

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 754**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2016** **PCT/US2016/063482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17091658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2016** **E 16869219 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020** **EP 3380840**

54 Título: **Métodos para predecir la progresión del esófago de Barrett**

30 Prioridad:

25.11.2015 US 201562260010 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
09.06.2021

73 Titular/es:

CERNOSTICS, INC. (100.0%)
116 Research Drive
Bethlehem, PA 18015, US

72 Inventor/es:

THORNE, REBECCA J.

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Ignacio

ES 2 831 754 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para predecir la progresión del esófago de Barrett

5 Introducción

El esófago de Barrett (BE, por sus siglas en inglés) es un precursor de adenocarcinoma de esófago (EAC, por sus siglas en inglés). Aunque el riesgo de progresión de BE no displásico (ND) a EAC es muy bajo, las opciones de tratamiento para EAC avanzado son limitadas y la detección temprana es fundamental para un manejo óptimo del paciente. El EAC se puede prevenir si la displasia se detecta y se trata temprano con terapias de erradicación endoscópica tales como ablación por radiofrecuencia (RFA, por sus siglas en inglés) y/o resección endoscópica de la mucosa (EMR, por sus siglas en inglés). A pesar de los programas de vigilancia endoscópica destinados a prevenir el EAC en pacientes con BE, la incidencia de EAC sigue siendo un problema de salud con tasas de supervivencia a 5 años de un 17 %. Se necesitan pruebas precisas para identificar pacientes con BE que tienen alto riesgo de progresión y requieren intervención terapéutica, así como para reconocer a pacientes con BE de bajo riesgo que posiblemente pueden reducir la frecuencia de vigilancia endoscópica. Dichas pruebas han sido difíciles de desarrollar hasta la fecha.

Las directrices de práctica actuales recomiendan la vigilancia endoscópica con biopsias a frecuencias determinadas por el grado de displasia. Sin embargo, la evaluación histológica de las biopsias esofágicas puede estar limitada por la variación entre observadores y el muestreo endoscópico aleatorio. Las anomalías histológicas en BE forman un espectro continuo y puede ser difícil distinguir los grados de displasia. Adicionalmente, los cambios moleculares y celulares asociados con la transformación maligna pueden preceder a los cambios morfológicos que los patólogos pueden evaluar mediante histología. Se han realizado esfuerzos durante mucho tiempo para identificar biomarcadores de predicción de riesgo en BE. Este concepto se ha vuelto más importante con el advenimiento de terapias endoscópicas altamente eficaces tales como RFA y EMR. Se han evaluado muchos biomarcadores en BE, pero los biomarcadores de predicción de riesgo han sido difíciles de identificar. La British Society of Gastroenterology (BSG) recomienda el uso de inmunohistoquímico (IHC, por sus siglas en inglés) p53 para ayudar al diagnóstico de displasia, sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado ni validado ningún biomarcador o grupo de biomarcadores para una predicción precisa de riesgo. La compleja estructura de tejidos destaca la necesidad de un enfoque de biología de sistemas alternativo a la patología anatómica. La evaluación de tejidos como un "sistema" puede mejorar las herramientas actuales mediante la cuantificación de características genéticas, inmunológicas, vasculares y morfológicas relevantes para los resultados del paciente. Estas características moleculares y celulares pueden estratificar con mayor precisión las diferencias genéticas y no genéticas que colocan a los pacientes con EB en riesgo de progresión. Este enfoque de patología de sistemas tisulares se describe en Rebecca J. Critchley-Thorne *et al.*: "TissueCypher (TM): A systems biology approach to anatomic pathology", Journal of Pathology Informatics, vol. 6, n.º 1, 31 de agosto de 2015, página 48 y se ha demostrado que tiene posibles aplicaciones de diagnóstico en BE. Este enfoque también puede tener aplicaciones de pronóstico mediante la cuantificación objetiva de múltiples características moleculares y celulares que preceden a los cambios morfológicos definitivos. En el presente documento, se describe un enfoque de patología de sistemas tisulares para estratificación del riesgo en BE. El enfoque emplea el marcaje de biomarcadores de fluorescencia multiplexado con imágenes digitales y análisis de imágenes para cuantificar objetivamente múltiples biomarcadores y morfologías epiteliales y estromales. Los datos morfométricos/biomarcadores cuantitativos se integran mediante un clasificador multivariante en las puntuaciones de pronóstico. El objetivo era desarrollar y validar de forma independiente una prueba de patología de sistemas tisulares que prediga el riesgo futuro de progresar a displasia de alto grado (HGD, por sus siglas en inglés)/EAC en pacientes con BE.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar un riesgo de progresión de esófago de Barrett en un sujeto, que comprende: a) proporcionar una muestra del sujeto; b) detectar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu; c) determinar características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y morfología, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos, relación de intensidad del 95º cuantil de HER2/neu:intensidad del 95º cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática, desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular, momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53 e intensidad del 95º cuantil nuclear de Hoechst; d) determinar una puntuación usando la combinación de las características de análisis de imágenes; y e) correlacionar la puntuación con el riesgo de progresión de esófago de Barrett en el sujeto.

