espectro de la enfermedad por una elevada prevalencia de condiciones distantes (F0 y F4) sin representar adecuadamente los estadios intermedios (F1-2-3). Esta distribución aumenta el VPP pre-test de las pruebas diagnósticas en la identificación de los casos con fibrosis avanzada [147,151]. Sin embargo, el objetivo de la RM no es diferenciar entre cirrosis y sujetos sanos, sino llenar el vacío de la zona gris que el uso de biomarcadores no invasivos de primera línea no permite caracterizar adecuadamente [27].
- A diferencia de la cuantificación de la grasa y el hierro, la baja precisión diagnóstica, la existencia de correlaciones débiles y la baja reproducibilidad de las métricas de RM para la fibrosis y la inflamación, limitan su relevancia clínica. Esto puede deberse a interacciones entre las diversas alteraciones que modifican la señal y las propiedades magnéticas de los tejidos para las secuencias analizadas, como era el caso de la sobrecarga de hierro y la esteatosis [105,108,129,145].

### 1.5. Finalidad del estudio: la precisión en la estimación

La RM es un método no invasivo que permite la extracción de biomarcadores de imagen que pueden representar los diversos procesos patológicos que acontecen en el tejido de las hepatopatías crónicas difusas. La aplicabilidad de la RM multiparamétrica en la práctica clínica habitual pretende ofrecer una herramienta para la tipificación de paciente de riesgo y la estadificación pronóstica de las hepatopatías crónicas. Este estudio pretende obtener uno o varios biomarcadores de imagen, tanto univariantes como multiparamétricos, que midan con precisión los principales componentes patológicos en las hepatopatías crónicas difusas. Se pretende finalmente desarrollar una metodología para cuantificar mediante el análisis de las imágenes de RM la cantidad de fibrosis, grasa, inflamación y hierro del tejido hepático. Este método se describe como una biopsia virtual que genera datos fiables de la existencia y distribución de los cambios patológicos que acontecen en el parénquima durante el desarrollo de las hepatopatías crónicas difusas, con un análisis de los factores de confusión y de la interacción entre los sustratos patológicos coexistentes. En resumen, y como bien decía Víctor Hugo: “trata de aumentar el conjunto sin confundirlo y completarlo sin recargarlo” (Figura 9).



**Figura 9:** Biopsia virtual hepática que permite abordar la cuantificación de los componentes tisulares implicados en los cambios patológicos principales de la hepatopatía crónica difusa. Esta información debe estimarse de manera simultánea dado que todas las variables analizadas influyen entre ellas y en la señal final de las imágenes de Resonancia Magnética. El análisis vóxel-a-vóxel proporciona datos sobre la magnitud y distribución de los cambios tisulares en el parénquima hepático.

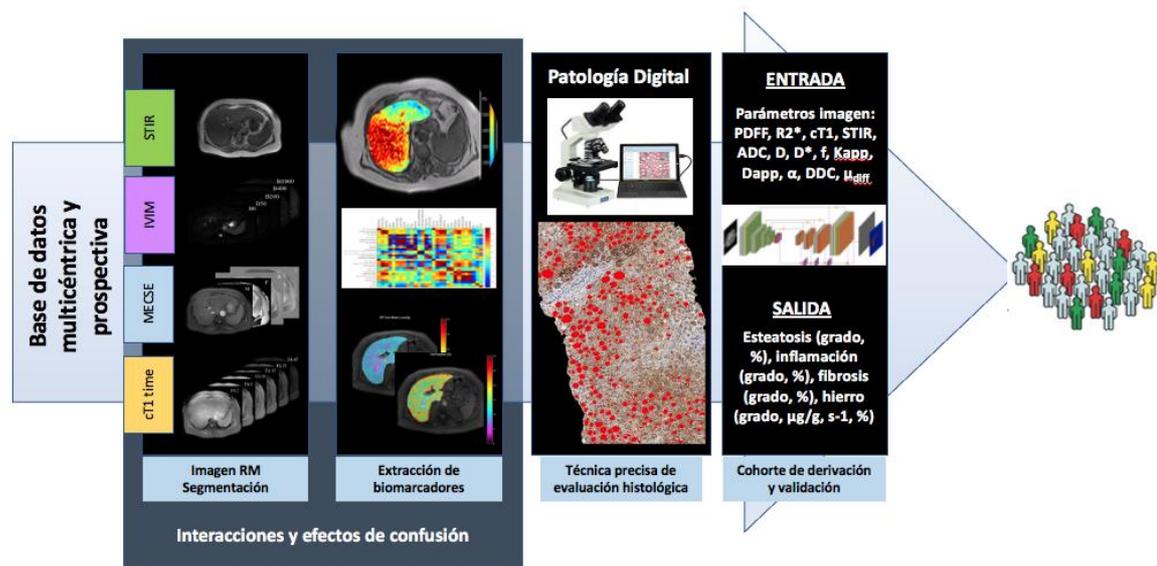


# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



# HIPÓTESIS

Los biomarcadores de imagen y su combinación representan una estimación como biopsia virtual precisa y fiable de los cambios anatomopatológicos que suceden en las hepatopatías crónicas difusas. Este análisis es múltiple (cuantificando el colágeno, la grasa, la inflamación y el hierro), está resuelto en el espacio (evaluando la heterogeneidad en la distribución de estos parámetros) y presenta una elevada correlación con los hallazgos de la biopsia hepática. En esta Tesis Doctoral se pretende desarrollar una metodología novedosa para la caracterización de los cambios principales que acontecen en el parénquima hepático de los pacientes con hepatopatías crónicas difusas a partir de sus imágenes de RM, analizadas mediante algoritmos avanzados de procesamiento de imágenes (Figura 10).



**Figura 10:** Diagrama de flujo del proyecto de Tesis Doctoral Biopsia Hepática Virtual.



## OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es:

- Evaluar el rendimiento diagnóstico de los parámetros obtenidos de la RM multiparamétrica como estimación cuantitativa y simultánea de la fibrosis, la esteatosis, la inflamación y la sobrecarga de hierro en pacientes con hepatopatía crónica difusa, tomando la histología como patrón de referencia.

Los objetivos secundarios en los que se ha desarrollado el trabajo son:

- Evaluar la relación entre las proporciones de colágeno, grasa, inflamación y hierro obtenidas mediante un análisis avanzado de imagen patológica digital de la biopsia hepática y sus correspondientes puntuaciones histológicas de gradación semicuantitativa para fibrosis, esteatosis, actividad necroinflamatoria y depósitos de hierro, respectivamente.
- Evaluar el rendimiento diagnóstico de distintos biomarcadores no invasivos de primera línea (clínicos, analíticos y ecográficos) en la estimación y gradación de la fibrosis, la esteatosis, la inflamación y el hierro hepático.
- Mejorar las estimaciones de los biomarcadores de imagen RM mediante la correlación de modelos univariante y multivariante con las observaciones cuantitativas obtenidas a partir del análisis patológico digital.
- Definir algoritmos de utilización de biomarcadores no invasivos y proponer un árbol de decisión clínica de uso en la práctica asistencial en pacientes con hepatopatía crónica difusa, dando valor al comité multidisciplinar.



# **METODOLOGÍA**



# MATERIAL Y MÉTODOS

## **3.1. Diseño del proyecto de investigación**

Para desarrollar los objetivos de esta Tesis Doctoral se ha diseñado un estudio de cohorte prospectivo, transversal y multicéntrico que se ha desarrollado entre enero de 2017 y enero de 2021. La población diana del estudio fueron los pacientes con hepatopatía crónica en seguimiento por los Servicios de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y Hospital Arnau de Vilanova. La digitalización de las muestras histológicas se centralizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico. Las pruebas de RM se realizaron y almacenaron en la Plataforma de Radiología Experimental y Biomarcadores de Imagen (PREBI) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Para la recogida de datos se empleó el programa informático Microsoft Excel versión 16.43. Se obtuvo la firma del consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio. El protocolo del estudio se ajustó a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, como se refleja en la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de cada institución participante (número registro del Hospital Clínico: 2016/209, Hospital La Fe: 2017/0031/PI, Hospital Arnau: 13/2019; Anexo 2). La presentación de los datos de investigación se ha realizado siguiendo las directrices de comunicación sobre los estudios de precisión de pruebas diagnósticas (STARD) [165] (Anexo 3).

### 3.2. Población de pacientes

A todo paciente con hepatopatía crónica, independientemente de su etiología, que fuera a someterse a una biopsia hepática como parte del estudio de seguimiento en las consultas de Hepatología de los hospitales participantes se ofreció la posibilidad de participar en el estudio. Los criterios de selección de pacientes fueron los siguientes:

- Criterios de inclusión: sujetos con una edad igual o superior a 18 años, que hubieran aceptado y firmado el consentimiento informado.
- Criterios exclusión: que existiera cualquier contraindicación para la realización del estudio de RM (tales como tener implantados ciertos marcapasos cardíacos o implantes cocleares), que la imagen RM adquirida estuviera artefactada por movimientos del paciente durante la exploración, que la muestra de tejido hepático fuera insuficiente para una adecuada lectura histológica según los criterios de la *AASLD – American Association for the Study of Liver Diseases* (principalmente si el tamaño de la muestra era inferior a 15 mm y tenía menos de 6 espacios porta) [63], o que se observara la presencia de enfermedad neoplásica en la biopsia hepática o en las exploraciones radiológicas del paciente.

Todos los pacientes incluidos en esta Tesis Doctoral se estudiaron mediante la realización de cuatro pruebas diagnósticas diferentes: biopsia hepática (considerada como el patrón de referencia), analítica sanguínea (con una combinación de diferentes marcadores séricos), elastografía (con ecografía de transición y/o onda de cizallamiento) y RM multiparamétrica. El tiempo transcurrido entre la biopsia hepática y las distintas pruebas complementarias empleadas siempre fue menor de cuatro semanas.

Se incluyeron 167 pacientes con una edad media de 55 años, 59% eran mujeres (n=98) y como agentes causales de daño hepático destacaba en primer lugar la EHGNA (n=102, 61%), seguido en frecuencia por la hepatitis autoinmune (n=29,

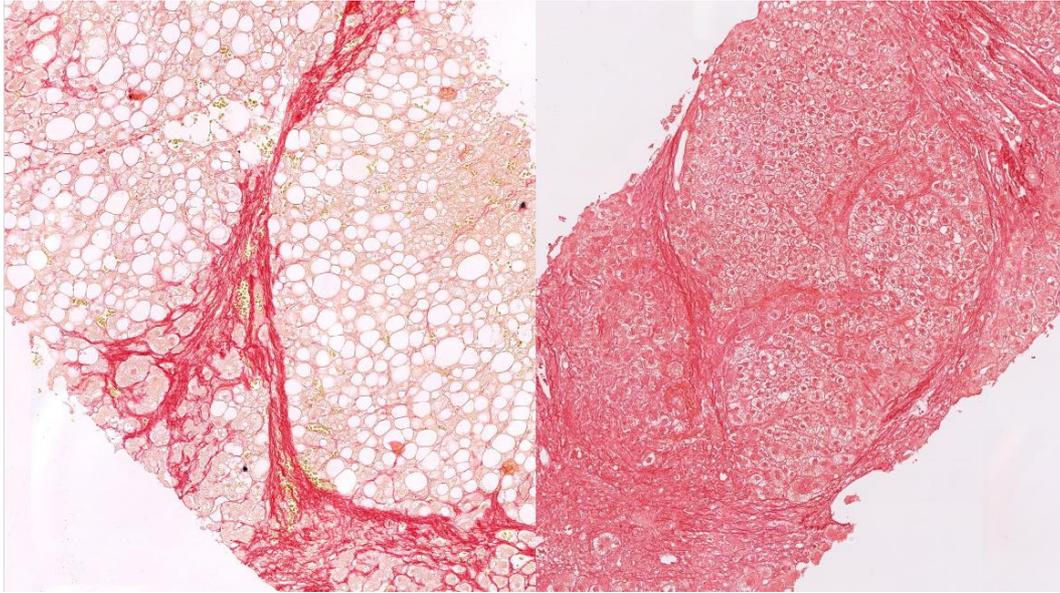
17%). Las características basales de la población estudiada serán descritas en la sección de resultados.

### **3.3. Anatomía Patológica**

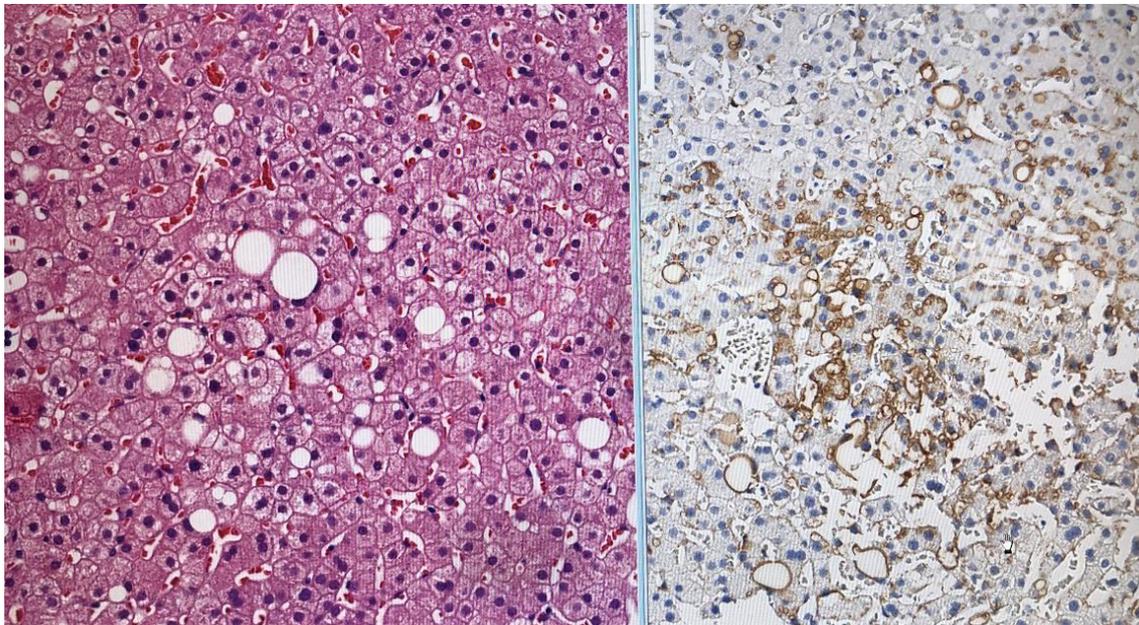
Las biopsias hepáticas se realizaron en el Servicio de Radiodiagnóstico de cada centro hospitalario con una aguja semiautomática de 16G de dos pasos, obteniendo una muestra representativa del lóbulo hepático derecho en los segmentos inferiores V y VI. De cada biopsia de tejido hepático se obtuvo cinco cortes histológicos de aproximadamente 4 µm de grosor cada uno. Tras su fijación con formaldehído al 10% y su inclusión en parafina, los cortes histológicos se tiñeron con diferentes reactivos para las tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas. Se empleó el sistema de preparación de muestras automatizado DAKO Omnis, Agilent Technologies para el análisis inmunohistoquímico. Los productos empleados fueron los siguientes:

- Rojo Sirio (solución 0.1%, Merck) para la detección de fibrosis. Su administración se realiza manualmente y debe ser cuidadosa para evitar la sobrecoloración y teñir de rojo zonas no correspondientes a fibras de colágeno. Si esto ocurre, se sobrestima la cuantificación del análisis digital (Figura 11).
- Inmunohistoquímica (IHQ) adipofilina (anticuerpo policlonal de conejo; proveedor: VITRO -Máster Diagnóstica-; catálogo: MAD-000627-QD) para la detección y evaluación de la esteatosis. La adipofilina es una proteína asociada con la monocapa de fosfolípidos que rodea las gotas de lípidos [185]. Esta IHQ se consideró una técnica específica en el análisis de las gotas de grasa por dos motivos:

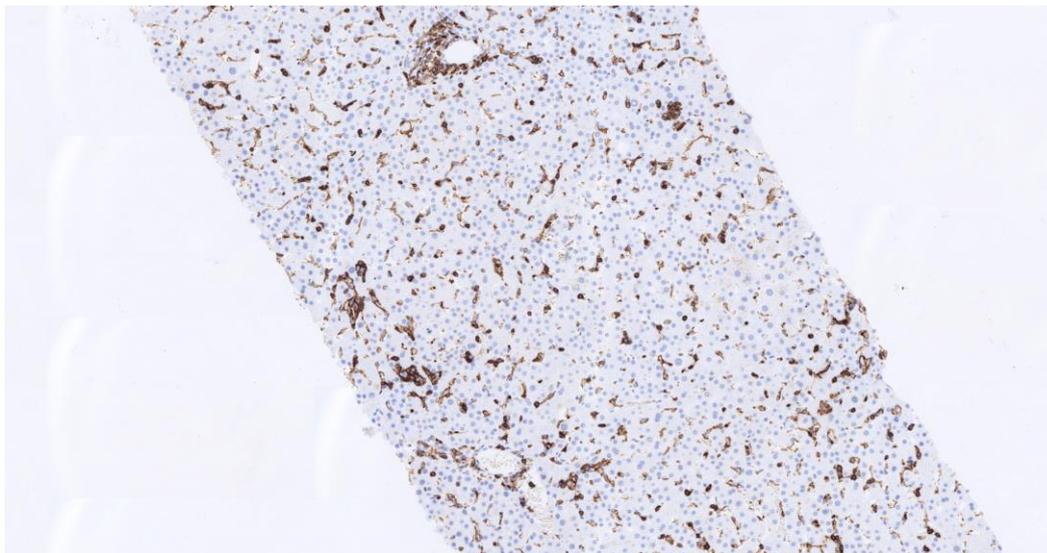
- Estudios previos de patología digital que han usado la tinción convencional de hematoxilina-eosina reflejan errores metodológicos derivados de la identificación de zonas no relacionadas con la esteatosis. Entre estos errores, destacara la rarefacción citoplasmática de los hepatocitos, los desgarros del tejido y los vasos sanguíneos sinusoidales [51,56].
- Existe una correlación positiva entre la tinción de adipofilina y la acumulación de lípidos hepatocitarios en la esteatosis hepática [186].
- Hematoxilina - Eosina (H&E) también para el análisis de esteatosis. Las gotas de grasa se evaluaron tanto con IHQ adipofilina como H&E para comparar los resultados de ambas técnicas de tinción en el análisis digital de la imagen patológica (Figura 12).
- IHQ-CD45 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-Humano CD45-LCA -*Leucocyte Common Antigen*; proveedor: DAKO; catálogo: IR751; número de clones: 2B11+PD7/26) [187] empleado para la detección de células inflamatorias (Figura 13). El marcador CD45+ es una de las glicoproteínas de superficie leucocitaria más abundante en las células de linaje hematopoyético [188].
- Tinción de Perls (Artisan Iron Staining Kit, DAKO) para la evaluación del hierro. Esta tinción identifica las dos formas de almacenamiento principales de hierro intracelular, específicamente ferritina y hemosiderina [189].



**Figura 11:** Muestra hepática teñida con Rojo Sirio. En la imagen de la izquierda se visualiza una correcta administración de la tinción ya que únicamente se han teñido de color rojo las fibras de colágeno. En la imagen de la derecha, la administración de la tinción ha sido excesiva provocando una sobrecoloración de toda la muestra, incluyendo los hepatocitos.



**Figura 12:** La imagen de la izquierda muestra una sección histológica teñida con H&E mientras que la imagen de la derecha está teñida con inmunohistoquímica adipofilina. Ambas son técnicas empleadas en el análisis de la esteatosis hepática.



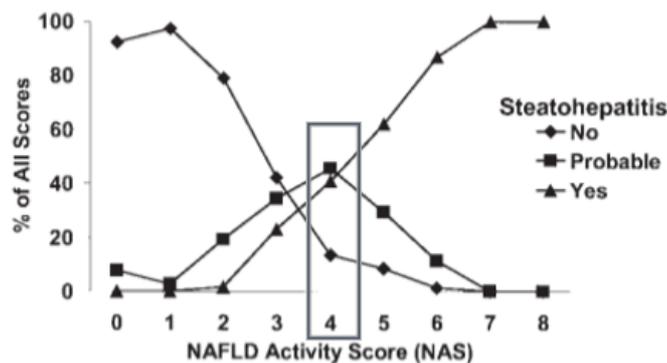
**Figura 13:** Muestra hepática teñida con la tinción inmunohistoquímica CD45. El marcador CD45+ es un marcador de células hematopoyéticas, excepto eritrocitos y plaquetas, por lo que juega un papel importante en el sistema inmunológico.

El análisis histológico se realizó mediante lectura semicuantitativa con microscopio óptico convencional de las diferentes preparaciones patológicas. Para cada muestra histológica se registró su longitud (en mm) y el número de espacios portales. La evaluación histológica se realizó de forma centralizada por dos patólogos experimentados del Hospital Clínico, cegados a los datos clínicos y los resultados del análisis digital de la imagen patológica escaneada. Todas las biopsias se evaluaron de forma semicuantitativa empleando los siguientes sistemas de puntuación histológica:

- Escala Metavir para la gradación de la fibrosis hepática en cinco estadios: F0 (ausencia de fibrosis), F1 (fibrosis portal), F2 (fibrosis periportal), F3 (puentes de fibrosis entre espacios porta) y F4 (cirrosis) [190]. Esta escala se dicotomizó en dos grupos (F0-1 vs. F2-4) considerando que los casos  $F \geq 2$  representa el espectro de fibrosis significativa con aumento del riesgo de mortalidad y, por lo tanto, deben considerarse candidatos para ensayos clínicos de terapia farmacológica [191,192].

- El sistema *Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) Clinical Research Network (CRN)* para la gradación de esteatosis en cuatro estadios: S0 (<5%), S1 (5-33%), S2 (34-66%), S3 (>66%) [193]. Esta escala se dicotomizó en dos grupos (S0-1 vs. S2-3) ya que los casos S>2 representa el espectro de esteatosis severa con aumento del riesgo de comorbilidades y mortalidad [14].
- La escala *Steatosis, Activity and Fibrosis (SAF)* para los casos de EHGNA (grados de inflamación lobular 0-2) [194] y la escala *Batts-Ludwig* para los casos de hepatopatía crónica inflamatoria como las hepatitis virales y la HAI (grados inflamación portal 0-4) [195].
  - La valoración de la inflamación lobular se gradó en tres estadios: 0 (ningún foco de células inflamatorias), 1 (< 2 focos por campo 200x), 2 (≥ 2 focos por campo 200x); mientras que la gradación de la inflamación portal se realizó en cinco estadios: 0 (ausente), 1 (inflamación leve sin necrosis), 2 (necrosis leve de la interfase), 3 (necrosis moderada de la interfase), 4 (necrosis severa y difusa de la interfase).
  - Estas escalas también se dicotomizaron entre ausencia o inflamación leve vs. inflamación moderada-severa (SAF 0-1 vs 2, Batts Ludwig 0-2 vs 3-4). El motivo de esta división es debido a que la inflamación moderada se asocia con la balonización hepatocelular y la fibrosis [196].
- Algoritmo *Fatty Liver Inhibition of Progression (FLIP)* y el sistema NASH-CRN para la categorización de esteatosis simple y esteatohepatitis [193,194]. La definición de esteatohepatitis según el algoritmo FLIP se basa en la presencia de esteatosis, inflamación lobular y balonización hepática. Una puntuación ≥4 en el sistema NASH-CRN también clasifica a los pacientes dentro del espectro de la esteatohepatitis (incluye las mismas variables que FLIP, pero no siendo ninguna imprescindible para su definición) (Figura 14).

- Escalas de Deugnier y Scheuer para la gradación de hierro [197,198]. Ambas escalas se dicotomizaron en dos grupos (ausencia vs. presencia de hierro) ya que la presencia de depósitos de hierro se relaciona con una mayor gravedad de las hepatopatías crónicas [15,199].
  - La escala de Scheuer se empleó por su sencillez, siendo de uso ampliamente extendido en la práctica clínica en pacientes con hemocromatosis. Se basa en la detección de gránulos de hierro hepatocitarios y en las magnificaciones a las que estos discretos gránulos se resuelven al microscopio: Fe0 (ausencia de gránulos), Fe1 (gránulos discernibles tenuemente a 250x de magnificación), Fe2 (gránulos visibles a 100x), Fe3 (gránulos visibles a 25x), Fe4 (masas visibles a un aumento de 10x).
  - Se empleó también la escala validada de Deugnier para valorar los depósitos de hierro no hepatocitarios y su distribución principal (macrófagos, sinusoides, sistema reticuloendotelial) en sujetos sin hemocromatosis. Esta escala es más completa y por la tanto más compleja, con una puntuación que abarca desde 0 hasta 33.



**Figura 14:** Gráfica de puntuación NASH-CRN (*Non-alcoholic Steatohepatitis - Clinical Research Network*). A partir de los 4 puntos, se aprecia un cambio en la probabilidad de padecer esteatohepatitis. Este punto de corte ha sido seleccionado en este trabajo para definir a los pacientes con esteatohepatitis, siguiendo la línea de otros grupos de investigación en EHGNA [124,200,201].

### 3.4. Patología Digital

Todas las preparaciones histológicas se digitalizaron con el escáner Ventana iScan HT (Roche, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA) para su posterior procesamiento como se demuestra en la Figura 15. Las muestras patológicas se escanearon en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario. Se escaneó toda la muestra histológica utilizando un aumento óptico máximo de 40x y una cámara calibrada (4000x4000 píxeles=1 mm<sup>2</sup>), conectada a un ordenador personal (Windows 10, i7). Las imágenes se guardaron con un formato RGB y codificadas con 24 bits de profundidad en el estándar de archivo de imagen etiquetada (TIFF, *Tagged Image File Format*). El almacenamiento multipágina garantiza que cada resolución (de 5x a 40x) fuera registrada como una capa individual dentro del archivo TIFF. Se diseñó un software semiautomático propio, desarrollado en el lenguaje MATLAB (MathWorks, versión R2016a, Natick, Massachusetts, USA) y ejecutado en un ordenador personal (Intel Core i7-6700, CPU de 3.40GHz y 64GB de RAM), para analizar todas las imágenes escaneadas en cuatro pasos consecutivos (Figura 16):

1. Preprocesado de las imágenes digitales para la eliminación de artefactos, espacios naturales sin rellenar y elementos no deseados como las cavidades vasculares, los grandes espacios portales con presencia de colágeno estructural, o el tejido conectivo de la cápsula de Glisson. Estos elementos fueron identificados y marcados manualmente por un patólogo utilizando la aplicación Ventana Image Viewer (Ventana Medical Systems, Inc). Un ejemplo de este primer paso queda ilustrado en la Figura 17 A-C.
2. Extracción automática del fondo de la imagen, sin apenas señal y muy homogéneo.
3. Aplicación de un algoritmo de normalización del color a la imagen segmentada resultante, basado en el método de Reinhard para minimizar la variabilidad entre imágenes [202].

4. Aplicación de nuevos algoritmos de segmentación al espacio de interés resultante para determinar el área proporcional de los distintos sustratos histológicos. En cualquiera de las cuatro situaciones clave (fibrosis, inflamación, grasa, hierro), el área proporcional se calculó dividiendo el área total del sustrato seleccionado entre el área total de la muestra analizada, expresada como porcentaje. Este algoritmo computacional se basa en la umbralización a través del color y la forma (detección de bordes y contornos), el análisis morfológico estructural y el realce del color, lo que permite detectar las distintas tinciones empleadas para resaltar los sustratos histopatológicos analizados [203].

En esta Tesis se utilizó la tinción Rojo Sirio para la detección del colágeno, H&E y la IHQ adipofilina para la identificación de la esteatosis, el marcador CD45+ para la cuantificación de los infiltrados inflamatorios leucocitarios no específicos, y la tinción de Perls para los depósitos de hierro.

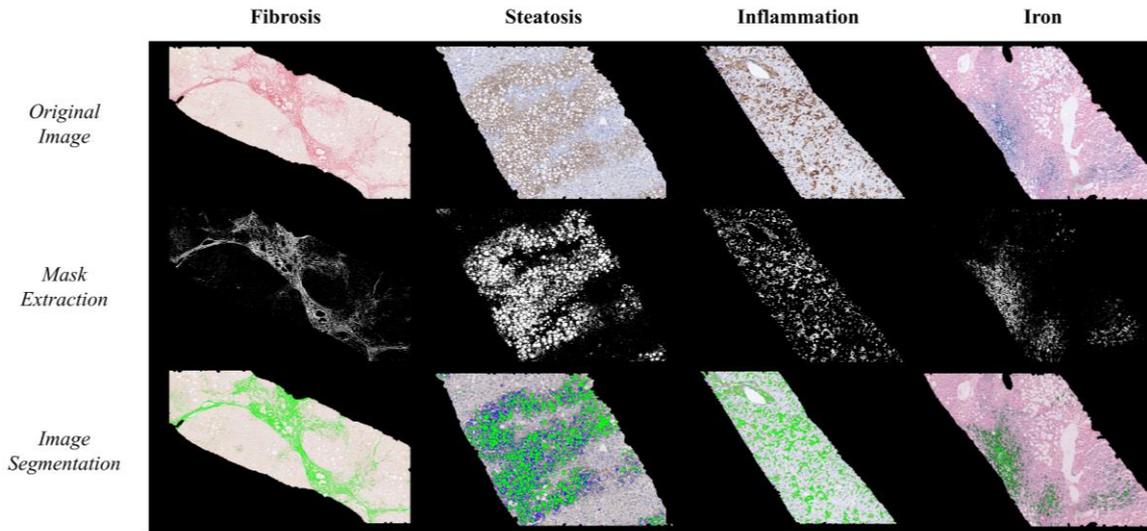
Los datos cuantitativos obtenidos de la patología digital se expresaron como las áreas proporcionales (%) de colágeno (APC), grasa (APG), inflamación (API) y hierro (APFe). El colágeno estructural de los espacios porta y de las paredes de los vasos sanguíneos que no representan fibrosis patológica se eliminó en un primer momento en el flujo de trabajo mencionado para excluirlo de la medición del APC. La determinación del APG incluyó tanto el área total de esteatosis macrovesicular como la microvesicular y su combinación se consideró como esteatosis total. La medición del API incluyó cualquier infiltrado inflamatorio teñido positivamente para el marcador CD45, independientemente de su distribución portal y/o lobular. La determinación del APFe incluyó el área total de los gránulos teñidos en el interior de hepatocitos, macrófagos y células sinusoidales, independientemente de su patrón de depósitos en células del sistema hepatocelular o en el sistema reticuloendotelial.

Se diseñó una prueba-reprueba de las imágenes digitalizadas para evaluar la repetibilidad del método. El mismo protocolo de patología digital, con el mismo escáner, software y operador, se realizó en dos ocasiones distintas, con meses de diferencia, para evaluar la reproducibilidad del análisis computacional.

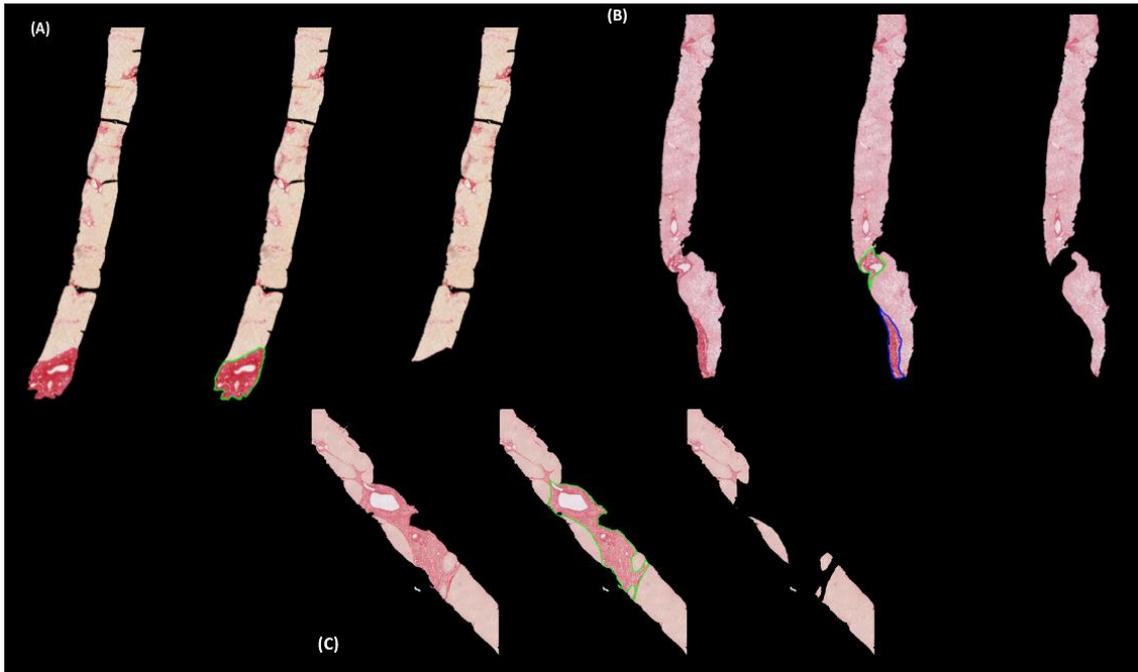
Para esta prueba, dos patólogos enmascarados a los datos del estudio volvieron a revisar las imágenes y a excluir, por separado e independientemente, las regiones no deseadas de colágeno para el análisis digital.



**Figura 15:** Escáner Ventana iScan HT (Roche, Ventana Medical Systems). Se introduce la lámina del corte histológico en el portaobjetos y se digitaliza la muestra con el escáner para su posterior análisis computacional.



**Figura 16:** Diagrama de flujo empleado en el análisis de las imágenes digitalizadas. La imagen muestra cuatro cortes histológicos teñidos con Rojo Sirio para fibrosis, inmunohistoquímica adipofilina para esteatosis, inmunohistoquímica CD45 para células inflamatorias y tinción de Perls para los depósitos de hierro. En primer lugar se realiza una extracción del fondo de la imagen original. Posteriormente se aplica una máscara basada en la detección de contornos y bordes, análisis morfológico estructural y realce de color. La segmentación de las imágenes determinó el área proporcional de las diferentes características histológicas (colágeno, grasa, inflamación y hierro).



**Figura 17:** Preprocesado de las imágenes digitales para la eliminación de áreas que no deben de ser incluidas en el análisis computacional: colágeno estructural de grandes espacios portales, tejido conectivo de la cápsula hepática y cavidades vasculares (imágenes A-C, respectivamente). Estos elementos no patológicos fueron manualmente eliminados en un primer paso para evitar su inclusión en el análisis digital.

### 3.5. Evaluación clínica y biomarcadores no invasivos de primera línea

Se recogieron diversas variables clínicas, analíticas y elastográficas para la completa caracterización de nuestra cohorte de estudio. Las variables demográficas y séricas se obtuvieron el mismo día de la biopsia hepática por medio de una entrevista clínica con el paciente y de una analítica sanguínea tras la extracción de sangre en ese mismo momento. Los datos elastográficos se obtuvieron mediante ecografía con diferentes equipos. Todas estas variables se recogieron atendiendo a las recomendaciones del grupo de trabajo *Liver Forum* para la estandarización de los datos recogidos en los ensayos clínicos farmacológicos de la EHGNA [166].

## Variables clínicas

Se recogieron las siguientes variables en el momento de la encuesta clínica.

- Sexo, edad (años) e índice de masa corporal (IMC: kg/m<sup>2</sup>).
- Comorbilidades: diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial, dislipemia, síndrome metabólico, fumador, hipotiroidismo. La hipertensión arterial se definió como presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg o pacientes en tratamiento activo con antihipertensivos. La DM se definió como niveles de glucosa en ayunas  $>126$  g/dl o pacientes en tratamiento activo con antidiabéticos. La dislipemia y el síndrome metabólico se diagnosticaron en base a los criterios del Panel de Tratamiento de Adultos III [167].
- Factores de riesgo cardiovascular: presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, presión arterial media, escalas de Framingham (*Framingham Risk Score Cardiovascular Disease*) [168] y ASCVD (*Atherosclerotic Cardiovascular Disease risk algorithm de la American College of Cardiology y la American Heart Association (AHA/ACC 2013)*) [169]. Estas escalas están diseñadas para predecir la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular a 10 años [170]. El riesgo cardiovascular se definió según (I) la escala Framingham como bajo ( $<10\%$ ), intermedio ( $10-20\%$ ) y alto ( $>20\%$ ); (II) la escala ASCVD como bajo ( $<5\%$ ), intermedio ( $5-7,5\%$ ) y alto ( $>7,5\%$ ) [171,172].
- Etiología de la hepatopatía crónica: EHGNA, enfermedad hepática por alcohol, VHC, VHB, hepatitis autoinmune (HAI), colangitis biliar primaria (CBP), hemocromatosis. Los sujetos con EHGNA se definieron por la presencia de transaminasas elevadas y evidencia de esteatosis hepática en la ecografía, además de obesidad ( $IMC \geq 25$ ), DM o desregulación metabólica [5]. Sus criterios definitorios se ajustan a la nueva definición de enfermedad hepática metabólica aunque en esta Tesis Doctoral se le ha denominado enfermedad hepática grasa no alcohólica.
- Escalas de función hepática: puntuaciones de Child-Pugh y MELD [173,174.].

## Variables analíticas

Se obtuvieron los siguientes datos analíticos de la muestra obtenida momentos antes de la biopsia hepática:

- Analítica sanguínea: glucosa (mg/dL), bilirrubina (mg/dL), aspartato aminotransferasa (AST; U/L), alanina aminotransferasa (ALT; U/L), ratio AST/ALT, gamma-glutamil transferasa (GGT; U/L), fosfatasa alcalina (FA; U/L), creatinina (mg/dL), triglicéridos (TG; mg/dL), colesterol (mg/dL), HDL colesterol (mg/dL) LDL colesterol (mg/dL), tiempo de protrombina (sec), INR, plaquetas ( $10^9/L$ ), hemoglobina (g/dL), ancho de distribución eritrocitaria (%), ferritina (ng/mL), albúmina (g/dL), neutrófilos ( $10^3/\mu L$ ), linfocitos ( $10^3/\mu L$ ), monocitos ( $10^3/\mu L$ ), eosinófilos ( $10^3/\mu L$ ).

- Biomarcadores séricos (las fórmulas para el cálculo de las distintas puntuaciones están resumidas en la Tabla 1):

- Fibrosis: APRI, BAAT, FIB-4, BARD y NAFLD fibrosis score [175,179].
- Esteatosis: *Hepatic Steatosis Index* (HIS), índice Triglicéridos – glucosa (TyG Index) [180,181].
- Inflamación: ALT (valor referencia 1-31 U/L), AST (valor referencia 1-31 U/L) y GGT (valor referencia 1-38 U/L) [182].
- Hierro: ferritina. Los valores de normalidad se definieron como <200 ng/mL en mujeres y <300 ng/mL en hombres, de acuerdo con el trabajo *Hemochromatosis and Iron Overload Screening Study* [183].

<b>Biomarcador</b>	<b>Componentes</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Predicción</b>
<i>APRI</i>	AST, plaquetas	$\frac{\text{AST (U/L)}}{\text{plaquetas (10}^9\text{/L)}} \times 100$	Fibrosis
<i>FIB-4</i>	AST, ALT, plaquetas, edad	$\frac{[\text{Edad (años)} \times \text{AST (U/L)}]}{[\text{plaquetas (10}^9\text{/L)} \times \text{ALT (U/L)}]}$	Fibrosis
<i>NAFLD FS</i>	Edad, IMC, AST, ALT, plaquetas, albúmina, glucemia alterada en ayunas/DM	$-1.675 + 0.037 \times \text{edad (años)} + 0.094 \times \text{IMC (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{DM (si=1, no= 0)} + 0.99 \times \text{ratio AST/ALT} - 0.013 \times \text{plaquetas (10}^9\text{/L)} - 0.66 \times \text{albúmina (g/dL)}$	Fibrosis
<i>BAAT</i>	IMC, edad, ALT, TG	IMC $\geq$ 28: 1 punto Edad $\geq$ 50 años: 1 punto ALT $\geq$ 2x ULN: 1 punto TG $\geq$ 1.7 mmol: 1 punto	Fibrosis
<i>BARD</i>	AST, ALT, IMC, DM	AST/ALT $\geq$ 0.8; 2 puntos IMC $\geq$ 28: 1 punto DM: 1 punto	Fibrosis
<i>HSI</i>	Sexo, AST, ALT, IMC, DM	$8 \times \text{ALT/AST} + \text{IMC (+2 si DM; +2 si mujer)}$	Esteatosis
<i>Índice TyG</i>	TG y glucosa	$\log [\text{TG (mg/dL)} \times \text{glucosa (mg/dL)} / 2]$	Esteatosis

**Tabla 1:** Resumen de biomarcadores séricos de primera línea empleados en la práctica clínica habitual para el diagnóstico no invasivo de fibrosis y esteatosis hepática. La tabla resume los parámetros que incluye cada parámetro y su fórmula de adquisición.

## Variables elastográficas

Estas mediciones expresan la elasticidad hepática y se obtuvieron en todos los pacientes con al menos 6 horas de ayunas a sólidos:

- Elastografía de transición - FibroScan® (unidades: kPa para la elasticidad hepática, y dB/m para el parámetro de atenuación controlada (CAP)). Se obtuvieron los datos de FibroScan en todos los centros participantes. Se empleó el mismo aparato de FibroScan (Echosens, París, Francia) en los tres hospitales. La exploración se realizó por operadores con experiencia que previamente habían realizado al menos 300 determinaciones en pacientes con enfermedad hepática crónica. Las mediciones se consideraron válidas cuando el intervalo RIQ/mediana no superaba el 30% [184]. El tipo de sonda empleada (M, XL) se recogió en todos los pacientes.
- Elastografía por onda de cizallamiento integrado en los dispositivos de ecografía convencional. La exploración fue realizada por un radiólogo experto en ecografía abdominal en condiciones de enmascaramiento respecto a los datos clínicos e histológicos. Se emplearon las siguientes técnicas:
  - Elastografía de onda de cizallamiento puntual (pSWE, *point Shear Wave Elastography*) – ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse*) (unidad: m/s). Esta exploración se realizó en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe con equipos Siemens utilizando el Virtual Touch Quantification (Siemens medical Solutions, Mountain View, California, USA).
  - Elastografía de onda de cizallamiento de dos dimensiones (2D-SWE, *2D Shear Wave Elastography*), SSI (Supersonic Shear Imaging) (unidad: kPa). Esta exploración se realizó en el Hospital Clínico y se empleó el dispositivo Aixplorer (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, Francia).

### **3.6. Protocolo de imagen RM**

Todas las adquisiciones de RM se realizaron empleando un escáner de 3 Tesla de intensidad de campo magnético (Achieva TX, Philips Healthcare, Holanda) con una bobina de superficie con una matriz de 16 canales en fase.

El protocolo de imágenes de RM incluyó:

- una secuencia 3D-T1 de alta resolución (THRIVE).
- una secuencia de difusión con múltiples valores b.
- una secuencia EG 3D-T1 con ángulos de inclinación variables.
- una secuencia EG multieco con desplazamiento químico (MECSE).
- una secuencia STIR de supresión grasa.

La Tabla 2 resume el protocolo de RM que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral. Las dimensiones en plano de los vóxeles fueron de 3x3 mm, con un grosor de corte de 7 mm y una separación entre cortes de 0,3 mm. La media de tiempo total de adquisición fue de 20 minutos ( $\pm 2$  minutos). La RM se realizó en la Plataforma de Radiología Experimental y Biomarcadores de Imagen (PREBI) situada en el sótano de la Torre A del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. La RM se obtuvo dentro de un margen temporal estricto, nunca superando una diferencia máxima de 4 semanas con respecto a la biopsia hepática.

Las imágenes de RM se analizaron por un radiólogo con 10 años de experiencia en estudios de RM del abdomen, en condiciones de enmascaramiento respecto a los datos clínicos e histológicos. Aquellas imágenes con presencia de lesiones incidentales que sugirieran una enfermedad neoplásica fueron excluidas y el paciente avisado.

Secuencia	TR/TE (msec)	TI (msec)	Matriz	Campo de visión (cm)	Grosor de corte (mm)	Valor-b (sec/mm <sup>2</sup> )	Ángulo inclinación (°)	Parámetros
3D T1 - THRIVE	3.025 / 1.42	0	256x256	37.5	3	-	10	-
2D T2 - STIR	3809.7 / 75	230	384x384	37.4	5	-	90	H/G [%]
3D T1 - EG	14 / 4.61	0	192x192	37.5	12	-	2, 5, 10, 15, 25, 45	Tiempo relajación T1 [ms] y su ratio R1 corregido por hierro [s <sup>-1</sup> ]
Difusión con técnica eco planar (EPI) a partir de un eco de spin (SE)	1957.7 / 68.6	0	240x240	37.5	6	0, 15, 50, 200, 400, 1000	90	ADC [mm <sup>2</sup> /s], D [mm <sup>2</sup> /s], D* [mm <sup>2</sup> /s], f [%], Dapp [mm <sup>2</sup> /s], Kapp [a.u.], DDC [mm <sup>2</sup> /s], α [a.u.], μ [kPa]
MECSE	9 / 0.9, 1.5, 2.2, 2.9, 3.5, 4.2, 4.9, 5.5, 6.0, 6.2, 6.8, 7.5, 8.2	0	375x302	37.5	7	-	10	FGDP [%], R2* [s <sup>-1</sup> ], Perímetro abdominal [cm]

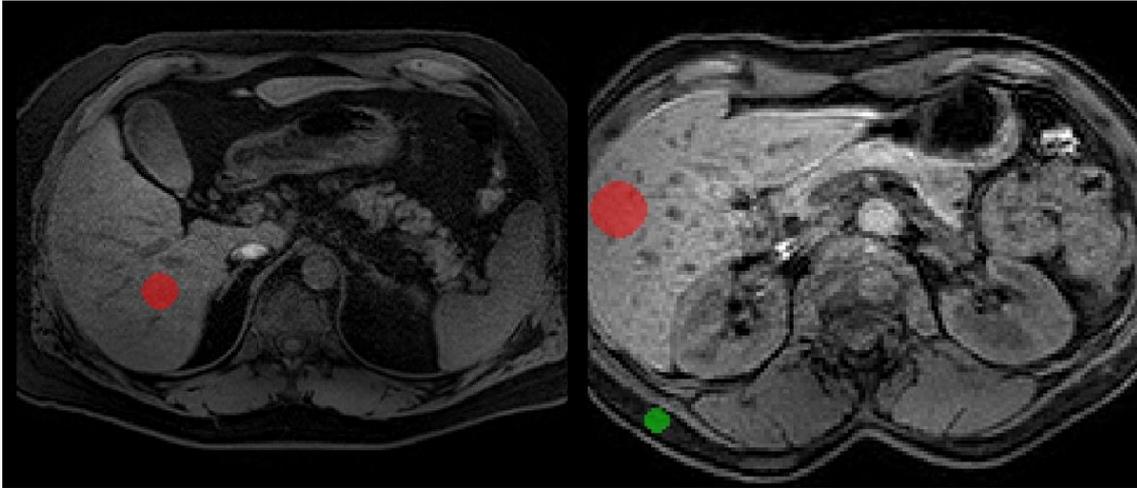
**Tabla 2:** Protocolo de adquisición de las secuencias de Resonancia Magnética.

### 3.7. Análisis de la imagen RM

La información contenida y generada por las imágenes de RM permite abordar la cuantificación de todos aquellos componentes tisulares implicados en los cambios patológicos principales de la hepatopatía crónica difusa (fibrosis, esteatosis, inflamación y depósitos de hierro). Esta información proporciona datos sobre la magnitud y distribución de los cambios tisulares en el parénquima hepático.

Previo al procesado de las diferentes imágenes de RM, los ficheros DICOM se transformaron al formato NIFTI (software dicom2nii) para su mejor procesamiento informático. Todas las mediciones fueron realizadas sobre las diferentes radiones de interés (ROI) seleccionadas sobre las imágenes THRIVE. Para ello se utilizó el software libre ITK-SNAP 3.6.0 (Figura 18) [204].

Para la selección de las 3 ROI se respetaron las siguientes reglas estandarizadas [205]: (I) evitar la selección de regiones artefactadas por movimiento o con mala relación señal frente a ruido; (II) seleccionar tres ROI de 16 mm de tamaño para valorar la representatividad y heterogeneidad de la distribución de la afectación en las enfermedades hepáticas difusas; (III) localizar las 3 regiones en el lóbulo hepático derecho, por debajo de la bifurcación de la vena porta derecha, segmentos inferiores V-VI, ya que corresponde al mismo lugar donde se realiza la biopsia hepática; (IV) evitar la inclusión de vasos sanguíneos, vesícula biliar y tracto de la biopsia; y (V) se seleccionó también en una ROI de 10 mm de tamaño en la grasa del tejido celular subcutáneo para analizar el ratio de la intensidad de señal del hígado frente a grasa en las imágenes STIR (H/G-STIR). La selección de las 3 ROI se realizó por duplicado con dos investigadores hepatólogos cegados a los datos clínicos e histológicos. El análisis de las ROI se realizó voxel a voxel por un científico computacional, utilizándose el promedio de los valores de las regiones seleccionadas como parámetro representativo.



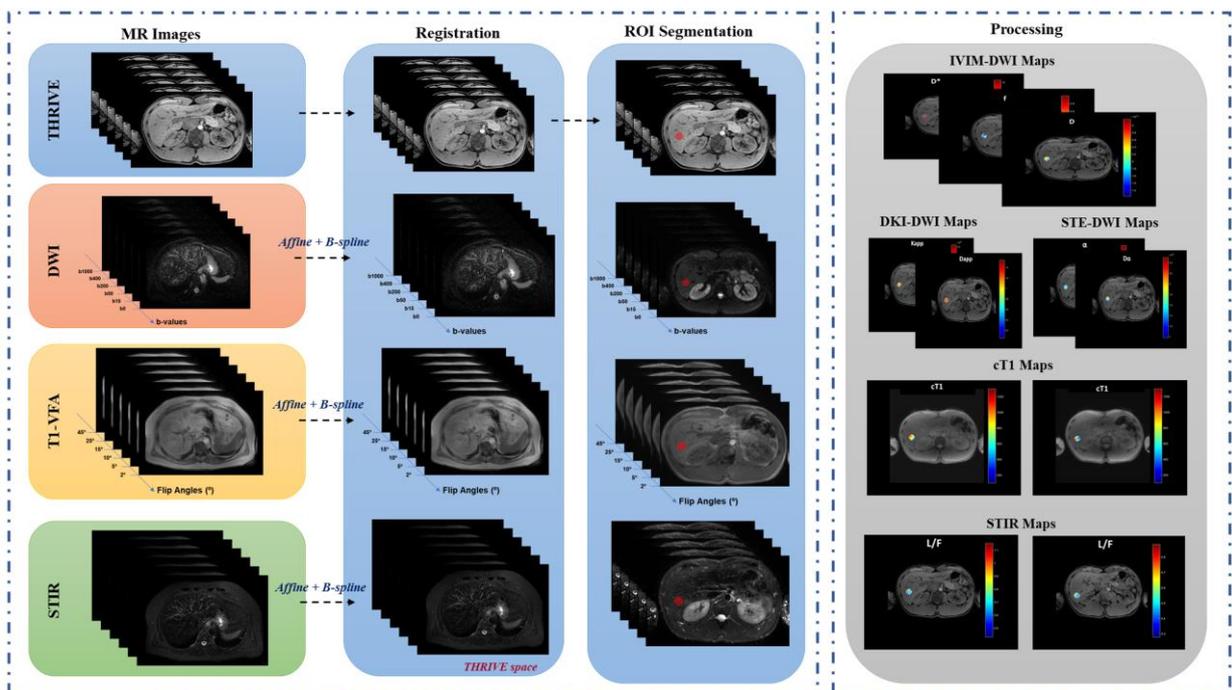
**Figura 18:** Selección de regiones de interés (ROI) para el análisis radiómico. Nótese como las ROI del hígado (círculo rojo) evitan la inclusión de vasos sanguíneos, vesícula biliar o una localización muy periférica. Se seleccionó también una ROI en la grasa subcutánea (círculo verde) para el análisis STIR.

Las imágenes se procesaron utilizando un software propio escrito en MATLAB y ejecutado en un ordenador personal (Intel Core i7-6700). Para garantizar unos resultados con estimaciones fiables y precisas se controlaron los sesgos inherentes a la variabilidad de la señal en RM, se preprocesaron todas las imágenes previo a su análisis. Dado que todas las variables analizadas influyen en la señal final de las imágenes obtenidas en RM por su influencia en propiedades intrínsecas como los tiempos de relajación, todas las características histológicas evaluadas en esta Tesis deben estimarse de manera simultánea. En el procesamiento de las imágenes previo al análisis computacional radiómico se procedió a eliminar el ruido de la imagen y asegurar la coherencia entre los vóxeles adquiridos en distintas series, como entre valores  $b$  en difusión o entre ecos en la secuencia MECSE. Para este fin se emplearon filtros para reducir el ruido tipo *non-local means* y para eliminar las inhomogeneidades de campo con el filtro N4.

Para garantizar la coherencia espacial entre imágenes se utilizó un registro entre adquisiciones dentro de una misma serie y entre series para las imágenes de Difusión, T1 con ángulo variable, MECSE y STIR. En el registro de adquisiciones en una misma secuencia (registro intra-secuencia), las imágenes de difusión con

múltiples valores b se registraron a la imagen del primer valor b, las imágenes T1 con diferentes ángulos de inclinación se registraron al primer ángulo de inclinación, y las imágenes MECSE con los diferentes tiempos de eco se registraron al primer tiempo de eco. Todas estas series de imágenes y las imágenes STIR, obtenidas con un tiempo de inversión (TI) de 230ms, se registraron sobre las imágenes THRIVE (registro inter-secuencia) de alta resolución mediante métodos de registro no lineal basados en *B-splines*, dada la deformabilidad que presenta el hígado por los movimientos respiratorios (Figura 19). Los métodos de registro empleados estuvieron basados en método no rígidos para el registro inter-secuencia y rígidos para el registro intra-secuencia utilizando la toolbox de Elastix v.4.8 [206].

Tras estos primeros pasos de selección de las ROI, preparación y registro se cuantificaron los diferentes parámetros derivados de cada una de las secuencias (Tabla 2). La distribución de los parámetros se analizó con los valores descriptivos de la media, mediana, desviación estándar (DS), percentil 25 y 75 (p 25 y p75)



**Figura 19:** Proceso de obtención de imágenes y análisis radiómico: secuencias de adquisición, registro, selección de ROI y extracción de datos.

## Difusión

Para la secuencia de difusión, se utilizaron cinco modelos distintos de caracterización de la pérdida de la señal, obteniendo diferentes parámetros cuantitativos los cuales se pretende correlacionar con la fibrosis y la inflamación hepática. Los modelos de difusión que se utilizaron, sus fórmulas de análisis y sus parámetros extraídos son los siguientes:

1. Ajuste monoexponencial sobre la curva creada con las intensidades de señal de la imagen adquirida con el b-valor más bajo (0 mm<sup>2</sup>/s) y con el b-valor más alto (1000 mm<sup>2</sup>/s). Este es el único modelo que no considera todos los valores b de la curva de intensidad de señal para cada vóxel. La Fórmula 1 permitió obtener el parámetro conocido como Coeficiente de Difusión Aparente monoexponencial para dos b-valores dados (ADC, mm<sup>2</sup>/s) [157].

$$\text{Fórmula 1: } \text{ADC} = -(\ln S_{b_2} - \ln S_{b_1}) / (b_2 - b_1)$$

ADC: coeficiente de difusión aparente.

S: intensidad de señal

b1: primer b-valor (0 mm<sup>2</sup>/s)

b2: segundo b-valor (1000 mm<sup>2</sup>/s)

2. El modelo IVIM (*IntraVoxel Incoherence Motion*) permitió obtener los siguientes parámetros aplicando la Fórmula 2 [207]: el Coeficiente de Difusión Aparente biexponencial (ADC, mm<sup>2</sup>/s), el porcentaje del volumen microvascular o fracción de perfusión (*f*, %), el coeficiente de difusión molecular real del agua (*D*, mm<sup>2</sup>/s), y coeficiente de pseudodifusión relacionado con la microcirculación incoherente (*D\**, mm<sup>2</sup>/s).

$$\text{Fórmula 2: } S/S_0 = fe^{-b(D+D^*)} + (1-f)e^{-bD}$$

S: intensidad de señal

S<sub>0</sub>: intensidad de señal con b-valor de 0 mm<sup>2</sup>/s

b: valor b

f: fracción de perfusión

D: coeficiente de difusión

D\*: coeficiente pseudoperfusión

3. El modelo Kurtosis (DKI, *Difusión Kurtosis Imaging*), permitió obtener el Coeficiente de Difusión Aparente (D<sub>app</sub>, mm<sup>2</sup>/s) y el valor de Kurtosis (K<sub>app</sub>, a.u.) aplicando la Fórmula 3 [208].

$$\text{Fórmula 3: } \ln \frac{S(n, b)}{S_0} = -bD_{app}(n) + \frac{1}{6}b^2D_{app}^2K_{app}(n)$$

S: intensidad de señal

S<sub>0</sub>: intensidad de señal con b-valor de 0 mm<sup>2</sup>/s

b: valor b

D<sub>app</sub>: coeficiente de difusión aparente

K<sub>app</sub>: valor de kurtosis

4. El modelo *Stretched* (STE, *Stretched-Exponential Model*) permitió calcular el Coeficiente de Difusión Distribuida (DDC, mm<sup>2</sup>/s) y el índice de heterogeneidad intravóxel (α, a.u.) con la Fórmula 4 [209].

Fórmula 4: 
$$S_b = S_0 \exp\{-(b \times DDC)^\alpha\}$$

$S_b$ : intensidad de señal a un determinado valor b

$S_0$ : intensidad de señal con b-valor de 0 mm<sup>2</sup>/s

b: valor b.

DDC: coeficiente de difusión distribuida

$\alpha$ : índice de heterogeneidad intravóxel

5. El modelo de Elastografía virtual basada en IVIM proporciona estimaciones cuantitativas de la rigidez del tejido hepático sin utilizar dispositivos que emitan vibraciones mecánicas como en la Elastografía por RM o elastografía de transición. En este modelo se calculó el módulo de cizallamiento del hígado a partir de las imágenes de difusión ( $\mu$ , kPa) mediante el cálculo del Coeficiente de Difusión Aparente desplazado (sADC, *shifted* ADC). Para ello se utilizó la señal de las imágenes obtenidas con los valores b de 200 y 1500 mm<sup>2</sup>/s. Esta medición se ha publicado que está relacionada con la fibrosis hepática. Para ello se empleó la Fórmula 5 y sus valores constantes  $\alpha$  y  $\beta$  [210].

Fórmula 5: 
$$\mu_{diff}(kPa) = \alpha \cdot sADC(mm^2/sec) + \beta$$

sADC (mm<sup>2</sup>/s):  $\ln(S_{200} / S_{1500}) / 1300$

$S_{200}$ : intensidad de señal con b-valor de 200 mm<sup>2</sup>/s

$S_{1500}$ : intensidad de señal con b-valor de 1500 mm<sup>2</sup>/s

sADC: coeficiente de difusión aparente desplazado

$\alpha$ : -12.740

$\beta$ : 14.0

## Mapas $T_1$

A partir de las imágenes de la secuencia  $T_1$  se calculó el tiempo de relajación  $T_1$  (ms) de cada vóxel aplicando un ajuste de curvas a la ecuación de Ernst, vóxel a vóxel, a las señales obtenidas con los valores de intensidad respecto a los diferentes ángulos de inclinación (Figura 20). Su valor se ha correlacionado con la fibrosis hepática y su fórmula de adquisición es la siguiente [211]:

Fórmula 6:

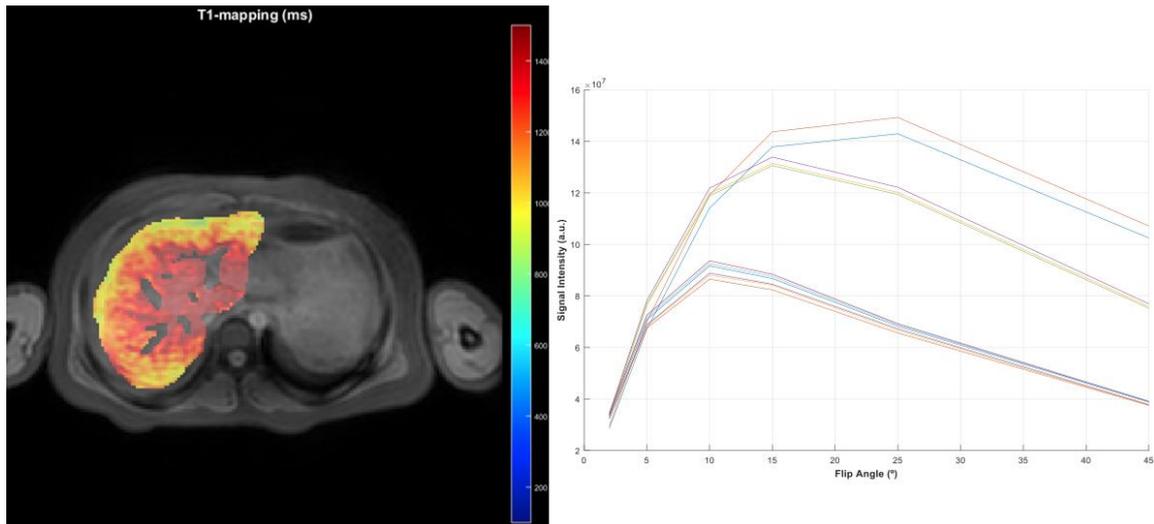
$$M_z(\Theta_n) = M_0 \frac{1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}}{1 - \cos(\Theta_n)e^{-\frac{TR}{T_1}}} \sin(\Theta_n)$$

$M_0$ : magnetización en equilibrio cuando el vector de magnetización neta apunta en la dirección del campo magnético aplicado  $B_0$ .

$T_1$ : tiempo transcurrido hasta que la diferencia entre la magnetización longitudinal ( $M_z$ ) y su valor de equilibrio ( $M_0$ ) se reduzca en un factor de  $e$ .

$TR$ : tiempo de repetición.

$\theta_n$ : ángulo de inclinación.



**Figura 20:** Mapa paramétrico del tiempo de relajación T1 como expresión de la concentración del colágeno en el parénquima hepático (imagen izquierda). La imagen de la derecha muestra la gráfica de pérdida de la señal en T1 con diferentes ángulos de inclinación (*flip angle* °).

### *MECSE, Multiecho Chemical Shift Encoded*

En las imágenes obtenidas con la secuencia MECSE se aplicó un modelo para ajustar las curvas de intensidades a la complejidad espectral de la grasa considerando los seis picos de frecuencia relacionados con el desplazamiento químico de todos los componentes de la grasa (Figura 7). El objetivo de este ajuste múltiplo es separar de manera precisa la cantidad de agua y grasa que contiene cada vóxel sin incertidumbres de componente principal. Se utilizó un ángulo de inclinación del 10° para minimizar el sesgo T1 ya que la intensidad de señal inicial del agua y la grasa es diferente. Para evitar la posible influencia de la presencia de hierro en el vóxel se corrigió el efecto T2\* tanto para el agua como para la grasa. Aplicando la Fórmula 7 y 8 se calcularon los parámetros de FGDP (expresado en %) y la cantidad del hierro hepático (considerada como R2w\*, s<sup>-1</sup>) [212].

Fórmula 7:

$$FGDP = \frac{Pf}{Pf + Pw}$$

$Pw$ : señal del agua

$Pf$ : señal de la grasa

$FGDP$ : fracción grasa por densidad protónica (0-100%)

Fórmula 8:

$$S_n(\rho_W, \rho_F, \phi_0, f_B, R_{2W}^*, R_{2F}^*) = \left( \rho_W e^{-R_{2W}^* TE_n} + \rho_F \sum_{p=1}^P \alpha_p e^{i2\pi f_{F,p} TE_n} e^{-R_{2F}^* TE_n} \right) e^{i(\phi_0 + 2\pi f_B TE_n)}$$

$Pw$ : señal del agua

$TE_n$ : tiempo de eco (0.9, 1.5, 2.2, 2.9, 3.5, 4.2, 4.9, 5.5, 6.0, 6.2, 6.8, 7.5, 8.2)

$Pf$ : señal de la grasa

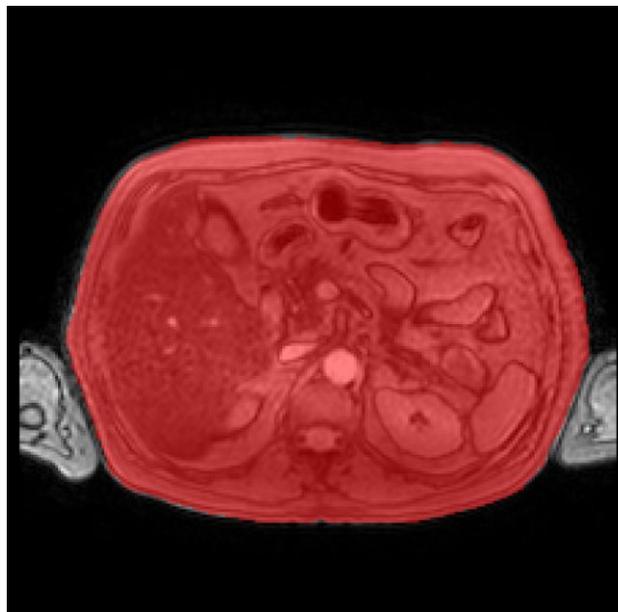
$\alpha_p$ : ajuste del modelo al peso ponderado de las frecuencias seleccionadas.

$f_{F,p}$ : frecuencia de los diferentes picos de resonancia de la grasa (5.48, 4.20, 2.75, 2.26, 1.43 y 0.90 ppm, pico 1 al 6 respectivamente)

$\phi_0$ : fase de orden cero (rad)

$f_B$ : fase de primer orden (rad s<sup>-1</sup>)

Tras el cálculo de  $R2^*$ , se empleó la fórmula de conversión de Henninger para obtener el valor de concentración de hierro hepático (CHH) en  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  ( $R2^*/2,31 + 4,8$ ) [106]. Se consideró sobrecarga de hierro cuando la  $\text{CHH} > 36 \mu\text{mol}/\text{gr}$  [122]. Las imágenes de esta secuencia MECSE se emplearon también para calcular el perímetro abdominal de los pacientes (Figura 21). Se empleó un modelo basado en Inteligencia Artificial con redes neuronales convolucionales (CNN) de Aprendizaje Supervisado para la segmentación automática de todo el abdomen. Una vez segmentado el estudio, de los últimos cuatro cortes de la imagen, representando la parte más próxima al ombligo del paciente, se calculó el contorno de la máscara como la mejor estimación del perímetro abdominal (cm) del paciente.



**Figura 21:** Segmentación automática de todo el abdomen. A diferencia de la ROI del hígado, la región de interés es la circunferencia abdominal completa (color rojo) para calcular el perímetro abdominal.

### *STIR, Short Time Inversion Recovery*

Para las imágenes adquiridas con la secuencia STIR se calculó la relación entre la intensidad de la señal del hígado con respecto a la de la grasa (H/G, %) como estimación de la cantidad relativa de agua y, por lo tanto, del edema y actividad

necroinflamatoria en el parénquima hepático. Para ello se utilizó la Fórmula 9 [125].

Fórmula 9:

$$Ratio_{STIR} = \frac{S_H}{S_G}$$

SH: intensidad de señal en el hígado

SG: intensidad de señal en la grasa

### **3.8. Estadística**

Las variables continuas se expresaron como la media  $\pm$  DS, o mediana y rango intercuartílico (RIQ), mientras que las variables categóricas lo hicieron como frecuencia absoluta y su porcentaje (%). La normalidad de las variables se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y los gráficos Q-Q (cuantil-cuantil). Un primer análisis univariante evaluó el grado de asociación entre las variables continuas de la patología digital, biomarcadores de primera línea y de la imagen de RM con las variables categóricas de los grados histológicos mediante las pruebas ANOVA post-hoc de Bonferroni o la no paramétrica de Kruskal-Wallis post-hoc de Tukey, según se requiriera, además del coeficiente de correlación de Pearson (r). Los resultados del análisis ANOVA se expresaron con el valor del estadístico F (variación entre las medias de las muestras / variación dentro de las muestras). La fuerza de la correlación de Pearson se interpretó de acuerdo con la siguiente escala: 0-0,19 = muy débil; 0,2-0,39 = débil; 0,40-0,59 = moderada; 0,60-0,79 = fuerte; y 0,80-1,0 = muy fuerte [213].

Las diferencias entre las distribuciones pareadas del parámetro APG (%) obtenidas con las técnicas de IHQ adipofilina y la tinción con H&E se evaluaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para datos pareados. Para evaluar la repetibilidad del análisis de la patología digital se calcularon el

Coefficiente de Variación (CoV) y el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) con un IC95%. Unas medidas obtenidas del CoV <15% y de la CCI >0,85 en una prueba-reprueba se consideraron como aceptables para validar la técnica analizada [21]. La reproducibilidad de la imagen RM ya ha sido evaluada por nuestro grupo de investigación, obteniendo un CCI >0,86 [140].

Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) y PR (*Precision-Recall*) evaluaron el rendimiento diagnóstico de las mediciones obtenidas de la patología digital y de la imagen de RM frente a poblaciones dicotomizadas de los distintos sustratos histológicos (ver sección Anatomía Patológica). Se obtuvo el valor del área bajo la curva (AUC) con un intervalo de confianza del 95% (IC95%) y se determinaron los puntos de corte óptimos para discriminar las diferentes poblaciones mediante el índice de Youden para así maximizar la sensibilidad y especificidad de las observaciones [214]. Para cada punto de corte se calcularon la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), exactitud, y la precisión y recuperación (*precision and recall*).

Las medidas de precisión derivadas de las curvas ROC son métodos tradicionales y bien explorados en la literatura científica para describir la exactitud de una prueba diagnóstica cuando tenemos un patrón de referencia dicotómico. Para las pruebas cuyos patrones de referencia no son binarios y cuando forzar su dicotomización puede conducir a sesgos e inconsistencias en las estimaciones, la medida de Obuchowski ha demostrado ser un método eficiente para evaluar la precisión diagnóstica en los casos que la variable respuesta es de tipo ordinal [215-217]. La medida de Obuchowski permite eliminar el sesgo relacionado con la distribución de la variable ordinal, evaluar clasificaciones multiclase y corregir la inflación del error tipo I o falso positivo. El esquema de ponderación y la matriz de penalización incluidos en su fórmula matemática permite ajustar la importancia del error entre clases (Figura 22). Su estimación global refleja de manera más realista las condiciones de la práctica clínica diaria con las que se enfrentan los médicos en la toma de decisiones. El ejemplo de la clasificación de fibrosis (FO-4) con este método refleja que el fallo en la estimación diagnóstica entre clases cercanas como FO (realidad histológica) y F1 (prueba diagnóstica), no puede ser penalizado de la misma manera que entre clases lejanas como FO (realidad histológica) y F4 (prueba diagnóstica). Así pues, la distancia del error

entre clases marca la penalización otorgada por el modelo (desde 0,25 hasta 1 punto).

Se realizó un análisis multivariante para construir los modelos de predicción con valores multiparamétricos obtenidos con la RM tomando la información histológica como variable respuesta. Para las variables histológicas dicotómicas y categóricas (sistemas de puntuación anatomopatológicos tradicionales) se han utilizado los métodos estadísticos de regresión logística, *Random Forest*, *Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis* (PLS-DA). Para las variables histológicas cuantitativas (patología digital) se han utilizado los modelos estadísticos de regresión PLS y *k-nearest neighbors* (KNN, k-vecino más cercano).

La técnica de regresión logística binomial se ha utilizado para variables dicotómicas (por ejemplo, fibrosis significativa) y la regresión logística ordinal para las variables categóricas (por ejemplo, fibrosis score) [218]. Para la selección de parámetros se empleó un método paso a paso aplicado utilizando el criterio de información de Akaike y la importancia relativa de cada parámetro se evaluó mediante la prueba paramétrica de Wald. Random Forest es una técnica basada en árboles de decisión (*Classification and Regression Trees*) que permite reducir la varianza de las predicciones combinando los resultados de varios clasificadores o sets de datos, cada uno de ellos modelados con diferentes subconjuntos o particiones de variables tomados al azar (*random*) de la misma población diana. Cada árbol da una predicción (vota por una clase) y el resultado es la clase con mayor número de votos en todo el bosque (*forest*) [219]. La regresión PLS construye modelos de regresión maximizando la covarianza entre las variables explicativas y las respuestas. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado este método en su versión discriminante (PLS-DA) que utiliza como variable respuesta una variable dicotómica [220]. La regresión KNN se basa en el método de clasificación supervisada no paramétrico *K-Nearest Neighbor* [221]. El método opera tomando como base una medida de distancia entre puntos, siendo la distancia euclídea la que se ha empleado en nuestro análisis. Cuando se introduce una observación que queremos predecir, se calculan las distancias del punto que queremos clasificar respecto a todos los puntos de las variables analizadas y se seleccionan los puntos más próximos. Se calcula la proporción de los *k*-puntos

que pertenece a cada una de las poblaciones y se clasifica la observación en la población con mayor frecuencia de puntos en los  $k$ -vecinos más cercanos. El error cuadrático medio (RMSE) mide la cantidad de error que hay entre dos conjuntos de datos al comparar un valor predicho y un valor observado o conocido.

El tamaño muestral mínimo que debía recoger y analizar esta Tesis Doctoral se calculó para el objetivo principal de evaluar el rendimiento diagnóstico de las métricas obtenidas a partir de la imagen RM como estimación de los distintos sustratos patológicos en las hepatopatías crónicas difusas. Se asumió una tasa de pérdida del 10%, un nivel de confianza del 95%, una potencia del 80%, una precisión de la estimación del 5% y una proporción esperada de lesiones histológicas significativas en torno al 40% (Anexo 1, Tablas 2-5), obteniendo un tamaño muestral final mínimo de 150 pacientes.

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de software SPSS (versión 24; SPSS, IBM, Chicago, Ill) y de computación estadística R 3.5.3 (R Core Team, 2020). Para todas las pruebas, se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  de dos colas  $\leq 0,05$ .

		Realidad: Anatomía Patológica				
		F0	F1	F2	F3	F4
Estimación: Imagen RM	F0	0	0,25	0,5	0,75	1
	F1	0,25	0	0,25	0,5	0,75
	F2	0,5	0,25	0	0,25	0,5
	F3	0,75	0,5	0,25	0	0,25
	F4	1	0,75	0,5	0,25	0

$$\hat{\theta}'' = 1.0 - \sum_{(t=1)}^T \sum_{(s>t)}^T w_{ts} \cdot L(t,s) \cdot (1 - \hat{\theta}_{ts})$$

**Figura 22:** Aplicación del modelo estadístico Obuchowski en la clasificación de fibrosis. Fórmula matemática de penalización ente clases (Fórmula 10).



# **RESULTADOS**



# RESULTADOS

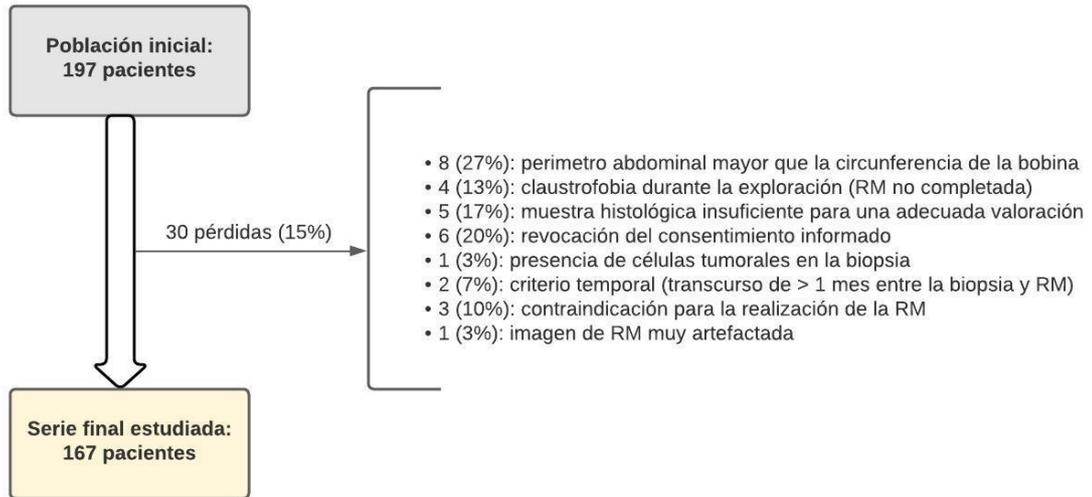
## 4.1. Características de la población

Se incluyeron 197 pacientes con enfermedad hepática crónica sometidos a biopsia hepática. De esta muestra inicial se excluyeron 30 sujetos por diferentes motivos (Figura 23). Destaca que la principal causa de exclusión de pacientes fue el excesivo perímetro abdominal que superaba las dimensiones de la circunferencia de la bobina de superficie de RM. Esto se debe a que la etiología principal de la hepatopatía crónica estudiada en esta Tesis Doctoral es la EHGNA (n=102, 61%) (Figura 24). En nuestra población se observó una alta prevalencia de obesidad (IMC medio =  $28,4 \pm 5,1$  kg/m<sup>2</sup>) y síndrome metabólico (n=64; 38%). En esta línea, también es de interés describir que la población incluida presentaba un riesgo cardiovascular intermedio (mediana = 6,2, [1,7-15,5]) definido según los criterios de la escala ASCVD. Las características basales clínicas y analíticas de la muestra final, constituida por 167 sujetos, están resumidas en la Tabla 3. El Hospital Clínico Universitario fue el que más pacientes incluyó con 135 casos (69%), seguido del Hospital Universitario y Politécnico La Fe con 50 casos (25%) y el Hospital Arnau de Vilanova con 12 casos (6%).

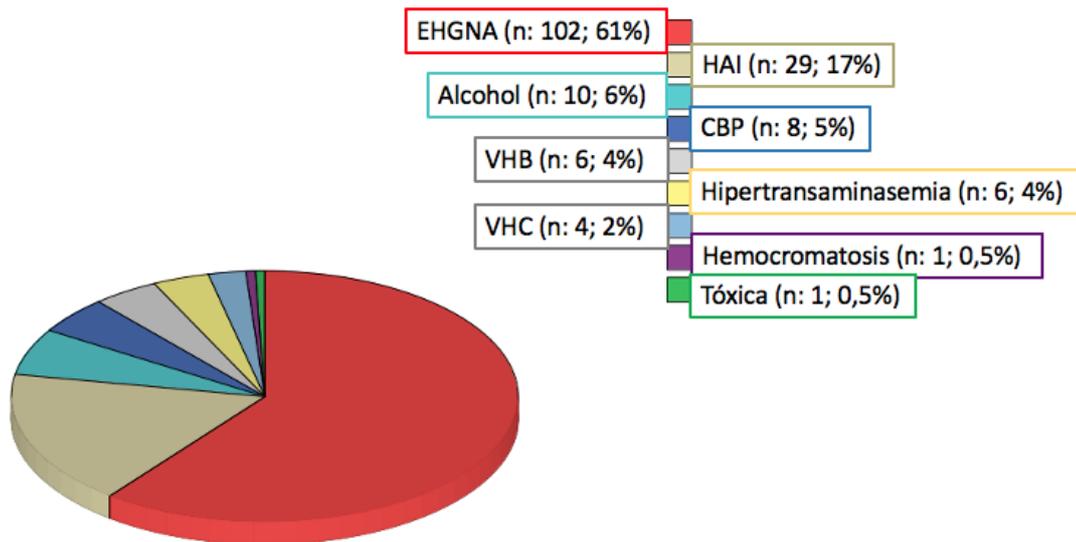
En el momento de la biopsia hepática, el 96% de los pacientes tenían una función hepática conservada con una puntuación Child-Pugh =  $5 \pm 0,4$  y MELD =  $7 \pm 1,5$  de (media  $\pm$  DS). Solamente 6 pacientes habían presentado descompensación hepática previa (tres ascitis, dos hemorragias por varices esofágicas y una encefalopatía hepática). La mediana del tiempo transcurrido entre la RM y la biopsia hepática fue de 18 días (RIQ: 12-24).

<i><b>Características clínicas</b></i>	<i><b>Casos</b></i>
Género (masculino/femenino)	69 (41%) / 98 (59%)
Edad (años)	55 ± 12
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,4 ± 5,1
Hipertensión arterial	75 (45%)
Presión arterial media (mmHg)	92 ± 14
DM	55 (33%)
Dislipemia	105 (63%)
Síndrome metabólico	64 (38%)
Hipotiroidismo	22 (13%)
Fumador	47 (28%)
Framingham	8 (3 – 11)
ASCVD	6,2 (1,7 – 15,5)
<i><b>Características analíticas</b></i>	<i><b>Casos</b></i>
AST (U/L)	39 (29 – 59)
AST (U/L)	49 (36 – 76)
AST/ALT	0,84 (0,66 – 1,02)
GGT (U/L)	82 (47 – 186)
FA (U/L)	92 (70 – 128)
Colesterol (mg/dL)	192 ± 42
Triglicéridos (mg/dL)	127 ± 74
LDL (mg/dL)	117 ± 34
HDL (mg/dL)	56 ± 17
Creatinina (mg/dL)	0,77 ± 0,19
Bilirrubina (mg/dL)	0,6 (0,45 – 0,82)
Albúmina (g/dL)	4,4 (4,2 – 4,6)
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	234 ± 73
Ferritina (ng/mL)	98 (46,5 – 219,5)
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	6,7 (5,8 – 8,0)
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μL)	3,5 (2,8 – 4,6)
Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	2,3 ± 0,8
Monocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	0,6 (0,5 – 0,7)
Hematíes (10 <sup>9</sup> /L)	4,78 (4,45 – 5,11)
Ancho de Distribución Eritrocitaria (%)	13,2 (12,7 – 13,9)
INR	1 (1 – 1,1)
Tiempo de Protrombina (seg)	12,04 ± 1,25

**Tabla 3:** Características basales de la población estudiada. Los datos se expresan como media ± DS cuando la distribución es normal, mediana (con su RIQ) cuando la distribución es asimétrica, o frecuencia (porcentaje) en caso de variables cuantitativas.



**Figura 23:** Diagrama de flujo del estudio.



**Figura 24:** Diagrama sectorial que muestra la distribución de las distintas etiologías de las hepatopatías crónicas incluidas en el estudio (n=167). Abreviaturas: EHGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; HAI, hepatitis autoinmune; CBP, colangitis biliar primaria; VHB, virus hepatitis B; VHC, virus hepatitis C.

## 4.2. Histología: correlación con patología digital

La mediana del tamaño de las muestras histológicas incluidas en el estudio fue de 20 (17–23) mm, incluyendo de promedio 10 (7–13) espacios porta valorables. Únicamente se excluyó cinco muestras por tejido histológico insuficiente para una adecuada interpretación (Figura 23). Las distribuciones de los distintos componentes histológicos y las métricas del análisis de patología digital se resumen en la Tabla 4.

La revisión histológica mostró que el 44% de casos tenía fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ,  $n=73$ ), el 39% esteatosis significativa ( $S \geq 2$ ,  $n=65$ ) y el 21% presentaban sobrecarga de hierro (Scheuer  $\geq 1$ ,  $n=36$ ). De los pacientes con EHGNA, el 63% mostraron lesiones de balonización hepatocelular ( $n=40$  grado 1,  $n=25$  grado 2), el 57% ( $n=59$ ) se clasificó como esteatohepatitis, y el 73% ( $n=74$ ) presentaba una actividad severa (Actividad SAF  $\geq 2$  y/o fibrosis  $F \geq 2$ ). De los pacientes con hepatopatía crónica inflamatoria ( $n=65$ , 39%), el 24% presentaba una inflamación avanzada ( $n=16$ , Batts Ludwig 3-4).

<b>Puntuación Histológica</b>	<b>Patología Digital</b>
<b>Estadio fibrosis (n, %)</b>	<b>Área proporcional de colágeno (%)</b>
F0 (51, 30%)	5,4±1,9
F1 (43, 26%)	6,3±2,6
F2 (33, 20%)	8,9±1,4
F3 (22, 13%)	10,6±2,2
F4 (18, 11%)	13,2±2,2
<b>Grado esteatosis (n, %)</b>	<b>Área proporcional de grasa (%)</b>
S0 (69, 41%)	3,2±1,7
S1 (33, 20%)	8,7±3,4
S2 (35, 21%)	13,4±4,2
S3 (30, 18%)	20,7±7,3
<b>Grado inflamación lobular (n, %)</b>	<b>Área proporcional de inflamación (%)</b>
I0 (21, 21%)	5,3±2,0
I1 (52, 51%)	6,2±2,5

I2 (29, 28%)	7,6±3,3
Grado inflamación portal (n, %)	Área proporcional de inflamación (%)
I0 (25, 39%)	5,0±1,5
I1 (15, 23%)	5,6±1,8
I2 (9, 14%)	6,8±2,9
I3 (8, 12%)	7,5±2,6
I4 (8, 12%)	10,9±3,5
Grado depósitos de hierro (n, %)	Área proporcional de hierro (%)
Deugnier 0 (100, 60%)	1,4±0,4
Deugnier 1-4 (38, 23%)	1,8±1,0
Deugnier ≥ 5 (29, 17%)	3,2±1,5

**Tabla 4:** Distribución de los grados histológicos de colágeno, grasa, inflamación (lobular y portal) y hierro con respecto a sus correspondientes áreas proporcionales de patología digital expresadas como valores medios  $\pm$  desviación estándar.

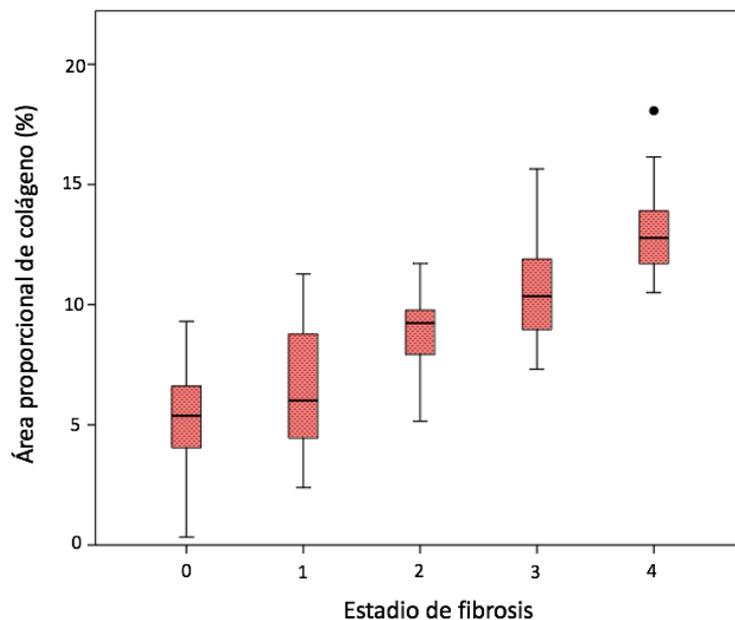
### *Área proporcional de colágeno y fibrosis*

Como refleja la Tabla 4, los valores de área proporcional de colágeno aumentaron significativamente con los estadios de fibrosis ( $P < 0,001$ ). Se observó una correlación muy significativa entre el porcentaje de colágeno y la puntuación de METAVIR ( $r = 0,79$ ;  $P < 0,001$ ), siendo la patología digital capaz de discriminar entre los estadios individuales de fibrosis, a excepción de las puntuaciones más bajas FO vs. F1 (Figura 25).