En una realización del método, el sujeto tiene un mayor riesgo de displasia de bajo grado, displasia de alto grado o

cáncer de esófago. En otra realización del método, el sujeto ha recibido un diagnóstico de metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, indefinido para displasia, displasia de bajo grado o displasia de alto grado. Incluso en otra realización del método, la detección de la pluralidad de biomarcadores comprende usar sondas que se unen específicamente a cada uno de los biomarcadores; opcionalmente, en donde las sondas son fluorescentes y/o comprenden un marcador fluorescente, o se detectan mediante una sonda secundaria que es fluorescente y/o comprende un marcador fluorescente, opcionalmente en donde cada sonda está marcada con un fluoróforo diferente. En esta realización, se pueden formar imágenes de portaobjetos marcados para producir campos de visión y/o se pueden analizar portaobjetos completos para extraer características asociadas con biomarcadores y morfología.

En algunas realizaciones del método, la detección de la pluralidad de biomarcadores se determina simultáneamente.

En algunas realizaciones del método, la muestra comprende células que contienen núcleos celulares y en donde los núcleos celulares están marcados con un grupo de reactivos seleccionados del grupo que consiste en Hoechst, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinciones de ácido nucleico de cianina y hematoxilina.

En algunas realizaciones del método, la puntuación se utiliza para determinar si un paciente es candidato para una intervención terapéutica para prevenir la progresión del esófago de Barrett; opcionalmente, en donde la intervención terapéutica es una ablación endoscópica y/o una terapia de resección quirúrgica, o una terapia quirúrgica no endoscópica o una terapia sistémica.

En algunas realizaciones del método, (a) la muestra comprende un cepillado, raspado, biopsia o resección quirúrgica de células y/o tejido obtenido del sujeto, (b) la misma está a temperatura ambiente o congelada, o (c) la muestra se obtuvo recientemente, fijada con formalina, fijada con alcohol o incluida en parafina.

En algunas realizaciones del método, la muestra se tomó mediante muestreo endoscópico aleatorio, muestreo endoscópico asistido por computadora, muestreo endoscópico guiado por imágenes, o muestreo no endoscópico mediante cepillado, abrasión o raspado.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para clasificar el esófago de Barrett en un sujeto que comprende: a) proporcionar una muestra del sujeto; b) detectar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX-2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu; c) determinar las características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y morfología, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos, relación de intensidad del 95 $^{\circ}$ cuantil de HER2/neu:intensidad del 95 $^{\circ}$ cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática; desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular, momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53 e intensidad del 95 $^{\circ}$ cuantil nuclear de Hoechst; (d) determinar una puntuación usando la combinación de las características de análisis de imágenes; y e) correlacionar la puntuación con una clasificación del esófago de Barrett.

En una realización del método, la clasificación del esófago de Barrett comprende metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, displasia de bajo grado y displasia de alto grado.

En otra realización del método, la detección de la pluralidad de biomarcadores comprende usar sondas que se unen específicamente a cada uno de los biomarcadores.

En algunas realizaciones del método, la muestra comprende células que contienen núcleos celulares, y en donde los núcleos celulares están marcados con un grupo de reactivos seleccionados del grupo que consiste en Hoechst, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinciones de ácido nucleico de cianina y hematoxilina.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Marcaje y toma de imágenes de biomarcadores multiplexados en casos de BE de pacientes con progresión de incidentes. Imágenes representativas de los 9 biomarcadores en los que se basa el clasificador de 15 características a partir de 2 biopsias ND (paneles A-B y C-D) y 1 biopsia LGD (paneles E-F) de pacientes con progresión de incidentes. A: p53, AMACR, p16, Hoechst; B: CD68, COX-2, Hoechst; C: p53, AMACR, p16, Hoechst; D: CD68, COX-2, Hoechst; E: HER2/neu, K20, Hoechst; F: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst.