Para la detección de fibrosis avanzada (F3-4) se obtuvo un AUC de 0,92 (IC95% 0,87–0,97). El mejor punto de corte fue 9,6% con un 79% de sensibilidad y un 85% de especificidad (Tabla 5). En cuanto a la prueba-reprueba de las imágenes digitalizadas, existió una adecuada concordancia: CoV=6,3%; CCI=0,968 (IC95%, 0,955–0,977)

Estadio Fibrosis	Punto de corte (%)	AUC APC	IC95%	Sensibilidad	Especificidad
$F \geq 1$	> 7,0	0,86	0,80–0,92	82	82
$F \geq 2$	> 7,6	0,92	0,88–0,97	89	81
$F \geq 3$	> 9,6	0,92	0,87–0,97	79	85
$F \geq 4$	> 10,8	0,96	0,92–0,99	92	91

**Tabla 5:** Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de colágeno (APC) para los diferentes estadios de fibrosis (F). Los resultados se presentan como el área bajo la curva (AUC) con intervalos de confianza del 95% (IC95%), valores de sensibilidad y de especificidad según el punto de corte óptimo seleccionado (índice de Youden).



**Figura 25:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de colágeno (APC) según el estadio de fibrosis (F).

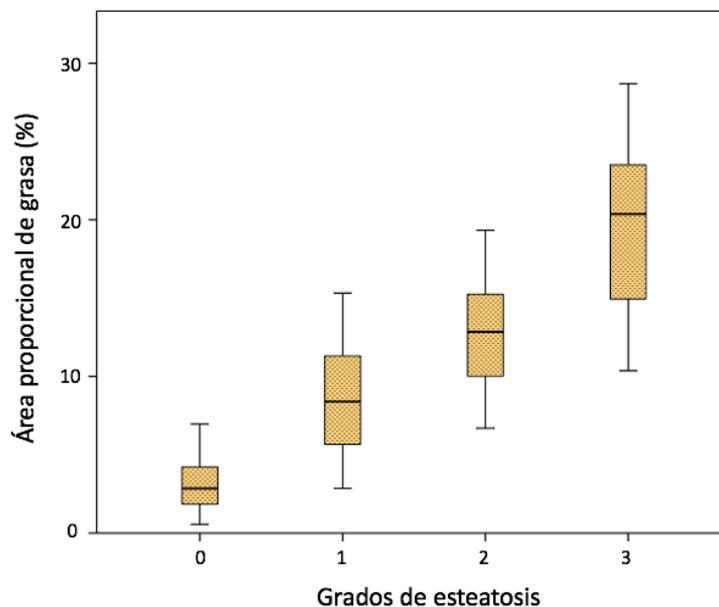
### *Área proporcional de grasa y esteatosis*

Los valores del área proporcional de grasa aumentaron significativamente con los grados de esteatosis ( $P < 0,001$ ). Se observó la existencia de una correlación muy significativa entre el porcentaje de grasa teñida con IHQ adipofilina y la puntuación histológica ( $r = 0,85$ ;  $P < 0,001$ ), siendo la patología digital capaz de discriminar entre todos los grados de esteatosis (Figura 26). Para la detección de esteatosis severa (S3 vs. S0-2) se obtuvo un AUC de 0,95 (IC95% 0,92-0,98). El mejor punto de corte fue 13,9% con un 89% de sensibilidad y un 90% de especificidad (Tabla 6). En la prueba-reprueba se obtuvo una concordancia excelente: CoV=1,1%; CCI=1 (IC95%, 1-1).

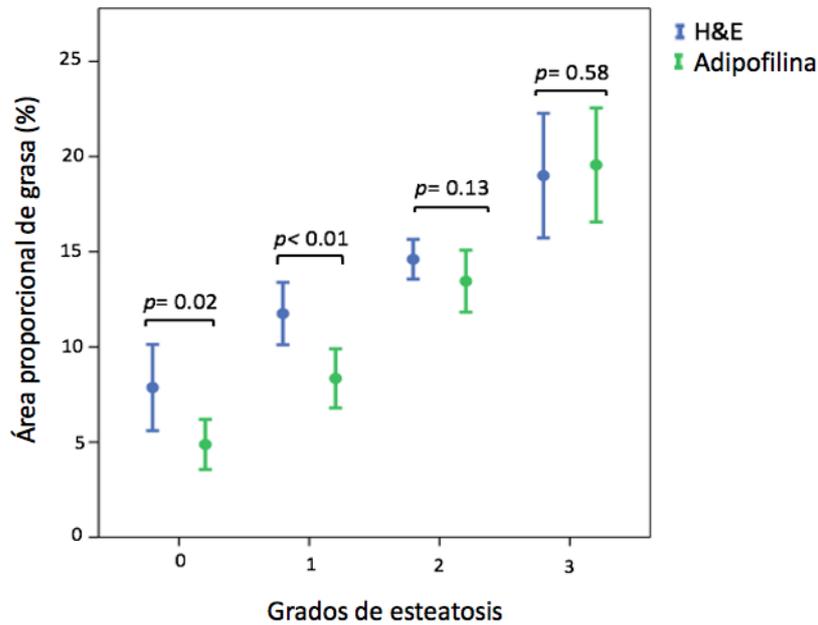
Empleando la tinción H&E para el análisis digital, se obtuvo en cambio una correlación sólo moderada, aunque significativa, con la puntuación histológica de esteatosis ( $r = 0,63$ ;  $P < 0,001$ ). Este tipo de tinción únicamente permitió diferenciar entre S3 y los grados inferiores de esteatosis. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el área proporcional de grasa identificada y cuantificada mediante IHQ adipofilina y H&E (APG media de 13,7 vs. 14,96, respectivamente;  $P = 0,017$ ) (Figura 27). El análisis con H&E obtuvo valores de área proporcional de grasa más elevados para los grados S0 y S1 (aumento de 2,9% y 3,4%, respectivamente).

Grados Esteatosis	Punto de corte (%)	AUC APG	IC95%	Sensibilidad	Especificidad
$S \geq 1$	> 6,5	0,98	0,96–0,99	92	98
$S \geq 2$	> 9,1	0,97	0,94–0,99	93	86
$S \geq 3$	> 13,9	0,95	0,92–0,98	89	90

**Tabla 6:** Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de grasa (APG) para los diferentes grados de esteatosis (S). Los resultados se presentan como el área bajo la curva (AUC) con intervalos de confianza del 95%, valores de sensibilidad y especificidad según el punto de corte óptimo seleccionado (índice de Youden).



**Figura 26:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de grasa teñida con IHQ adipofilina según el grado de esteatosis.



**Figura 27:** Distribución de los valores del área proporcional de grasa (media e IC95%) obtenidos con inmunohistoquímica adipofilina (verde) y tinción hematoxilina-eosina (H&E, azul). Se puede apreciar una mejor correlación entre las mediciones de adipofilina y los grados de esteatosis. Los p-valor muestran el aumento significativo del APG medida con H&E con respecto a la adipofilina para los grados S0 y S1.

### Área proporcional CD45+ e inflamación

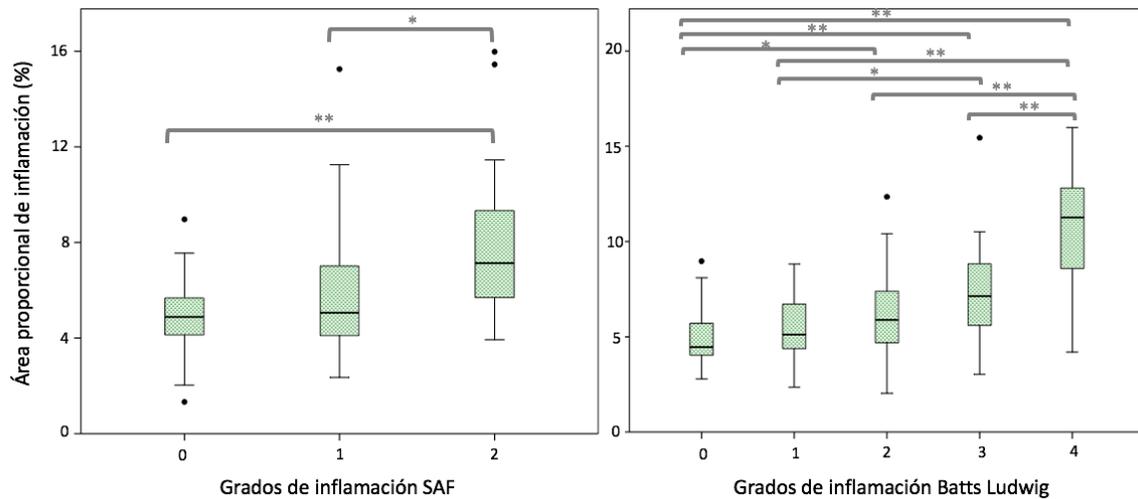
Los valores de área proporcional de inflamación obtenidos con la técnica IHQ del CD45+ aumentaron significativamente con los grados de inflamación ( $P < 0.001$ ). Se observó una correlación significativa entre el porcentaje de células CD45+ y las puntuaciones histológicas SAF ( $r = 0,31$ ;  $P < 0,001$ ) para los casos de EHGNA, y Batts Ludwig ( $r = 0,57$ ;  $P < 0,001$ ) para los casos de hepatopatía crónica inflamatoria (Figura 28). Para la detección de SAF inflamación moderada (I2 vs. I0-1) se obtuvo un AUC de 0,68 (IC95% 0,57–0,79), mientras que para Batts Ludwig inflamación moderada-severa (I3–4 vs. I0–2) se obtuvo un AUC de 0,81 (IC95% 0,72–0,89). El mejor punto de corte fue 5,7% con un 74% de sensibilidad y un 61% de especificidad para la dicotomización SAF y 6,7% con un 75% de sensibilidad y un 73% de especificidad para la dicotomización Batts Ludwig

## Resultados

(Tabla 7). En la prueba-reprueba se obtuvo una concordancia excelente: CoV=0,3%; CCI=1 (IC95%, 1-1).

Grados de Inflamación	Punto de corte (%)	AUC API	IC95%	Sensibilidad	Especificidad
<i>SAF</i> ≥1	> 5,1	0,67	0,58– 0,77	65	62
<i>SAF</i> ≥2	> 5,7	0,68	0,57– 0,79	74	62
<i>Batts</i> ≥1	> 4,8	0,71	0,62– 0,79	75	60
<i>Batts</i> ≥2	> 5,4	0,75	0,67– 0,84	74	66
<i>Batts</i> ≥3	> 6,7	0,81	0,72– 0,89	75	73
<i>Batts</i> ≥4	> 7,6	0,88	0,74– 0,99	90	85

**Tabla 7:** Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de inflamación (API) para los diferentes grados de inflamación lobular (*SAF*) y portal (*Batts Ludwig*). Los resultados se presentan como el área bajo la curva (AUC) con intervalos de confianza del 95% (IC95%), valores de sensibilidad y especificidad según el punto de corte óptimo seleccionado (índice de Youden).



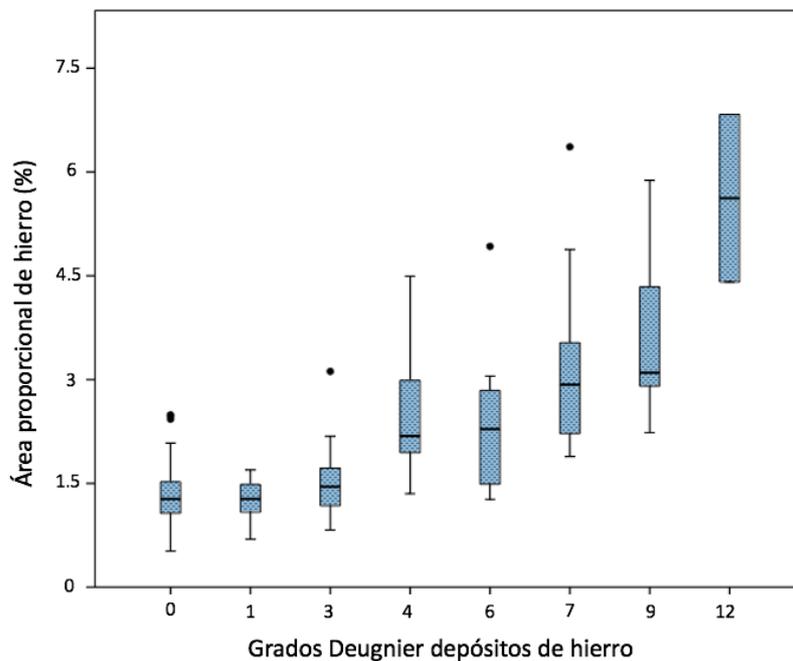
**Figura 28:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de inflamación según el grado de actividad necroinflamatoria. El gráfico de la izquierda representa la población con EHGNA (n=102) y su clasificación histológica SAF (*Steatosis, Activity and Fibrosis*). El gráfico de la derecha representa la población con hepatopatía crónica inflamatoria (n=65) y su clasificación histológica Batts Ludwig. Las líneas horizontales en gris representan las diferencias significativas entre los grados que marcan sus extremos (\*P=0,05; \*\*P<0,001).

### Área proporcional de hierro y depósitos de hierro

Los valores del área proporcional de hierro aumentaron significativamente con los grados de sobrecarga de hierro ( $P<0,001$ ). Como en el resto de las evaluaciones, se observó una correlación muy significativa entre el porcentaje de hierro y la puntuación Deugnier ( $r=0,70$ ;  $P<0,001$ ) (Figura 29). Para discriminar la presencia de depósitos de hierro (Deugnier  $\geq 1$ ) se obtuvo un AUC de 0,76 (IC95% 0,67–0,84). El mejor punto de corte fue 1,5% con un 68% de sensibilidad y un 73% de especificidad (Tabla 8). En la prueba-reprueba se obtuvo una concordancia excelente con un CoV=1,1% y un CCI=0,998 (IC95%, 0,997–0,999).

Grados Hierro	Punto de corte (%)	AUC APFe	IC95%	Sensibilidad	Especificidad
<i>Deugnier</i> $\geq 1$	> 1,5	0,76	0,67–0,84	68	73
<i>Deugnier</i> $\geq 5$	> 2,1	0,89	0,82–0,96	82	89

**Tabla 8:** Precisión diagnóstica de los valores de corte del área proporcional de hierro (APFe) para los diferentes grados de sobrecarga de hierro. Los resultados se presentan como el área bajo la curva con intervalos de confianza del 95%, valores de sensibilidad y especificidad según el punto de corte óptimo seleccionado (índice de Youden).



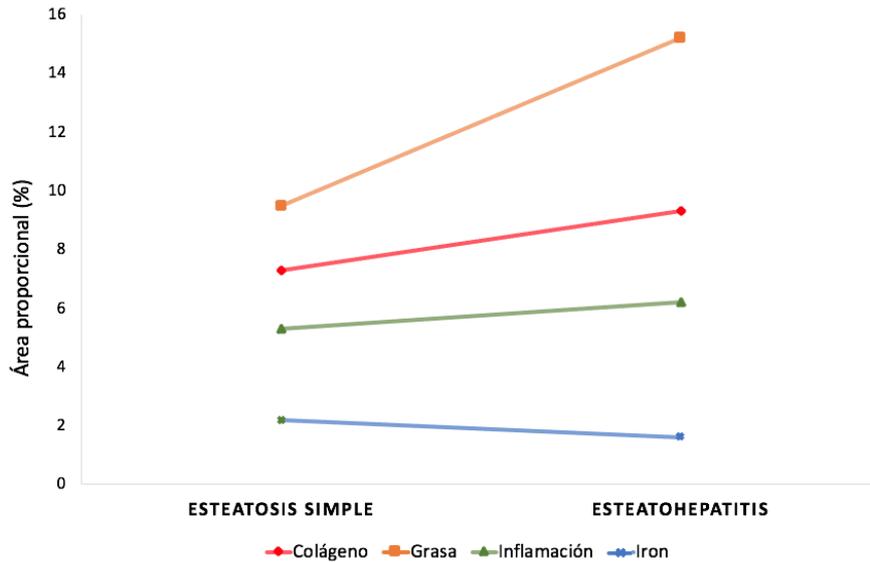
**Figura 29:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del área proporcional de hierro según el grado de sobrecarga de hierro.

### *Correlación entre los distintos sustratos histopatológicos*

Considerando únicamente a la población con EHGNA en esta Tesis Doctoral (n=102), la Figura 30 muestra la distribución de los valores de patología digital entre las categorías de esteatosis simple vs. esteatohepatitis definidos por la clasificación FLIP/SAF. Los pacientes con esteatohepatitis presentaron significativamente una mayor proporción de colágeno (APC) y de grasa (APG) en comparación con los casos de esteatosis simple ( $P < 0,005$ ). Aunque se observó que existía una mayor proporción de células inflamatorias con una menor proporción de depósitos de hierro en los pacientes con esteatohepatitis, no se obtuvieron diferencias significativas en comparación con los casos de esteatosis simple (Tabla 9). El sustrato patológico que mejor se correlacionó con la puntuación NASH-CRN fue el APG ( $r=0,8$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 31).

Con respecto al total de la muestra (n=167), el porcentaje de colágeno se asoció significativamente con mayores proporciones de CD45+ ( $r=0,24$ ;  $P=0,007$ ) y adipofilina ( $r=0,27$ ;  $P=0,001$ ). Se observó una asociación lineal entre el área proporcional de células inflamatorias y los grados de fibrosis ( $5,0 \pm 1,6$ ;  $5,8 \pm 1,8$ ;  $6,6 \pm 2,5$ ;  $7,2 \pm 3,7$ ;  $7,8 \pm 2,5$ ; F0-F1-F2-F3-4 respectivamente;  $P < 0,001$ ), mientras que la asociación entre el área proporcional de grasa y la escala METAVIR ( $4,6 \pm 3,4$ ;  $10,3 \pm 7,8$ ;  $10,9 \pm 7,7$ ;  $12,9 \pm 7,4$ ;  $9,2 \pm 4,1$ ; F0-F1-F2-F3-4 respectivamente;  $P < 0,001$ ) presenta una relación no lineal (Figura 32). El porcentaje de grasa también aumentó significativamente con los grados de balonización hepatocelular ( $5,0 \pm 4,1$ ;  $12,3 \pm 6,5$ ;  $16,4 \pm 5,7$ ; balonización 0–1-2 respectivamente;  $P < 0,001$ ) y los grados de inflamación lobular ( $6,0 \pm 5,5$ ;  $9,3 \pm 6,9$ ;  $11,9 \pm 7,2$ ; I0–I1-I2 escala SAF;  $P=0,002$ ).

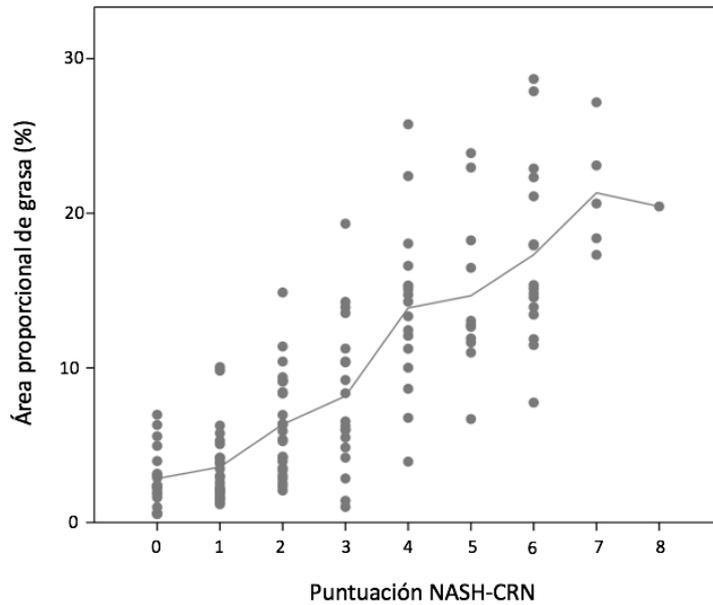
## Resultados



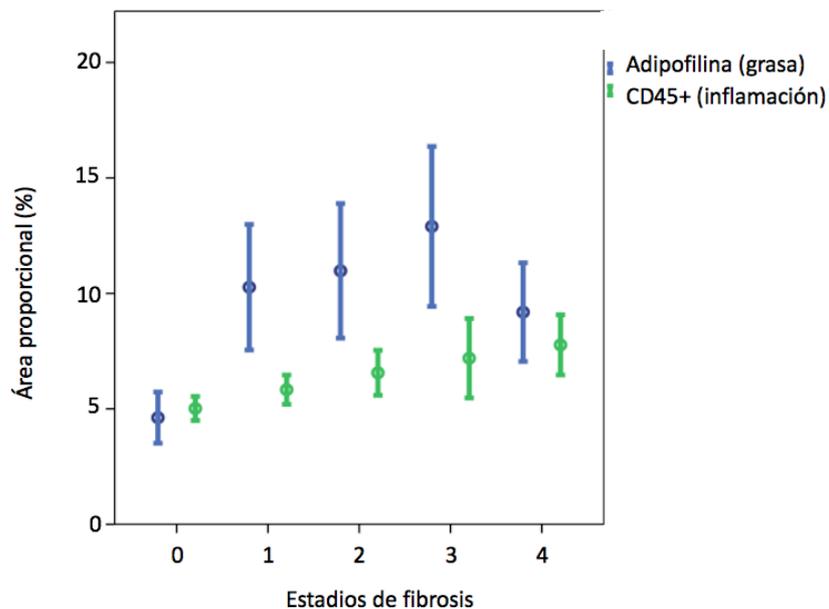
**Figura 30:** Gráfico de líneas múltiples que muestra la distribución del área proporcional de colágeno, grasa, inflamación y hierro entre las categorías de EHGNA.

Patología Digital	Esteatosis simple	Esteatohepatitis	P-valor
Área proporcional de colágeno	7,2±3,4 %	9,2±3,0 %	0,004
Área proporcional de grasa	9,5±5,2 %	15,2±8,1 %	0,001
Área proporcional de inflamación	5,3±1,9 %	6,2±3,0 %	0,104
Área proporcional de hierro	2,2±1,6 %	1,2±0,9 %	0,060

**Tabla 9:** Distribución de los valores obtenidos con Patología Digital entre las categorías de esteatosis simple (n=43) y esteatohepatitis (n=59) definidas mediante el algoritmo FLIP/SAF (*Fatty Liver Inhibition of Progression / Steatosis, Activity and Fibrosis*). Los datos se expresan como media ± desviación estándar.



**Figura 31:** Gráfico de dispersión lineal del área proporcional de grasa frente a la clasificación histológica NASH-CRN (*Non-alcoholic Steatohepatitis-Clinical Research Network*). La línea de interpolación muestra un aumento proporcional de la ratio de esteatosis, más marcado a partir de los 4 puntos de NASH-CRN.



**Figura 32:** Distribución de los valores del área proporcional de grasa e inflamación (media con su IC95%) respecto a los estadios de fibrosis. Se puede apreciar una correlación lineal con CD45+ pero no lineal con la adipofilina.

### 4.3. Biomarcadores no invasivos de primera línea

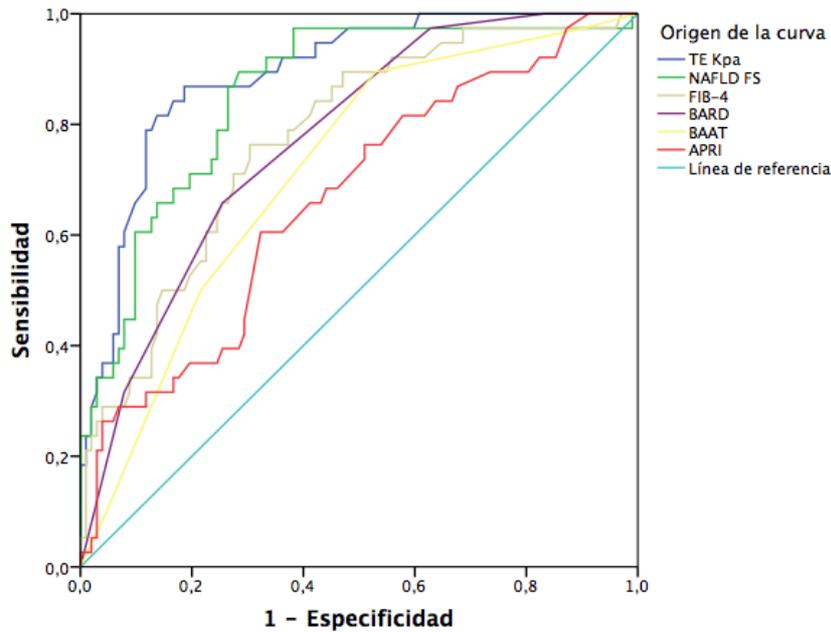
Se analizó la precisión diagnóstica de los biomarcadores séricos y elastográficos para la estimación de la fibrosis, esteatosis, inflamación y depósitos de hierro. La elastografía por onda de cizallamiento con ecografía se realizó solamente en 40 sujetos (n=11 pSWE y n=29 2D-SWE) por lo que no se incluyó en el análisis de esta Tesis Doctoral. La elastografía de transición (FibroScan) se realizó en 157 sujetos (65% con sonda M), de los cuales 2 casos se excluyeron por presentar un intervalo RIQ/mediana >30%. En cuanto a la validez de la prueba, la media del intervalo RIQ/mediana de las mediciones obtenidas fue de  $12,1 \pm 7,6$ . La mediana de elasticidad fue 8,6 (5,4-11,8) kPa y de CAP fue 272 (218-322) dB/m.

#### *Fibrosis*

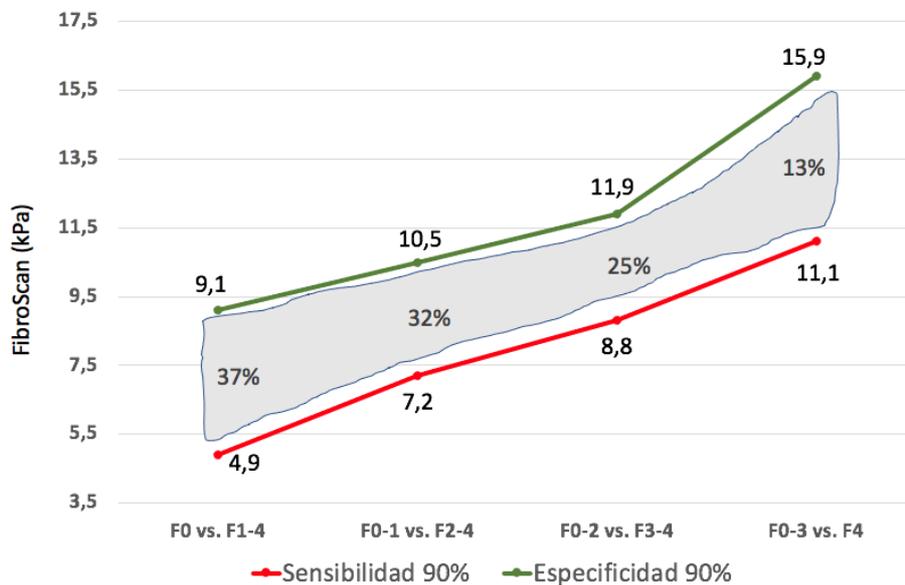
Todos los biomarcadores no invasivos menos APRI presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grados de fibrosis (Tabla 10). El análisis de curva ROC para diferenciar la fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ) y avanzada ( $F \geq 3$ ) mostró que el FibroScan (kPa) y el NAFLD *fibrosis score* obtuvieron las AUC más fiables (Figura 33). Aplicando distintos puntos de corte con el FibroScan para la estadificación de fibrosis en función de si priorizamos la sensibilidad o la especificidad de la prueba, se observa que existe una zona gris que impide estadificar al 25–32% de los pacientes con fibrosis avanzada-significativa (Figura 34). Los valores de rigidez hepática se correlacionaron significativamente con los valores de área proporcional de colágeno ( $r=0,48$ ;  $P < 0,001$ ).

<b>Biomarcador</b>	<b>Estadístico F</b>	<b>P-valor</b>	<b>AUC (IC95%) F2-4</b>	<b>AUC (IC95%) F3-4</b>
<i>APRI</i>	1,51	0,203	0,66 (0,57–0,75)	0,67 (0,57–0,77)
<i>BAAT</i>	8,73	<0,001	0,72 (0,63–0,80)	0,72 (0,63–0,81)
<i>BARD</i>	9,42	<0,001	0,71 (0,63–0,80)	0,77 (0,69–0,86)
<i>FIB-4</i>	6,07	<0,001	0,73 (0,64–0,81)	0,78 (0,69–0,86)
<i>NAFLD FS</i>	18,24	<0,001	0,79 (0,70–0,86)	0,85 (0,78–0,92)
<i>FibroScan (kPa)</i>	19,75	<0,001	0,84 (0,77–0,90)	0,89 (0,94–0,95)

**Tabla 10:** Precisión diagnóstica de los diferentes biomarcadores de fibrosis hepática.



**Figura 33:** Análisis curva ROC de los biomarcadores no invasivos empleados para diagnosticar fibrosis. Se muestran las áreas debajo de la curva (AUC) para identificar los casos con fibrosis avanzada (F3-4).



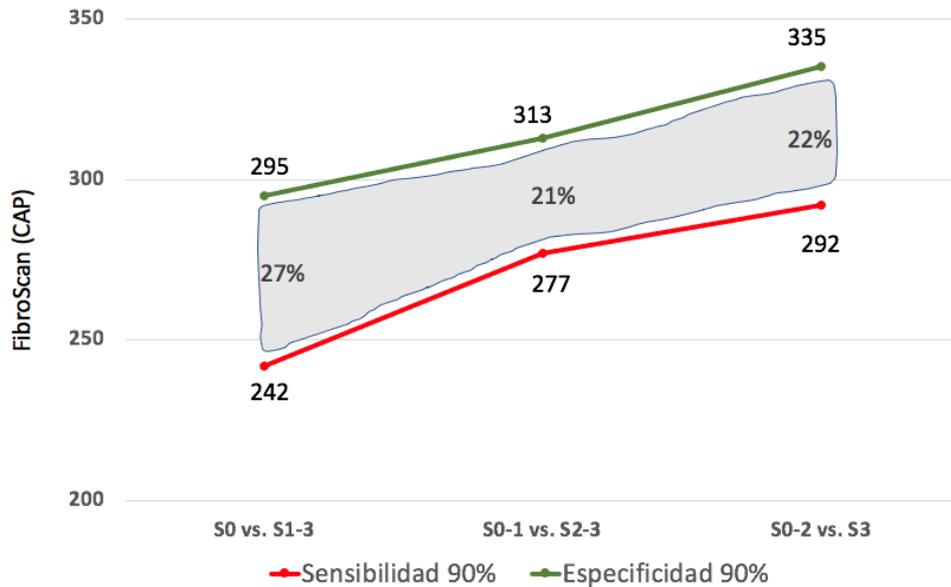
**Figura 34:** Distribución de los puntos de corte del FibroScan para el diagnóstico de fibrosis. La línea inferior roja corresponde al valor umbral para una sensibilidad del 90% y la línea superior verde para una especificidad del 90%. Entre ellas se define una zona gris en la cual se especifica el porcentaje de pacientes que caen en ella y no pueden ser correctamente clasificados por cada estadio.

## Esteatosis

En cuanto a la esteatosis, el FibroScan (CAP, dB/m) y el *Hepatic Steatosis Score* (HSI) mostraron una elevada precisión, principalmente para diagnosticar los pacientes con esteatosis severa (Tabla 11). Aplicando distintos puntos de corte con el FibroScan para la estadificación de la esteatosis en función de si priorizamos la sensibilidad o la especificidad de la prueba, se visualiza una zona gris que no nos permite estadificar al 21–22% de los pacientes con esteatosis moderada-severa (Figura 35). Los parámetros de atenuación controlada (CAP) se correlacionaron significativamente con los valores de área proporcional de grasa ( $r=0,68$ ;  $P<0,001$ ).

Biomarcador	Estadístico F	P-valor	AUC (IC95%) S2-3	AUC (IC95%) S3
<i>HSI</i>	14,35	<0,001	0,74 (0,64–0,85)	0,79 (0,69–0,89)
<i>Índice TyG</i>	4,23	0,008	0,63 (0,49–0,76)	0,56 (0,36–0,76)
<i>FibroScan</i> (CAP, dB/m)	27,29	<0,001	0,85 (0,77–0,93)	0,91 (0,84–0,98)
<i>FGDP (RM)</i>	121,74	<0,001	0,96 (0,94–0,99)	0,95 (0,92–0,99)

**Tabla 11:** Precisión diagnóstica de los diferentes biomarcadores de esteatosis hepática. Abreviatura: HSI, *Hepatic Steatosis Index*; FGDP, fracción grasa por densidad protónica.



**Figura 35:** Distribución de los puntos de corte del FibroScan (CAP, dB/m) para el diagnóstico de esteatosis. La línea inferior roja corresponde al valor umbral para una sensibilidad del 90% y la línea superior verde para una especificidad del 90%. En medio, queda una zona gris en la cual se especifica por cada clasificación el porcentaje de pacientes que caen en ella y no pueden ser correctamente clasificados.

### Inflamación

Los valores de ALT, AST y GGT aumentaron con los grados de inflamación lobular y portal, únicamente pudiendo discernir con ALT y AST entre inflamación severa y el resto de los grados individuales de inflamación (Tabla 12). Existió una correlación leve entre los valores de ALT y AST con el área proporcional de inflamación CD45+ ( $r=0,42$  y  $r=0,38$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente). El AUC para diagnosticar inflamación severa con estos parámetros fue poco precisa: SAF  $\geq 2$  0,65 (0,54-0,76) y 0,62 (0,51-0,73); Batts Ludwig  $\geq 4$  0,76 (0,60-0,91) y 0,73 (0,56-0,90); AST y ALT respectivamente.

Escala	Biomarcador	Estadístico F	P-valor	Media ± DS
Inflamación portal (Batts Ludwig 0-4)	AST (U/L)	9,82	<0,001	I0: 49,4 ± 36,6
				I1: 37,8 ± 23,5
				I2: 54,7 ± 32,5
				I3: 64,8 ± 44,6
				I4: 157,0 ± 177,2*
	ALT (U/L)	8,06	<0,001	I0: 65,1 ± 52,0
				I1: 48,3 ± 40,6
				I2: 56,9 ± 25,6
				I3: 77,3 ± 62,4
				I4: 217,0 ± 296,5*
	GGT (U/L)	1,91	0,103	I0: 140,8 ± 151,2
				I1: 108,2 ± 210,9
				I2: 202,4 ± 209,0
				I3: 213,9 ± 305,6
				I4: 261,3 ± 201,8
Inflamación lobular (SAF 0-2)	AST (U/L)	7,13	0,001	I0: 47,7 ± 30,8
				I1: 47,0 ± 33,9
				I2: 91,8 ± 111,6*
	ALT (U/L)	4,58	0,012	I0: 67,2 ± 47,1
				I1: 55,3 ± 45,2
				I2: 114,3 ± 180,8*
	GGT (U/L)	2,28	0,106	I0: 157,4 ± 147,3
				I1: 137,6 ± 201,3
				I2: 229,1 ± 212,5

**Tabla 12:** Distribución de los valores de transaminasas según el grado de inflamación (I). Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Abreviaturas: AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma-glutamyl transferasa; DS, desviación estándar; SAF, *Steatosis, Activity and Fibrosis*; \*p<0,05

*Esteatohepatitis*

En los sujetos con EHGNA (n=102), el análisis univariante de los biomarcadores no invasivos asociados a la condición de esteatohepatitis se muestra en la Tabla 13. Destaca como el número de factores de riesgo metabólico (DM, hipertensión arterial, dislipemia y fumador) y la puntuación en la escala de riesgo cardiovascular son mayores en los sujetos con esteatohepatitis. En cuanto al FibroScan, los sujetos con esteatohepatitis presentaron valores más elevados de CAP ( $P=0,002$ ), pero no de rigidez hepática (11,7 kPa en esteatosis simple vs. 12,1 kPa en esteatohepatitis;  $P=0,85$ ).

<b>Biomarcador</b>	<b>Esteatosis simple</b>	<b>Esteatohepatitis</b>	<b>P-valor</b>
<i>Número de factores de riesgo metabólico</i>	1,7 ± 1,1	2,4 ± 1,0	0,005
<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	27,9 ± 4,7	31,9 ± 4,7	<0,001
<i>Edad</i>	52 ± 12	60 ± 9	<0,001
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	106,4 ± 20,2	135,4 ± 42,2	<0,001
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	117,1 ± 63,3	161,8 ± 87,5	0,003
<i>ASCVD (%)</i>	8,7 ± 9,2	17,8 ± 15,5	0,001
<i>FibroScan (CAP, dB/m)</i>	274 dB/m	311 dB/m	0,002
<i>Sonda FibroScan (XL, %)</i>	30,4 %	69,6 %	0,001

**Tabla 13:** Distribución de distintos parámetros clínico-analíticos entre las categorías de esteatosis simple (n=43) y esteatohepatitis (n=59). Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Abreviaturas: IMC, índice de masa muscular; ASCVD, *Atherosclerotic Cardiovascular Disease risk*.

## Hierro

El 24% de los hombres y el 16% de las mujeres presentaron hiperferritinemia. Los valores de ferritina aumentaron significativamente con los grados sobrecarga de hierro ( $101,9 \pm 83,9$  [n=100];  $374,1 \pm 190,6$  [n=9];  $234,1 \pm 73,8$  [n=7];  $589,7 \pm 759,2$  [n=10] y  $229,0 \pm 82,7$  [n=3]; Scheuer Fe<sub>0</sub>-Fe<sub>1</sub>-Fe<sub>2</sub>-Fe<sub>3</sub>-Fe<sub>4</sub> respectivamente;  $P < 0,001$ ). Existió una correlación adecuada entre los valores de ferritina con el área proporcional de hierro ( $r=0,37$ ;  $P < 0,001$ ).

### 4.4. Imagen RM: precisión diagnóstica multiparamétrica

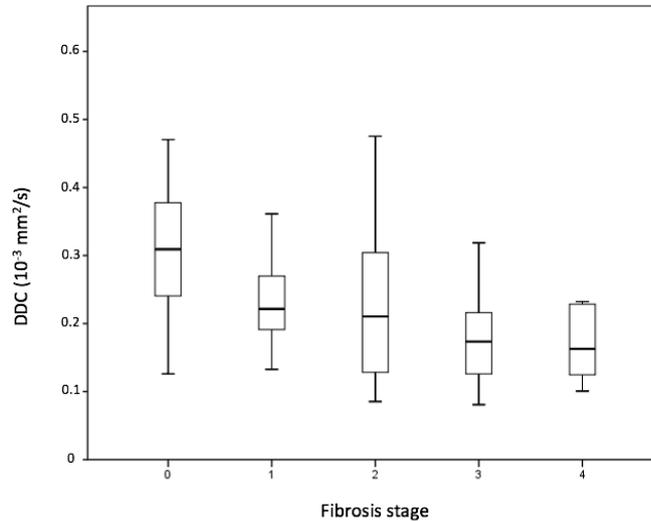
#### Fibrosis

La tabla 14 resume la correlación de los distintos parámetros de RM con los estadios de fibrosis y el área proporcional de colágeno. El parámetro con mayor precisión diagnóstica fue el Coeficiente de Difusión Aparente (Dapp) de la secuencia Difusión, modelo Kurtosis. Este parámetro permitió discriminar a los sujetos con fibrosis avanzada ( $F \geq 3$ ) con un AUC de 0,83 (IC<sub>95%</sub> 0,75-0,90). A pesar de que la magnitud de las diferencias significativas era considerable (valor F: 9,3), se observó un solapamiento de los datos entre los estadios de fibrosis (Figura 36). Por ello, se realizaron análisis multivariantes combinando distintos parámetros radiómicos y los biomarcadores de primera línea NAFLD FS y FibroScan (Tabla 15). Para los estadios de fibrosis, se obtuvo un índice de Obuchowski de 0,93 con una especificidad del 94% y un valor predictivo positivo (VPP) del 90% para fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ) y una especificidad del 97% y un VPP de 84% para fibrosis avanzada (Tabla 16). Los modelos multivariantes permitieron diagnosticar fibrosis significativa (AUC:0,82) y avanzada (AUC:0,86) a expensas de una elevada especificidad (>90%). Para el área proporcional de colágeno (APC), las variables de RM permitieron identificar a los sujetos con  $APC > 7,6\%$  (compatible con fibrosis significativa) con una especificidad del 88% y un VPP del 90% y a los pacientes con  $APC > 9,6\%$  (fibrosis avanzada) con una especificidad y un VPP del 100% (Figura 37).

RM	Estadio Fibrosis		Fibrosis significativa	Fibrosis avanzada	APC
	<i>F</i>	<i>rho</i>	<i>AUC</i>	<i>AUC</i>	<i>rho</i>
<i>ADC 2b</i> (mm <sup>2</sup> /s)	3,690* (p75)	-0,315** (p75)	0,69** (p75)	0,67* (p75)	-0,233* (p75)
<i>ADC 6b</i> (mm <sup>2</sup> /s)	7,437** (media)	-0,427** (p75)	0,70** (mediana)	0,77** (media)	-0,288* (mediana)
<i>D</i> (mm <sup>2</sup> /s)	1,946 (DS)	-0,247* (DS)	0,61* (DS)	0,67* (DS)	0,177* (DS)
<i>D*</i> (mm <sup>2</sup> /s)	4,132* (media)	-0,252* (p25)	0,60* (p25)	0,69* (mediana)	-0,086 (media)
<i>f</i> (%)	5,080* (p25)	-0,302** (p25)	0,65* (DS)	0,73** (p25)	0,237* (DS)
<i>Dapp</i> (mm <sup>2</sup> /s)	9,290** (media)	-0,456** (p75)	0,69** (mediana)	0,82** (p75)	-0,321** (p25)
<i>Kapp</i> (a.u.)	4,089* (p25)	0,367** (p25)	0,69** (p25)	0,70** (p25)	0,196* (p25)
<i>DDC</i> (mm <sup>2</sup> /s)	8,450** (p75)	-0,428** (p75)	0,68** (p75)	0,79** (p75)	-0,222* (media)
<i>α</i> (a.u.)	8,328** (p25)	0,419** (media)	0,69** (media)	0,77** (p25)	0,259* (media)
<i>μ</i> (kPa)	1,645 (p75)	-0,183* (DS)	0,56 (DS)	0,62* (DS)	-0,054 (media)
<i>T1c</i> (ms)	4,035* (media na)	0,169* (p75)	0,59 (p75)	0,64* (p75)	0,123 (p75)
<i>H/G</i> (%)	1,270 (p25)	0,137 (p25)	0,55 (mediana)	0,61 (DS)	0,392** (p25)
<i>Perímetro abdominal</i> (cm)	2,473* (media)	0,316** (media)	0,69** (media)	0,68* (media)	0,160 (media)

**Tabla 14:** Análisis univariante de correlación entre la fibrosis hepática y los distintos parámetros de RM. Se muestra el valor estadístico *F* (test ANOVA) y *rho* (correlación de Spearman) para la escala METAVIR y el área proporcional de colágeno (APC), así como el área debajo de la curva (AUC) para discriminar los estadios de fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ) y avanzada ( $F \geq 3$ ). En cada casilla, la

métrica con la mejor correlación se especifica entre paréntesis (media, desviación estándar (DS), mediana, p25, p75). En amarillo se resaltan los parámetros radiómicos con mayor precisión diagnóstica. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ .



**Figura 36:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores de DDC (modelo Stretched de la secuencia Difusión) según el estadio de fibrosis.