FIG. 2. Desarrollo y rendimiento de la puntuación de riesgo de 15 características en el conjunto de capacitación de pacientes con BE. Panel A: Curva ROC para la puntuación de riesgo de 15 características en el conjunto de capacitación de pacientes con progresión de incidentes y sin progresión. Paneles B, C y D: Análisis de KM de la probabilidad de progresión a HGD/EAC en pacientes con puntuación de riesgo bajo, intermedio y alto mediante

el clasificador de riesgo de 15 características de las cuatro instituciones, las tres instituciones estadounidenses y AMC, respectivamente. Panel E: HR y OR univariantes con IC del 95 % para comparaciones entre grupos de riesgo.

FIG. 3. Detección de características de alto riesgo que preceden cambios morfológicos en BE. Se muestran imágenes de endoscopia, H&E y biomarcadores de fluorescencia multiplexados para un paciente con progresión de incidentes (IP, por sus siglas en inglés) paneles A-C) y un paciente sin progresión (NP) (paneles D-F) con diagnóstico del subespecialista GI de BE ND. El paciente con IP progresó a HGD (displasia de alto grado) 6,3 años más tarde y el clasificador de 15 características lo calificó de alto riesgo. El paciente NP tuvo 7,8 años de vigilancia endoscópica que no mostró progresión a HGD/EAC y se calificó de bajo riesgo. A: Imagen de endoscopia de IP que muestra BE sin lesiones visibles; B: Biopsia teñida con H&E de IP que muestra ND; C: Patrones de biomarcadores en la biopsia ND de IP (fragmento superior izquierdo: p53, p16, AMACR, Hoechst, superior derecha: HER2/neu, K20, Hoechst, inferior izquierda: CD68, COX-2, Hoechst, inferior derecha: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst; D: Imagen de endoscopia de NP que muestra BE sin lesiones visibles; E: Biopsia teñida con H&E de NP que muestra ND; F: Patrones de biomarcadores en la biopsia ND de NP que muestran ausencia de cambios de alto riesgo (superior izquierda: p53, p16, AMACR, Hoechst, superior derecha: HER2/neu, K20, Hoechst, inferior izquierda: CD68, COX-2, Hoechst, inferior derecha: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst).

FIG. 4. Validación del clasificador de riesgo de 15 características en un conjunto de validación independiente de pacientes con BE. Panel A: Curva ROC para el clasificador de riesgo de 15 entidades en el conjunto de validación. Paneles B, C y D: Análisis de KM de la probabilidad de progresión a HGD/EAC en el conjunto de validación de pacientes con puntuación de riesgo bajo, intermedio y alto mediante el clasificador de riesgo de 15 características en pacientes de las cuatro instituciones, instituciones estadounidenses y AMC, respectivamente. E: HR y OR (IC del 95 %) para comparaciones entre grupos de riesgo. F: Tasa de progresión a los 5 años en función continua de la puntuación de riesgo.

FIG. 5. Diagrama de flujo de etapas para capacitar y validar el clasificador de 3 niveles y 15 características/mediciones para la predicción de riesgos en biopsias de esófago de Barrett.

FIG. 6. Rendimiento del clasificador de riesgo de 3 niveles en la estratificación de pacientes con BE con HGD/EAC prevalente a partir de pacientes con BE sin progresión. Panel A: Curva ROC para clasificador de riesgo de 3 niveles basado en el resultado binario de bajo/alto. Panel B: Análisis de KM de la probabilidad de diagnóstico posterior de HGD/EAC en pacientes con puntuación de riesgo bajo, intermedio y alto mediante el clasificador de riesgo. Panel C: HR y OR univariantes con IC del 95 % para comparaciones entre los grupos de riesgo previstos por el clasificador.