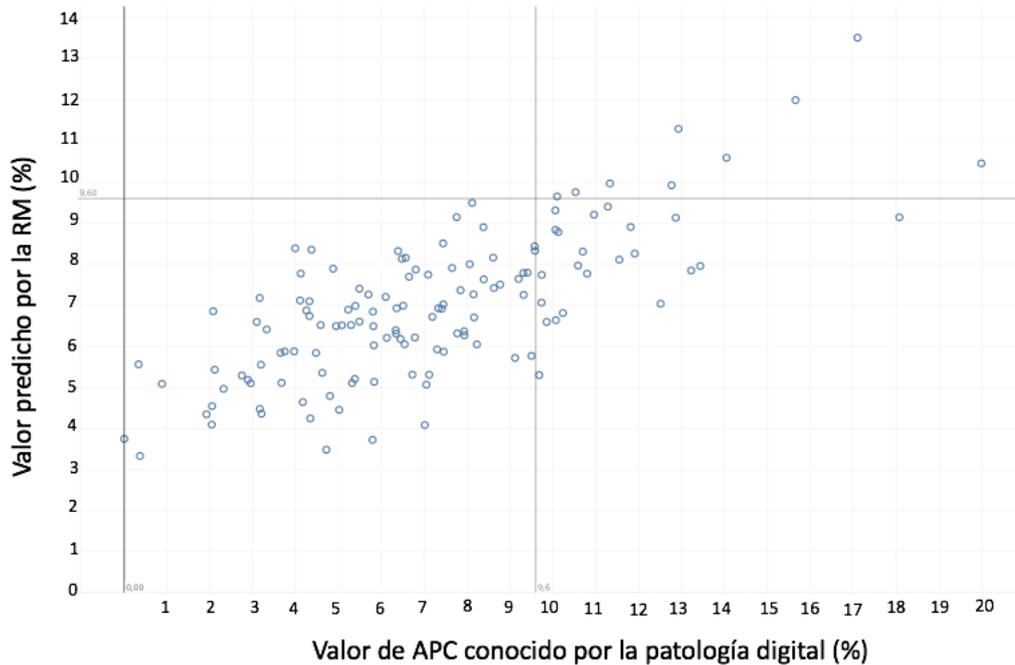
Sustrato patológico	Método estadístico	Selección de variables	AUC / IO / RMSE	Sn, Sp, VPN, VPP
<i>Fibrosis (0-4)</i> <i>METAVIR</i>	Obuchowski, regresión logística	NAFLD FS, FibroScan (kPa); $D^*$ , $f$ , (IVIM); Dapp (Kurtosis) DDC, $\alpha$ (Stretched)	IO: 0,93	$F \geq 2$ Sn: 64% Sp: 94% VPN: 75% VPP: 90%
<i>Fibrosis significativa (<math>F \geq 2</math>)</i>	Regresión logística	NAFLD FS, FibroScan (kPa); $ADC_{6b}$ , $D^*$ (IVIM); Dapp, Kapp (Kurtosis); DDC, $\alpha$ (Stretched)	AUC: 0,82	Sn: 62% Sp: 95% VPN: 52% VPP: 97%

<i>Fibrosis avanzada</i> ( $F \geq 3$ )	Random Forest	NAFLD FS, FibroScan (kPa); D (IVIM); Dapp (Kurtosis); $\alpha$ (Stretched)	AUC: 0,86	Sn: 82% Sp: 87% VPN: 85% VPP: 85%
<i>APC</i>	KNN	NAFLD FS, FibroScan (kPa), todas las variables de RM	RMSE: 2,08	APC > 9,6% Sn: 33% Sp: 100% VPN: 86% VPP: 100%

**Tabla 15:** Análisis multivariante para distintos sustratos patológicos de interés relacionados con la fibrosis hepática. Se muestra el método estadístico empleado para cada tipo de variable (dicotómica, categórica y cuantitativa) que obtuvo mayor rendimiento diagnóstico. Se especifican las variables que incluyó cada modelo multivariante y su precisión diagnóstica. Abreviaturas: AUC, área debajo la curva; IO, índice Obuchowski; KNN, k vecinos más cercanos (k-nearest neighbors), RMSE, raíz del error cuadrático medio; Sn, sensibilidad; SP, especificidad; VPN, valor predictivo negativo; VPP, valor predictivo positivo.

		Valor conocido (anatomía patológica)				
		P/R	0	1	2	3
Valor predicho (RM)	0	28	13	8	0	0
	1	15	17	12	4	0
	2	0	5	7	11	7
	3	0	0	3	2	3
	4	0	0	0	3	7

**Tabla 16:** Análisis de Obuchowski para fibrosis.



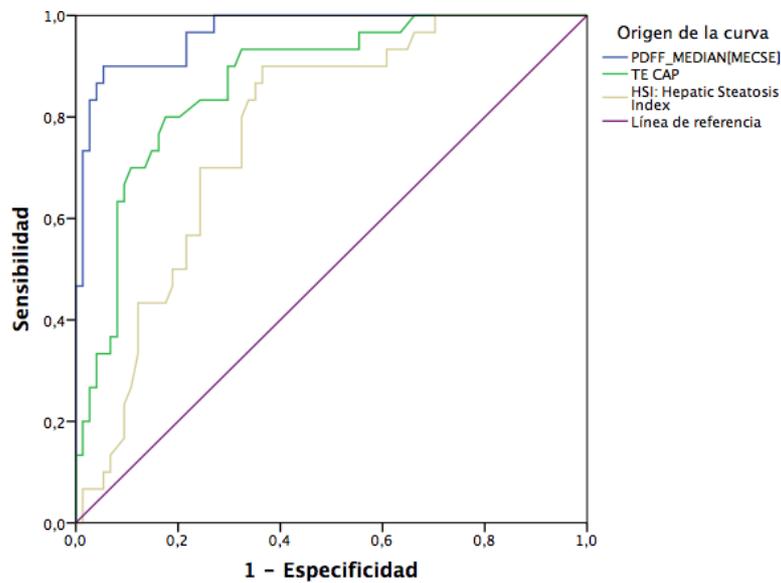
**Figura 37:** Gráfico de dispersión lineal del valor conocido de área proporcional de colágeno (APC, Patología Digital) frente al valor predicho por las variables RM. La línea negra muestra el punto de corte de 9,6% compatible con fibrosis avanzada.

### *Esteatosis*

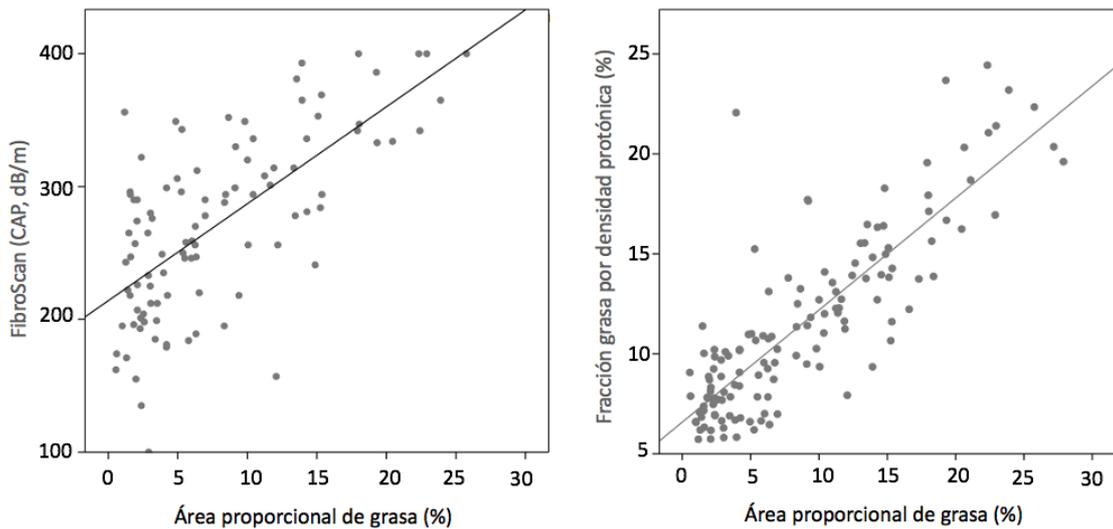
Para la estimación de esteatosis mediante biomarcadores de imagen se utilizó la fracción grasa por densidad protónica (FGDP) obtenida de la secuencia MECSE. La media ( $\pm$ DS) del contenido de grasa hepática determinado por RM fue de  $11,5 \pm 4,7\%$ , muy próximo, pero algo mayor que el determinado por patología digital que fue de  $9,3 \pm 7,6\%$ . Estos datos reflejan que la presencia de esteatosis en la población analizada en esta Tesis Doctoral fue elevada.

La FGDP aumentó significativamente con los grados histológicos de esteatosis hepática ( $7,8 \pm 1,4$ ;  $11,1 \pm 2,5$ ;  $13,8 \pm 2,8$ ;  $19,0 \pm 4,2$ ; S0–S1–S2–S3 respectivamente;  $P < 0,001$ ). Existió una excelente correlación positiva significativa entre el área proporcional de grasa y la FGDP ( $r = 0,88$ ;  $P < 0,001$ ), permitiendo discriminar entre los grados dicotomizados de esteatosis moderada y severa con mayor

precisión que los biomarcadores no invasivos de primera línea (Tabla 11, Figura 38-39).



**Figura 38:** Análisis curva ROC de los biomarcadores empleados para diagnosticar esteatosis. Se muestran las áreas debajo de la curva para esteatosis moderada (S2-3).



**Figura 39:** Gráficas de dispersión de los valores de FibroScan (gráfica izquierda) y FGDP (gráfica derecha) con respecto al área proporcional de grasa. Se muestra una dispersión lineal más precisa para la FGDP. El coeficiente de determinación ( $R_2$ ) para las rectas de regresión son 0,76 y 0,47 para FGDP y CAP, respectivamente.

## Inflamación

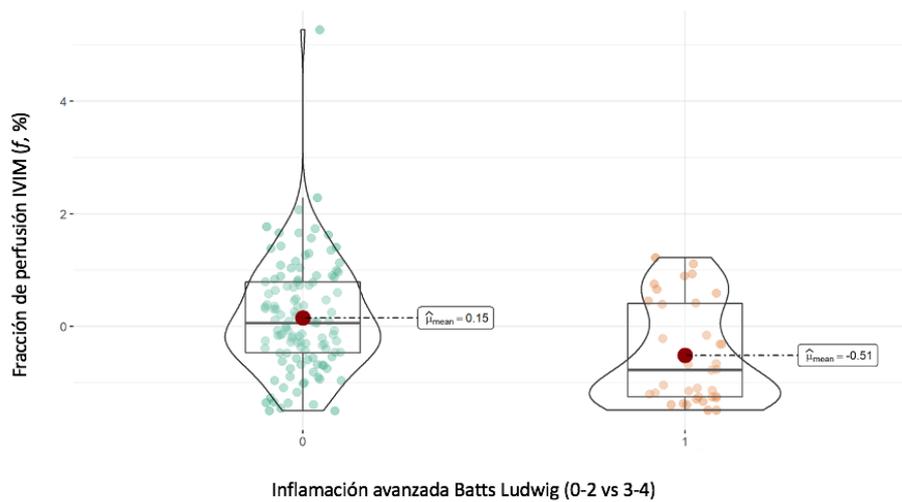
La tabla 17 resume la correlación de los distintos parámetros de RM con los estadios de inflamación y el área proporcional de inflamación. El parámetro con mayor precisión diagnóstica fue el Coeficiente de Difusión Aparente ( $D_{app}$ ) de la secuencia Difusión, modelo Kurtosis. Sin embargo, la magnitud de las diferencias significativas fue baja y se observó un solapamiento de los datos entre los distintos grados de inflamación (Figura 40). Por ello, se realizaron análisis multivariantes combinando distintos parámetros radiómicos (Tabla 18). Para los grados de inflamación, la precisión de los modelos multivariantes fue moderada, obteniendo los mejores resultados con un índice Obuchowski de 0,86 para inflamación lobulillar y un AUC de 0,75 para discriminar inflamación portal avanzada. Para el área proporcional de inflamación (API), las variables de RM permitieron identificar a los sujetos  $API > 5,7\%$  (compatible con inflamación avanzada  $SAF \geq 2$ ) con una sensibilidad del 91% y un VPN del 86% y a los pacientes con  $API > 6,7\%$  (inflamación avanzada Batts-Ludwig  $\geq 3$ ) con una especificidad del 89% y un VPP de 77% (Figura 41).

RM	Batts Ludwig		SAF		Inflamación avanzada		API
	F	rho	F	rho	Batts AUC	SAF AUC	
<i>ADC 2b</i> ( $mm^2/s$ )	1,712 (mediana)	-0,183* (p75)	3,464* (p75)	-0,178* (p75)	0,60 (p75)	0,54 (p75)	0,232* (DS)
<i>ADC 6b</i> ( $mm^2/s$ )	4,697* (p75)	-0,38** (mediana)	7,143** (media)	-0,309** (mediana)	0,72** (median)	0,65* (mediana)	0,207* (mediana)
<i>D</i> ( $mm^2/s$ )	1,219 (p25)	-0,25** (DS)	1,270 (p25)	-0,193* (DS)	0,66* (DS)	0,61* (DS)	0,226* (DS)
<i>D*</i> ( $mm^2/s$ )	2,673* (p75)	-0,233* (p75)	2,966* (p75)	-0,186* (p75)	0,65* (p75)	0,63* (p75)	0,218* (p75)
<i>f</i> (%)	4,314* (p25)	-0,267* (p25)	3,346* (p25)	-0,192* (p25)	0,69* (p25)	0,63* (p25)	0,242* (p25)
<i>D<sub>app</sub></i> ( $mm^2/s$ )	6,482** (p25)	-0,41** (mediana)	11,30** (p25)	-0,353** (p25)	0,74** (mediana)	0,68* (p25)	0,281** (p25)
<i>Kapp</i> (a.u.)	3,383* (p25)	0,318** (p25)	4,567* (p25)	0,249** (p25)	0,68* (p25)	0,57 (p25)	-0,192* (DS)

Resultados

<i>DDC</i> (mm <sup>2</sup> /s)	6,356** (p75)	-0,36** (p75)	10,12** (p75)	-0,313** (p75)	0,72** (p75)	0,61* (p75)	-0,209* (p75)
<i>α</i> (a.u.)	6,037** (media)	0,377** (media)	6,413* (media)	0,284** (media)	0,70** (media)	0,62* (media)	0,233* (mediana)
<i>μ</i> (kPa)	1,685 (p75)	-0,184* (DS)	1,112 (p75)	-0,122 (DS)	0,64* (DS)	0,60 (DS)	-0,161 (p75)
<i>T1c</i> (ms)	3,464* (p25)	0,754 (p75)	0,347 (p25)	0,134 (p25)	0,65* (p25)	0,51 (p75)	0,201* (p25)
<i>H/G</i> (%)	0,192 (p25)	0,048 (p25)	0,441 (p25)	0,051 (p25)	0,57 (p25)	0,53 (p25)	0,138 (p25)
<i>Perímetro abdominal</i> (cm)	0,755 (media)	0,145 (media)	2,698 (media)	0,181* (media)	0,57 (media)	0,52 (media)	0,013 (media)

**Tabla 17:** Análisis univariante de correlación entre la inflamación y distintos parámetros de RM. Se muestra el valor estadístico F (test ANOVA) y rho (correlación de Spearman) para las escalas Batts Ludwig (inflamación portal) y SAF (inflamación lobular) así como el área proporcional de inflamación (API). Se refleja también el área bajo la curva (AUC) para diferenciar inflamación avanzada (Batts-Ludwig $\geq$ 3 y SAF $\geq$ 2). En cada casilla, la métrica con la mejor correlación se especifica entre paréntesis (media, desviación estándar (DS), mediana, p25, p75). En amarillo se resaltan los parámetros radiómicos con mayor precisión diagnóstica. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ .

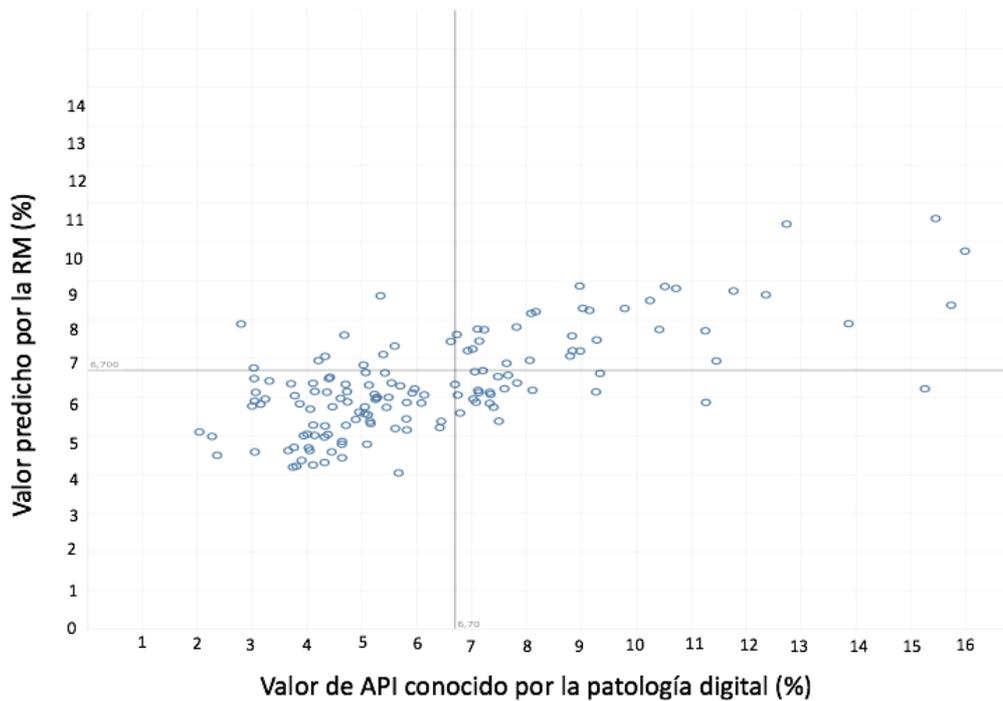


**Figura 40:** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores de  $f$  (modelo IVIM de la secuencia Difusión) según la dicotomización de inflamación avanzada.

Sustrato patológico	Método estadístico	Selección de variables	AUC / IO / RMSE	Sn, Sp, VPN, VPP
<i>Lobulitis SAF</i> (0-2)	Obuchowski, Random Forest	ADC (IVIM); DDC, $\alpha$ (Stretched); T1c; H/G (STIR).	IO: 0,86	SAF $\geq 2$ Sn: 36% Sp: 83% VPN: 76% VPP: 48%
<i>Batts Ludwig</i> (0-4)	Obuchowski, Random Forest	ADC <sub>6b</sub> , $f$ (IVIM); Dapp (Kurtosis); DDC, $\alpha$ (Stretched); H/G (STIR)	IO: 0,84	Batts $\geq 3$ Sn: 36% Sp: 82% VPN: 75% VPP: 46%
<i>Inflamación lobular avanzada</i>	PLS-DA	ADC <sub>6b</sub> , $D^*$ , $f$ (IVIM); Dapp (Kurtosis); DDC, $\alpha$ (Stretched)	AUC: 0,69	Sn: 78% Sp: 53% VPN: 89% VPP: 33%

<i>Inflamación portal avanzada (Batts≥3)</i>	PLS-DA	D, D*, <i>f</i> (IVIM); Dapp (Kurtosis); DDC, $\alpha$ (Stretched); $\mu$ (Elastografía); T1c; H/G (STIR)	AUC: 0,75	Sn: 89% Sp: 65% VPN: 94% VPP: 37%
<i>API</i>	KNN	Todas las variables de RM	RMSE: 2,14	API>6,7% Sn: 60% Sp: 89% VPN: 78% VPP: 77%

**Tabla 18:** Análisis multivariante para distintos sustratos patológicos de interés relacionados con la inflamación hepática. Se muestra el método estadístico empleado para cada tipo de variable (dicotómica, categórica y cuantitativa) que obtuvo mayor rendimiento diagnóstico. Se especifican las variables que incluyó cada modelo multivariante y su precisión diagnóstica. Abreviaturas: AUC, área debajo la curva; IO, índice Obuchowski; KNN, k vecinos más cercanos (k-nearest neighbors), RMSE, raíz del error cuadrático medio; Sn, sensibilidad; SP, especificidad; VPN, valor predictivo negativo; VPP, valor predictivo positivo.



**Figura 41:** Gráfico de dispersión lineal del valor conocido de área proporcional de inflamación (API, Patología Digital) frente al valor predicho por las variables RM. La línea roja muestra el punto de corte de 6,7% compatible con inflamación avanzada.

### *Esteatohepatitis*

En la población con EHGNA (n=102) se evaluó la capacidad diagnóstica de variables clínicas, analíticas y todos los biomarcadores de imagen para discriminar entre las categorías de esteatosis simple y esteatohepatitis. En el análisis de regresión lineal multivariante, las variables que se mantuvieron en el modelo como predictores de esteatohepatitis fueron las de imagen: FGDP y el perímetro abdominal (Tabla 18). El modelo permitió clasificar correctamente como esteatohepatitis al 88% de los pacientes con EHGNA. Estos hallazgos están en paralelo con los resultados de la patología digital en los cuales el área proporcional de grasa aumenta con la puntuación NASH-CRN (0-8) y el algoritmo de clasificación FLIP/SAF (Figuras 30 y 31). La correlación entre FGDP y la puntuación NASH-CRN fue alta ( $r=0.76$ ) y significativa ( $P<0,001$ ).

Parámetro	OR (IC95%)	p-valor	Esteatosis simpe	Esteato- hepatitis
<i>FGDP (%)</i>	1,564 (1,314–1,862)	<0,001	10,34%	15,97%
<i>Perímetro abdominal (cm)</i>	1,004 (1,001–1,007)	0,026	97,0 cm	111,3 cm
<i>FibroScan (CAP, dB/m)</i>	1,008 (0,994–1,022)	0,252	274 dB/m	311 dB/m

**Tabla 19:** Análisis multivariante para el diagnóstico de esteatohepatitis. Las variables clínica y analíticas no obtuvieron significación estadística. Abreviaturas: OR, Odds ratio; FGDP, fracción grasa por densidad protónica.

### *Hierro*

Para la estimación de los depósitos de hierro en el parénquima hepático se utilizó la medida del tiempo de relajación  $T2^*$  y su ratio  $R2^*$  ( $1/T2^*$ ) obtenidas a partir de las imágenes obtenidas con la secuencia MECSE. La mediana (RIQ) del  $R2^*$  fue de 51,1 (42,4–64,4)  $s^{-1}$  y la del área proporcional de hierro medido con análisis digital de las muestras histológicas fue de 1,7 (1,2–2,6) %. Estos datos reflejan que la mayoría de nuestra población no presentaba sobrecarga de hierro hepático (solamente el 15%,  $n=24$ , presentaron una CHH  $>36 \mu\text{mol/gr}$ ).

El  $R^2$ \* aumentó significativamente con los grados histológicos de sobrecarga férrica ( $49,7 \pm 11,2$  [n=115];  $65,4 \pm 17,3$  [n=10];  $66,6 \pm 14,6$  [n=8];  $86,8 \pm 44,3$  [n=11] y  $75,9 \pm 8,7$  [n=5]; Scheuer Fe0–Fe1–Fe2–Fe3–Fe4 respectivamente;  $P < 0,001$ ). Existió una correlación positiva significativa entre el área proporcional de hierro y la  $R^2$ \* ( $r=0,54$ ;  $P < 0,001$ ), permitiendo discriminar la presencia de hemosiderosis (Scheuer  $\geq 1$ : AUC 0,83 [0,74-0,91]), y la sobrecarga severa de hierro (Scheuer  $\geq 3$ : AUC 0,82 [0,67-0,96]) con precisión.



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

En el estudio de las hepatopatías crónicas difusas existe una necesidad clínica de medir en el hígado objetivamente el tipo de lesión tisular y gradar su severidad. Esta Tesis Doctoral describe una metodología detallada para un análisis computacional preciso de la imagen y la obtención de parámetros cuantitativos. La Patología Digital y la RM multiparamétrica permite estimar con una alta precisión las características histológicas que subyacen en las enfermedades hepáticas. Por un lado, el análisis de las muestras histológicas digitalizadas permite cuantificar el área proporcional de los distintos sustratos patológicos con una correlación adecuada con los sistemas de puntuación anatomopatológicos clásicos, aumentando su reproducibilidad y fiabilidad. Por otro lado, la RM multiparamétrica clarifica las amplias zonas grises de incertidumbre diagnóstica de los biomarcadores no invasivos de primera línea, tipificando y caracterizando con una mayor precisión a estos pacientes con hepatopatía crónica. De la mano de la imagen digital patológica y radiológica, y de su análisis cuantitativo computacional, ambos enfoques suponen un progreso en el diagnóstico de estos pacientes y aportan definitivamente un valor de fiabilidad al manejo de las enfermedades hepáticas.

En comparación con el escenario marcado por los ensayos clínicos, donde los pacientes examinados se someten a una biopsia hepática para incluir casos con suficiente actividad necroinflamatoria o fibrosis, esta Tesis Doctoral ha estudiado a todo paciente con indicación clínica de biopsia hepática, independientemente de su grado de lesión y etiología. La necesidad de disponer de material histológico como patrón de referencia puede interpretarse como un sesgo de selección de pacientes, ya que los pacientes sometidos a una biopsia hepática suelen ser aquellos que se presentan con hepatopatías más avanzadas y situaciones clínicas más preocupantes. A pesar de ello, en un intento de acercar los datos de práctica clínica diaria y analizar todo el espectro de la enfermedad hepática crónica, se estableció como criterio de inclusión la indicación de la biopsia y no sus hallazgos histológicos.

En consecuencia, la muestra final incluida presenta una adecuada distribución de los distintos sustratos patológicos de interés (Tabla 4). A diferencia de otros trabajos que comparan condiciones extremas de la enfermedad, tales como sanos y estadios iniciales frente a casos muy avanzados, en este estudio las lesiones severas no fueron muy prevalentes (alrededor de un 15% de cirrosis, esteatosis avanzada o actividad necroinflamatoria severa) y los grados leves o intermedios estuvieron adecuadamente representados (alrededor de un 20% de la muestra padecía fibrosis intermedia F2, esteatosis S1 y inflamación portal leve) [104,106,109,143,147,148]. Además, la ausencia de lesión (alrededor de un 30% de la muestra no tiene fibrosis, esteatosis o inflamación) permitió la comparación con un grupo control con patrón de referencia. Destaca que 15 pacientes (9% del total) no presentaron ninguna lesión histológica. El hecho de que el amplio abanico histológico de las lesiones analizadas esté representado adecuadamente evita el sesgo de que las pruebas diagnósticas analizadas aumenten falsamente su VPP y permite utilizar pruebas estadísticas sin incurrir en el error tipo I. La única excepción a este comentario es la infrarrepresentación de la hemosiderosis, ya que solamente el 21% presentaban sobrecarga de hierro (Scheuer $\geq$ 1, n=36). Es de destacar que solamente hubo un caso de hemocromatosis en la serie de esta Tesis Doctoral y que, aunque relevante, la sobrecarga de hierro en estas entidades es poco frecuente [222].

En línea con otros factores de riesgo metabólico y cardiovascular, la etiología principal del daño hepático en nuestro estudio fue la EHGNA o enfermedad hepática metabólica (MAFLD). Hoy en día, se observa una tendencia cambiante en la prevalencia y morbilidad asociadas al desencadenante de la lesión hepática, con una disminución en la carga asistencial por hepatitis virales y un aumento de la EHGNA [223]. Además, en nuestra serie se observó una prevalencia del 57% de esteatohepatitis entre los sujetos con enfermedad hepática metabólica, cifra elevada pero similar a otros estudios multicéntricos de sujetos con EHGNA y biopsia, debida a la propia indicación de la biopsia hepática que trata de diferenciar esteatosis simple de esteatohepatitis. [25,224,225].

## 5.1. Patología Digital

El área proporcional de colágeno (APC) se ha estudiado principalmente en sujetos con hepatopatía crónica de etiología vírica [19,40,43,44,47-49,52,54,55,57,59]. Las diferentes indicaciones de la biopsia hepática y las peculiaridades de la fibrosis del hígado graso no alcohólico, con patrón predominante centrolobulillar pero no portal y su menor tasa de progresión en comparación con el VHC, pueden justificar el hecho de que las muestras de pacientes de esta Tesis Doctoral presentan valores de área proporcional de colágeno compatibles con FO más elevados (APC 5,4% en nuestra cohorte frente al 2,7% de media para las series de hepatitis virales) y un porcentaje de colágeno menor para el estadio F4 (APC 13,2% en nuestra cohorte frente al 20,7% de media para las series de hepatitis viral) [19,40,43,44,47-49,52,54,55,57,59]. Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que el valor diagnóstico del área proporcional de colágeno presenta limitaciones para diferenciar los estadios leves e iniciales de fibrosis. Es en estas etapas donde los cambios morfológicos y arquitecturales cualitativos juega un papel más importante con respecto a la cantidad de fibras de colágeno (Figura 25) [23]. A pesar de ello, el área proporcional de colágeno es capaz de discriminar la fibrosis avanzada con una gran precisión (AUC F3-4: 0,92), ya que un APC de 9,6% como punto de corte permite identificar a los sujetos con mayor riesgo de desenlaces clínicos asociados a su enfermedad [192]. La distribución de los valores de la Patología Digital fue muy similar a los obtenidos por E. Buzzetti y colaboradores, que aplicaron una metodología de análisis similar a la empleada en esta Tesis: objetivo de gran aumento (40x), escaneado de la muestra histológica completa, tinción con Rojo Sirio y algoritmos de segmentación basados en la forma y el color [37]. Las diferentes tinciones para la detección de fibrosis, como el tricrómico de Masson o la elástica de Van Gieson, no son selectivas de las fibras de colágeno y la cantidad de tinción podría no corresponder con el área proporcional de colágeno [41-43,47-49,52].

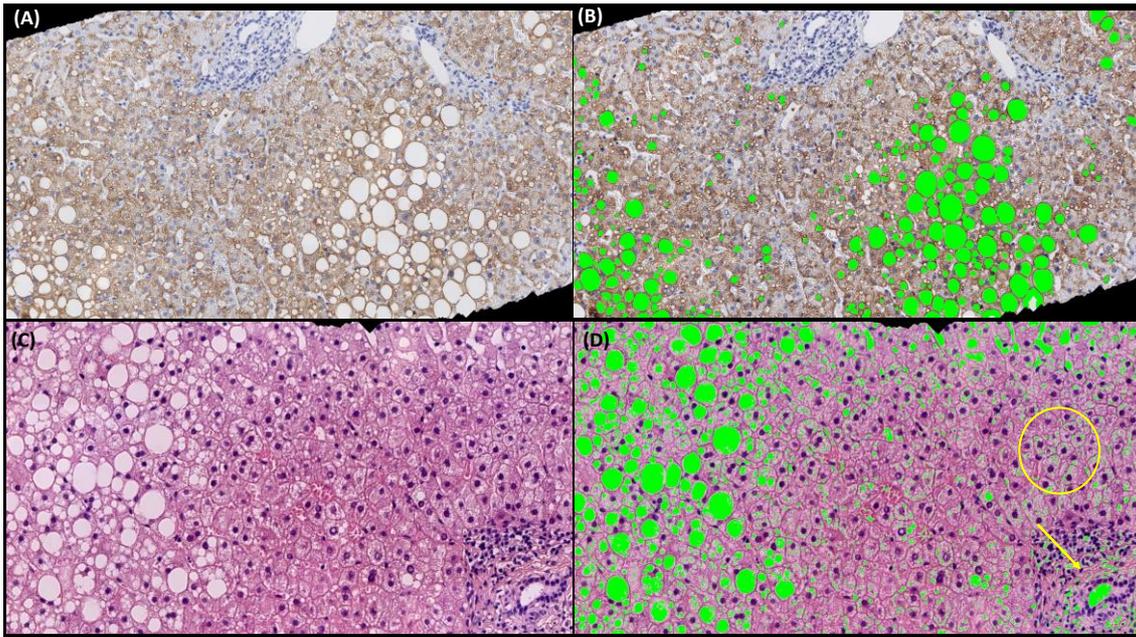
Una tinción adecuada y estandarizada del Rojo Sirio (Figura 11) identifica específicamente las fibras de colágeno y debería emplearse en el análisis de la Patología Digital para no infraestimar la medida del porcentaje de fibrosis [23,226]. Aunque la presencia y el grado de fibrosis están relacionados con el desarrollo de la esteatohepatitis, la fibrosis también puede estar presente en pacientes con esteatosis simple [225,227]. En esta Tesis Doctoral, las mediciones de colágeno y su distribución entre las categorías de EHGNA (Figura 30) efectivamente confirma que los pacientes con esteatosis simple pueden tener cierto grado de fibrosis (APC media de 7,2%), con una prevalencia creciente de esteatohepatitis a medida que empeora la fibrosis (APC media de 9,2%). Por tanto, cuantificar la fibrosis hepática y categorizar a los pacientes según el porcentaje de colágeno puede permitir una evaluación pronóstica más precisa [37,49,228]. En este mismo sentido, es razonable considerar que el área proporcional de colágeno permite evaluar la eficacia terapéutica de forma similar a como ya se ha demostrado en la colangitis biliar primaria [229].

La excelente concordancia en la prueba-reprueba de las imágenes patológicas digitalizadas para evaluar la repetibilidad del método. La reproducibilidad del análisis computacional para la esteatosis, inflamación y hierro obtuvo un coeficiente de variación no superior al 1,1%. Aunque aceptable, el área proporcional de colágeno obtuvo el coeficiente de variación más alto (6,3%) debido muy probablemente al procesado manual previo de las imágenes para eliminar elementos de colágeno estructural normal en los tractos portales, los espacios vasculares y el tejido conectivo de la cápsula hepática (Figura 17). A pesar de que la edición manual se realizó por dos patólogos expertos y ciegos al diagnóstico final, la consistencia de los datos para las mediciones repetidas fue excelente (CCI >0,96).

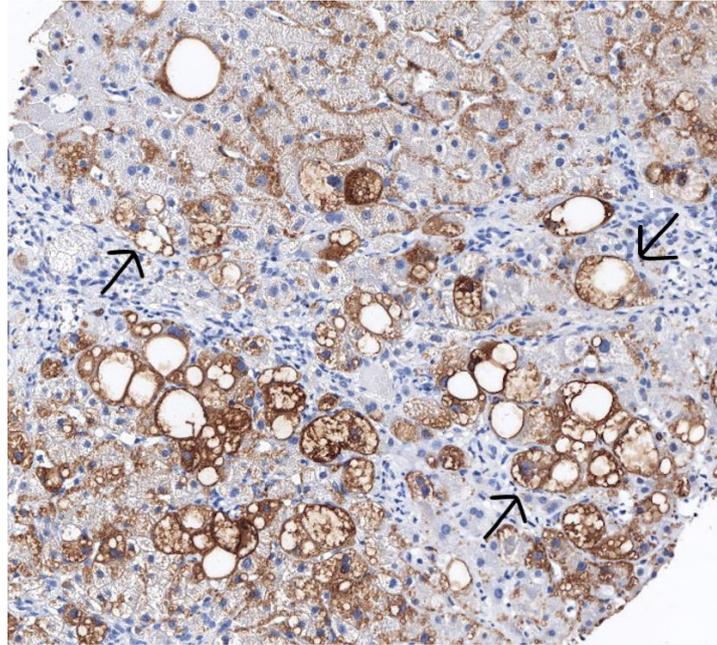
En cuanto a la esteatosis, pocos trabajos han analizado el área proporcional de grasa (APG) con la Patología Digital (Anexo 1, Tabla 1). Los resultados en esta Tesis Doctoral muestran que existe una alta correlación entre el área proporcional de grasa y los grados de esteatosis, pudiendo discriminar de esta forma entre todos los grados.

Un umbral APG de 13,9% detecta esteatosis severa (AUC S3: 0,95), que además se relaciona con una fibrosis significativa y una mayor morbimortalidad [14,225]. El mejor rendimiento del análisis digital de la grasa en comparación con el colágeno se debe principalmente al sistema de puntuación histológica empleado por los patólogos para la esteatosis, ya que consideran únicamente el porcentaje de tejido ocupado por gotas de grasa y no los cambios arquitecturales o morfológicos. Diversas publicaciones previas obtienen unos resultados similares aplicando algoritmos de segmentación análogos basados en la umbralización restrictiva del color, el tamaño y la forma de las vacuolas lipídicas [39,56]. En paralelo con estos estudios, los valores del área proporcional de grasa obtenidos en esta Tesis Doctoral fueron inferiores al rango porcentual del grado de esteatosis dictaminado por los patólogos. Cabe destacar que el grado S3 correspondió a un área proporcional media de grasa del 21% con prácticamente todos los casos por debajo del umbral del 30%. Otros trabajos que han empleado distintas tinciones para el análisis de área proporcional de esteatosis, como el tricrómico de Masson o H&E, obtienen sin embargo unos valores más elevados [51,230]. Para clarificar estos aspectos, en esta Tesis se llevó a cabo un análisis interno para comparar el área proporcional de grasa obtenida con la tinción H&E y con la inmunohistoquímica (IHQ) adipofilina. Se observó unos valores más elevados y un mayor solapamiento de datos en las mediciones de APG con la tinción H&E. Estas medidas aumentaron una media del 1,3% con respecto a las obtenidas con la IHQ adipofilina. Esta discrepancia debe atribuirse a la cuantificación de espacios parenquimatosos no lipídicos como la rarefacción citoplasmática de los hepatocitos, los vasos sanguíneos sinusoidales y los conductos biliares en la tinción H&E (Figura 42). La magnitud de esta sobreestimación grasa con la tinción H&E se observó que era significativa sólo en el espectro inferior de afectación (grados S0 y S1). La ausencia de diferencia en los grados S2 y S3 puede deberse a la compresión sinusoidal por el parénquima esteatótico, reduciendo los errores causados por la cuantificación de estos espacios no lipídicos. En definitiva, al igual que con la tinción histoquímica del Rojo Sirio para el colágeno, la IHQ adipofilina tiñe las vacuolas lipídicas y ofrece una cuantificación más precisa del área de esteatosis, evitando la sobreestimación de espacios blancos no unidos a la membrana lipídica como son los vasos sanguíneos y los desgarros del tejido. Nuestro estudio también confirma el hecho

de que los pacientes con esteatohepatitis tienen valores más elevados de área proporcional de grasa frente a los que sólo presentan esteatosis (Figura 31). Aunque en la puntuación NASH-CRN tienen un peso desequilibrado los componentes definitorios de esteatohepatitis, con un gran peso de la esteatosis, al utilizar la clasificación FLIP/SAF se demuestra que el área grasa aumenta claramente con la severidad de la EHGNA. Estos resultados añaden evidencia al impacto del grado de esteatosis como marcador importante de la actividad en la hepatopatía metabólica [231,232]. Es de destacar que la adipofilina también puede expresarse en los hepatocitos balonzados, lo que contribuiría a aumentar los valores de área proporcional de grasa en la esteatohepatitis [233]. Una revisión en profundidad de nuestras biopsias confirmó que los hepatocitos balonzados se teñían con adipofilina en el borde roto de la vacuola lipídica citoplasmática (Figura 43). Pese a ello, y dado que la proporción de grasa medida con adipofilina muestra una mejor correlación con los grados de esteatosis ( $r=0,85$ ) frente al porcentaje medido con H&E ( $r=0,63$ ), la sobrestimación por la tinción de hepatocitos balonzados parece tener un menor impacto en la evaluación de la esteatosis que los espacios parenquimatosos no lipídicos teñidos con H&E. Por último, la observación de una asociación no lineal con la puntuación de fibrosis respalda la evidencia de que la esteatosis disminuye cuando se desarrolla la cirrosis en la EHGNA [234].



**Figura 42:** Análisis digital de una biopsia con lesiones histológicas compatibles con esteatohepatitis (Ventana iScan HT, aumento de x40). (A) La inmunohistoquímica adipofilina muestra una reacción positiva en torno a la esteatosis micro-macrovesicular; (B) el algoritmo computacional de segmentación basado en umbrales de color y forma identifica las gotas de lípidos (marcadas en verde); (C) sección de tejido teñida con H&E; (D) el algoritmo de segmentación identifica las vacuolas lipídicas (marcadas en verde) y los espacios parenquimatoso no lipídicos como la rarefacción citoplasmática de los hepatocitos (círculo amarillo) y el conducto biliar (flecha amarilla).



**Figura 43:** Tinción inmunohistoquímica adipofilina en una biopsia con lesiones histológicas compatibles con esteatohepatitis (Ventana iScan HT, aumento de x40). La expresión positiva para la adipofilina se observa en gotas de lípidos, pero también en hepatocitos balonizados (flechas negras).

Una de las grandes novedades que aporta esta Tesis Doctoral es el uso de patología digital para cuantificar simultáneamente las células inflamatorias y los depósitos de hierro. Los sistemas de gradación de la inflamación se basan en cambios morfológicos como los agregados de linfocitos y monocitos [235,236]. La puntuación SAF para la inflamación lobular se constituye por el número de focos inflamatorios en el lobulillo hepático, mientras que la puntuación Batts Ludwig se basa en si el infiltrado inflamatorio portal rebasa la membrana limitante con erosión de la misma (hepatitis de interfase). Se observó una correlación baja entre el marcador CD45+ y los grados de inflamación, siendo el área proporcional de células inflamatorias capaz de discriminar únicamente la presencia de inflamación moderada y severa (Figura 28). La falta de precisión comparado con los demás sustratos patológicos analizados con patología digital probablemente se deba a cuatro razones principales: (I) imposibilidad de la Patología Digital para diferenciar entre la inflamación portal y la lobulillar; (II) el enfoque cuantitativo de una escala de base cualitativa basada en cambios

morfológicos; (III) la alta variabilidad interobservador que existe en la gradación de la actividad necroinflamatoria [20]; y (IV) el uso de marcadores no específicos de linfocitos y monocitos como el IHQ CD45 que marca las diferentes células hematopoyéticas. Una explicación al incremento del porcentaje CD45+ que se aprecia en los grados moderados de inflamación (SAF I2 y Batts Ludwig I3-4) es la gran afluencia de linfocitos y monocitos derivados de macrófagos que se aprecia en las formas severas de la enfermedad hepática, tales como la esteatohepatitis y la hepatitis de interfase [237,238].

Es de destacar que mediante Patología Digital no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área proporcional de inflamación entre las diferentes categorías de EHGNA (Tabla 9). Empleando una metodología computacional distinta, otro estudio reciente que también ha valorado la distribución de células CD45+ en la EHGNA demuestra la presencia de un mayor porcentaje de células inflamatorias activadas en la esteatosis hepática en comparación con los controles sanos, sin diferencia alguna con la esteatohepatitis [239]. Esta falta de discriminación se debe muy probablemente al hecho de que: (I) nuestra cohorte presenta una frecuencia baja de casos con inflamación avanzada (24%); (II) el análisis digital no diferencia entre afectación lobular y portal mientras que las escalas histológicas semicuantitativas de la EHGNA solamente tienen en cuenta la inflamación lobulillar; y (III) la definición de esteatohepatitis depende en gran medida de un patrón morfológico basado en *clústers* o agregados celulares más que de un valor cuantitativo. Además, el término esteatohepatitis incluye no solo inflamación sino también balonización hepatocelular, hallazgo este último que no se tipificó ni cuantificó con las tinciones inmuno-específicas. La IHQ Sonic Hedgehog o la queratina 8/18 identifican de manera selectiva la degeneración balonizante y permitirían definir los sujetos con esteatohepatitis con una mayor especificidad que el marcador CD45 [240,241]. Por último y en línea con estudios anteriores, la existencia de una correlación lineal entre los estadios de fibrosis y el área proporcional CD45+ confirma que en la enfermedad hepática avanzada aumenta la infiltración de células inflamatorias activadas. [225,242].

Para la validación del análisis y la cuantificación del hierro se ha utilizado como patrón de referencia la escala histológica Deugnier porque, a diferencia de la

escala Scheuer, tiene en cuenta tanto los depósitos parenquimatosos como mesenquimales. Esta decisión ha permitido una comparación más directa con la tinción de Perls evaluada mediante la Patología Digital y permitiendo demostrar en esta Tesis la buena correlación existente con el área proporcional de hierro. La escala de Deugnier y los puntos de corte seleccionados ( $\geq 1\%$  and  $\geq 5\%$ ) se han validado también en otras series de sujetos sin hemocromatosis [197,243]. Se ha demostrado en esta Tesis que un área proporcional de 1,5% se asocia con presencia de hierro (Deugnier  $\geq 1$ ) y que, por lo tanto, superar ese valor representa un marcador subrogado de enfermedad hepática avanzada [243,244]. Nuestros datos también indican que no hay diferencias entre la cantidad de hierro demostrada por su área proporcional en Patología Digital y las categorías establecidas de EHGNA. A pesar de que la magnitud del depósito del hierro en la enfermedad metabólica grasa es relativamente pequeña, estudios previos y nuestros resultados indican que su impacto en la esteatohepatitis depende más de la distribución de los depósitos que de su cantidad [15,199].

## 5.2. Biomarcadores no invasivos de primera línea

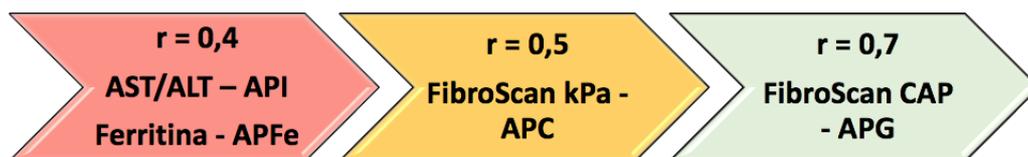
El siguiente aspecto de esta Tesis ha sido analizar la precisión diagnóstica de los biomarcadores no invasivos considerados como de primera línea en la práctica clínica habitual. De estos biomarcadores se han analizado los analíticos y por FibroScan. Uno de los objetivos de este análisis era identificar las zonas grises o indeterminadas que no permiten clasificar adecuadamente a los pacientes y determinar la magnitud de esta incertidumbre.

De todos los biomarcadores séricos analíticos evaluados, *NAFLD Fibrosis Score* y *Hepatic Steatosis Index* presentaron una mejor precisión para diagnosticar la fibrosis y esteatosis, respectivamente. Este resultado parece relacionarse con la elevada prevalencia de DM (33%) y obesidad (media IMC de 29 kg/m<sup>2</sup>) en nuestra población. De forma similar a los resultados de estudios centrados en la EHGNA, sus rendimientos diagnósticos rondaban en esta Tesis un AUC=0,8 con variaciones en función de los grados de enfermedad que se pretende diferenciar,

pero con una elevada sensibilidad y valor predictivo negativo [245]. Por otro lado, y en línea con otros trabajos, los valores analíticos de transaminasas y ferritina solamente permiten sospechar afectación inflamatoria y por depósito de hierro dado que su grado de correlación con el área proporcional de inflamación y hierro es baja [226].

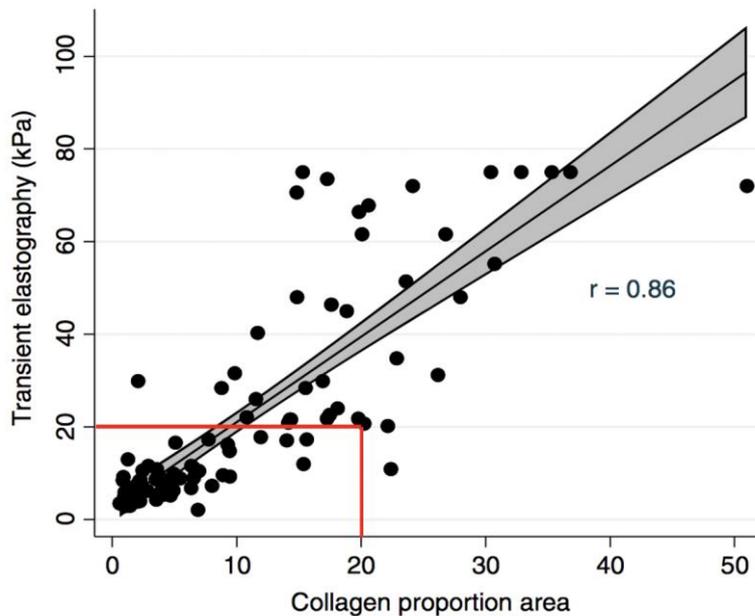
El FibroScan fue de todos los biomarcadores de primera línea analizados el biomarcador no invasivo con mejor precisión diagnóstica. Sin embargo, entre un 25-30% de los sujetos caían en la zona gris que no permitía su correcta clasificación (Figuras 34,35). Estos resultados confirman y ponen de manifiesto la necesidad de emplear otra prueba diagnóstica que, de manera secuencial, permita categorizar a los pacientes no tipificados mediante el FibroScan [27].

El análisis de la correlación entre los biomarcadores no invasivos y las medidas de patología digital es uno de los aspectos más novedosos de esta Tesis Doctoral. Los ratios de correlación obtenidos se reflejan en la Figura 44. Las mejores correlaciones se observaron entre el FibroScan y el área proporcional de colágeno (kPa - APC) y de grasa (CAP -APG). Esta información nos acerca de una manera más cercana y cuantitativa a la biopatología del proceso subyacente.



**Figura 44:** Semáforo de correlaciones entre los biomarcadores no invasivos de primera línea y la Patología Digital. En rojo se marca una correlación débil entre los biomarcadores analíticos (transaminasas y ferritina) con el área proporcional de inflamación (API) y hierro (APFe), respectivamente. En amarillo se marca una correlación moderada entre el FibroScan con su valor de rigidez hepática (kPa) y el área proporcional de colágeno (APC). En verde se marca una correlación fuerte entre el FibroScan con su parámetro de atenuación controlada (dB/m) y el área proporcional de grasa (APG).

Estudios recientes también centrados en estos análisis obtienen resultados similares. Así, empleando la tinción Rojo Sirio para detectar fibrosis y analizando sujetos con distintas etiologías de hepatopatía crónica, la correlación entre el FibroScan (kPa) y el área proporcional de colágeno suele considerarse sólo como moderada (valor de  $r$  en torno al 0,5) [45,70,71,246]. Conviene destacar el estudio de Israelsen M y colaboradores que analizan sujetos con hepatopatía alcohólica avanzada, la mayoría cirróticos, obteniendo una correlación más fuerte ( $r=0,86$ ) [36]. Es probable que el rango de dispersión de los datos en estadios avanzados de la enfermedad (F4) con valores más elevados de área proporcional de colágeno (APC>20%) y FibroScan (>20kPa) sea responsable de esta correlación más alta (Figura 45). En nuestro estudio, solamente 14 sujetos (9%) presentaron un valor de elasticidad hepática >20kPa y sólo un único caso tuvo un valor de APC>20%. Así pues, en población sin cirrosis avanzada el grado de correlación es menor dada la coexistencia de los factores de confusión que acontecen simultáneamente en el proceso biopatológico subyacente.

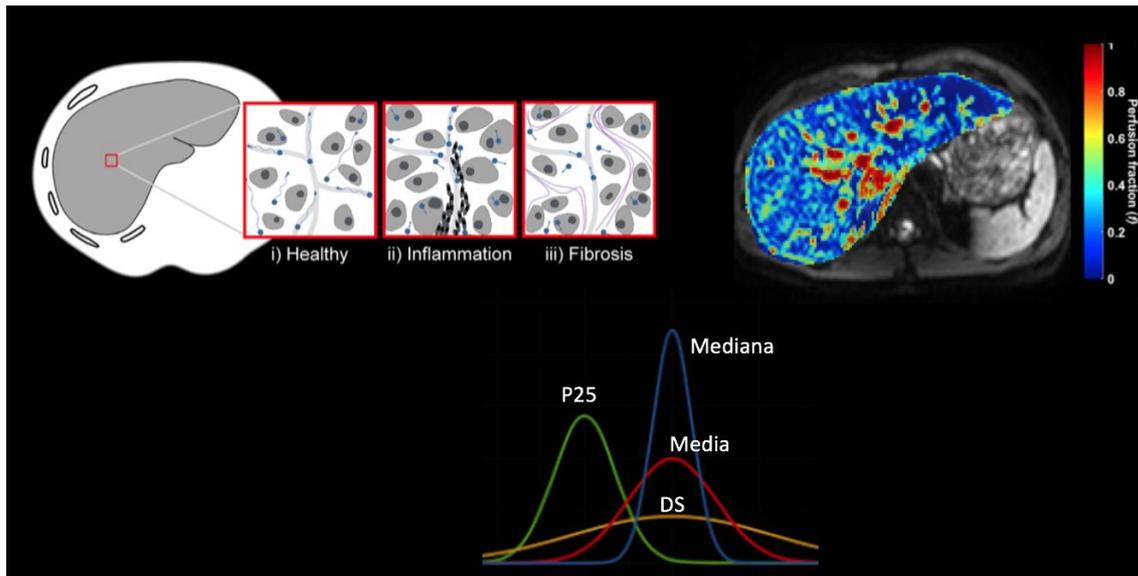


**Figura 45:** Imagen de Israelsen M, et al [36]. Gráfico de dispersión lineal que muestra en su serie la correlación entre FibroScan y el área proporcional de colágeno (APC). Nótese como en estadios de enfermedad no avanzada (F0-F3, <20Kpa, APC<20%) existe un mayor grado de solapamiento entre los datos. La correlación aumenta (menos solapamiento) a partir de los casos con enfermedad avanzada (F4, >20kPa, APC>20%). La separación entre poblaciones se ha marcado con líneas rojas.

El valor de FibroScan CAP obtuvo un grado de correlación alto con el área proporcional de grasa (semáforo verde, Figura 43). Los valores obtenidos en esta Tesis superan los descritos en la literatura debido probablemente a la selectividad de la inmunohistoquímica con adipofilina empleada para la detección de vacuolas lipídicas en nuestras biopsias frente a las tinciones inespecíficas de otros estudios (como el tricrómico de Masson) [43].

### 5.3. RM multiparamétrica

La fibrosis hepática representa el sustrato histopatológico con mayor impacto pronóstico en las enfermedades hepáticas crónicas difusas [10]. Por ello, su diagnóstico debe ser lo más preciso y fiable. Dado que los biomarcadores de primera línea permiten descartar fibrosis significativa con un elevado valor predictivo negativo, un objetivo de la RM es diagnosticar la fibrosis significativa con un elevado valor predictivo positivo VPP (Figura 2). Dado que la afectación de las enfermedades hepáticas es usualmente heterogénea en su distribución, es importante conocer las medidas de tendencia central de los biomarcadores de imagen y las de dispersión. Un ejemplo de ello es evaluado en esta Tesis Doctoral es la fracción de perfusión ( $f$ ) que se correlaciona inversamente con la fibrosis (Figura 46). En la distribución de la variable  $f$ , el p25 (los casos con mayor restricción a la perfusión) y la desviación estándar (los casos con elevada dispersión de sus valores con zonas poco perfundidas y otras muy vascularizadas) son los que mejor predicen la fibrosis hepática. Estos resultados nos permiten topografiar la heterogeneidad de la enfermedad y aumentar la capacidad predictiva más allá de las medidas de tendencia central. Hoy en día, los parámetros con biomarcadores de imagen computacional más estudiados han sido los derivados de la secuencia Difusión (modelo IVIM) y los mapas de los tiempos T1 de relajación (Anexo 1, Tabla 4).



**Figura 46:** Las hepatopatías crónicas presentan con frecuencia una afectación difusa pero heterogénea en su distribución, por lo que los parámetros mejor empleados para describirlas han sido las medidas de localización central y las de dispersión.

Respecto al modelo IVIM, el Coeficiente de Difusión Aparente biexponencial (ADC) biexponencial mostró los mejores resultados, permitió discriminar a los sujetos con fibrosis avanzada con un AUC de 0,79 (IC95% 0,70-0,87). Otros modelos más complejos de analizar los parámetros de Difusión han dado resultados más variables. Así, existen multitud de estudios que muestran una correlación débil entre los parámetros IVIM y los estadios de fibrosis [128,131,133,138-141,144]. Similar a estos trabajos, las diferencias estadísticas de ADC, D, D\* y  $f$  que obtenemos en esta Tesis Doctoral (Tabla 14) han presentado una magnitud del efecto pequeña con un valor estadístico F bajo. Para diferenciar los estadios de fibrosis, los modelos de Kurtosis y Stretched presentaron una mejor capacidad diagnóstica comparados con el modelo IVIM. Estudios procedentes de China y Korea en sujetos con hepatopatía vírica han mostrado una correlación moderada entre los coeficientes de difusión aparente (Dapp para Kurtosis) y la difusión distribuida (DDC para Stretched) con los estadios de fibrosis [135-137]. La correlación de Pearson rondaba el valor de  $r$ : -0,5 y sólo aumentaba a una correlación fuerte ( $r > 0,6$ ) con la inclusión de sujetos sanos en el análisis para que se magnificaran las diferencias [137]. Nuestros resultados

univariantes mostraron que Dapp presenta una correlación débil con el área proporcional de colágeno ( $\rho$ : -0,32) pero moderada con los estadios de fibrosis ( $\rho$ : -0,46), permitiendo discriminar los sujetos con fibrosis avanzada (AUC=0,82; IC95% 0,75-0,90). El Coeficiente de Difusión Aparente (Dapp) destaca como el parámetro de imagen de mayor precisión para diagnosticar y gradar la fibrosis hepática. Sin embargo, los resultados con Dapp ilustran la limitación de la RM: (I) una precisión diagnóstica inferior al FibroScan (AUC-kPa: 0,89 vs AUC-Dapp: 0,82; para fibrosis avanzada); y (II) una especificidad similar entre ambas pruebas (81-82%) con una mayor sensibilidad global por parte del FibroScan (87% vs 69%).

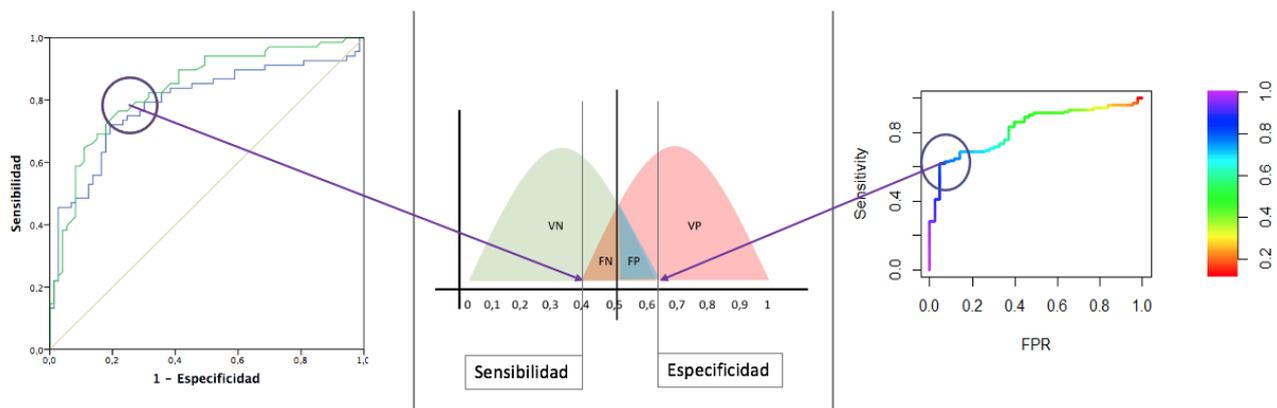
Existen algunos trabajos que han estudiado la correlación entre los valores de RM (principalmente el T1c) y el área proporcional de colágeno [70,71,108]. En población con esteatosis hepática, la correlación de T1c con el área proporcional de colágeno varía desde inexistente ( $r=0,14$  [70]), a débil ( $r=0,3$  [71]) e incluso moderada ( $r=0,57$  [108]). Estos resultados pertenecen al mismo grupo de investigación con una metodología similar (*LiverMultiScan, Perspectum Diagnostics, Oxford, UK*) y la variabilidad de sus resultados demuestra probablemente la dificultad para reproducir los análisis de las imágenes. Es posible que la actividad inflamatoria de la esteatohepatitis suponga un factor de confusión en la evaluación de la fibrosis hepática mediante nuestra aproximación por RM [105]. En línea con los resultados obtenidos por Hoad y colaboradores, el T1c en nuestro estudio se asocia estadísticamente con el marcador de inflamación CD45+ ( $\rho=0,2$ ;  $P=0,017$ ). La inflamación influye pues el tiempo de relajación T1 y dificulta por tanto su uso para diagnosticar la fibrosis. Además, el FibroScan es un biomarcador de primera línea mucho más sencillo y disponible, con una mejor correlación con el área proporcional de colágeno [70,71].

Ante un escenario de incertidumbre y relativa confusión por las múltiples influencias ejercidas por los diferentes factores histológicos sobre la precisión diagnóstica de las diferentes variables analizadas, con capacidad para excluir, pero no para diagnosticar, se ha llevado a cabo en esta Tesis Doctoral un análisis estadístico multivariante. Este modelo predictor utiliza distintos métodos estadísticos, diferentes desenlaces de interés (incluyendo los estadios para

fibrosis, fibrosis significativa, fibrosis avanzada y el área proporcional de fibrosis) e incluyendo todos los parámetros para un mejor ajuste (biomarcadores de primera línea que habían mostrado elevada precisión diagnóstica [NAFLD FS y FibroScan] y los obtenidos de la imagen de RM). De los resultados de este análisis cabe destacar:

- El índice Obuchowski (IO) evaluó la capacidad para discriminar los estadios individuales de la fibrosis. Con la combinación de NAFLD FS, FibroScan y de los parámetros de imagen IVIM, Kurtosis y Stretched se obtuvo un IO=0,93. La precisión con esta combinación es superior a la obtenida mediante el empleo de los biomarcadores no invasivos individuales por separado [29]. La combinación de los biomarcadores séricos con los de imagen ya se ha planteado con el FIB-4 y la Elastografía por RM (índice MEFIB) [191]. En nuestro caso, se seleccionó el NAFLD FS por su mayor fiabilidad en población con EHGNA (ya que el FIB-4 se desarrolló en una población con VHC) y no se disponía en esta Tesis de la Elastografía por RM. Por ello, se empleó el FibroScan combinado con las métricas de RM. Ambos enfoques consiguieron aumentar los valores de especificidad con un VPP por encima de 90% para el diagnóstico de fibrosis significativa [191].
- El valor añadido de utilizar la RM para establecer el diagnóstico de fibrosis significativa no es aumentar la precisión diagnóstica de los biomarcadores, ya que se obtiene un AUC similar al del FibroScan, sino aumentar la especificidad de esa precisión (Figura 47). Aplicando un enfoque secuencial, utilizando el FibroScan en un primer momento y la RM a continuación, podemos aumentar nuestra exactitud global descartando la fibrosis significativa en un primer instante (FibroScan) para diagnosticar la fibrosis significativa en un segundo instante (RM). Este enfoque tiene especial interés dado que la media de elasticidad en nuestra población estudiada fue de 8,6 kPa, que es un valor intermedio que no permite clasificar los casos con fibrosis significativa.
- Tomando el área proporcional de colágeno (APC) como un marcador subrogado de enfermedad avanzada [49,37,228], el análisis de

regresión con KNN permitió a la RM diagnosticar un valor de APC superior a 7,6 con un VPP del 90 y un APC superior al 9,6% con un VPP del 100% (Figura 37). De nuevo, y a pesar de no poder diagnosticar todos los casos positivos debido a su error cuadrático medio (RMSE) del 2%, la elevada especificidad de la imagen permite disminuir el número de casos no clasificados adecuadamente con los biomarcadores de primera línea.



**Figura 47:** Análisis de los distintos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de la fibrosis avanzada. La imagen de la izquierda muestra el área debajo de la curva (AUC) de FibroScan (0,84) y NAFD FS (0,79) para diagnosticar fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ). La imagen de la derecha muestra el AUC de la RM en combinación con el FibroScan y NAFLD FS (0,82). A pesar de mantener una precisión global parecida, el valor de añadir la RM viene dado por un cambio en la ponderación de la sensibilidad y la especificidad para diagnosticar fibrosis significativa. La forma del AUC del FibroScan y el NAFLD FS muestra que predomina la sensibilidad con un elevado VPN para descartar la fibrosis significativa. La forma del AUC de la RM evidencia el predominio de la especificidad con un elevado VPP para diagnosticar fibrosis significativa.

La Fracción Grasa por Densidad Protónica (FGDP) presenta una elevada especificidad en la identificación y gradación de la esteatosis hepática. La prevalencia de esteatosis hepática medida por FGDP ( $>9,1\%$  según el punto de Youden con un 95% de sensibilidad y 85% de especificidad) en nuestra muestra es del 60%, lo que se considera elevada por la presencia de factores metabólicos y de riesgo cardiovascular. En este contexto, la FGDP se ha mostrado como un

predictor independiente de aterosclerosis subclínica [247]. Los puntos de corte para cada grado de esteatosis coinciden entre los rangos de valores reflejados en la literatura (Anexo 1 Tabla 2; S1: 3,7-11,3%; S2: 13-23,7%; S3: 16,7-31,5%). Es importante reconocer que estos umbrales de esteatosis se mantienen en una población heterogénea de enfermedad hepática, ya que la mayoría de los estudios valoran la esteatosis en sujetos con EHGNA como única etiología de daño hepático [66,70,73-77]. Una de las grandes novedades de esta Tesis Doctoral es el análisis de correlación entre la FGDP y el área proporcional de grasa calculada en las biopsias hepáticas mediante Patología Digital computacional. Varios artículos han analizado el porcentaje de esteatosis estimado visualmente por los patólogos al microscopio frente al valor FGDP de la RM, obteniendo una correlación fuerte [79,82,93]. Un análisis computacional de las biopsias escaneadas y más controlado de las imágenes de RM nos permite obtener correlaciones muy altas ( $r=0,88$ ) por la elevada precisión de la FGDP calculada con la secuencia MECSE y corregida por  $T2^*$  y por el multiplico de la frecuencia. Esta correlación fue mayor que la observada para el valor de FibroScan (CAP) y el área proporcional de grasa (Figura 39) [43]. Por todo ello, nuestros resultados confirman la importancia de este parámetro de RM y añaden su validez por la correlación lineal con el área proporcional de grasa en la Patología Digital computacional.

El diagnóstico y la gradación de la actividad necroinflamatoria en las hepatopatías crónicas inflamatorias (etiología vírica y HAI) obtuvo en este estudio resultados poco precisos. Similar a la estimación de la fibrosis, los modelos de Kurtosis y Stretched presentaron una mejor capacidad diagnóstica para diferenciar los estadios de inflamación Batts-Ludwig. En esta valoración destaca de nuevo el Coeficiente de Difusión Aparente (Dapp) que permitió discriminar los sujetos con inflamación avanzada con un AUC de 0,74 (IC95% 0,65-0,83). Numerosos estudios previos muestran también que la capacidad diagnóstica de los modelos de Difusión IVIM y Kurtosis es como mucho moderada, con un coeficiente de correlación inferior a 0,5 y unas AUC inferiores a 0,75 (Anexo 1, Tabla 5). Además, la precisión diagnóstica disminuye en los sujetos con EHGNA ya que la esteatosis ejerce como un factor de confusión (Tabla 17) [129,131].

Un punto importante de esta Tesis Doctoral es la aplicabilidad de la RM para diagnosticar los casos de esteatohepatitis en una población con EHGNA. Es muy relevante resaltar que el valor de la FGDP y el perímetro abdominal de la secuencia MECSE permite identificar correctamente al 88% de los pacientes con esteatohepatitis. El perímetro abdominal se calcula segmentando automáticamente la superficie abdominal con métodos basados en Inteligencia Artificial utilizando redes neuronales convolucionales (CNN) de Aprendizaje Supervisado. Aunque en la práctica clínica diaria no se suele recoger esta medida, pues rara vez se mide el perímetro abdominal de los pacientes en las consultas externas, su extracción desde las imágenes de RM adquiridas es bastante sencilla con estas herramientas automáticas. Un ejemplo de la falta de completitud de este dato en los registros clínicos son los estudios donde se analiza el impacto del riesgo metabólico en la gravedad de la EHGNA, los cuales solamente disponen de la medida del perímetro abdominal en la mitad de los pacientes [117]. Por la asociación entre obesidad central y resistencia insulina [248], se decidió calcular el perímetro abdominal como una variable por imagen a partir de los algoritmos computacionales descritos aplicados a las imágenes MECSE de la RM. Ello permitió, junto con la FGDP, identificar con una elevada precisión aquellos pacientes con esteatohepatitis. Existen diversos estudios que han analizado la rentabilidad de la RM en el diagnóstico de la esteatohepatitis (Anexo1, Tabla 6). De entre ellos, es importante destacar lo siguiente:

- La mayoría de los estudios tienen un tamaño muestral escaso. Solamente el 33% superan los 100 casos [66,69,77]. En todos ellos la prevalencia de esteatohepatitis está adecuadamente representada, en torno al 50% de la muestra.
- Presentan diferentes definiciones de esteatohepatitis con distintas escalas histológicas empleadas (NASH-CRN o FLIP/SAF) y diferentes puntos de corte seleccionados, lo que dificultan las comparaciones entre los estudios.
- De entre los parámetros de imagen analizados, el T1c y la FGDP obtienen buenos resultados, siendo los obtenidos de la difusión y la elastografía por RM de poca utilidad. Destaca el análisis radiómico de NASHMRI en el estudio de Gallego-Durán y colaboradores, con una

AUC de 0,83 [126]. Sin embargo, su tamaño muestra es pequeño (n=87 EHGNA, n=44 esteatohepatitis) y sus resultados todavía no se han validado externamente.

Nuestros resultados de Patología Digital muestran como el área proporcional de grasa aumenta con los valores de la escala NASH-CRN (Figura 31) y también con la categoría de esteatohepatitis definida por el algoritmo FLIP/SAF (Figura 30). En este contexto, no sorprende la rentabilidad de la FGDP para detectar sujetos con esteatohepatitis dado que los depósitos de grasa tienen un papel importante en el desarrollo de la inflamación. Además, el desplazamiento químico entre la fase de las señales de los protones de agua y grasa observado por la secuencia MECSE cuantifica no sólo la cantidad relativa de señal de grasa sino también del agua como marcador de edema en el tejido hepático [249]. Es de reseñar que la combinación de FGDP y la medida del perímetro abdominal aumenta la precisión con la que se diagnosticaba a los sujetos con esteatohepatitis [69]. Estos hallazgos, unidos a que la reducción significativa de la grasa hepática medida por RM se asocia con una mayor resolución de la esteatohepatitis, sitúan a la FGDP como un potencial marcador subrogado de respuesta terapéutica en los ensayos clínicos de la EHGNA [250].

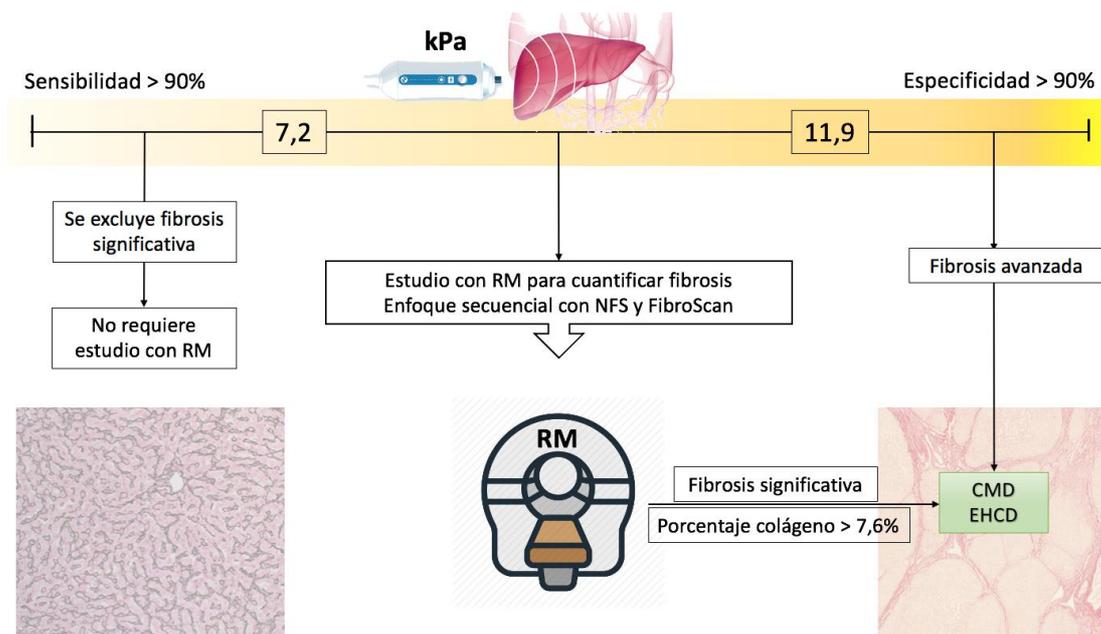
Por último, la sobrecarga de hierro tuvo una baja prevalencia en nuestra población de sujetos con enfermedad hepática y presentación clínica inicial en las consultas de hepatología. Solamente el 15% presentó una concentración de hierro hepático superior a 36  $\mu\text{mol}/\text{gr}$ . A pesar de que la EHGNA suele presentar niveles de hierro en el rango de la normalidad, su cuantificación es importante dada su implicación pronóstica [15,102]. El valor de  $R2^*$  permite diagnosticar la presencia de hemosiderosis con una elevada precisión (AUC de 0,83), presentando en estos niveles bajos una correlación moderada con el área proporcional de hierro ( $r=0,54$ ). La ausencia de una correlación fuerte puede deberse además de a sus bajos valores a la influencia de la grasa hepática sobre el valor de  $R2^*$  [102,103]. A diferencia de los casos con hemocromatosis y elevada sobrecarga de hierro en los que el valor de  $R2^*$  se correlaciona linealmente con el depósito tisular [106,107,111,113], parece que en población con esteatosis hepática el  $R2^*$  refleja mayoritariamente los efectos de susceptibilidad de las vacuolas lipídicas confundiendo la medición precisa de los depósitos de hierro. Aunque las

partículas de hierro tienen efectos de susceptibilidad mucho mayores que las gotas de grasa, dado que la cantidad de hierro que se encuentra en la población con EHGNA es baja y la cantidad de grasa es elevada, la esteatosis hepática parece tener un impacto negativo en la estimación del hierro por los valores  $R2^*$  medidos por RM. En un subanálisis de nuestros datos, segmentando la muestra en sujetos con y sin EHGNA, se pudo confirmar este efecto. Así, los sujetos sin esteatosis hepática presentan una correlación fuerte entre el valor de  $R2^*$  y el área proporcional de hierro ( $r=0,68$ ;  $P<0,001$ ), mientras que por el contrario los casos con esteatosis revelan una correlación débil para el área proporcional de hierro ( $r=0,36$ ;  $P<0,001$ ) y moderada entre el valor de  $R2^*$  y el área proporcional de grasa ( $r=0,59$ ;  $P<0,001$ ). El AUC de  $R2^*$  para discriminar pacientes con sobrecarga de hierro es de 0,91 (IC95% 0,78-0,99) en sujetos sin EHGNA y de 0,8 (IC95% 0,7-0,91) en casos con esteatosis hepática. Estos resultados muestran que, a pesar de que  $R2^*$  es un parámetro preciso para diagnosticar el hierro hepático, su exactitud se ve influida y reducida por un sesgo atribuible a la influencia de la grasa.

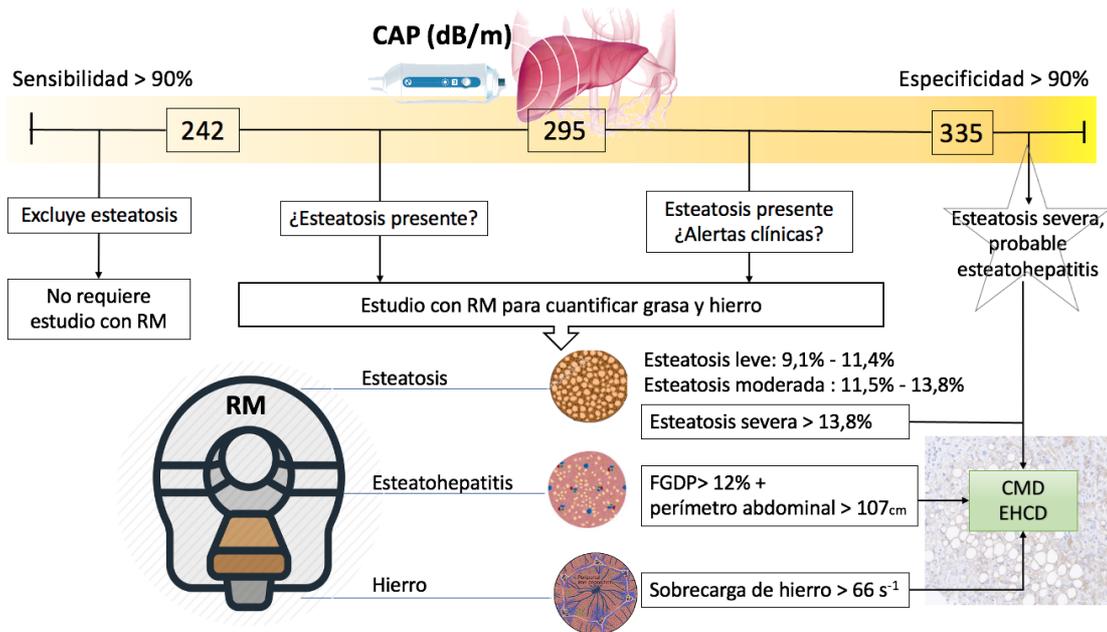
#### 5.4. Árbol de decisión: algoritmos de empleo de los biomarcadores de imagen en la práctica clínica habitual

A partir de toda la información obtenida en esta Tesis Doctoral, se proponen dos algoritmos diagnósticos para el manejo clínico de las hepatopatías crónicas difusas. El punto de partida viene dado por los valores de rigidez hepática (elastografía, kPa) y atenuación controlada (CAP, dB/m) obtenidos con el FibroScan. Se propone este punto de partida porque el FibroScan es una herramienta accesible y de uso diario en las consultas de hepatología, y porque su precisión diagnóstica validada en este estudio ha demostrado ser fiable como prueba de primera línea. Los valores de FibroScan permiten acortar el espectro de pacientes sobre los que hemos de profundizar el estudio.

Para la fibrosis hepática, los puntos de corte seleccionados del FibroScan permiten, con una elevada sensibilidad y especificidad superior al 90%, excluir la fibrosis significativa (<7,2 kPa, 39% de nuestra muestra) y diagnosticar la fibrosis avanzada (>11,9 kPa, 23% de la muestra en esta Tesis). Los casos que se sitúan en la zona gris intermedia (38% de la muestra) no pueden ser clasificados correctamente y, por lo tanto, es en ellos en los que hay que realizar una RM (Figura 48). El objetivo de la RM es identificar los pacientes con fibrosis significativa o con un área proporcional de colágeno superior a 7,6% que deben derivarse a su valoración por un comité multidisciplinar de enfermedades hepáticas crónicas difusas (CMD-EHCD). Como ejemplo, en nuestra población de estudio el 48% de los casos en la zona intermedia fueron diagnosticados con la RM de fibrosis significativa con una especificidad del 92% y un VPP 97%.



**Figura 48:** Algoritmo diagnóstico para la fibrosis hepática. Las flechas dibujan un árbol de decisión clínica de uso en la práctica asistencial en pacientes con enfermedad hepática crónica difusa (EHCD), tamizando los casos que deberían valorarse por un comité multidisciplinar (CMD). Abreviaturas: NFS, *NAFLD Fibrosis Score*; RM, Resonancia Magnética.



**Figura 49:** Algoritmo diagnóstico para la esteatosis, esteatohepatitis y el hierro hepático. Las flechas dibujan un árbol de decisión clínica de uso en la práctica asistencial en pacientes con enfermedad hepática crónica difusa (EHCD), tamizando los casos que deberían ser valorados por un comité multidisciplinario (CMD). Abreviaturas: FGDP, fracción grasa por densidad protónica; RM, Resonancia Magnética.

En cuanto a la esteatosis, los puntos de corte seleccionados del FibroScan presentan una elevada sensibilidad y especificidad, superior al 90%, para diagnosticar la presencia de grasa hepática. Un valor CAP inferior a 242 dB/m excluye la posibilidad de esteatosis (35% de la muestra en nuestro estudio), mientras que un valor superior a 295 dB/m establece la existencia de esteatosis hepática (36% de la muestra). Cuando el valor CAP es superior a 335 dB/m permite diagnosticar la esteatosis severa y esteatohepatitis (18% de la muestra). Así pues, estaría indicada la realización de una RM en los siguientes escenarios (Figura 49):

1. Sujetos cuyos valores CAP se sitúan en la zona intermedia con unos valores de FibroScan comprendidos entre 242 y 295 dB/m (29% de la muestra).

2. Sujetos con valores de FibroScan comprendidos entre 295 y 335 dB/m (18% de la muestra) con datos de alerta clínica por sospecha esteatohepatitis:
  - Aumento del perímetro abdominal ( $\geq 102$  cm en los hombres y  $\geq 88$  cm en las mujeres).
  - Presencia de al menos 2 factores de riesgo metabólico (DM, hipertensión arterial, dislipemia, fumador) o con una puntuación de riesgo cardiovascular elevada (ASCVD  $> 7,5\%$ ).
  - Índice de masa corporal  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>.
  - Sospecha de sobrecarga de hierro en el contexto de ferritina elevada ( $> 200$  ng/mL en mujeres y  $> 300$  ng/mL en hombres).

El objetivo de la RM en el primer supuesto es tipificar los sujetos con esteatosis y gradar su severidad. En la población con valores de FibroScan comprendidos entre 242 y 295 dB/m, la FGDP clasificó al 42% sin esteatosis, el 33% con esteatosis grado I, el 13% con esteatosis grado II, el 12% con grado III y el 9% con esteatohepatitis. Consecuentemente, la RM derivaría un 18% de los pacientes al comité multidisciplinar de enfermedades hepáticas crónicas difusas por indicación de esteatosis severa y/o esteatohepatitis. El objetivo de la RM en el segundo supuesto es identificar de entre los casos diagnosticados por el FibroScan de esteatosis, aquellos con esteatosis severa (FGDP  $> 13,8\%$ ), esteatohepatitis (FGDP  $> 12\%$  y perímetro abdominal  $> 107$ cm) y sobrecarga de hierro ( $R_2^* > 66$  s<sup>-1</sup>). Entre los casos diagnosticados de esteatosis por el FibroScan con datos de alerta clínica asociados, la RM clasificó en nuestra serie al 19% con esteatosis grado III, el 30% con esteatohepatitis y el 15% con sobrecarga de hierro. Consecuentemente, la RM derivaría un 42% de los pacientes al comité multidisciplinar por indicación de esteatosis severa y/o esteatohepatitis y/o sobrecarga de hierro.

## 5.5. Limitaciones y Líneas de Futuro

Esta Tesis Doctoral presenta algunas limitaciones y fortalezas que deben ser comentadas y analizadas.

En cuanto a la Patología Digital, se debe de ser muy específico con las inmunotinciones empleadas para poder detectar de manera selectiva el sustrato patológico de interés y no sobrestimar las áreas proporcionales medidas. La detección de hepatocitos balonzados con IHQ adipofilina y distintas células hematopoyéticas con el marcador CD45 restan especificidad al análisis digital. Además, se debe de interpretar cuidadosamente las comparaciones entre medidas cuantitativas objetivas de la Patología Digital y escalas semicuantitativas subjetivas basadas en patrones morfológicos o arquitecturales. En algunos casos, la ausencia de diferencias puede deberse a que ambos enfoques son inherentemente distintos y analizan diferentes aspectos de la entidad. Así, por ejemplo, los cambios morfológicos son fundamentales para la caracterización de los estadios de fibrosis bajo e intermedio y de los distintos grados de inflamación donde el aporte cuantitativo de colágeno y células inflamatorias es menor, no siendo capaz de reemplazar la evaluación del patólogo. Además, el cálculo del área proporcional de inflamación o de hierro no permite valorar la distribución de su afectación, es decir, si la inflamación es lobular o portal y si los depósitos de hierro son parenquimatosos o mesenquimales.

Respecto a la RM, es posible que todavía se requiera ajustar mejor los protocolos de adquisición y procesamiento de las imágenes digitales para la cuantificación simultánea de los distintos sustratos patológicos dada la contribución múltiple y las inferencias producidas en los cambios de señal, como los ejemplos mencionados del impacto de la esteatosis en el modelo IVIM y  $R_2^*$  o la inflamación en la intensidad de señal T1. La selección de ROI puede además no reflejar la distribución heterogénea de la enfermedad hepática y nuestro grupo de investigación está trabajando en la segmentación automática de todo el hígado con modelos de Aprendizaje Supervisado e Inteligencia Artificial, para superar esta limitación.

Finalmente, la naturaleza transversal del estudio no permite la evaluación de los cambios por imagen durante la evolución de las hepatopatías crónicas para determinar los umbrales críticos de irreversibilidad de la enfermedad, la asignación del tratamiento médico y la evaluación del efecto terapéutico.

Esta Tesis Doctoral también posee algunas fortalezas y define nuevas estrategias que deben destacarse. Se trata de un estudio prospectivo con una población bien caracterizada de sujetos con hepatopatía crónica con una distribución adecuada de los diferentes sustratos patológicos investigados. Esta información nos acerca al escenario de la práctica clínica habitual en el manejo de las enfermedades hepáticas en los Servicios de Digestivo. Para reducir el sesgo institucional, la evaluación histopatológica se centralizó en el Hospital Clínico mientras que el análisis de imagen se realizó en el Hospital La Fe. Dentro de la complejidad del análisis computacional de las imágenes, se han utilizado herramientas sencillas sin requerimiento de componentes complejos. Por ejemplo, la RM empleó secuencias de imagen que pueden ser realizadas en todo hospital terciario y evitó el uso de contraste organoespecífico o de dispositivos externos como la Elastografía por RM de la que carecen la mayoría de los centros. También, el análisis de Patología Digital se basó en parámetros elementales como el color y la forma de las biopsias escaneadas, evitando algoritmos complejos de aprendizaje supervisado y dispositivos específicos como la microscopía de detección de segundo armónico. La naturaleza automatizada del análisis computacional de las imágenes digitales proporciona datos altamente reproducibles y facilita su aplicabilidad. Finalmente, los resultados obtenidos de la RM multiparamétrica permiten cambiar el enfoque diagnóstico de los biomarcadores no invasivos desde una perspectiva basada en la exclusión de la enfermedad a un diagnóstico orientado a la inclusión de la enfermedad.

Como líneas de desarrollo en las que ya está trabajando mencionar la enorme importancia de la segmentación automática del hígado para extraer la información de la proporción de grasa, la cantidad de hierro y la presencia de colágeno e inflamación de todo el hígado.

Estas herramientas de Inteligencia Artificial pueden también entrenarse para extraer automáticamente estos parámetros sin necesidad de utilizar modelos predefinidos. Incluso los desarrollos de radiómica con análisis de texturas y matrices de coocurrencia pueden mejorar la estimación de aspectos que se escapan al análisis preciso como son la fibrosis y la inflamación. Esta misma Inteligencia Artificial puede ser de utilidad para mejorar el análisis computacional de la Patología Digital al analizar también patrones de afectación, tan relevantes en la fibrosis y la inflamación. Finalmente, todos los resultados de esta Tesis Doctoral deben transferirse a la práctica clínica mediante la innovación con informes estructurados en FibroScan y RM que incluyan las estimaciones y sugieran la conducta a seguir. Estos informes estructurados serán la base además de la validación de los biomarcadores y los algoritmos propuestos en una nueva serie de casos prospectivos.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

- La Patología Digital permite cuantificar de forma precisa y objetiva las lesiones histológicas de las hepatopatías crónicas mediante un análisis computacional. Su reproducibilidad es muy elevada pero su precisión todavía está limitada cuando se compara con escalas histológicas basadas principalmente en los cambios morfológicos.
- Los biomarcadores no invasivos de primera línea, principalmente el FibroScan, permiten excluir con una elevada sensibilidad la presencia de fibrosis y esteatosis. Sin embargo, alrededor de un 30% de los sujetos en su evaluación clínica inicial no pueden clasificarse adecuadamente con esta técnica.
- La RM multiparamétrica empleada en este estudio permite diagnosticar con una elevada especificidad la presencia de fibrosis significativa, cualquier grado de esteatosis y la presencia de sobrecarga de hierro hepático. La RM permite por ello seleccionar a aquellos pacientes que deben ser remitidos a un comité multidisciplinar de enfermedades hepáticas crónicas difusas.
- El diagnóstico y la gradación de la actividad inflamatoria por cualquier biomarcador analítico y de RM es limitado y no puede sustituir la indicación de la biopsia hepática. En la población con enfermedad hepática grasa no alcohólica, la fracción grasa por densidad protónica elevada (12%) tiene un papel en la identificación de la esteatohepatitis.



# REFERENCIAS



## REFERENCIAS

1. Gines P, Graupera I, Lammert F, et al. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2016; 1:256–60.
2. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int.* 2018; 38 Suppl 1:2-6.
3. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017; 390:1211-1259.
4. Asrani SK, Kouznetsova M, Ogola G, et al. Increasing Health Care Burden of Chronic Liver Disease Compared With Other Chronic Diseases, 2004-2013. *Gastroenterology.* 2018;155(3):719-729.e4.
5. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020; 73:202-209.
6. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest.* 2017; 127:55–64.
7. Caballería L, Pera G, Arteaga I, et al. High Prevalence of Liver Fibrosis Among European Adults With Unknown Liver Disease: A Population-Based Study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018; 16(7):1138-1145.e5.
8. Kwok R, Choi KC, Wong GL, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut.* 2016; 65(8):1359-1368.
9. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, et al. The epidemiology of cirrhosis in the United States: a population-based study. *J Clin Gastroenterol.* 2015; 49:690-696

10. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015; 149(2):389-97.e10.
11. Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2012; 56:1171–1180.
12. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64(1):73-84.
13. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019; 69(6):2672-2682.
14. Nasr P, Fredrikson M, Ekstedt M, Kechagias S. The amount of liver fat predicts mortality and development of type 2 diabetes in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2020; 40:1069-1078.
15. Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, et al.; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011; 53:448-457.
16. Simon TG, Roelstraete B, Khalili H, et al. Mortality in biopsy-confirmed nonalcoholic fatty liver disease: results from a nationwide cohort. *Gut*. 2020; gutjnl-2020-322786.
17. Myers RP, Fong A, Shaheen AAM. Utilization rates, complications and costs of percutaneous liver biopsy: a population based study including 4275 biopsies. *Liver Int*. 2008; 28:705–712.
18. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, et al; LIDO Study Group. Sampling Variability of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2005; 128: 1898–1906.
19. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38:1449–1457.
20. Davison BA, Harrison SA, Cotter G, et al. Suboptimal reliability of liver biopsy evaluation has implications for randomized clinical trials. *J Hepatol*. 2020; 73(6):1322-1332.

21. European Society of Radiology (ESR). ESR statement on the validation of imaging biomarkers. *Insights Imaging*. 2020; 11:76.
22. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*. 1995; 19(12):1409-17.
23. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, et al. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut*. 2006; 55:569-578.
24. Poynard T, Lenaour G, Vaillant JC, et al. Liver biopsy analysis has a low level of performance for diagnosis of intermediate stages of fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012; 10:657-663.e7.
25. European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016; 64(6):1388-402.
26. Dufour JF, Caussy C, Loomba R. Combination therapy for non-alcoholic steatohepatitis: rationale, opportunities and challenges. *Gut*. 2020; 69(10):1877-1884.
27. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019; 156:1264–1281.
28. Srivastava A, Gailer R, Tanwar S, et al. Prospective evaluation of a primary care referral pathway for patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2019; 71:371–378.
29. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016; 65(3):570-578.
30. Berzigotti A, França M, Martí-Aguado D, Martí-Bonmatí L. Imaging biomarkers in liver fibrosis. *Radiología*. 2018; 60(1):74-84.
31. Tapper EB, Castera L, Afdhal NH. FibroScan (vibration-controlled transient elastography): where does it stand in the United States practice. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015; 13:60-7.

32. Hsu C, Caussy C, Imajo H, et al. Magnetic Resonance vs Transient Elastography Analysis of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Pooled Analysis of Individual Participants. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019; 17:630–637.
33. Marti-Aguado D, Rodríguez-Ortega A, Alberich-Bayarri A, Marti-Bonmati L. Magnetic Resonance imaging analysis of liver fibrosis and inflammation: overwhelming gray zones restrict clinical use. *Abdom Radiol (NY)*. 2020; 45(11):3557-3568.
34. Paradis V, Quaglia A. Digital pathology, what is the future? *J Hepatol*. 2019; 70:1016-1018.
35. Forlano R, Mullish BH, Giannakeas N, et al. High-Throughput, Machine Learning-Based Quantification of Steatosis, Inflammation, Ballooning, and Fibrosis in Biopsies From Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020; 18(9):2081-2090.e9.
36. Israelsen M, Guerrero Misas M, Koutsoumourakis A, et al. Collagen proportionate area predicts clinical outcomes in patients with alcohol-related liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020; 52(11-12):1728-1739.
37. Buzzetti E, Hall A, Ekstedt M, et al. Collagen proportionate area is an independent predictor of long-term outcome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019; 49:1214-1222.
38. Abudhaise H, Luong TV, Watkins J, et al. Reliability and Accuracy of Clinical Assessment and Digital Image Analysis for Steatosis Evaluation in Discarded Human Livers. *Transplant Proc*. 2019; 51(6):1679-1683.
39. Munsterman ID, van Erp M, Weijers G, et al. A novel automatic digital algorithm that accurately quantifies steatosis in NAFLD on histopathological whole-slide images. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019; 96:521-528.
40. Stasi C, Tsochatzis EA, Hall A, et al. Comparison and correlation of fibrosis stage assessment by collagen proportionate area (CPA) and the ELF panel in patients with chronic liver disease. *Dig Liver Dis*. 2019; 51:1001-1007.
41. Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, et al. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Commun*. 2017; 2:58-68.

42. Jedrzkiewicz J, Bronner MP, Salama ME, et al. Liver fibrosis quantification by digital whole slide imaging and two photon microscopy with second harmonic generation. *Int J Pathol Clin Res.* 2018; 4:078.
43. Mendes LC, Ferreira PA, Miotto N, et al. Elastogram quality assessment score in vibration-controlled transient elastography: Diagnostic performance compared to digital morphometric analysis of liver biopsy in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2018; 25:335-343.
44. Zhou Y, Ru GQ, Yan R, et al. An Inexpensive Digital Image Analysis Technique for Liver Fibrosis Quantification in Chronic Hepatitis B Patients. *Ann Hepatol.* 2017; 16(6):881-887.
45. Halász T, Horváth G, Kiss A, et al. Evaluation of Histological and non-Invasive Methods for the Detection of Liver Fibrosis: The Values of Histological and Digital Morphometric Analysis, Liver Stiffness Measurement and APRI Score. *Pathol Oncol Res.* 2016; 22(1):1-6.
46. Stasi C, Leoncini L, Biagini MR, et al. Assessment of liver fibrosis in primary biliary cholangitis: Comparison between indirect serum markers and fibrosis morphometry. *Dig Liver Dis.* 2016; 48(3):298-301.
47. Yegin EG, Yegin K, Karatay E, et al. Quantitative assessment of liver fibrosis by digital image analysis: Relationship to Ishak staging and elasticity by shear-wave elastography. *J Dig Dis.* 2015; 16(4):217-227.
48. Campos CFF, Paiva DD, Perazzo H, et al. An inexpensive and worldwide available digital image analysis technique for histological fibrosis quantification in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2014; 21:216-222.
49. Huang Y, de Boer WB, Adams LA, et al. Image analysis of liver biopsy samples measures fibrosis and predicts clinical outcome. *J Hepatol.* 2014; 61:22-27.
50. Hall AR, Green AC, Luong TV, et al. The use of guideline images to improve histological estimation of hepatic steatosis. *Liver Int.* 2014; 34(9):1414-27.
51. Hall AR, Dhillon AP, Green AC, et al. Hepatic steatosis estimated microscopically versus digital image analysis. *Liver Int.* 2013; 33:926-935.
52. Abe T, Hashiguchi A, Yamazaki K, et al. Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens. *Pathol Int.* 2013; 63:305-310.

53. Hall A, Germani G, Isgro G, et al. Fibrosis distribution in explanted cirrhotic livers. *Histopathology*. 2012; 60(2):270-277.
54. Manousou P, Dhillon AP, Isgro G, et al. Digital image analysis of liver collagen predicts clinical outcome of recurrent hepatitis C virus 1 year after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2011; 17(2):178-188.
55. Calvaruso V, Burroughs AK, Standish R, et al. Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology*. 2009; 49:1236-1244.
56. Turlin B, Ramm GA, Purdie DM, et al. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. *Liver Int*. 2009; 29:530-535.
57. McPherson S, Jonsson JR, Cowin GJ, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered. *J Hepatol*. 2009; 51(2):389-397.
58. El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, et al. Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of a gold standard. *Ann Surg*. 2009; 250(5):691-697.
59. O'Brien MJ, Keating NM, Elderiny S, et al. An assessment of digital image analysis to measure fibrosis in liver biopsy specimens of patients with chronic hepatitis C. *Am J Clin Pathol*. 2000; 114(5):712-718.
60. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores: Comparison with serum markers. *Journal of Hepatology*. 1998; 28: 439-446.
61. Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, et al. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology*. 1997; 25(4):1028-1031.
62. Turlin B, Mendler MH, Moirand R, et al. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol*. 2001; 116: 263-70.
63. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD; American Association for the Study of Liver Diseases. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009; 49(3):1017-1044.

64. Martí-Bonmatí L, Delgado F. MR imaging in liver cirrhosis: classical and new approaches. *Insights Imaging*. 2010; 1(4):233-244.
65. Reeder SB, Sirlin CB. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2010; 18:337–357.
66. Lee YS, Yoo YJ, Jung YK, et al. Multiparametric MR Is a Valuable Modality for Evaluating Disease Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020; 11(4):e00157.
67. Vieira J, Amorim J, Marti-Bonmati L, et al. Quantifying steatosis in the liver and pancreas with MRI in patient with chronic liver disease. *Radiologia*. 2020; 62(3):222-228.
68. Park CC, Hooker C, Hooker JC, et al. Assessment of a high-SNR chemical-shift-encoded MRI with complex reconstruction for proton density fat fraction (PDFF) estimation overall and in the low-fat range. *J Magn Reson Imaging*. 2019; 49(1):229-238.
69. Wildman-Tobriner B, Middleton MM, Moylan CA, et al. Association Between Magnetic Resonance Imaging-Proton Density Fat Fraction and Liver Histology Features in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease or Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2018; 155(5):1428-1435.e2.
70. Eddowes PJ, McDonald N, Davies N, et al. Utility and cost evaluation of multiparametric magnetic resonance imaging for the assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018; 47(5):631-644.
71. McDonald N, Eddowes PJ, Hodson J, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging for quantitation of liver disease: a two-centre cross-sectional observational study. *Sci Rep*. 2018; 8(1):9189.
72. França M, Alberich-Bayarri A, Marti-Bonmati L, et al. Accurate simultaneous quantification of liver steatosis and iron overload in diffuse liver diseases with MRI. *Abdom Radiol (NY)*. 2017; 42(5):1434-1443.
73. Hong CW, Mamidipalli A, Hooker JC, et al. MRI proton density fat fraction is robust across the biologically plausible range of triglyceride spectra in adults with nonalcoholic steatohepatitis. *J Magn Reson Imaging*. 2018; 47(4):995-1002.
74. Middleton MS, Heba ER, Hooker CA, et al. Agreement Between Magnetic Resonance Imaging Proton Density Fat Fraction Measurements and

- Pathologist-Assigned Steatosis Grades of Liver Biopsies From Adults With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2017; 153(3):753-761.
75. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017; 152(3):598-607.e2.
76. Paige JS, Bernstein GS, Heba E, et al. A Pilot Comparative Study of Quantitative Ultrasound, Conventional Ultrasound, and MRI for Predicting Histology-Determined Steatosis Grade in Adult Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *AJR Am J Roentgenol*. 2017; 208(5):W168-W177.
77. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, et al. Magnetic resonance imaging more accurately classifies steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease than transient elastography. *Gastroenterology*. 2016; 150(3):626-637 e627.
78. Wang X, Hernando D, Reeder SB. Sensitivity of chemical shift-encoded fat quantification to calibration of fat MR spectrum. *Magn Reson Med*. 2016; 75(2):845-851.
79. Kukuk GM, Hittatiya K, Sprinkart AM, et al. Comparison between modified Dixon MRI techniques, MR spectroscopic relaxometry, and different histologic quantification methods in the assessment of hepatic steatosis. *Eur Radiol*. 2015; 25(10):2869-2879.
80. Schwimmer JB, Middleton MS, Behling C, et al. Magnetic resonance imaging and liver histology as biomarkers of hepatic steatosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2015; 61(6):1887-1895.
81. Tyagi A, Yeganeh O, Levin Y, et al. Intra- and inter-examination repeatability of magnetic resonance spectroscopy, magnitude-based MRI, and complex-based MRI for estimation of hepatic proton density fat fraction in overweight and obese children and adults. *Abdom Imaging*. 2015; 40(8):3070-3077.
82. Tang A, Desai A, Hamilton G, et al. Accuracy of MR imaging-estimated proton density fat fraction for classification of dichotomized histologic steatosis grades in nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology*. 2015; 274(2):416-425.

83. Bashir MR, Zhong X, Nickel MD, et al. Quantification of hepatic steatosis with a multistep adaptive fitting MRI approach: prospective validation against MR spectroscopy. *AJR Am J Roentgenol.* 2015; 204(2):297-306.
84. Idilman IS, Keskin O, Celik A, et al. A comparison of liver fat content as determined by magnetic resonance imaging-proton density fat fraction and MRS versus liver histology in non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Radiol.* 2016; 57(3):271-278.
85. Paparo F, Cenderello G, Revelli M, et al. Diagnostic value of MRI proton density fat fraction for assessing liver steatosis in chronic viral C hepatitis. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:758164.
86. Jimenez-Aguero R, Emparanza JI, Beguiristain A, et al. Novel equation to determine the hepatic triglyceride concentration in humans by MRI: diagnosis and monitoring of NAFLD in obese patients before and after bariatric surgery. *BMC Med.* 2014; 12:137.
87. Kuhn JP, Jahn C, Hernando D, et al. T1 bias in chemical shift-encoded liver fat-fraction: role of the flip angle. *J Magn Reson Imaging.* 2014; 40(4):875-883.
88. Zhong X, Nickel MD, Kannengiesser SA, et al. Liver fat quantification using a multi-step adaptive fitting approach with multi-echo GRE imaging. *Magn Reson Med.* 2014; 72(5):1353-1365.
89. Tang A, Tan J, Sun M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: MR imaging of liver proton density fat fraction to assess hepatic steatosis. *Radiology.* 2013; 267(2):422-431.
90. Idilman IS, Aniktar H, Idilman R, et al. Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy. *Radiology.* 2013; 267(3):767-775.
91. Nouredin M, Lam J, Peterson MR, et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology.* 2013; 58(6):1930-1940.
92. Permutt Z, Le TA, Peterson MR, et al. Correlation between liver histology and novel magnetic resonance imaging in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease - MRI accurately quantifies hepatic steatosis in NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 36(1):22-29.

93. Kuhn JP, Hernando D, Muñoz del Rio A, et al. Effect of multipeak spectral modeling of fat for liver iron and fat quantification: correlation of biopsy with MR imaging results. *Radiology*. 2012; 265(1):133-142.
94. Yu H, Shimakawa A, Hines CD, et al. Combination of complex-based and magnitude-based multiecho water-fat separation for accurate quantification of fat-fraction. *Magn Reson Med*. 2011; 66(1):199-206.
95. Meisamy S, Hines CD, Hamilton G, et al. Quantification of hepatic steatosis with T1-independent, T2-corrected MR imaging with spectral modeling of fat: blinded comparison with MR spectroscopy. *Radiology*. 2011; 258(3):767-775.
96. Yokoo T, Shiehorteza M, Hamilton G, et al. Estimation of hepatic proton-density fat fraction by using MR imaging at 3.0 T. *Radiology*. 2011; 258(3):749-759.
97. Hines CD, Frydrychowicz A, Hamilton G, et al. T(1) independent, T(2) (\*) corrected chemical shift based fat-water separation with multi-peak fat spectral modeling is an accurate and precise measure of hepatic steatosis. *J Magn Reson Imaging*. 2011; 33(4):873-881.
98. Kang GH, Cruite I, Shiehorteza M, et al. Reproducibility of MRI-determined proton density fat fraction across two different MR scanner platforms. *J Magn Reson Imaging*. 2011; 34(4):928-934.
99. Hu HH, Kim HW, Nayak KS, Goran MI. Comparison of fat-water MRI and single-voxel MRS in the assessment of hepatic and pancreatic fat fractions in humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; 18(4):841-847.
100. Yokoo T, Bydder M, Hamilton G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and fat-grading accuracy of low-flip-angle multiecho gradient-recalled-echo MR imaging at 1.5 T. *Radiology*. 2009; 251(1):67-76.
101. Reeder SB, Robson PM, Yu H, et al. Quantification of hepatic steatosis with MRI: the effects of accurate fat spectral modeling. *J Magn Reson Imaging*. 2009; 29(6):1332-1339.
102. Bashir MR, Wolfson T, Gamst AC, et al. Hepatic R2\* is more strongly associated with proton density fat fraction than histologic liver iron scores in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Magn Reson Imaging*. 2019; 49(5):1456-1466.

103. Karlsson, M., Ekstedt, M., Dahlstrom, N., et al. Liver R2\* is affected by both iron and fat: A dual biopsy-validated study of chronic liver disease. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2019; 50:325-333.
104. d'Assignies G, Paisant A, Bardou-Jacquet E, et al. Non-invasive measurement of liver iron concentration using 3-Tesla magnetic resonance imaging: validation against biopsy. *Eur Radiol*. 2018; 28(5):2022-2030.
105. Hoad, C. L., Palaniyappan, N., Kaye, P., et al. A study of T1 relaxation time as a measure of liver fibrosis and the influence of confounding histological factors. *NMR Biomed*. 2015; 28:706- 714.
106. Henninger B, Zoller H, Rauch S, et al. R2\* relaxometry for the quantification of hepatic iron overload: biopsy-based calibration and comparison with the literature. *Rofo*. 2015; 187(6):472-479.
107. Garbowski MW, Carpenter JP, Smith G, et al. Biopsy-based calibration of T2\* magnetic resonance for estimation of liver iron concentration and comparison with R2 Ferriscan. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2014; 16(1):40.
108. Banerjee R, Pavlides M, Tunnicliffe EM, et al. Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease. *J Hepatol*. 2014; 60(1):69-77.
109. Allkemper T, Sagmeister F, Cicinnati V, et al. Evaluation of fibrotic liver disease with whole-liver T1ρ MR imaging: a feasibility study at 1.5 T. *Radiology*. 2014; 271(2):408-415.
110. Bulow R, Mensel B, Meffert P, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for staging liver fibrosis is less reliable in the presence of fat and iron. *Eur Radiol*. 2013; 23(5):1281-1287.
111. Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, et al. R2\* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*. 2009; 113(20):4853-4855.
112. Virtanen JM, Komu ME, Parkkola RK. Quantitative liver iron measurement by magnetic resonance imaging: in vitro and in vivo assessment of the liver to muscle signal intensity and the R2\* methods. *Magnetic Resonance Imaging*. 2008; 26(8):1175-1182.
113. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, et al. MRI R2 and R2\* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005; 106(4):1460-1465.

114. Alustiza JMJ, Artetxe JJ, Castiella AA, et al. MR quantification of hepatic iron concentration. *Radiology* 2004; 230:479-484.
115. Gandon Y, Olivie D, Guyader D, et al. Noninvasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *The Lancet*. 2004; 363:357-62.
116. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2008; 336:924-926.
117. Ampuero, J, Aller, R, Gallego-Durán, R, et al. The effects of metabolic status on non-alcoholic fatty liver disease-related outcomes, beyond the presence of obesity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018; 48:1260-1270.
118. Choi HSJ, Brouwer WP, Zanjir WMR, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is Associated with Liver-Related Outcomes and All-Cause Mortality in Chronic Hepatitis B. *Hepatology*. 2020; 71(2):539-548.
119. Yokoo T, Browning JD. Fat and iron quantification in the liver: past, present, and future. *Top Magn Reson Imaging*. 2014; 23(2):73-94.
120. Martí-Aguado D, Alberich-Bayarri Á, Martín-Rodríguez JL, et al. Differences in multi-echo chemical shift encoded MRI proton density fat fraction estimation based on multifrequency fat peaks selection in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Radiol*. 2020; 75(11):880.e5-880.e12.
121. Younossi ZM, Noureddin M, Bernstein D, et al. Role of Noninvasive Tests in Clinical Gastroenterology Practices to Identify Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis at High Risk of Adverse Outcomes: Expert Panel Recommendations. *Am J Gastro*. 2020; doi: 10.14309/ajg.0000000000001054.
122. França M, Carvalho JG. MR imaging assessment and quantification of liver iron. *Abdom Radiol (NY)*. 2020; 45(11):3400-3412.
123. Vilar-Gomez E; Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients with Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study. *Gastroenterology*. 2018; 155:443-457.
124. Loomba R, Wolfson T, Ang B, et al. Magnetic Resonance Elastography Predicts Advanced Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Prospective Study. *Hepatology*. 2014; 60(6):1920-1928.

125. Marti-Bonmati L, Talens A, del Olmo J, et al. Chronic hepatitis and cirrhosis: evaluation by means of MR imaging with histologic correlation. *Radiology*. 1993;188(1):37-43.
126. Gallego-Durán R, Cerro-Salido P, Gomez-Gonzalez E, et al. Imaging biomarkers for steatohepatitis and fibrosis detection in non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2016; 6:31421.
127. Pavlides M, Banerjee R, Tunnicliffe EM, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging for the assessment of nonalcoholic fatty liver disease severity. *Liver Int*. 2017; 37:1065-1073.
128. Tosun M, Onal T, Uslu H, et al. Intravoxel incoherent motion imaging for diagnosing and staging the liver fibrosis and inflammation. *Abdom Radiol*. 2020; 45:15-23.
129. Kim JW, Lee YS, Park YS, et al. Multiparametric MR Index for the Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 2020; 10(1):2671.
130. Gulbay M, Ciliz DS, Celikbas AK, et al. Intravoxel incoherent motion parameters in the evaluation of chronic hepatitis B virus-induced hepatic injury: fibrosis and capillarity changes. *Abdom Radiol (NY)*. 2020; 45(8):2345-2357.
131. Lefebvre T, Hebert M, Bilodeau L, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MRI for the characterization of inflammation in chronic liver disease. *Eur Radiol*. 2020; doi: 10.1007/s00330-020-07203-y.
132. Fu F, Li X, Chen C, et al. Non-invasive assessment of hepatic fibrosis: comparison of MR elastography to transient elastography and intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MRI. *Abdom Radiol (NY)*. 2020; 45(1):73-82.
133. Zawada E, Serafin Z, Dybowska D, et al. Monoexponential and Biexponential Fitting of Diffusional Magnetic Resonance Imaging Signal Analysis for Prediction of Liver Fibrosis Severity. *J Comput Assist Tomogr*. 2019; 43(6):857-862.
134. Idilman IS, Venkatesh SH, Eaton JE, et al. Magnetic resonance imaging features in 283 patients with primary biliary cholangitis. *Eur Radiol*. 2020; 30(9):5139-5148.

135. Yoon JH, Lee JM, Lee KB, et al. Comparison of monoexponential, intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging and diffusion kurtosis imaging for assessment of hepatic fibrosis. *Acta Radiol.* 2019; 60(12):1593-1601.
136. Yang L, Rao S, Wang W, et al. Staging liver fibrosis with DWI: is there an added value for diffusion kurtosis imaging? *Eur Radiol.* 2018; 28(7):3041-3049.
137. Seo N, Chung YE, Park YN, et al. Liver fibrosis: stretched exponential model outperforms mono-exponential and bi-exponential models of diffusion-weighted MRI. *Eur Radiol.* 2018; 28(7):2812-2822.
138. Sandrasegaran K, Territo P, Elkady RM, et al. Does intravoxel incoherent motion reliably stage hepatic fibrosis, steatosis, and inflammation? *Abdom Radiol.* 2018; 43(3):600606.
139. Leitao HS, Doblaz S, Garteiser P, et al. Hepatic Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: Influence on the MR Viscoelastic and Diffusion Parameters in Patients with Chronic Liver Disease. *Radiology.* 2017; 283(1):98-107.
140. França M, Marti-Bonmati L, Alberich-Bayarri A, et al. Evaluation of fibrosis and inflammation in diffuse liver diseases using intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging. *Abdom Radiol.* 2017; 42(2):468-477.
141. Wu CH, Ho MC, Jeng YM, et al. Assessing hepatic fibrosis: comparing the intravoxel incoherent motion in MRI with acoustic radiation force impulse imaging in US. *Eur Radiol.* 2015;25(12):3552-3559.
142. Kocakoc E, Bakan AA, Poyrazoglu OK, et al. Assessment of Liver Fibrosis with Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Using Different b-values in Chronic Viral Hepatitis. *Med Princ Pract.* 2015; 24(6):522-526.
143. Singh A, Reddy D, Haris M, et al. T1 $\rho$  MRI of healthy and fibrotic human livers at 1.5 T. *J Transl Med.* 2015; 13:292.
144. Parente DB, Paiva FF, Oliveira Neto JA, et al. Intravoxel Incoherent Motion Diffusion Weighted MR Imaging at 3.0 T: Assessment of Steatohepatitis and Fibrosis Compared with Liver Biopsy in Type 2 Diabetic Patients. *PLoS ONE.* 2015; 10(5): e0125653.
145. Murphy P, Hooker J, Ang B, et al. Associations between histologic features of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and quantitative diffusion-

- weighted MRI measurements in adults. *J Magn Reson Imaging*. 2015; 41(6):1629-1638.
146. Takayama Y, Nishie A, Asayama Y, et al. T1 $\rho$  Relaxation of the liver: A potential biomarker of liver function. *J Magn Reson Imaging*. 2015; 42(1):188-95.
147. Chung SR, Lee SS, Kim N, et al. Intravoxel incoherent motion MRI for liver fibrosis assessment: a pilot study. *Acta Radiol*. 2015; 56(12):1428-1436.
148. Yoon JH, Lee JM, Baek JH, et al. Evaluation of hepatic fibrosis using intravoxel incoherent motion in diffusionweighted liver MRI. *J Comput Assist Tomogr*. 2014; 38(1):110-116.
149. Onur MR, Poyraz AK, Bozdogan PG, et al. Diffusion weighted MRI in chronic viral hepatitis: correlation between ADC values and histopathological scores. *Insights Imaging*. 2013; 4(3):339-345.
150. Vaziri-Bozorg SM, Ghasemi-Esfe AR, Khalilzadeh O, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for diagnosis of liver fibrosis and inflammation in chronic viral hepatitis: the performance of low or high B values and small or large regions of interest. *Can Assoc Radiol J*. 2012; 63(4):304-311.
151. Kovac JD, Dakovic M, Stanisavljevic D, et al. Diffusion-weighted MRI versus transient elastography in quantification of liver fibrosis in patients with chronic cholestatic liver diseases. *Eur J Radiol*. 2012; 81(10):2500-2506.
152. Pasquinelli F, Belli G, Mazzoni LN, et al. MR-diffusion imaging in assessing chronic liver diseases: does a clinical role exist? *Radiol Med*. 2012; 117(2):242-253.
153. Watanabe H, Kanematsu M, Goshima S, et al. Staging hepatic fibrosis: comparison of gadoxetate disodium-enhanced and diffusion-weighted MR imaging--preliminary observations. *Radiology*. 2011; 259(1):142-150.
154. Wang Y, Ganger DR, Levitsky J, et al. Assessment of chronic hepatitis and fibrosis: comparison of MR elastography and diffusion-weighted imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2011; 196(3):553-561.
155. Fujimoto K, Tonan T, Azuma S, et al. Evaluation of the mean and entropy of apparent diffusion coefficient values in chronic hepatitis C: correlation with

## Referencias

- pathologic fibrosis stage and inflammatory activity grade. *Radiology*. 2011; 258(3):739-48.
156. Sandrasegaran K, Akisik FM, Lin C, et al. Value of diffusion-weighted MRI for assessing liver fibrosis and cirrhosis. *AJR Am J Roentgenol*. 2009; 193(6):1556-60.
157. Taouli B, Chouli M, Martin AJ, et al. Chronic hepatitis: role of diffusion-weighted imaging and diffusion tensor imaging for the diagnosis of liver fibrosis and inflammation. *J Magn Reson Imaging*. 2008; 28(1):89-95.
158. Girometti R, Furlan A, Bazzocchi M, et al. Diffusionweighted MRI in evaluating liver fibrosis: a feasibility study in cirrhotic patients. *Radiol Med*. 2007; 112(3):394-408.
159. Taouli B, Tolia AJ, Losada M, et al. Diffusion-weighted MRI for quantification of liver fibrosis: preliminary experience. *AJR Am J Roentgenol*. 2007; 189(4):799-806.
160. Lewin M, Poujol-Robert A, Boelle PY, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2007; 46(3):658-665.
161. Koinuma M, Ohashi I, Hanafusa K, Shibuya H. Apparent diffusion coefficient measurements with diffusion-weighted magnetic resonance imaging for evaluation of hepatic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2005; 22(1):80-5.
162. Boulanger Y, Amara M, Lepanto L, et al. Diffusion-weighted MR imaging of the liver of hepatitis C patients. *NMR Biomed*. 2003; 16(3):132-6.
163. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981; 1(5):431-435.
164. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011; 378(9793):804-814.
165. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015; 351:h5527.
166. Patel YA, Imperial JC, Muir AJ, et al; Liver Forum's Data Standardization Working Group. Baseline Parameters in Clinical Trials for Nonalcoholic

- Steatohepatitis: Recommendations from the Liver Forum. *Gastroenterology*. 2017; 153(3):621-625.e7.
167. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004; 109:433-438.
168. Sytkowski PA, Kannel WB, D'agostino RB. Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990; 322(23):1635-41.
169. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014; 129(25 Suppl 2):S74-5.
170. Redon J. Global cardiovascular risk assessment: Strengths and limitations. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2016; 23:87-90.
171. D'Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008; 117:743-753.
172. Muntner P, Colantonio LD, Cushman M, et al. Validation of the atherosclerotic cardiovascular disease pooled cohort risk equations. *JAMA*. 2014; 311:1406.
173. Pugh R, Murray-lyon I, Dawson J. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973; 60:646-9.
174. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001; 33(2):464-70.
175. Angulo P, Hui J, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45:846-854.
176. Sterling R, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 43:1317-1325.

177. Harrison S, Oliver D, Arnold H, et al. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* 2008; 57:1441–1447.
178. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38(2):518-526.
179. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*. 2000; 118:1117–1123.
180. Lee JH, Kim D, Kim HJ, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2010; 42:503–8.
181. Guerrero-Romero F, Simental-Mendia LE, González-Ortiz M, et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:3347–51.
182. Long MT, Gandhi S, Loomba R. Advances in non-invasive biomarkers for the diagnosis and monitoring of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2020; 111S:154259. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154259.
183. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med*. 2005; 352:1769–1778.
184. Boursier J, Zarski JP, de Ledinghen V, et al. Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology*. 2013; 57:1182-1191.
185. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, et al. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*. 1998; 294(2):309-21.
186. Straub BK, Stoeffel P, Heid H, et al. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*. 2008; 47:1936-1946.
187. Warnke RA, Gatter KC, Falini B, et al. Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. *N Engl J Med*. 1983; 309(21):1275-81.

188. Torlakovic EE, Naresh K, Kremer M, et al. Call for a European programme in external quality assurance for bone marrow immunohistochemistry; report of a European Bone Marrow Working Group pilot study. *J Clin Pathol.* 2009; 62:547-551.
189. Iezzoni JC. Diagnostic histochemistry in hepatic pathology. *Semin Diagn Pathol.* 2018; 35(6):381-389.
190. Bedossa P, Poynard T, The METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996; 24:289-293.
191. Jung J, Loomba RR, Imajo K, et al. MRE combined with FIB-4 (MEFIB) index in detection of candidates for pharmacological treatment of NASH-related fibrosis. *Gut.* 2020; gutjnl-2020-322976.
192. Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology.* 2017; 65(5):1557-1565.
193. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41:1313-1321.
194. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2012; 56:1751-1759.
195. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol.* 1995; 19:1409-1417.
196. Nascimbeni F, Bedossa P, Fedchuk L, et al. Clinical validation of the FLIP algorithm and the SAF score in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2020; 72(5):828-838.
197. Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:4755-4760.
198. Scheuer P, Williams R, Muir A. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J Pathol Bacteriol.* 1962; 84:53-64.
199. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, et al. HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2010; 138:905-912.

200. Caussy C, Ajmera VH, Puri P, et al. Serum metabolites detect the presence of advanced fibrosis in derivation and validation cohorts of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2019; 68:1884–1892.
201. Loomba R, Cui J, Wolfson T, et al. Novel 3D Magnetic Resonance Elastography for the Noninvasive Diagnosis of Advanced Fibrosis in NAFLD: A Prospective Study. *Am J Gastroenterol*. 2016; 111(7):986-994.
202. Reinhard E, Adhikhmin M, Gooch B, Shirley P. Color transfer between images. *IEEE Comput Graphics Appl*. 2001; 21:34-41.
203. Yegin EG, Yegin K, Ozdogan OC. Digital image analysis in liver fibrosis: basic requirements and clinical implementation. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2016; 30:653-660.
204. Paul A, Yushkevich, Joseph Piven, Heather Cody Hazlett, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 2006; 31(3):1116-28.
205. Campo CA, Hernando D, Schubert T, et al. Standardized Approach for ROI-Based Measurements of Proton Density Fat Fraction and R2\* in the Liver. *AJR Am J Roentgenol*. 2017; 209(3):592-603.
206. Klein S, Staring M, Murphy K, et al. Elastix: A Toolbox for Intensity-Based Medical Image Registration. *IEEE Trans Med Imaging*. 2010; 29:196–205.
207. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*. 1988; 168:497–505.
208. Rosenkrantz AB, Padhani AR, Chenevert TL, et al. Body diffusion kurtosis imaging: basic principles, applications, and considerations for clinical practice. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2015; 42(5):1190-1202.
209. Chen X, Jiang J, Shen N, et al. Stretched-exponential model diffusion-weighted imaging as a potential imaging marker in preoperative grading and assessment of proliferative activity of gliomas. *American journal of translational research*. 2018; 10(8):2659.
210. Le Bihan D, Ichikawa S, Motosugi U. Diffusion and Intravoxel Incoherent Motion MR Imaging–based Virtual Elastography: A Hypothesis-generating Study in the Liver. *Radiology*. 2017; 285(2):609-619.

211. Fram EK, et al. Rapid calculation of T1 using variable flip angle gradient refocused imaging. *Magn. Reson. Imaging*. 1987; 5(3):201–208.
212. Leporq B, Lambert SA, Ronot M, et al. Quantification of the triglyceride fatty acid composition with 3.0 T MRI. *NMR in Biomedicine*. 2014; 27(10):1211-1221.
213. Hallgren KA. Computing Inter-Rater Reliability for Observational Data: An Overview and Tutorial. *Tutor Quant Methods Psychol*. 2012; 8(1):23–34.
214. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988; 44:837-45.
215. Obuchowski NA. An ROC-type measure of diagnostic accuracy when the gold standard is continuous-scale. *Stat Med*. 2006; 25:481–93.
216. Obuchowski NA. Estimating and comparing diagnostic tests' accuracy when the gold standard is not binary. *Acad Radiol*. 2005; 12:1198 –204.
217. Lambert J, Halfon P, Penaranda G, et al. How to measure the diagnostic accuracy of noninvasive liver fibrosis indices: the area under the ROC curve revisited. *Clin Chem*. 2008; 54(8):1372-1378.
218. Bender R, Grouven U. Ordinal logistic regression in medical research. *J R Coll Physicians Lond*. 1997;31(5):546-551.
219. Breiman, L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001; 45:5–32.
220. Geladi P, Kowalski BR. Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 1986; 185:1-17.
221. Peterson LE. K-nearest neighbor. *Scholarpedia*. 2009; 4(2):1883.
222. Nelson JE, Klintworth H, Kowdley KV. Iron metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012; 14:8-16.
223. Kim D, Li AA, Gadiparthi C, et al. Changing Trends in Etiology-Based Annual Mortality From Chronic Liver Disease, From 2007 Through 2016. *Gastroenterology*. 2018; 155(4):1154-1163.e3.
224. Eddowes PJ, Sasso M, Allison M, et al. Accuracy of FibroScan controlled attenuation parameter and liver stiffness measurement in assessing steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2019; 156:1717-1730.

225. Pelusi S, Cespiati A, Rametta R, et al. Prevalence and risk factors of significant fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver without steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019; 17:2310-2319.
226. Huang YI, de Boer WB, Adams LA, et al. Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int.* 2013; 33:1249-1256.
227. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol.* 2013; 59:550-556.
228. Tsochatzis E, Bruno S, Isgro G, et al. Collagen proportionate area is superior to other histological methods for sub-classifying cirrhosis and determining prognosis. *J Hepatol.* 2014; 60:948-954.
229. Bowlus CL, Pockros PJ, Kremer AE, et al. Long-term obeticholic acid therapy improves histological endpoints in patients with primary biliary cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020; 18:1170-1178.
230. Mendes LC, Ferreira PA, Miotto N, et al. Controlled attenuation parameter for steatosis grading in chronic hepatitis C compared with digital morphometric analysis of liver biopsy: impact of individual elastography measurement quality. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2018; 30:959-966.
231. Bedossa P; FLIP Pathology Consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014; 60:565-575.
232. Pai RK, Kleiner DE, Hart J, et al. Standardising the interpretation of liver biopsies in non-alcoholic fatty liver disease clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019; 50:1100-1111.
233. Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, et al. Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J Atheroscler Thromb.* 2009; 16:893-901.
234. van der Poorten D, Samer CF, Ramezani-Moghadam M, et al. Hepatic fat loss in advanced nonalcoholic steatohepatitis: are alterations in serum adiponectin the cause? *Hepatology.* 2013; 57:2180-2188.
235. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2007; 47(4):598-607.

236. Burt AD, Lackner C, Tiniakos DG. Diagnosis and assessment of NAFLD: definitions and histopathological classification. *Semin Liver Dis.* 2015; 35:207-220.
237. Dey A, Allen J, Hankey-Giblin PA. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Front Immunol.* 2015; 5:683.
238. Rahim MN, Miquel R, Heneghan MA, Approach to the patient with acute severe autoimmune hepatitis. *JHEP Rep.* 2020; 2(6):100149.
239. Schwenger K, Chen L, Chelliah A, et al. Markers of activated inflammatory cells are associated with disease severity and intestinal microbiota in adults with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2018; 42:2229-2237.
240. Estep M, Mehta R, Bratthauer G, et al. Hepatic sonic hedgehog protein expression measured by computer assisted morphometry significantly correlates with features of non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2019; 19:27.
241. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, et al. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol.* 2008; 48:821-828.
242. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, et al. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology.* 2009; 49:809-820.
243. Ganne-Carrié N, Christidis C, Chastang C, et al. Liver iron is predictive of death in alcoholic cirrhosis: a multivariate study of 229 consecutive patients with alcoholic and/or hepatitis C virus cirrhosis: a prospective follow up study. *Gut.* 2000; 46:277-282.
244. George DK, Goldwurm S, Macdonald GA, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology.* 1998; 114:311-318.
245. Staufer K, Halilbasic E, Spindelboeck W, et al. Evaluation and comparison of six noninvasive tests for prediction of significant or advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *United European Gastroenterol J.* 2019; 7(8):1113-1123.

## Referencias

246. Behairy Bel-S, Sira MM, Zalata KR, Salama el-SE, Abd-Allah MA. Transient elastography compared to liver biopsy and morphometry for predicting fibrosis in pediatric chronic liver disease: Does etiology matter?. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(16):4238-4249.
247. Shao C, Ye J, Li F, et al. Early Predictors of Cardiovascular Disease Risk in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Non-obese Versus Obese Patients. *Dig Dis Sci.* 2020; 65(6):1850-1860.
248. Simarro Rueda M, Carbayo Herencia JA, Massó Orozco J, et al. Association of insulin resistance to different anthropometric measures and cardiovascular risk factors in a non-diabetic population. *Endocrinol Nutr.* 2011; 58(9):464-471.
249. Reeder SB, Cruite I, Hamilton G, Sirlin CB. Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Magn Reson Imaging.* 2011; 34:729-749.
250. Loomba R, Neuschwander-Tetri BA, Sanyal A, et al. Multicenter Validation of Association Between Decline in MRI-PDFF and Histologic Response in NASH. *Hepatology.* 2020; 72(4):1219-1229.

# ANEXOS



## ANEXOS

- **Anexo 1:** Tablas de estudios publicados sobre la precisión diagnóstica de la Patología Digital (Tabla 1) y la Resonancia Magnética (Tablas 2-6).

Las abreviaturas utilizadas en estas tablas son las siguientes:

A, actividad necroinflamatoria; ADC, coeficiente de difusión aparente; APC, área proporcional de colágeno; APE, área proporcional de elastina; APG, área proporcional de grasa; API, área proporcional inflamación; AUC, área debajo de la curva;  $\alpha$ , ángulo de inclinación;  $\alpha$ , índice de heterogeneidad de la difusión molecular del agua intracelular (RM);  $\beta$ , pendiente de la recta (análisis regresión lineal); CBP, colangitis biliar primaria; CEP, colangitis esclerosante primaria; CHH, concentración de hierro en hígado; D, coeficiente de difusión pura; D\*, coeficiente de pseudoperfusión; Dapp, coeficiente de difusión aparente; DDC, coeficiente de difusión corregido sobre heterogeneidad microestructural; DM, diabetes mellitus; DS, desviación estándar; EG, secuencia eco de gradiente; EHA, enfermedad hepática alcohólica; EHGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; ERM, espectroscopía por resonancia magnética; F, fibrosis;  $f$ , fracción vascular; Fe, hierro; FGDP, fracción grasa por densidad protónica; FLIP, *Fatty Liver Inhibition of Progression algorithm*; FSE, *Fast Spin Echo*; gr, gramos; H&E, tinción hematoxilina-eosina; HAI, hepatitis autoinmune; HAI, *histologic activity index* (histología); HC, hepatocitario; H/G, ratio de señal relativo entre el hígado y la grasa del tejido celular subcutáneo; HH, hemocromatosis hereditaria; Hi-SNR, alta relación señal-ruido; IC, intervalo confianza; IDEAL, *iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation*; IVIM, *intravoxel incoherent motion*; k, coeficiente kappa; Kapp, valor de kurtosis; L, lobulitis (inflamación lobular); LIF, *Liver Inflammation and Fibrosis category*; mg, miligramos; ms, milisegundos;  $\mu$ mol, micromoles; mEG,

multieco de gradiente; NASH-CRN, *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Scoring System*; PDFF, *proton density fat fraction*;  $r$ , coeficiente de correlación Pearson;  $\rho$ , coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ );  $R_2$ , coeficiente determinación; RIQ, rango Intercuartílico; RM, Resonancia Magnética; RM-C, Resonancia Magnética *complex-based*; RM-M, Resonancia Magnética *magnitude-based*; RM-MC, Resonancia Magnética híbrida *magnitude-complex technique*; S, esteatosis; SAF, *Steatosis, Activity and Fibrosis score*; shMOLLI, versión corta inversión-recuperación de look-locker modificada; SIR H/M, ratio intensidad señal hígado–músculo; SNR, relación señal-ruido; STIR, *short inversion time inversion recovery*; T, Tesla; TE, tiempos de eco; TG, triglicéridos; TH, trasplante hepático; TR, tiempo de repetición; TSL, *time of spin lock*;  $T_1$ , *Spin lock relaxation time constant in rotating frame*; VHB, Virus Hepatitis B; VHC, Virus Hepatitis C.

- I. **Tabla 1:** Estudios realizados en población humana que han evaluado técnicas de patología digital para la detección y cuantificación de distintos sustratos patológicos, tomando el análisis histológico semicuantitativo (sistemas de gradación) como patrón de referencia. La tabla resume 30 estudios ordenados cronológicamente.
  
- II. **Tabla 2:** Estudios realizados en población humana que han evaluado la imagen RM con una secuencia eco de gradiente codificado por desplazamiento químico con múltiples ecos (MECSE) para la detección y cuantificación de esteatosis hepática. La tabla resume 37 estudios ordenados cronológicamente. Los protocolos de adquisición de imagen RM están resumidos entre la cuarta y la octava columna de la tabla. La puntuación histológica de esteatosis se divide en (I) S0, < 5% steatosis; (II) S1, 5-33% steatosis; (III) S2, 33-66% steatosis; (IV) S3, >66% steatosis.

- III. Tabla 3:** Estudios realizados en población humana que han evaluado la imagen RM para la detección y cuantificación de hierro hepático. La tabla resume 18 estudios ordenados cronológicamente.
- IV. Tabla 4:** Estudios realizados en población humana que han evaluado distintas técnicas de RM (Difusión, mapas T1 y STIR) para la detección y cuantificación de fibrosis hepática, tomando el análisis histológico como patrón de referencia. Se resumen 45 estudios ordenados cronológicamente. La columna imagen RM incluye información sobre intensidad de campo (Teslas); secuencia (Difusión y modelo [IVIM, Stretched, Kurtosis], mapa T1 [shMOLLI y T1 $\rho$ ], STIR) y protocolo adquisición entre paréntesis (valores b para Difusión, TR/TE para T1, TSL para T1 $\rho$  y TI para STIR); biomarcadores de imagen analizados (ADC para Difusión; D, D\* y  $f$  para IVIM; DDC y  $\alpha$  para Stretched; Dapp y Kapp para Kurtosis; tiempo relajación T1 y T2, T1c y T1 $\rho$  para mapas T1; H/G para STIR).
- V. Tabla 5:** Estudios realizados en población humana que han evaluado distintas técnicas de RM (Difusión, mapas T1 y STIR) para la detección y cuantificación de inflamación hepática, tomando el análisis histológico como patrón de referencia. Se resumen 24 estudios ordenados cronológicamente. La columna imagen RM incluye la intensidad de campo (Teslas); secuencia (Difusión y modelo [IVIM, Kurtosis], mapa T1 [shMOLLI y T1 $\rho$ ], STIR) y protocolo adquisición entre paréntesis (valores b para Difusión, TR/TE para T1, TSL para T1 $\rho$  y TI para STIR); biomarcadores de imagen analizados (ADC para Difusión; D, D\* y  $f$  para IVIM; Dapp y Kapp para Kurtosis; tiempo relajación T1, T1c y T1 $\rho$  para mapas T1; H/G para STIR).

**VI. Tabla 6:** Estudios realizados en población humana con enfermedad hepática grasa no alcohólica que han evaluado la imagen RM para la detección de esteatohepatitis. La tabla resume 9 estudios ordenados cronológicamente. La definición de esteatohepatitis se realizó con la escala histológica NASH-CRN o FLIP/SAF.

- **Anexo 2:** Aprobaciones de los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) en las instituciones sanitarias que han participado en el desarrollo del estudio.
- **Anexo 3:** Lista de comprobación de la guía STARD (*Standards for Reporting Diagnostic accuracy studies*) para la presentación de los datos de investigación en los estudios de precisión de pruebas diagnósticas. Para cada directriz se especifica el número de página de la Tesis Doctoral correspondiente.
- **Anexo 4:** Artículos científicos derivados de la Tesis Doctoral (no se mencionan las 10 comunicaciones a congresos).
  - I. Marti-Aguado D, Rodríguez-Ortega A, Mestre-Alagarda C, et al. Digital pathology: accurate technique for quantitative assessment of histological features in metabolic-associated fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2021; 53(1):160-171.
  - II. Marti-Aguado D, Rodríguez-Ortega A, Alberich-Bayarri A, Marti-Bonmati L. Magnetic Resonance imaging analysis of liver fibrosis and inflammation: overwhelming gray zones restrict clinical use. *Abdom Radiol (NY).* 2020;45(11):3557-3568.
  - III. Martí-Aguado D, Alberich-Bayarri Á, Martín-Rodríguez JL, et al. Differences in multi-echo chemical shift encoded MRI proton density fat fraction estimation based on multifrequency fat

peaks selection in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Radiol.* 2020; 75(11):880.e5-880.e12.

**IV.** Berzigotti A, França M, Martí-Aguado D, Martí-Bonmatí L. Imaging biomarkers in liver fibrosis. Cuantificación de la fibrosis hepática mediante biomarcadores de imagen. *Radiología.* 2018; 60(1):74-84.

• **Anexo 5:** Proyectos de investigación concedidos relacionados con la Tesis Doctoral.

- I.** 7<sup>a</sup> Convocatoria de proyectos de investigación en VIH, enfermedades hepáticas y hemato-oncología de GILEAD Sciences (GLD19/00050).
- II.** Ayudas FIS a la Investigación, Acción Estratégica en Salud (AES 2019), Instituto de Investigación Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (PI19/0380).
- III.** Contrato Rio Hortega, Instituto de Investigación Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (CM19/00212).



# **Anexo 1**



Estudio	Tinción	Objetivo, campos analizados	Número de pacientes	Tamaño biopsia (mm)	Espacio porta	Etiología	Patología digital	Histología (escala)	Distribución (%), correlación
<i>Forlano R, 2020 [35]</i>	H&E Rojo Sirio	20x, biopsia completa	246	>30	>6	EHGNA	APC, APG, API (mediana, RIQ)	NASH - CRN	APC $\rho$ : 0,57* F0(10): 1,3(0,6-2) F1 (27): 2,3(1,9-4,3) F2 (16): 2,4(1,6-3,6) F3 (34): 5,1(2,8-8,2) F4 (13): 13(5,5-20,9)  APG $\rho$ : 0,66** S1 (28): 2,6(1,7-3,8) S2 (57): 15,1(10,1-20,1) S3 (15): 28,4(20,2-31,9)  API $\rho$ : 0,36** I0 (17): 0,9(0,3-1,7) I1 (67): 1,1(0,7-3,3) I2 (15): 3,8(3,2-4,2) I3 (1): 5,1

<i>Israelsen M, 2020 [36]</i>	Rojó Sirio	4x, biopsia completa	386	-	-	EHA	APC (mediana, RIQ)	Brunt	F0 (14): 1,6 (0,4) F1 (23): 2,2 (1,3) F2 (23): 2,9 (1,5) F3 (16): 5,7 (5,5) F4 (25): 23,1 (14)
<i>Buzzetti E, 2019 [37]</i>	Rojó Sirio	10x, biopsia completa	437	19 (4-58)	-	EHGNA	APC (mediana, RIQ)	NASH - CRN	r: 0,73** F0 (56): 5,4 (3,9) F1 (18.5): 6,6 (4) F2 (7.5): 8,6 (5,2) F3 (6): 11,2 (9,5) F4 (12): 23 (16)
<i>Abudhaise H, 2019 [38]</i>	H&E	10x, 3 campos por biopsia	42	>15	-	TH	APG	NASH - CRN	k: 0,70 (0.57-0.82) *
<i>Munsterman ID, 2019 [39]</i>	H&E	20x, biopsia completa	79	-	>11	EHGNA	APC (mediana, RIQ)	NASH - CRN	S0: 1.41 (1,0-1,8) S1: 4.99 (2,9-9,3) S2: 13,65 (10,9-16,1) S3: 16,34





												F4 (11): 15.6 (4.1-27.3) F5-6 (8): 29.9 (11.9-52.8)
<i>Campos CFF, 2014 [48]</i>	Tricrómico o de Masson	40x, 6-18 campos por imagen	282	-	-	-	VHC	APC (media)	METAVI R			F0 (2): 2.1 F1 (35): 2.8 F2 (28): 4.3 F3 (27): 4.8 F4 (8): 12.3
<i>Huag Y, 2014 [49]</i>	Tricrómico o de Masson	-	533	15 ± 4	9 ± 4	VHC	APC	METAVI R				F0 (22): 3.7 F1 (47): 4.8 F2 (16): 7.2 F3 (8): 11.0 F4 (7): 21.3
<i>Hall AR, 2014 [50]</i>	H&E	20x y 4x, ≥21 campos no superpuestos por biopsia	106	-	-	EHGNA	APG	Porcentaj e estimado esteatosis				20x r: 0.91** 4x r: 0.79**
<i>Hall AR, 2013 [51]</i>	H&E	20x, ≥25 campos no superpuestos por biopsia	21	> 20	-	-	APG (mediana , RIQ)	NASH - CRN				S0: 1 (1-5) S1: 10 (1-20) S2: 25 (15-45) S3: 50 (25-75)
<i>Abe T, 2013 [52]</i>	Elastica van Gieson	20x, biopsia completa	38	16.3 (3.2)	-	VHC VHB	APC y APE (media)	-				Fibrosis leve: - APC 6.2 - APE 2.2 Fibrosis grave: - APC 16.7 - APE 4.6

<i>Poynard T, 2012 [24]</i>	Rojo Sirio	40x, regiones rectangulares (5 x 1 mm)	20 muestras quirúrgicas	5 - 30	-	25% VHB, 20% VHC, 20% EHGNA , 15% EHA	APC (media ± IC)	METAVI R	F0 (25): 3.3 (3.1-3.5) F1 (10): 6.6 (6.2-7) F2 (20): 7 (6.8-7.3) F3 (10): 9.5 (8.9-10.2) F4 (35): 18.2 (16.5-17.6)
<i>Hall A, 2012 [53]</i>	Rojo Sirio	-, biopsia completa	60 sujetos, 120 muestras	25	-	TH	APC (mediana , RIQ)	-	F4 (100): 21.5 (8-47)
<i>Manousou P, 2011 [54]</i>	Rojo Sirio	-	135	20	12	VHC - TH	APC (mediana , RIQ)	Ishak	I: 0.6** F0 (9): 2 (1.4- 5.4) F1 (35): 2.4 (1.6-3.2) F2 (30): 3.7 (1.4-4.7) F3 (12): 4.7 (2.0-7.8) F4 (5): 6.2 (2.9-11.4) F5 (6): 9.9 (7.0-20.1) F4 (3): 21.7 (15.8-23)

<i>Calvaruso, 2009 [55]</i>	Rojo Sirio	1x, biopsia completa	225	22 (12-46)	<sup>12</sup> (4-27)	VHC	APC (media $\pm$ DS)	Ishak	r: 0.67** F0: 2.7 $\pm$ 2 F1: 3.7 $\pm$ 3 F2: 5.8 $\pm$ 3.5 F3: 6.6 $\pm$ 4.1 F4: 9.4 $\pm$ 4.8 F5: 14 $\pm$ 8.1 F6: 22.6 $\pm$ 11.3
<i>Turlin B, 2009 [56]</i>	H&E	10x, 10 campos no superpuestos por biopsia	108	21 (10-65)	-	EHGNA	APG (mediana, RIQ)	Turlin B [62]	S0 (19): 0.1 (0.18) S1 (32): 2.7 (3.1) S2 (18): 7.9 (4.5) S3 (18): 15.0 (6.6) S4 (13): 19.7 (9.5)
<i>McPherson S, 2009 [57]</i>	-	40x, 10 campos por imagen	68	20 (6-63)	-	VHC	número de núcleos de hepatocito	Fibrosis - METAVIR	r: -0.38**
<i>El-Badry AM, 2009 [58]</i>	H&E	40x, 50 campos no superpuestos por biopsia	46	20	-	EHGNA	APG	Porcentaje esteatosis estimada por el patólogo	r: 0.43

<i>Bedossa P, 2003 [19]</i>	Rojo Sirio	100x, zonas/campos de 2.5 mm	17 secciones quirúrgicas (10,659 muestras de biopsia virtual)	5.6	-	VHC	APC (media ± DS)	METAVIR	F0 (23): 2 ± 0.14 F1 (18): 3.4 ± 0.3 F2 (23): 5.8 ± 0.7 F3 (18): 14-7 ± 0.77 F4 (18): 25 ± 1.4
<i>O'Brien MJ, 2000 [59]</i>	Tricromico de Masson	40x, biopsia completa	230	-	-	VHC	APC (media)	Ishak	F0 (4): 3.6 F1 (20): 5.6 F2 (25): 7.0 F3 (17): 6.4 F4 (9): 11.9 F5 (6): 15.3 F6 (19): 28.6
<i>Pillete C, 1999 [60]</i>	Rojo Sirio	100x, biopsia completa	243	20 ± 7	12 ± 5	66% EHA, 34% hepatitis vírica	APC (media)	METAVIR	r: 0.84** F0: 7 ± 4 F1: 8 ± 4 F2: 11 ± 4 F3: 19 ± 12 F4: 20 ± 8 F5: 36 ± 9
<i>Kage M, 1997 [61]</i>	H&E	40x, 10-40 campos por imagen	45	-	>5	VHC VHB	APC	Scheuer	HCV r: 0.75** HBV r: 0.67**

**Tabla 1:** Estudios realizados en población humana que han evaluado técnicas de patología digital para la detección y cuantificación de distintos sustratos patológicos, tomando el análisis histológico semicuantitativo (sistemas de gradación) como patrón de referencia. La tabla resume 30 estudios ordenados cronológicamente. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

Estudio	RM, población	Patrón de referencia	Picos (p)	Frecuencias (ppm)	Amplitud relativa (%)	Ecos / TE (ms) / TR (ms) / ángulo $\alpha$	Ajuste factores de confusión	Resultados
<i>YS Lee, 2020 [66]</i>	3.0T mDixon, n=130 EHGNA	Biopsia (NASH-CRN)	7	0.9, 1.3, 1.59, 2.03, 2.25, 2.77, 5.31	-	6 / 1.9-11.05 / 14.0 / 6	T1, T2*, SNR, complejidad espectral	AUC S0vs.S1-3: 1.00 (0.96-1.00) [punto corte 2%]; S0-1vs.S2-3: 0.82 (0.75-0.89) [punto corte 15,7%]; S0-2vs.3: 0.85 (0.78-0.91) [punto corte 16,7%]
<i>J Vieira, 2020 [67]</i>	3.0T RM-C, n=46 con enfermedad hepática crónica (41% vírica, 9% EHGNA)	Biopsia (S0-3)	3	1.46, 2.26, 5.48	-	12 / 0.99 - 8.69 / 10 / 10	T1, T2*, complejidad espectral, artefactos por corrientes de Eddy	r: 0,875**
<i>C Park, 2019 [68]</i>	3.0T, Hi-SNR RM-C vs. estándar RM-C,	ERM	3	0.73, 2.49, 3.29	8, 17, 75	6 / 0.94-4.72 / 6-8 / 3	T1, T2*, complejidad espectral, SNR, artefactos por corrientes de	RM-C R <sup>2</sup> : 0.982, $\beta$ : 1.035;

	n=231 EHGNA								Eddy, defectos homogeneidad	Hi-SNR R: 0.986, $\beta$ : 1.008
<i>B Wildman- Tobriner, 2018 [69]</i>	1,5/3T, n=370 EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	5	0.9, 1.3, 2.1, 4.2, 5.3	9, 70, 12, 4, 5	6 / 1.15-6-9 / 125 / 10	T1, T2*, complejidad espectral	r = 0.78**		
<i>Eddowes PJ, 2018 [70]</i>	3.0T, Dixon, n=50 EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	-	-	-	- / 1,23- 9,84 / 500 /6-20	<i>LiverMultiscan</i>	S0: 0.3% S1: 11.3% S2: 23.7% S3: 31.5%		
<i>McDonald N, 2018 [71]</i>	3.0T Dixon, n=156 con enfermedad hepática crónica	Biopsia (grados Brunt)	-	-	-	- / 1,23- 9,84 / 500 /6-20	<i>LiverMultiscan</i>	FGDP r: 0,8** AUC S0vs.S1-3: 0.90 (0.84- 0.97) [punto corte 6,4%]; S0-1vs.S2-3: 0.94 (0.87- 1,00) [punto corte 10%]; S0-2vs.3: 0.94 (0.89- 0.99) [punto corte 22,1%]		
<i>M França, 2017 [72]</i>	3.0T RM-C, n=109 con enfermedad hepática crónica	Biopsia (S0-3)	3	1.46, 2.26, 5.48	75, 17, 8	12 / 0.99 - 8.69 / 10 / 10	T1, T2*, complejidad espectral, artefactos por	r: 0.718** S0: 3.9% S1: 6.7% S2: 9.1% S3: 17.4%		





<i>Schwimmer; JB 2015 [80]</i>	3.0T, n=174 niños con EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	6	-	-	-	/ >150/ / >150/	T1, T2*, complejidad espectral	r: 0.725** S0: 2.6% S1: 9.2% S2: 15.1% S3: 26.8% RM-M R <sup>2</sup> : 0.986, β: 0.99; RM-C R <sup>2</sup> : 0.991, β: 0.96 AUC SOvs.1- 3: 0.96 (punto corte 6,4%); SO- 1vs.2-3: 0.95 (punto corte 17,4%); SO- 2vs.3: 0.92 (punto corte 22,1%); % biopsia r:0.87*
<i>A Tyagi, 2015 [81]</i>	3.0T RM-M vs. RM-C, n=29 sujetos obesos	ERM	5	0.9, 1.3, 2.1, 4.2, 5.3	9, 70, 12, 4, 5	6 / 1.15-6-9 / 125 / 10	T1, T2*, espectral, artefactos por corrientes Eddy	RM-MC R <sup>2</sup> : 0.97, β: 1.01; RM-C R <sup>2</sup> : 0.97, β: 0.98	
<i>An Tang, 2015 [82]</i>	3.0T, n=89 NAFLD	Biopsia (NASH- CRN, porcentaje esteatosis)	6	5.3, 4.2, 2.75, 2.1, 1.3, 0.9	4.7, 3.9, 0.6, 12, 70, 8.8	6 / 2.3-13.8 / 120-270 / 10	T1, T2*, complejidad espectral		
<i>MR Bashir, 2015 [83]</i>	3.0T RM-MC vs. RM-C, n=42 con enfermedad hepática crónica	ERM	3	0.73, 2.49, 3.29	8, 17, 75	6 / 1.23- 7.38 / 8.9 / 4	T1, T2*, espectral, artefactos por corrientes Eddy		

<i>IS Iditman, 2015 [84]</i>	1.5T IDEAL, n=19 NAFLD	Biopsia (NASH-CRN)	2	4.7, 1.2	-	6 / 1.6-9.8 / 12.9 / 5	T1, T2*, complejidad espectral	r: 0.743**
<i>F Paparo, 2015 [85]</i>	1.5T, n=77 VHC	Biopsia (NASH-CRN)	4	0.9, 1.3, 2.2, 4.7	-	16 / 1.1-18.35 / 120-270 / 20	T1, T2*	r: 0.754** S0: 4.3% S1: 10.4% S2: 13.5%
<i>R Jimenez-Agüero, 2014 [86]</i>	1.5T, n=129 (89% obesos)	Biopsia (S0-3; mg TG / gr tejido seco)	-	-	-	12 / 1.04-25.14 / 72 / 25	T1, T2*	S0-3 r: 0.77**; mg/gr r: 0.90** S0: 5% S1: 12% S2: 24% S3: 33%
<i>JP Kühn, 2014 [87]</i>	3.0T RM-SNR, n=33 sujetos con obesidad	ERM	3	-	-	3 / 1.22-4.90 / 6.51 / 1, 3, 10, 20	T1, T2*, SNR, complejidad espectral	$\alpha=1^{\circ}$ R <sup>2</sup> : 0.94, $\beta$ : 0.95; $\alpha=3^{\circ}$ R <sup>2</sup> : 0.94, $\beta$ : 0.94; $\alpha=10^{\circ}$ R <sup>2</sup> : 0.92, $\beta$ : 0.95; $\alpha=20^{\circ}$ R <sup>2</sup> : 0.89, $\beta$ : 0.95
<i>X Zhong, 2014 [88]</i>	3.0T Dixon, n=30	ERM	7	3.73, 3.33, 3.04, 2.60, 2.38, 1.86, 0.68	8, 63, 7, 9, 7, 2, 4	6 / 1.23-7.38 / 8.9 / 4	T1, T2*, complejidad espectral, artefactos por	R <sup>2</sup> : 0.974 $\beta$ : 1.034

<i>An Tang, 2013 [89]</i>	1.5T, n=77 EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	6	5.3, 4.2, 2.75, 2.1, 1.3, 0.9	4.7, 3.9, 0.6, 12, 70, 8.8	6 / 2.3-13.8 / 120-270 / 10	T1, T2*, complejidad espectral	r: 0.69** S0: 3.8% S1: 12.5% S2: 16.5% S3: 26.5%
<i>IS Idilman, 2013 [90]</i>	1.5T IDEAL, n=77 EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	2	4.7, 1.2	-	6 / 1.6-9.8 / 12.9 / 5	T1, T2*, complejidad espectral	r: 0.82**
<i>M Noureddin, 2013 [91]</i>	1.5T IDEAL, n=42 EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	6	0.6, 0.5, 1.95, 2.6, 3.4, 3.8	4.7, 3.9, 0.6, 12, 70, 8.8	6 / 1.3-11.3 / 13.7 / 5	T1 ( $\alpha$ ), T2*, complejidad espectral, artefactos por corrientes Eddy	**p<0,001
<i>Z Permutt, 2012 [92]</i>	3.0T RM-M, n=51 EHGNA	Biopsia (NASH- CRN)	6	5.3, 4.2, 2.75, 2.1, 1.3, 0.9	4.7, 3.9, 0.6, 12, 70, 8.8	6 / 2.3-13.8 / 120-270 / 10	T1, T2*, complejidad espectral	R <sup>2</sup> : 0.54** S1: 8.9% S2: 16.3% S3: 25.02%
<i>JP Kühn, 2012 [93]</i>	1.5T, n=97 con enfermedad hepática crónica	Biopsia (porcentaje esteatosis)	1, 3	-	-	3 / 2.4-9.6 / 11 / 10	T1, T2*, defectos homogeneidad, SNR, complejidad espectral	1p r: 0.85* 3p r: 0.85*
<i>H Yu, 2011 [94]</i>	1.5T IDEAL RM-C vs. RM-MC; n=55	ERM	3	0.73, 2.49, 3.29	8, 17, 75	6 / 1.3-11,3 / - / 5	T1, T2*, SNR, complejidad espectral, artefactos por	RM-C R <sup>2</sup> : 0.88 $\beta$ : 0.91*;

									corrientes Eddy	RM-MC: R <sup>2</sup> : 0.99, β: 1
<i>S Meisamy, 2011 [95]</i>	1.5T IDEAL, n=55 sujetos sin enfermedad hepática crónica	ERM	1, 6	0.6, 0.5, 1.95, 2.6, 3.4, 3.8	4.7, 3.9, 0.6, 12, 70, 8.8	6 / 1.3-11.3 / 13.7 / 5	T1, T2*, SNR, defectos homogeneidad, complejidad espectral, artefactos por corrientes Eddy	1p r: 0.76 β: 0.71 6p r: 0.99 β: 1		
<i>T Yokoo, 2011 [96]</i>	3.0T, n=163 (14% VHC, 77% EHGNA 9% sanos)	ERM	1, 5	0.9, 1.3, 2.1, 4.2, 5.3	9, 70, 12, 4, 5	6 / 1.15-6-9 / 125 / 10	T1, T2*, complejidad espectral	1p R <sup>2</sup> : 0.98, β: 0.75* 5p R <sup>2</sup> : 0.99 β: 0.98		
<i>DG Hines, 2011 [97]</i>	1.5T IDEAL, n=42 EHGNA	ERM	6	0.6, 0.5, 1.95, 2.6, 3.4, 3.8	4.7, 3.9, 0.6, 12, 70, 8.8	6 / 1.3-11.3 / 13.7 / 5	T1, T2*, SNR, defectos homogeneidad, complejidad espectral, artefactos por corrientes Eddy	R <sup>2</sup> : 0.96, β: 1.04		
<i>GH Kang, 2011 [98]</i>	1.5 vs. 3T, n=21 EHGNA	ERM	5	0.9, 1.3, 2.1, 4.2, 5.3	5, 4, 12, 70, 9	6 / 1.15-6.90 / 125-240 / 10	T1, T2*, defectos homogeneidad, complejidad espectral	1.5T r: 0.993, β: 0.958; 3.0T r: 0.989, β: 1.02		
<i>H Hu, 2010 [99]</i>	3.0T IDEAL, n=16 sujetos sanos	ERM	7	0.61, 1.93, 2.45, 2.67, 3.11, 3.4, 3.8	4.2, 1.5, 6.6, 9.6, 7.1, 62.7 8.3	6 / 2.0-4.0 / 10 / 5	T1, T2*, complejidad espectral	R <sup>2</sup> : 0.95, β: 0.90*		

<i>T Yokoo, 2009 [100]</i>	1.5T, n=110 (72% EHGNA, 28% sujetos sanos)	ERM	1, 3	2.1, 1.3, 0.9	9, 77.9, 13.1	6 / 2.3-13.8 / 122 / 10	T1, T2*, complejidad espectral	1p $\beta$ : 0.85* 3p $\beta$ : 0.98
<i>SB Reeder, 2009 [101]</i>	1.5T IDEAL, n=31 (35% EHGNA, 65% sujetos sanos)	ERM	1, 3, 6	5.48, 4.2, 2.75 2.26, 1.46. 0.9	-	3 / 2.0-5.2 / 7.4 / 5	T1, T2*, complejidad espectral	1p R <sup>2</sup> :0.91, $\beta$ :0.6*; 3p R <sup>2</sup> :0.91, $\beta$ :0.83*; 6p R <sup>2</sup> :0.94, $\beta$ :0.96
<i>McPherson, 2009 [57]</i>	1.5T Dixon, n=94 (40% VHC, 25% EHGNA, 12% VHB)	Biopsia (NASH-CRN)	-	-	-	-	T2*	r: 0.88**

**Tabla 2:** Estudios realizados en población humana que han evaluado la imagen RM con una secuencia eco de gradiente codificado por desplazamiento químico con múltiples ecos (MECSE) para la detección y cuantificación de esteatosis hepática. La tabla resume 37 estudios ordenados cronológicamente. Los protocolos de adquisición de imagen RM están resumidos entre la cuarta y la octava columna de la tabla. La puntuación histológica de esteatosis se divide en (I) S0, < 5% steatosis; (II) S1, 5-33% steatosis; (III) S2, 33-66% steatosis; (IV) S3, >66% steatosis. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

Estudio	Población	Imagen RM	Objetivo	Histología (escala y distribución)	Precisión diagnóstica
<i>Bashir MR, 2019 [102]</i>	204 EHGNA (19% sobrecarga hierro, 16% patrón mixto)	1.5/3.0T, MECSE (6 ecos, TR: 120, TE: 2,3-9,2), R2*(s-1)	Hierro (localización)	Hepatocitario (HCo-4) 0: 83% 1: 14%; 2: 3% No hepatocitario (no-HCo-2) 0: 84% 1: 12%; 2: 4%	1.5T R2* - HC p=0.13 1.5T R2* - noHC p=0.2 3.0T R2* - HC p=0.1 3.0T R2* - noHC p=0.05
<i>Karlsson, M, 2019 [103]</i>	81 casos con enfermedad hepática crónica (40% EHGNA)	1.5T, Mapas T2 (TR: 26, TE: 4,6-23, 20°); R2*(s-1)	CHH (correlación)	Scheuer 0-4 (0: 83%, 1: 12%, 2: 5%)	R2* - CHH r: 0.82 AUC CHH >1,2 mg/gr: 0,97
<i>d'Assignies G, 2018 [104]</i>	105 pacientes (50% EHGNA, 14% EHA)	3.0 T; mEG (TE: 1.2-12.7 ms; TR: 120 ms; α: 20°); R2*(s-1), SIR H/M (μmol/gr)	CHH (correlación)	Valores CHH (μmol/gr): ausencia sobrecarga (<36) 47%, presencia Fe (>36) 23%, HH (>80) 30%	R2* r: 0.95** AUC CHH >36: 0,98 (punto corte: 77 s-1) SIR r: 0.92** AUC CHH >36: 0,96 (punto corte: 20 μmol/gr)
<i>McDonald N, 2018 [71]</i>	156 casos con enfermedad hepática crónica (36% EHGNA, 17% HAI)	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLLI); T2* (msec) (LiverMultiScan).	Hierro (grados)	Scheuer 0-4	T2* r: 0,34** AUC ≥1: 0,79** (punto corte: 18 ms)
<i>França M, 2017 [72]</i>	109 pacientes con enfermedad hepática crónica	3.0 T; MECSE 3 picos (corregido por sesgo T1 y T2*); R2*(s-1: mediana, RIQ)	Hierro (grados)	Scheuer 0-4 (0: 50%, 1: 25%, 2: 15%, 3: 5%, 4: 5%)	0: 36 (41-32); 1: 43 (53-93); 2: 75 (95-65); 3: 100 (128-91)*;

						AUC $\geq$ 1: 0.85 (punto de corte: 42 s <sup>-1</sup> ); AUC $\geq$ 3: 0.97 (punto de corte 91 s <sup>-1</sup> )
<i>Hoad CL, 2015 [105]</i>	110 con enfermedad hepática crónica (57% EHGNA, 21% vírica)	1.5T, Mapas T1-T2 (ms)	Hierro (grados)		Scheuer 0-4 (0: 55%, 1: 28%, 2: 14%, 3: 2%, 4: 1%)	T2* AUC $\geq$ 2: 0.91** (punto de corte $\geq$ 1: 22,6)
<i>Paparo F, 2015 [85]</i>	77 VHC	1.5T; MECSE un pico; T2* (ms)	Hierro (presencia)		0-3 ( $\geq$ 1: 5,2%)	p > 0,05
<i>Henninger B, 2015 [106]</i>	17 sujetos con haemosiderosis (59% HH)	1.5T; mEG (TE: 0.9-1.4 ms; TR: 200 ms; $\alpha$ : 20°, supresión grasa); R2* (s <sup>-1</sup> : media)	CHH (correlación)		Valores CHH (mg/gr): ausencia sobrecarga (<2) 23%, presencia Fe (>2) 23%, HH (>4) 54%	r: 0.93** R2* ausencia Fe: 72,1; R2* presencia Fe: 124,7; R2* HH: 274,8
<i>Garbowski MW, 2014 [107]</i>	25 sujetos con haemosiderosis (50 biopsias)	3.0 T; mEG (TE 0.93-16 ms); R2* Ferriscan (s <sup>-1</sup> )	CHH (correlación)		Valores CHH (mg/gr): ausencia sobrecarga (<2) 4%, presencia Fe (>2) 12%, HH (>4) 84%	r: 0.94** Punto de corte HCC > 2: 67 s <sup>-1</sup>
<i>Banerjee R, 2014 [108]</i>	79 pacientes con enfermedad hepática crónica (41% vírica, 41% EHGNA, 18% otras causas)	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLLI); T2* (ms)	Hierro (grados)		Scheuer 0-4 (2-4: 8%)	r: -0,69** AUC ovs.1-4: 0.94** (0.87-1.00) punto de corte: 12,5

<i>Allkemper T, 2014 [109]</i>	59 casos: 34 pacientes con enfermedad hepática crónica (35% VHC, 30% EHA) y 25 sujetos sanos	1.5 T; Mapa T1ρ (TSL: 10-20-40-80 ms); valor de T1ρ.	Hierro (presencia)	0-3 (≥1: 6,7%)	p>0,05
<i>Bülow R, 2013 [110]</i>	33 casos sin información etiológica	1.5 T; Difusión (50-400-800); ADC.	Hierro (grados)	0-3 (0: 67%, 1: 15%, 2: 9%, 3: 9%)	R <sup>2</sup> : 0.29
<i>Kühn JP, 2012 [93]</i>	97 pacientes con enfermedad hepática crónica	1.5T; MECSE 3 picos; R2* (s <sup>-1</sup> media)	Hierro (grados)	0 (<5%):74% 1 (5-20%): 15% 2 (21-50%): 6% 3 (>50%): 5%	0: 31.3; 1: 37.1; 2: 45.9; 3: 63.6
<i>Hankins JS, 2009 [111]</i>	43 sujetos con haemosiderosis	1.5T; mEG (TE: 1.1-17.3 ms, sin supresión grasa); R2* (Hz)	CHH (correlación)	Valores CHH (mg/gr): ausencia sobrecarga (<2) 5%, presencia Fe (>2) 95%	ρ: 0.98* Punto de corte HCC>2: 88 s <sup>-1</sup>
<i>Virtanen JM, 2008 [112]</i>	7 casos (3 EHGNA, 2 HAL, 1 EHA, 1 VHC)	1.5T; mEG (TE: 4.9, 9, 21 ms, TR: 200 ms; α: 20, supresión grasa); R2* (s <sup>-1</sup> )	CHH (correlación)	Valores CHH (μmol/gr): ausencia sobrecarga (<36) 86%, presencia Fe (>36) 14%	p>0,05
<i>Wood JC, 2005 [113]</i>	22 sujetos con haemosiderosis	1.5T; EG (TE: 0.8-4.8 ms; TR: 25 ms; α: 20°, sin supresión grasa); R2* (Hz)	CHH (correlación)	Valores CHH (mg/gr): ausencia sobrecarga (<2) 4%, presencia Fe (>2) 96%	r: 0.97** Punto de corte HCC>2: 71 s <sup>-1</sup>

<i>Alustiza JMJ, 2004 [114]</i>	112 VHC o con sospecha de sobrecarga hierro	1.5T; EG (TE: 4, 14 ms; TR: 120 ms; $\alpha$ : 20°); SIR H/M ( $\mu\text{mol/gr}$ )	CHH (correlación)	Valores CHH ( $\mu\text{mol/gr}$ ): ausencia sobrecarga (<36) 61%, presencia Fe (>36) 20%, HH (>80) 19%	r: 0.94** Punto corte HCC>36: 20 $\mu\text{mol/gr}$
<i>Gandon Y, 2004 [115]</i>	174 VHC o con sospecha de sobrecarga hierro	1.5T; EG (TE: 4, 9, 14 ms; TR: 120 ms; $\alpha$ : 20°); SIR H/M ( $\mu\text{mol/gr}$ )	CHH (correlación)	Valores CHH ( $\mu\text{mol/gr}$ ): ausencia sobrecarga (<36) 35%	r: 0.87** AUC presencia sobrecarga de hierro: 0.94**

**Tabla 3:** Estudios realizados en población humana que han evaluado la imagen RM para la detección y cuantificación de hierro hepático. La tabla resume 18 estudios ordenados cronológicamente. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

Estudio	Población	Imagen RM	Objetivo	Histología (escala y distribución)	Precisión diagnóstica
<i>Tosun H, 2020</i> [128]	96 casos: 54 pacientes VHB y 42 sujetos sanos	3.0 T; Difusión IVIM (0-10-20-30-40-50-60-70-80-90-100-120-150-200-400-800); D, D*, f.	Fibrosis (estadios)	Ishak Fo-6 (11% F4-6)	D r: -0.425* D* r: -0.315* f r: 0.26
<i>Kim JW; 2020</i> [129]	47 pacientes con EHGNA	3.0 T; mapas de T1 (TR/TE, 3.0/1.32 msec); tiempo de relajación T1.	Fibrosis (estadios)	NASH-CRN Fo-4 (30% Fo, 53% F1-2, 17% F3-4)	AUC ≥F1: 0,614 AUC ≥F2: 0,659 AUC ≥F3: 0,572
<i>Gulbay M, 2020</i> [130]	37 casos VHB	1.5 T; Difusión IVIM (12 valores b 0-1000); D, D*, f. ADC.	Fibrosis (estadios)	Ishak Fo-6 (8% Fo, 30% F1, 24% F2, 22% F3, 8% F4, 8% F5-6)	D r: -0.685** D AUC ≥F4: 0.935** D* AUC ≥F4: 0.696 f AUC ≥F4: 0.833** ADC r: -0.641** ADC AUC ≥F4: 0.964**
<i>Lefebvre T, 2020</i> [131]	91 casos con enfermedad hepática crónica (52% EHNA, 41% vírica)	3.0 T; Difusión IVIM (0-50-100-300-600-800); D, D*, f, ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (15% Fo, 17% F1, 25% F2, 18% F3, 25% F4)	D ρ: -0.15 D* ρ: -0.14 f ρ: -0.46** ADC ρ: -0.16
<i>Lee YS, 2020</i> [66]	130 pacientes con EHGNA	3.0 T mDixon-FGDP, elastografía RM, ERM, mapas de T1, Difusión.	Fibrosis (estadios)	NASH-CRN Fo-4 (27% Fo, 22% F3-4)	T1 AUC ≥F3: 0.60 (IC95% 0.50-0.70)
<i>Fu F, 2019</i> [132]	125 casos: 100 con enfermedad hepática crónica (89% vírica) y 25 sujetos sanos	3.0 T; Difusión IVIM (0-10-20-30-40-50-100-200-400-800); D, D*, f, ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (50% F1-2, 49% F3-4)	ADC r: -0.601** D r: -0.727** D* r: -0.121 f r: -0.503**

<i>Zawada E, 2019 [133]</i>	40 casos VHB	1.5 T; Difusión IVIM (0-20-50-100-200-400-600-800-1000); D, D*, f, ADC.	Fibrosis (estadios)	Scheuer Fo-4 (18% Fo, 43% F1, 10% F3-4)	ADC $\rho$ : -0.53* D $\rho$ : -0.25 D* $\rho$ : -0.14 f $\rho$ : -0.11
<i>Idilman IS, 2019 [134]</i>	283 casos con CBP	1.5 / 3.0 T; Difusión (0-800) y mapa T2; ADC, T2.	Fibrosis (estadios)	Batts Ludwig Fo-4	ADC $\rho$ : 0.332* T2 $\rho$ : 0.579**
<i>Yoon JH, 2019 [135]</i>	102 casos con enfermedad hepática crónica (89% vírica)	1.5 T; Difusión modelo Kurtosis e IVIM (0-15-25.4-42.9-72.5-122.5-207-350-592-1000); Dapp, Kapp; D, D*, f.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (85% F2-4, 67% F3-4)	Dapp $\rho$ : -0.4* Dapp AUC $\geq$ F2: 0.73 Kapp $\rho$ : 0.4* Kapp AUC $\geq$ F2: 0.75 D $\rho$ : -0.01 D* $\rho$ : -0.5** D* AUC $\geq$ F2: 0.89 f $\rho$ : -0.1
<i>Yang L, 2018 [136]</i>	81 casos con enfermedad hepática crónica (77% vírica)	1.5 T; Difusión Kurtosis (0-200-500-1000-1500-2000); Dapp, Kapp, ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (50% F3-4)	Dapp $\rho$ : -0.491** Dapp AUC $\geq$ F3: 0.710** Kapp $\rho$ : 0.537** Kapp AUC $\geq$ F3: 0.768** ADC $\rho$ : -0.496** ADC AUC $\geq$ F3: 0.747**
<i>McDonald N, 2018 [71]</i>	156 casos con enfermedad hepática crónica (36% EHGNA, 17% HAI)	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLL); T1c (msec) corregido por T2* y LIF score ( <i>LiverMultiScan</i> ).	Fibrosis (estadios y APC)	Ishak Fo-6 (20% Fo, 18% F1, 16% F2, 22% F3, 6% F4, 17% F5-6)	AUC $\geq$ F1: 0.72 AUC $\geq$ F3: 0.72 AUC $\geq$ F5: 0.72 T1c - APC $\rho$ : 0.33**
<i>Seo N, 2018 [137]</i>	95 casos: 65 pacientes con enfermedad hepática crónica	3.0 T; Difusión modelo Stretched e IVIM (0-10-25-50-75-100-200-500-	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (54% F2-4, 31% F4)	DDC $\rho$ : -0.609** DDC AUC $\geq$ F3: 0.816 $\alpha$ $\rho$ : -0.585**; $\alpha$ AUC $\geq$ F3: 0.753

	(78% vírica) y 30 sujetos sanos	800); DDC, $\alpha$ , D, D*, <i>f</i> , ADC.			D* $\rho$ : -0.507** D* AUC $\geq$ F3: 0.787 <i>f</i> $\rho$ : -0.383** <i>f</i> AUC $\geq$ F3: 0.675 ADC $\rho$ : -0.222* ADC AUC $\geq$ F3: 0.592
<i>Sandrasegaran K, 2018 [138]</i>	49 pacientes con enfermedad hepática crónica (73% vírica)	3.0 T; Difusión IVIM (0-50-100-300-600-800); D, D*, <i>f</i> , ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (76% F2-4, 71% F3-4)	ADC AUC $\geq$ F2: 0.590 D* AUC $\geq$ F2: 0.706* D AUC $\geq$ F2: 0.586 <i>f</i> AUC $\geq$ F2: 0.505
<i>Eddowes PJ, 2018 [70]</i>	50 pacientes con EHGNA	3.0T, T1, T2*, PDFF-Dixon ( <i>LiverMultiScan</i> ); T1c	Fibrosis (estadios y APC)	Kleiner Fo-4 (12% Fo, 38% F1-2, 50% F3-4)	T1c - Kleiner: $p > 0,05$ AUC $\geq$ F2: 0.63 AUC $\geq$ F3: 0.63 T1c - APC $\rho$ : 0.404*
<i>Leitao HS, 2017 [139]</i>	68 pacientes con enfermedad hepática crónica (87% vírica)	1.5 T; Difusión IVIM (0-10-20-30-40-50-75-100-150-300-500); D, D*, <i>f</i> , ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (22% F3-4)	D r: -0.3* ADC r: -0.4*
<i>França M, 2017 [140]</i>	74 pacientes con enfermedad hepática crónica (22% vírica)	3.0 T; Difusión IVIM (0-50-200-400-600-800); D, D*, <i>f</i> , ADC.	Fibrosis (estadios)	Ishak Fo-6 (16% F4-6)	ADC r: -0.32* ADC AUC $\geq$ F4: 0.705* <i>f</i> r: -0.38* <i>f</i> AUC $\geq$ F4: 0.690*
<i>Pavlidis M; 2016 [127]</i>	71 pacientes con EHGNA	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLL); T1c (msec) corregido por T2* y LIF score ( <i>LiverMultiScan</i> ).	Fibrosis (estadios)	Puntuación SAF Fo-F4 (36% F3-F4)	LIF r: 0.51** LIF AUC $>$ F3: 0.85**
<i>Gallego-Duran R, 2016 [126]</i>	Cohorte derivación: 39 pacientes EHGNA.	1.5 T; Spin (single shot FSE-T2), dinámico (T1 EG) y STIR; FibroMRI (análisis radiómico).	Fibrosis (estadios)	NASH-CRN Fo-4 (41% Fo, 51% F1-2, 19% F3-4)	r: 0.54** AUC $\geq$ F2 cohorte 1: 0.94 AUC $\geq$ F2 cohorte 2: 0.85



<i>Takayama Y, 2015 [146]</i>	53 casos: 37 pacientes con enfermedad hepática crónica (70% vírica) y 16 sujetos sanos	3.0 T; Mapa T1ρ (TSL: 1-20-40-60 msec); valor de T1ρ.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (21% F3-4)	ρ: 0.01
<i>Chung SR, 2015 [147]</i>	57 casos: 37 pacientes con enfermedad hepática crónica (92% VHB) y 20 sujetos sanos	1.5 T; Difusión IVIM (0-30-60-100-150-200-400-600-900); D, D*, f, ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (51% F3-4)	D ρ: -0.261* D AUC ≥F3: 0.656 D* ρ: -0.446** D* AUC ≥F3: 0.773 f ρ: -0.497** f AUC ≥F3: 0.834 ADC ρ: -0.404* ADC AUC ≥F3: 0.762
<i>Banerjee R, 2014 [108]</i>	79 pacientes con enfermedad hepática crónica (41% vírica, 41% EHGNA)	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLLI); T1c (msec) corregido por T2*	Fibrosis (estadios y APC)	Ishak Fo-6 (91% F1-6)	r: 0,68** AUC ≥F1: 0.94** T1c-APC vírica r: 0.86** T1c-APC EHGNA r: 0.57**
<i>Allkemper T, 2014 [109]</i>	59 casos: 34 pacientes con enfermedad hepática crónica (35% VHC, 30% EHA), 25 sanos	1.5 T; Mapa T1ρ (TSL: 10-20-40-80 msec); valor de T1ρ.	Fibrosis (cirrosis)	Batts Ludwig Fo-4 (100% F4)	AUC Fo vs F4: 0.97**
<i>Yoon JH, 2014 [148]</i>	55 casos: 47 pacientes con cirrosis (96% VHB) y 8 sujetos sanos	3.0 T; Difusión IVIM (0-25-50-75-100-200-500-800); D, D*, f, ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (55% F3-4)	D r: -0.31* D AUC >F3: 0.676* D* r: -0.72* D* AUC >F3: 0.849** f r: -0.43*

<i>Bülow R, 2013 [110]</i>	95 casos							AUC > F3: 0.667* ADC r: -0.41* ADC AUC > F3: 0.742* R <sup>2</sup> : 0.38
<i>Onur MR, 2013 [149]</i>	101 casos: 50 pacientes con enfermedad hepática crónica vírica y 51 sujetos sanos		1.5 T; Difusión (50-400-800); ADC. 1.5 T; Difusión (0-100-600-1000); ADC.	Fibrosis (estadios) Fibrosis (estadios)	Ishak Fo-F6 (21% F5-6) Ishak Fo-6			r: -0.119
<i>Vaziri-Bozorg SM, 2012 [150]</i>	44 casos: 33 pacientes con enfermedad hepática crónica vírica y 11 sujetos sanos		1.5 T; Difusión (0-500-700-1000); ADC.	Fibrosis (estadios)	Ishak Fo-6 (25% F5-6)			r: -0.599** AUC ≥ F5: 0.86**
<i>Kovac JD, 2012 [151]</i>	45 pacientes con enfermedad hepática crónica (73% CBP, 27% CEP)		1.5 T; Difusión (0-50-200-400-800); ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (53% F3-4)			ρ: -0.937** AUC ≥ F2: 0.868 AUC ≥ F3: 0.906
<i>Pasquinelli F, 2012 [152]</i>	28 casos: 21 pacientes con enfermedad hepática crónica y 7 sanos		1.5 T; Difusión IVIM (0-200-400-600-800-1,000); D, f, ADC.	Fibrosis (cirrosis)	METAVIR Fo-4 (50% F3-4)			ADC and f difiere entre los grupos F1-2 vs F3-4*
<i>Watanabe H, 2011 [153]</i>	114 casos: 99 pacientes con enfermedad		3.0 T; Difusión monoexponencial (0-500); ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (54% F3-4)			r: -0.47**

	hepática crónica (83% vírica) y 15 sujetos sanos						
<i>Wang Y, 2011 [154]</i>	76 pacientes con enfermedad hepática crónica (62% vírica)	1.5 T; Difusión (0-50-500-1000); ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (34% F3-4)	$\rho$ : -0.661** AUC $\geq$ F3: 0,84		
<i>Fujimoto K, 2011 [155]</i>	55 casos: 43 pacientes VHC y 12 sujetos sanos	1.5 T; Difusión monoexponencial (0-1000); ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (38% Fo-1, 20% F2, 42% F3-4)	AUC $\geq$ F2: 0.925** AUC $\geq$ F3: 0.926** AUC $\geq$ F4: 0.842**		
<i>Sandrasegaran K, 2009 [156]</i>	78 pacientes con enfermedad hepática crónica (55% vírica, 14% EHNA)	1.5 T; Difusión (0-50-400); ADC.	Fibrosis (cirrosis)	METAVIR Fo-4 (53% F3-4)	r: -0.36* AUC Fo vs F4: 0.919 AUC $\geq$ F3: 0.544		
<i>Taouli B, 2008 [157]</i>	44 casos: 31 pacientes con enfermedad hepática crónica (68% vírica) y 13 sujetos sanos	1.5 T; Difusión monoexponencial (0-500); ADC.	Fibrosis (estadios)	Batts Ludwig Fo-4 (45% F3-4)	r: -0.453* AUC $\geq$ F3: 0.717		
<i>Girrometti R, 2007 [158]</i>	57 casos: 28 pacientes con cirrosis (75% vírica) y 29 sujetos sanos	1.5 T; Difusión (0-150-250-400-600-800); ADC.	Fibrosis (cirrosis)	Ishak Fo-6 (100% F6)	AUC para diferenciar controles vs F6: 0,96**		
<i>Taouli B, 2007 [159]</i>	30 casos: 23 pacientes con enfermedad hepática crónica	1.5T; Difusión (0-50-300-500-700-1,000); ADC.	Fibrosis (estadios)	Batts Ludwig Fo-4 (33% F3-4)	r: -0.654* AUC $\geq$ F3: 0.896		

	(78% vírica) y 7 sujetos sanos					
<i>Lewin M, 2007 [160]</i>	74 casos: 54 pacientes con VHC y 20 sujetos sanos	1.5 T; Difusión (0-200-400-800); ADC.	Fibrosis (estadios)	METAVIR Fo-4 (28% F3-4)	AUC ≥F2: 0.79 AUC ≥F3: 0.92	
<i>Koizuma, 2005 [161]</i>	75 casos: 31 pacientes con enfermedad hepática crónica y 34 sanos	1.5 T; Difusión monoexponencial (0-128); ADC.	Fibrosis (estadios)	Knodell HAI Fo-4 (26% Fo-1, 74% F3-4) [163]	$\rho$ : -0.798**	
<i>Boulanger, 2003 [162]</i>	31 casos: 18 pacientes VHC y 13 sujetos sanos	1.5 T; Difusión (50-100-150-200-250); ADC.	Fibrosis (estadios)	Ishak Fo-6	p>0,05	
<i>Marti-Bonmati L, 1993 [125]</i>	128 casos: 100 pacientes con enfermedad hepática crónica (76% vírica), 28 sujetos sanos	0.5 T; imagen STIR (TI: 100 msec); H/G.	Fibrosis (cirrosis)	Knodell HAI Fo-4 (46% F4) [163]	p>0,05	

**Tabla ( :** Estudios realizados en población humana que han evaluado distintas técnicas de RM (Difusión, mapas T1 y STIR) para la detección y cuantificación de fibrosis hepática, tomando el análisis histológico como patrón de referencia. Se resumen 45 estudios ordenados cronológicamente. La columna imagen RM incluye información sobre intensidad de campo (Teslas); secuencia (Difusión y modelo [IVIM, Stretched, Kurtosis], mapa T1 [shMOLLI y T1 $\rho$ ], STIR) y protocolo adquisición entre paréntesis (valores b para Difusión, TR/TE para T1, TSL para T1 $\rho$  y TI para STIR); biomarcadores de imagen analizados (ADC para Difusión; D, D\* y f para IVIM; DDC y  $\alpha$  para Stretched; Dapp y Kapp para Kurtosis; tiempo relajación T1 y T2, T1c y T1 $\rho$  para mapas T1; H/G para STIR). \*p<0,05; \*\*p<0,001.

Estudio	Población	Imagen RM	Objetivo	Histología (escala y distribución)	Precisión diagnóstica
<i>Tosun H, 2020 [128]</i>	96 casos: 54 pacientes VHB y 42 sujetos sanos	3.0 T; Difusión IVIM (0-10-20-30-40-50-60-70-80-90-100-120-150-200-400-800); D, D*, f.	Inflamación (grados)	Ishak AO-18 (31% A7-18)	D r: -0.223 D* r: -0.194 f r: -0.274*
<i>Kim JW; 2020 [129]</i>	47 pacientes con EHGNA	3.0 T; mapas de T1 (TR/TE, 3.0/1.32 msec); tiempo de relajación T1.	Inflamación (grados)	Puntuación SAF: lobulitis 0-2 (68% L2), actividad 0-4	AUC lobulitis $\geq 2$ : 0.686 Punto corte: 895 ms AUC actividad $\geq 2$ : 0.664
<i>Gulbay M, 2020 [130]</i>	37 casos con VHB	1.5 T; Difusión IVIM (12 valores b 0-1000); D, D*, f, ADC.	Inflamación (grados)	Ishak AO-18 (70% A1-6, 19% A7-12, 11% A13-18)	D r: -0.490* ADC r: -0.357* D* y f p > 0,05
<i>Lefebvre T, 2020 [131]</i>	91 casos con enfermedad hepática crónica (52% EHNA, 41% vírica)	3.0 T; Difusión IVIM (0-50-100-300-600-800); D, D*, f, ADC.	Inflamación (grados)	NASH-CRN AO-3 (50% A1, 31% A2, 10% A3)	D $\rho$ : 0.103 D AUC $\geq A1/\geq 2$ : 0.53 / 0.57 D* $\rho$ : -0.27* D* AUC $\geq 1/\geq 2$ : 0.70 / 0.60 f $\rho$ : -0.70** f AUC $\geq 1/\geq 2$ : 0.84 / 0.88 ADC $\rho$ : 0.10 ADC AUC $\geq 1/\geq 2$ : 0.56 / 0.56
<i>Sandrasegaran K, 2018 [138]</i>	49 pacientes con enfermedad hepática crónica (73% vírica)	3.0 T; Difusión IVIM (0-50-100-300-600-800); D, D*, f, ADC.	Inflamación (grados)	METAVIR AO-3 (71% A0, 23% A1, 6% A3)	p > 0,05

<i>Yang L, 2018</i> [136]	81 casos con enfermedad hepática crónica (77% vírica)	1.5 T; Difusión Kurtosis (0-200-500-1000-1500-2000); Dapp, Kapp, ADC.	Inflamación (grados)	Scheuer A0-4 (75% A1-2, 7.4% A3-4)	Dapp $\rho$ : -0.406** Kapp $\rho$ : 0.369** ADC $\rho$ : -0.341* ADC r: -0.3*
<i>Leitao HS, 2017</i> [139]	68 pacientes con enfermedad hepática crónica: 87% vírica	1.5 T; DWI-IVIM (0-10-20-30-40-50-75-100-150-300-500); D, D*, f, ADC.	Inflamación (grados)	METAVIR A0-3 (22% A2-3)	
<i>França M, 2017</i> [140]	74 pacientes con enfermedad hepática crónica (22% vírica)	3.0 T; Difusión IVIM (0-50-200-400-600-800); D, D*, f, ADC.	Inflamación (grados)	Ishak A0-18 (74% A1-6, 18% A7-12, 0% A13-18)	ADC r: -0.31* ADC AUC $\geq$ A1: 0.748* ADC AUC $\geq$ A7: 0.682* f r: -0.31* f AUC $\geq$ A1: 0.749* f AUC $\geq$ A7: 0.687*
<i>Pavides M, 2016</i> [127]	71 pacientes con EHGNA	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLL); T1c (msec) corregido por T2* y LIF score ( <i>LiverMultiScan</i> ).	Inflamación (grados) y EHNA (presencia)	Puntuación SAF: lobulitis 0-2 (82% L1), actividad 0-4 (83% A1-2) y EHNA (65%)	Lobulitis 0 vs 1-2* r actividad: 0.58** AUC actividad $\geq$ 2: 0.83** AUC EHNA: 0.8**
<i>Gallego-Duran R, 2016</i> [126]	Cohorte derivación: 39 pacientes EHGNA Cohorte validación: 87 pacientes EHGNA	1.5 T; Spin (single shot FSE-T2), dinámico (T1-EG) y STIR; NashMRI (análisis radiómico).	EHNA (presencia)	NASH-CRN (51% EHNA)	AUC EHNA cohorte 1: 0.88 AUC EHNA cohorte 2: 0.83
<i>Parente DB, 2015</i> [144]	59 pacientes con EHGNA (esteatosis y DM)	3.0 T; Difusión IVIM (0-10-20-40-80-160-200-400-800-1000); D, D*, f.	EHNA (presencia)	NASH CRN (37% EHNA)	D AUC EHNA: 0.742 D* AUC EHNA: 0.678 f AUC EHNA: 0.607
<i>Murphy P, 2015</i> [145]	89 pacientes con EHGNA	3.0 T; Difusión IVIM (0-100-500); ADC, D, f.	Inflamación (grados) y EHNA	NASH CRN (45% A1, 52% A2, 3% A3, 89% EHNA)	p > 0,05

<i>Takayama Y, 2015 [146]</i>	53 casos: 37 pacientes con enfermedad hepática crónica (70% vírica) y 16 sanos	3.0 T; Mapa T1ρ (TSL: 1-20-40-60 msec); valor de T1ρ.	Inflamación (grados)	METAVIR A0-3 (29% A2-3)	ρ: -0.03
<i>Allkemper T, 2014 [109]</i>	59 casos: 34 pacientes con enfermedad hepática crónica (35% VHC, 30% EHA) y 25 sujetos sanos	1.5 T; Mapa T1ρ (TSL: 10-20-40-80 msec); valor de T1ρ.	Inflamación (grados)	Batts Ludwig A0-4 (50% A3-4)	r: 0.31
<i>Yoon JH, 2014 [148]</i>	55 casos: 47 pacientes con cirrosis (96% VHB) y 8 sujetos sanos	3.0 T; Difusión IVIM (0-25-50-75-100-200-500-800); D, D*, f, ADC.	Inflamación (grados)	METAVIR A0-3 (17% A2-3)	p > 0,05
<i>Onur MR, 2013 [149]</i>	101 casos: 50 pacientes con enfermedad hepática crónica vírica y 51 sujetos sanos	1.5 T; Difusión (0-100-600-1000); ADC.	Inflamación (grados)	Ishak A0-18	r: -0.124
<i>Vaziri-Bozorg SM, 2012 [150]</i>	44 casos: 33 pacientes con enfermedad hepática crónica vírica y 11 sujetos sanos	1.5 T; Difusión (0-500-700-1000); ADC.	Inflamación (grados)	Ishak A0-18 (40% A7-18)	r: -0.486*
<i>Watanabe H, 2011 [153]</i>	114 casos: 99 pacientes con enfermedad hepática crónica (83% vírica) y 15 sanos	3.0 T; Difusión monoexponencial (0-500); ADC.	Inflamación (grados)	METAVIR A0-3 (40% A2-3)	r: -0,28*

<i>Fujimoto K, 2011 [155]</i>	55 casos: 43 pacientes VHC y 12 sujetos sanos	1.5 T; Difusión monoexponencial (0-1000); ADC.	Inflamación (grados)	METAVIR AO-3 (55% A2-3)	AUC ≥A1: 0.889 AUC ≥A2: 0.807 AUC ≥A3: 0.842
<i>Taouli B, 2008 [157]</i>	44 casos: 31 pacientes con enfermedad hepática crónica (68% vírica) y 13 sujetos sanos	1.5 T; Difusión monoexponencial (0-500); ADC.	Inflamación (grados)	Batts Ludwig AO-4 (34% A2-4)	r: -0.543** AUC ≥A1: 0.825 AUC ≥A2: 0.759
<i>Taouli B, 2007 [159]</i>	30 casos: 23 pacientes con enfermedad hepática crónica (78% con hepatitis vírica) y 7 sujetos sanos	1.5T; Difusión (0-50-300-500-700-1,000); ADC.	Inflamación (presencia)	Batts Ludwig AO-4 (73% A1-4)	r: -0.516* AUC ≥A1: 0.875*
<i>Koinuma, 2005 [161]</i>	75 casos: 31 pacientes con enfermedad hepática crónica y 34 sujetos sanos	1.5 T; Difusión monoexponencial (0-128); ADC.	Inflamación (presencia)	Knodell HAI (68% hepatitis crónica) [163]	p > 0,05
<i>Boulanger, 2003 [162]</i>	31 casos: 18 pacientes VHC y 13 sujetos sanos	1.5 T; Difusión (50-100-150-200-250); ADC.	Inflamación (grados)	Ishak AO-18	p > 0,05
<i>Marti-Bonmatí L, 1993 [125]</i>	128 casos: 100 pacientes con enfermedad hepática crónica (76% vírica), 28 sujetos sanos	0.5 T; imagen STIR (TI: 100 msec); H/G.	Inflamación (grados)	Knodell HAI (42% hepatitis crónica) [163]	H/G ≥ 1,6 se relaciona con HAI ≥ 5 *

**Tabla 5:** Estudios realizados en población humana que han evaluado distintas técnicas de RM (Difusión, mapas T1 y STIR) para la detección y cuantificación de inflamación hepática, tomando el análisis histológico como patrón de referencia. Se resumen 24 estudios ordenados cronológicamente. La columna imagen RM incluye la intensidad de campo (Teslas); secuencia (Difusión y modelo [IVIM, Kurtosis], mapa T1 [shMOLLI y T1ρ], STIR) y protocolo adquisición entre paréntesis (valores b para Difusión, TR/TE para T1, T2SL para T1ρ y TI para STIR); biomarcadores de imagen analizados (ADC para Difusión; D, D\* y f para IVIM; Dapp y Kapp para Kurtosis; tiempo relajación T1, T1c y T1ρ para mapas T1; H/G para STIR). \*p<0,05; \*\*p<0,001.

Estudio	Población	RM	Patrón referencia	Resultados
<i>Kim JW; 2020 [129]</i>	47 pacientes con EHGNA (EHNA definida por la puntuación SAF)	3.0 T; elastografía RM, ERM, mapas de <b>T1</b> (tiempo relajación T1). <b>MR Index</b>	FLIP/SAF (43% EHNA)	AUC EHNA: 0.883
<i>Lee YS, 2020 [66]</i>	130 pacientes con EHGNA (EHNA definida por la puntuación SAF)	3.0T mDixon-FGDP, <b>elastografía RM</b> , ERM, mapas de <b>T1</b> , Difusión	NASH-CRN (54% EHNA)	T1 AUC EHNA: 0.59 (0.49-0.67) Elastografía AUC EHNA: 0,77
<i>Wildman-Tobriner B, 2018. [69]</i>	370 pacientes con EHGNA (EHNA: NAS ≥4)	1,5/3T; MECSE, <b>FGDP</b>	NASH-CRN	AUC EHNA: 0.72 (0.59-0.84) [punto de corte: 12,4%] r NAS: 0,54**
<i>Eddowes PJ, 2018 [70]</i>	50 pacientes con EHGNA (EHNA definida por la puntuación SAF y NAS≥5)	3.0T, T1, T2*, PDFF-Dixon <b>(LiverMultiScan); T1c</b>	NASH-CRN (76% EHNA)	AUC EHNA (SAF): 0.69 (IC 95% 0.5-0.88) AUC EHNA-NAS: 0.74 (IC 95% 0.59-0,88) ρ NAS: 0,51**
<i>Park C, 2017 [75]</i>	104 pacientes con EHGNA (EHNA: NAS ≥5)	3.0T, <b>Elastografía RM</b>	NASH-CRN (63% EHNA)	AUC EHNA: 0.70 (IC95% 0.57-0.82)
<i>Pavlidis M; 2016 [127]</i>	71 pacientes con EHGNA (EHNA definida por la puntuación SAF)	3.0 T; Mapas T1-T2* (shMOLLI); T1c (msec) corregido por T2* y LIF score <b>(LiverMultiScan)</b> .	FLIP/SAF (65% EHNA)	LIF AUC EHNA: 0.80 (IC95% 0.69-0.92) r SAF: 0,7**
<i>Imajo K, 2016 [77]</i>	142 pacientes con EHGNA (EHNA: NAS ≥5)	3.0T; <b>elastografía RM</b> + <b>MECSE-FGDP</b>	NASH-CRN (27% EHNA)	AUC EHNA: 0.77 (IC95% 0.67-0.87)
<i>Gallego-Duran R, 2016 [126]</i>	Cohorte 1 (derivación): 39 pacientes EHGNA Cohorte 2 (validación): 87 pacientes EHGNA	1.5 T; Spin (single shot FSE-T2), dinámico (T1-EG) y STIR; <b>NASHMRI</b> (análisis radiómico).	FLIP/SAF (51% EHNA)	AUC EHNA cohorte 1: 0.88 (IC95% 0.77-0.99) AUC EHNA cohorte 2: 0.83 (IC95% 0.75-0.92)

<i>Parente DB, 2015 [144]</i>	(EHNA definida por SAF) 59 pacientes con EHGNA (esteatosis y DM) (EHNA: balonización)	3.0 T; <b>Difusión IVIM</b> (0-10-20-40-80-160-200- 400-800-1000); D, D*, f.	NASH-CRN (37% EHNA)	D AUC EHNA: 0.742 D* AUC EHNA: 0.678 f AUC EHNA: 0.607
-----------------------------------	--	--	------------------------	--

**Tabla 6:** Estudios realizados en población humana con enfermedad hepática grasa no alcohólica que han evaluado la imagen RM para la detección de esteatohepatitis. La tabla resume 9 estudios ordenados cronológicamente. La definición de esteatohepatitis se realizó con la escala histológica NASH-CRN o FLIP/SAF. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

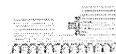


## **Anexo 2**





Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE  
VALENCIA

D. Antonio Peláez Hernández, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

## CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 27 de octubre de 2016, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

*Estudio prospectivo multicéntrico observacional de precisión diagnóstica de los biomarcadores de imagen en las hepatopatías crónicas difusas.*

Mismo que será llevado a cabo en el Servicio de Medicina Digestiva y cuyo investigador principal es el Dr. Miguel Angel Serra Desfilis, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la *Declaración de Helsinki* (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la *Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO* y los acuerdos del *Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina* (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la corealización de la Tesis Doctoral de Don David Martí Aguado.

Valencia, 27 de octubre de 2016.

Fdo. : D. Antonio Peláez Hernández  
Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica



FPNT-CEIB-04 (B)

## DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **14 de junio de 2017**, el Proyecto de Investigación:

Título: **“ESTUDIO PROSPECTIVO MULTICÉNTRICO DE PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS BIOMARCADORES DE IMAGEN EN LAS HEPATOPATÍAS CRÓNICAS DIFUSAS.”**

Nº de Registro: **2017/00031/PI**

Versión/fecha del protocolo: **Marzo 2017**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: **2/ 30 de marzo de 2017**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el **Dr. SALVADOR BENLLOCH PEREZ** del servicio de **MEDICINA DIGESTIVA**, y por el **Dr. LUIS MARTÍ BONMATÍ** del servicio de **RADIOLOGÍA** como Investigadores Principales.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a **14 de junio de 2017**



Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán  
Secretario del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos



CEIm: 29/2019

**Dr. Fernando Sánchez-Toril López, Presidente del Comité Ético de Investigación con medicamentos del Departamento de Salud Arnau de Vilanova – Llíria**

**INFORMA**

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación con medicamentos del Hospital Arnau de Vilanova, en su sesión ordinaria del día **27 de Noviembre de 2019 (acta 13/2019)**, y una vez estudiada la documentación presentada por el Dr. Salvador Benloch Pérez en calidad de investigadora principal, del proyecto que se llevara a cabo en el Servicio Digestivo del Hospital Arnau de Vilanova-Llíria en colaboración con los Hospitales H. Universitario y politécnico de la Fe de Valencia y Hospital Clínico de Valencia, como miembros del equipo tiene a bien informar que el proyecto de investigación, titulado:” **“Estudio multicentrico de precisión diagnostica de los biomarcadores de imagen en las hepatopatías crónicas difusas.”**”, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Se emite **dictamen favorable** a la realización de dicho proyecto.

Y para que conste, lo firma en Valencia con fecha 27 de Noviembre del 2019

Fdo. Dr. Fernando Sánchez-Toril López  
Presidente del CEIm





# **Anexo 3**



Section & Topic	No	Item	
<b>TITLE OR ABSTRACT</b>			
	<b>1</b>	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>			
	<b>2</b>	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	
<b>INTRODUCTION</b>			
	<b>3</b>	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	<b>29-47</b>
	<b>4</b>	Study objectives and hypotheses	<b>51-53</b>
<b>METHODS</b>			
<i>Study design</i>	<b>5</b>	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	<b>57</b>
<i>Participants</i>	<b>6</b>	Eligibility criteria	<b>58</b>
	<b>7</b>	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	<b>58</b>
	<b>8</b>	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	<b>57-58</b>
	<b>9</b>	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	<b>57-58</b>
<i>Test methods</i>	<b>10a</b>	Index test, in sufficient detail to allow replication	<b>74-85</b>
	<b>10b</b>	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	<b>59-68</b>
	<b>11</b>	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	<b>59-64</b>
	<b>12a</b>	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	<b>87</b>
	<b>12b</b>	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	<b>62-64</b>
	<b>13a</b>	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	<b>74</b>
	<b>13b</b>	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	<b>62</b>
<i>Analysis</i>	<b>14</b>	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	<b>86-89</b>

	<b>15</b>	How indeterminate index test or reference standard results were handled	<b>86-89</b>
	<b>16</b>	How missing data on the index test and reference standard were handled	<b>86-89</b>
	<b>17</b>	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	<b>86-89</b>
	<b>18</b>	Intended sample size and how it was determined	<b>89</b>
<b>RESULTS</b>			
<i>Participants</i>	<b>19</b>	Flow of participants, using a diagram	<b>95</b>
	<b>20</b>	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	<b>93-95</b>
	<b>21a</b>	Distribution of severity of disease in those with the target condition	<b>96-97</b>
	<b>21b</b>	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	<b>95</b>
	<b>22</b>	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	<b>93</b>
<i>Test results</i>	<b>23</b>	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	<b>96-97, 116-118, 121-124</b>
	<b>24</b>	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	<b>98-126</b>
	<b>25</b>	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	<b>93</b>
<b>DISCUSSION</b>			
	<b>26</b>	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	<b>155-157</b>
	<b>27</b>	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	<b>151-154</b>
<b>OTHER INFORMATION</b>			
	<b>28</b>	Registration number and name of registry	<b>57</b>
	<b>29</b>	Where the full study protocol can be accessed	<b>253-255</b>
	<b>30</b>	Sources of funding and other support; role of funders	



# Anexo 4





# Digital pathology: accurate technique for quantitative assessment of histological features in metabolic-associated fatty liver disease

David Marti-Aguado | Alejandro Rodríguez-Ortega | Claudia Mestre-Alagarda |  
Mónica Bauza | Elena Valero-Pérez | Clara Alfaro-Cervello | Salvador Benlloch |  
Judith Pérez-Rojas | Antonio Ferrández | Pilar Alemany-Monraval |  
Desamparados Escudero-García | Cristina Monton | Victoria Aguilera |  
Ángel Alberich-Bayarri | Miguel Ángel Serra | Luis Marti-Bonmati

Valencia, Spain

## Correspondence

David Marti-Aguado, Department of Gastroenterology and Hepatology, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain; Río Hortega, Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain.  
Email: davidmmaa@gmail.com

## Funding information

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III (PI19/0380) and GILEAD Sciences (Grant Number: GLD19/00050). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## Summary

**Background:** Histological evaluation of metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) biopsies is subjective, descriptive and with interobserver variability.

**Aims:** To examine the relationship between different histological features (fibrosis, steatosis, inflammation and iron) measured with automated whole-slide quantitative digital pathology and corresponding semiquantitative scoring systems, and the distribution of digital pathology measurements across Fatty Liver Inhibition of Progression (FLIP) algorithm and Steatosis, Activity and Fibrosis (SAF) scoring system

**Methods:** We prospectively included 136 consecutive patients who underwent liver biopsy for MAFLD at three Spanish centres (January 2017–January 2020). Biopsies were scored by two blinded pathologists according to the Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) Clinical Research Network system for fibrosis staging, the FLIP/SAF classification for steatosis and inflammation grading and Deugnier score for iron grading. Proportionate areas of collagen, fat, inflammatory cells and iron deposits were measured with computer-assisted digital image analysis. A test-retest experiment was performed for precision repeatability evaluation.

**Results:** Digital pathology showed strong correlation with fibrosis ( $r = 0.79$ ;  $P < 0.001$ ), steatosis ( $r = 0.85$ ;  $P < 0.001$ ) and iron ( $r = 0.70$ ;  $P < 0.001$ ). Performance was lower when assessing the degree of inflammation ( $r = 0.35$ ;  $P < 0.001$ ). NASH cases had a higher proportion of collagen and fat compared to non-NASH cases ( $P < 0.005$ ), whereas inflammation and iron quantification did not show significant differences between categories. Repeatability evaluation showed that all the coefficients of variation were  $\leq 1.1\%$  and all intraclass correlation coefficient values were  $\geq 0.99$ , except those of collagen.

The complete list of authors' affiliation are listed in Appendix 1.

The Handling Editor for this article was Professor Jonathan Rhodes, and it was accepted for publication after full peer-review.



## Magnetic Resonance imaging analysis of liver fibrosis and inflammation: overwhelming gray zones restrict clinical use

D. Marti-Aguado<sup>1,2</sup> · A. Rodríguez-Ortega<sup>2</sup> · A. Alberich-Bayarri<sup>2,3</sup> · L. Marti-Bonmati<sup>2,4</sup> Received: 31 May 2020 / Revised: 30 July 2020 / Accepted: 18 August 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

### Abstract

Magnetic resonance (MR) identification and grading of subjects with liver fibrosis and inflammation represents a clinical challenge. MR elastography plays a well-defined role in fibrosis estimation, but its use is not widely available in clinical settings. Given that liver MR is becoming the reference standard for fat and iron quantitation, there is a need to clarify whether there is any role for MR imaging in the concomitant evaluation of fibrosis and inflammation in this setting. This review summarizes the diagnostic estimations of different MR imaging parameters obtained from conventional non-contrast-enhanced multiple *b* values diffusion-weighted acquisitions, variable flip angles T1 relaxation maps and STIR images. Although some derived parameters have shown a significant correlation to histological scores, a small magnitude of effect with wide overlap across severity grades is the rule. Contrary to fat and iron quantification, the low precision and reproducibility of MR imaging metrics limits its clinical relevance in fibrosis and inflammation assessment. In a sequential clinical approach combining different methodologies, MR imaging has no applicability for ruling-out and low accuracy for ruling-in advanced fibrosis. Thereby, MR elastography remains as the only image method with high diagnostic accuracy for the detection of advanced fibrosis. Until date, inflammation remains in a gray zone where biopsy cannot be replaced, and further investigations are needed. The present review offers an in-depth discuss of the MR imaging diagnostic performance for the evaluation of liver fibrosis and inflammation, highlighting the need for scientific improvements.

**Keywords** Magnetic resonance (MR) · Chronic liver disease (CLD) · Diffusion-weighted imaging · T1 relaxometry (mapping) · Short-TI inversion recovery STIR sequence · Liver fibrosis · Inflammation

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00261-020-02713-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ L. Marti-Bonmati  
mart\_iui@gva.es

<sup>1</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

<sup>2</sup> Biomedical Imaging Research Group (GIBI230 and PREBI), and Imaging La Fe Node at Distributed Network for Biomedical Imaging (ReDIB) Unique Scientific and Technical Infrastructures (ICTS), La Fe Health Research Institute, Valencia, Spain

<sup>3</sup> Quantitative Imaging Biomarkers in Medicine, QUIBIM SL, Valencia, Spain

<sup>4</sup> Radiology Department, La Fe University and Polytechnic Hospital, Av Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain

### Abbreviations

A	Inflammation grade
ADC	Apparent diffusion coefficient
AUC	Area under the curve
CLD	Chronic liver diseases
D	True molecular diffusion coefficient of water
D*	Pseudo-diffusion coefficient related to the incoherent microcirculation
DDC	Distributed diffusion coefficient
DW	Diffusion weighted
<i>f</i>	Percentage of microvascular volume or perfusion fraction
F	Fibrosis stage
L/F	Signal intensity of liver to subcutaneous fat ratio
IVIM-DW	Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted image
MR	Magnetic resonance
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis

Published online: 28 August 2020

Springer



## Differences in multi-echo chemical shift encoded MRI proton density fat fraction estimation based on multifrequency fat peaks selection in non-alcoholic fatty liver disease patients



D. Martí-Aguado<sup>a,b,c,\*</sup>, Á. Alberich-Bayarri<sup>c,d</sup>, J.L. Martín-Rodríguez<sup>e</sup>,  
M. França<sup>f</sup>, F. García-Castro<sup>d</sup>, J. González-Cantero<sup>g</sup>,  
Á. González-Cantero<sup>h</sup>, L. Martí-Bonmatí<sup>c,i</sup>

<sup>a</sup>Gastroenterology and Hepatology Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Río Hortega, Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup>Biomedical Imaging Research Group (GIBI<sup>30</sup>), La Fe Health Research Institute, Valencia, Spain

<sup>d</sup>QUIBIM SL, Quantitative Imaging Biomarkers in Medicine, Valencia, Spain

<sup>e</sup>Radiology Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

<sup>f</sup>Imaging Department, Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

<sup>g</sup>Department of Radiology, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain

<sup>h</sup>Department of Dermatology, Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, Spain

<sup>i</sup>Medical Imaging Department, La Fe Polytechnics and University Hospital, Valencia, Spain

### ARTICLE INFORMATION

#### Article history:

Received 18 February 2020

Accepted 28 July 2020

**AIM:** To compare the performance of multi-echo chemical-shift-encoded (MECSE) magnetic resonance imaging (MRI) proton density fat fraction (PDFF) estimation, considering three different fat frequency peak combinations, for the quantification of steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

**MATERIALS AND METHODS:** The present study was a prospective cross-sectional research of 121 patients with metabolic syndrome and evidence of hepatic steatosis on ultrasound, who underwent a 3 T MRI examination. All patients were studied with a multifrequency MECSE sequence. The PDFF was calculated using six peaks (MECSE<sub>p123456</sub>), three peaks (MECSE<sub>p456</sub>), and a single peak (MECSE<sub>p5</sub>) model. The two simpler fat peak models were compared to the six peaks model, which was considered the reference standard. Linearity was evaluated using linear regression while agreement was described using Bland–Altman analysis.

**RESULTS:** The mean age was 47 ( $\pm 9$ ) years and BMI was 29.9 ( $\pm 2.9$ ) kg/m<sup>2</sup>. Steatosis distribution was 15%/31%/54% (S1/S2/S3, respectively). Compared to MECSE<sub>p123456</sub>, both models provided linear PDFF measurements ( $R_2 = 0.99$  and 0.97, MECSE<sub>p456</sub> and MECSE<sub>p5</sub> respectively). Regression slope (0.92;  $p < 0.001$ ) and mean Bland–Altman bias ( $-1.5\%$ ; 95% limits of agreement:  $-3.19\%$ , 0.22%) indicated minimal underestimation by using PDFF-MECSE<sub>p456</sub>. Nonetheless, mean differences in PDFF estimations varied from  $-1.5\%$  (MECSE<sub>p456</sub>,  $p = 0.006$ ) to  $-2.2\%$  (MECSE<sub>p5</sub>,  $p < 0.001$ ) when compared to full six fat frequencies model.

\* Guarantor and correspondent: D. Martí-Aguado, Gastroenterology and Hepatology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Avda, Blasco Ibáñez 17, 46010, Valencia, Spain.

E-mail address: [davidmmaa@gmail.com](mailto:davidmmaa@gmail.com) (D. Martí-Aguado).

<https://doi.org/10.1016/j.crad.2020.07.031>

0009-9260/© 2020 The Royal College of Radiologists. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Model  
RX 10031-11

ARTICLE IN PRESS

1 Radiología. 2017;xxx(xx):xxx-xxx

2 **SERAM**  
Sociedad Española de Radiología Médica

RADIOLOGÍA

www.elsevier.es/rx



SERIE: CIRROSIS HEPÁTICA Y SUS COMPLICACIONES

## 3 Cuantificación de la fibrosis hepática mediante 4 biomarcadores de imagen

5 Q1 A. Berzigotti<sup>a,\*</sup>, M. França<sup>b</sup>, D. Martí-Aguado<sup>c</sup> y L. Martí-Bonmatí<sup>d</sup>

6 <sup>a</sup> Swiss Liver Center, Hepatology, University Clinic for Visceral Surgery and Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

7 <sup>b</sup> Imaging Department, Centro Hospitalar do Porto; I3S, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde; IBMC, Institute for  
8 Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal

9 <sup>c</sup> Servicio de Digestivo, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, España

10 <sup>d</sup> Servicio de Radiología, Área Clínica de Imagen Médica, Hospital Universitario y Politécnico La Fe; Grupo de Investigación  
11 Biomédica GIBI230, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

12 Recibido el 16 de febrero de 2017; aceptado el 3 de septiembre de 2017

### 13 PALABRAS CLAVE

14 Fibrosis hepática;  
15 Elastografía por  
16 ecografía;  
17 Elastografía por  
18 resonancia  
19 magnética;  
20 Biomarcadores de  
21 imagen;  
22 Resonancia  
23 magnética  
24 cuantitativa

**Resumen** La creciente prevalencia y la morbimortalidad de las enfermedades crónicas del hígado justifican la necesidad de identificar precozmente la fibrosis. El grado de fibrosis hepática determina el pronóstico y sus opciones terapéuticas. Actualmente, la biopsia hepática representa el patrón de referencia para la estadificación de la fibrosis. Sin embargo, sus limitaciones y complicaciones han forzado el desarrollo de distintos métodos incruentos para la cuantificación de la fibrosis *in vivo*. Por su precisión y fiabilidad, destacan las mediciones de biomarcadores derivados de la ecografía y la resonancia magnética. Este artículo realiza una revisión de las distintas técnicas actualmente empleadas en la evaluación de la fibrosis hepática, su rendimiento diagnóstico, su aplicabilidad y su uso clínico. Para interpretar correctamente sus resultados en el contexto clínico apropiado, es necesario comprender estas técnicas de imagen y sus parámetros de calidad, la estandarización y la validación de sus unidades, y las medidas de control de los problemas metodológicos.

© 2017 SERAM. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### 26 KEYWORDS

27 Liver fibrosis;  
28 Ultrasound  
29 elastography;  
30 Magnetic resonance  
31 elastography

### Imaging biomarkers in liver fibrosis

**Abstract** There is a need for early identification of patients with chronic liver diseases due to their increasing prevalence and morbidity-mortality. The degree of liver fibrosis determines the prognosis and therapeutic options in this population. Liver biopsy actually represents the reference standard for fibrosis staging. However, given its limitations and complications, different non-invasive methods have been developed recently for the *in vivo* quantification of fibrosis.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [annalisa.berzigotti@insel.ch](mailto:annalisa.berzigotti@insel.ch) (A. Berzigotti).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rx.2017.09.003>

0033-8338/© 2017 SERAM. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Berzigotti A, et al. Cuantificación de la fibrosis hepática mediante biomarcadores de imagen. Radiología. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rx.2017.09.003>

# **Anexo 5**





MINISTERIO  
DE CIENCIA, INNOVACIÓN  
Y UNIVERSIDADES



Instituto  
de Salud  
Carlos III

Madrid, 14 de octubre de 2019

Estimado/a Dr. /Dra. Martí Bonmati, Luis,

Las propuestas recibidas en esta 7ª Convocatoria de proyectos de investigación en VIH, enfermedades hepáticas y hemato-oncología de GILEAD Sciences, han sido sometidas a un proceso de evaluación en dos etapas.

La primera de ellas ha consistido en una evaluación científico-técnica de cada proyecto llevada a cabo de forma individual por expertos internacionales.

Estos expertos han sido seleccionados por el ISCIII, y de modo confidencial e independiente, han emitido dos informes de evaluación sobre cada propuesta.

Tras el examen de los informes individuales, se ha elaborado un informe de síntesis científico-técnico por expertos nacionales independientes.

En la segunda fase, la Comisión Técnica de Evaluación, se reunió en un panel con expertos de VIH, Enfermedades Hepáticas y Hemato-Oncología, en la que se trataron todas las propuestas. En esta sesión de panel se confeccionó la lista de prelación de los proyectos propuestos para la financiación.

El proyecto titulado "*Multicenter Study of diagnostic accuracy for quantification by Magnetic Resonance Imaging of liver steatosis, inflammation, fibrosis, iron and vascular resistance in non-alcoholic fatty liver disease*", con número de expediente **GLD19/00050**, ha obtenido la siguiente financiación:

PERSONAL	BIENES Y SERVICIOS	VIAJES	TOTAL	TOTAL + GASTOS INDIRECTOS
0,00	41.160,00	3.900,00	45.060,00	49.566,00

Como establecen las bases de la 7ª Convocatoria de proyectos de investigación en VIH, enfermedades hepáticas y hemato-oncología de GILEAD Sciences, en los próximos días GILEAD se pondrá en contacto con ustedes para proceder a la tramitación de la firma del convenio de colaboración entre GILEAD y la entidad solicitante beneficiaria.

Reciba un cordial saludo,

Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación  
Instituto de Salud Carlos III



**FIRMADO**



FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL LA FE	INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA HOSPITAL LA FE	HOSPITAL LA FE	G97067557	PI19/00153	MALABSORCIÓN/INTOLERANCIA A CARBOHIDRATOS; UNA NUEVA PERSPECTIVA PARASITOLÓGICA CON IMPLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO	28.107.465A.758	48.400,00 €	21.780,00 €	13.310,00 €	13.310,00 €
FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL LA FE	FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL LA FE		G97067557	PI19/00245	Generación de un producto biológico basado en vesículas extracelulares angiogénicas generadas por células mesenquimales modificadas genéticamente para el tratamiento de las enfermedades cardio-vasculares (Acónimo: GEVECAR)	28.107.465A.758	147.820,00 €	36.300,00 €	55.860,00 €	55.860,00 €
FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL LA FE	FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL LA FE		G97067557	PI19/00303	Distrofias de Retina. Síndrome de Usher: una aproximación genómica, celular, funcional y bioinformática, para acelerar su diagnóstico y tratamiento y medir su impacto	28.107.465A.758	191.180,00 €	167.708,00 €	1.936,00 €	21.538,00 €
FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL LA FE	INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA HOSPITAL LA FE	HOSPITAL LA FE	G97067557	PI19/00380	Estudio prospectivo multicéntrico de la precisión diagnóstica para la cuantificación mediante imágenes multiparamétricas por resonancia magnética de fibrosis hepática, inflamación, esteatosis, hierro y resiste	28.107.465A.758	75.020,00 €	36.300,00 €	19.360,00 €	19.360,00 €

La autenticidad de este documento puede ser comprobada mediante el código electrónico: QTU0509PLPL1SKX en <http://www.pap.mihap.gob.es>

BELDA INESTA CRISTOBAL - 2019-07-31 13:34:32 CET



### DILIGENCIA:

Para hacer constar a los efectos de adjuntar la presente al Nombramiento de Personal Estatutario Temporal Eventual para Servicios Temporales/Extraordinarios suscrito el 1 de enero de 2021 entre D. José Álvaro Bonet Pla, como empleador, Gerente del Departamento Clínico – Malvarrosa y de otra parte, y en concepto de Trabajador, **D. DAVID MARTÍ AGUADO** como Facultativo Especialista Medicina Digestiva.

Nombramiento realizado al amparo de la Subsección 3ª “Contratos Rio Hortega” de la Resolución de 28 de diciembre de 2018 de la Directora del Instituto de Salud Carlos III O.A., M.P., por la que se aprueba la convocatoria correspondiente al año 2019 mediante tramitación anticipada de concesión de subvenciones de la Acción Estratégica en Salud 2017-2020, del Programa Estatal de Investigación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020, referencia: CM19/00212, y cofinanciado por el instituto de Salud Carlos III y el Fondo Social Europeo.

Este nombramiento se hace según lo dispuesto en los artículos 9 y 33 de la Ley 55/2003, de 16 de diciembre (BOE 17.12.2003), del Estatuto Marco de personal estatutario de los servicios de salud.

Su duración será de 6 meses renovables hasta los dos años que establece el artículo 38 de la Resolución de 28 de diciembre de 2018.

Su jornada será de 1589 horas anuales efectivas.  
Su retribución será de 26.866 euros anuales, abonado en 14 pagas.

En Valencia 1 de enero de 2021.

**EL GERENTE DEL DEPARTAMENTO  
SALUD CLINICO – MALVARROSA**

**José Álvaro Bonet Pla**

  
**EL TRABAJADOR  
DAVID MARTÍ AGUADO**