La FIG. 7 ilustra un proceso clasificador de riesgo de 3 niveles y 15 características y la puntuación de riesgo (0-10) y la clase (baja, intermedia o alta) se calculan a partir de la suma ajustada y ponderada por coeficientes de 15 mediciones (características) de análisis de imágenes cuantitativas procedentes de 9 biomarcadores basados en proteínas y morfología de la siguiente manera: 1) *Marcaje de portaobjetos de inmunofluorescencia multiplexados* - Las secciones seriadas de las biopsias de BE FFPE están inmunomarcadas con fluorescencia para p16, AMACR, p53, HER2, K20, CD68, COX-2, HIF-1 α y CD45RO, más Hoechst; 2) *Escaneo de fluorescencia de portaobjetos completo* - Se obtienen imágenes de portaobjetos marcados mediante un escaneo de fluorescencia de portaobjetos completo que genera datos de imagen en cada biomarcador y núcleo; 3) *Análisis de imagen automatizado*: Las imágenes de tejido se analizan mediante un programa informático de análisis de imágenes automatizado para extraer 15 características de los 9 biomarcadores basados en proteínas y Hoechst; 4) *Clasificación de riesgo*: Las 15 características se ajustan utilizando parámetros de centro y ajuste definidos en un estudio de capacitación, ponderado luego por los coeficientes procedentes del análisis de regresión de Cox univariante de las características y los resultados de progresión en el estudio de capacitación como se describe en el presente documento.

La FIG. 8 ilustra el rendimiento de la puntuación de riesgo de 15 características en biopsias de BE no displásicas y con LGD de pacientes sin progresión y pacientes con HGD/EAC prevalente. Panel A: Curva ROC para la puntuación de riesgo de 15 características y porcentaje de células que sobreexpresan p53 (determinada por un programa informático de análisis de imágenes como se describió anteriormente (Ejemplo 3, referencia 19). Panel B: Gráficos de caja y bigotes de la puntuación de riesgo de 15 características en los casos de no progresión y prevalentes ($p < 0,0001$, prueba de suma de rango de Wilcoxon que compara casos de no progresión frente a todos los prevalentes). Panel C: OR univariantes con IC del 95 % y valores p de regresión logística para comparaciones entre las clases de riesgo previstas. Panel D: Número de casos con puntuación de riesgo bajo, intermedio (inter) y alto mediante diagnóstico patológico del subespecialista GI. Panel E: Tasa de diagnóstico posterior de HGD/EAC como una función continua de la puntuación de riesgo de 15 características. Las curvas discontinuas indican IC del 95 %. El gráfico de alfombra en el eje x muestra la puntuación de riesgo para los controles de no progresión (guiones negros) y los casos prevalentes (guiones rojos), y se muestran valores de corte para riesgo bajo, inter y alto.

La FIG. 9 ilustra imágenes representativas de biomarcadores de alto riesgo en biopsias de BE. Los paneles A-D muestran una biopsia ND de un paciente que tenía HGD en la endoscopia repetida 310 días después; A: p53, AMACR, Hoechst, B: HER2/neu, Hoechst. C: CD68, COX-2, Hoechst, D: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst. Los paneles E-H muestran una biopsia de LGD de un paciente que tuvo HGD en la endoscopia repetida 56 días después; E: p53, AMACR, Hoechst; F: HER2/neu, Hoechst. G: CD68, COX-2, H: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst. Los paneles I-L muestran una biopsia de LGD de un paciente que tuvo HGD en la endoscopia repetida 60 días después; I: p53, AMACR, Hoechst; J: HER2/neu, Hoechst. K: CD68, COX-2, Hoechst, L: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst. Los paneles M-P muestran una biopsia ND de un paciente de no progresión con un tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC de

2.186 días; M: p53, AMACR, Hoechst; N: HER2/neu, Hoechst. O: CD68, COX-2, Hoechst; P: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst.

La FIG. 10 ilustra imágenes representativas de biomarcadores de alto riesgo y puntuaciones de riesgo en múltiples niveles endoscópicos. Los paneles A-E y los paneles F-J muestran una biopsia de LGD y una biopsia ND, respectivamente, de un paciente con segmento de BE de 2 cm que tuvo HGD en la endoscopia repetida 56 días después. Las imágenes muestran anomalías epiteliales y estromales similares en las biopsias a pesar de la diferencia en el diagnóstico. Las puntuaciones de riesgo de 15 características para las biopsias LGD y ND fueron 8,7 y 8,9 (ambas de alto riesgo), respectivamente. Paneles A-E Biopsia LGD - A: H&E, B: p53, AMACR, Hoechst; C: HER2/neu, Hoechst. D: CD68, COX-2, Hoechst; E: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst. Paneles F-J Biopsia ND - F: H&E, G: p53, AMACR, Hoechst; H: HER2/neu, Hoechst. I: CD68, COX-2, Hoechst; J: HIF-1 α , CD45RO, Hoechst.

Descripción detallada

Debe entenderse que esta descripción detallada de metodologías particulares tiene el propósito de ilustrar únicamente y que la presente invención no pretende limitarse a ellas. También debe entenderse que la terminología utilizada en la descripción tiene el propósito de describir las versiones o realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance a menos que se indique explícitamente. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la técnica.

También cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usa en este documento, los términos "comprenden", "tienen", e "incluyen" y sus conjugados, como se usa en el presente documento, significan "incluyendo, pero sin limitación". Mientras que varias composiciones, métodos y dispositivos se describen en términos de "que comprenden" varios componentes o etapas (interpretados en el sentido de "que incluyen, pero sin limitación"), las composiciones, métodos y dispositivos también pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" los diversos componentes y etapas, y dicha terminología debe interpretarse como la definición de grupos esencialmente de miembros cerrados.

Los acrónimos de los biomarcadores utilizados en el presente documento se definen en la Tabla 1. Otros acrónimos no definidos específicamente en el presente documento tienen su significado conocido por un experto en la materia.

Tabla 1: Lista de biomarcadores

p53	antígeno tumoral celular p53, supresor tumoral p53
HIF-1 α	Factor-1 alfa inducible por hipoxia
COX2	Ciclooxigenasa-2
p16	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A, supresor tumoral múltiple 1
AMACR	Alfa-metilacil-CoA racemasa
CD68	Grupo de diferenciación 68
CD45RO	Grupo de antígeno de diferenciación 45 ubicado en linfocitos T de memoria
K20	Queratina 20
HER2/neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

Como se usa en el presente documento, el término "biomarcador" significa cualquier analito, metabolito, ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o fragmentos de la misma, poliproteína, complejo de proteínas, molécula, o compuesto químico que se produce, metaboliza, cataboliza, secreta, fagocita, o expresa por una célula o tejido y que proporciona una medida útil de la presencia, ausencia o cantidad de un determinado tipo de célula o característica descriptiva indicativa de, característica de o sugestiva de un diagnóstico de una enfermedad o trastorno particular. Los biomarcadores usados en los métodos de la presente invención son las moléculas identificadas en la Tabla 1. Los biomarcadores pueden ser la medida de los niveles de expresión del receptor, activación del factor de transcripción; ubicación o cantidad o actividad de una proteína, polinucleótido, orgánulo y similares; el estado de fosforilación de una proteína, relación de una proteína entre compartimentos celulares y compartimentos tisulares, relación de una proteína a otra proteína, ubicación conjunta o expresión conjunta de al menos dos proteínas, etc. El biomarcador puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, incluyendo micro ARN, ARNnp, ARNm, ARNr, etc.), un receptor, un antígeno de la membrana celular, un antígeno intracelular y un antígeno extracelular, una molécula de señalización, una proteína, y similares sin limitación, lípidos, lipoproteínas, proteínas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, péptidos, ácidos nucleicos, genes y oligonucleótidos, junto con sus complejos relacionados, metabolitos, mutaciones, las variantes, polimorfismos, modificaciones, fragmentos, subunidades, productos de degradación, elementos y otros analitos o medidas procedentes de la muestra. Un biomarcador también puede incluir una proteína o proteínas mutadas, un ácido nucleico mutado o ácidos nucleicos mutados, variaciones en el número de copias y/o variantes de transcripción, en circunstancias en las que dichas mutaciones,

variaciones en el número de copias y/o variantes de transcripción son útiles para generar un modelo predictivo, o son útiles en modelos predictivos desarrollados usando marcadores relacionados (por ejemplo, versiones no mutadas de las proteínas o ácidos nucleicos, transcripciones alternativas, etc.).

Como se usa en el presente documento, la enfermedad es un trastorno gastrointestinal. Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno gastrointestinal" se refiere a cualquier enfermedad o anomalía relacionada con el tubo digestivo que incluye, pero no necesariamente se limita a, una o más de las siguientes afecciones: dolor abdominal, enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), estreñimiento, diarrea, diverticulosis, hemorragia gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de intestino, cáncer de colon, esófago de Barrett, enfermedad del intestino irritable, colitis infecciosa, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis isquémica, colitis por radiación, síndrome de intestino irritable, perforación aguda, íleon, apendicitis, abscesos intraabdominales, obstrucción intestinal, gastritis, gastritis atrófica metaplásica autoinmunitaria, úlceras en el estómago, enfermedad de úlcera péptica, dispepsia, tumores estromales gastrointestinales, tumores del intestino delgado, síndrome del músculo elevador, enfermedad pilonidal, proctitis, fístulas, fisuras, incontinencia.

La expresión "subclase del esófago de Barrett" se refiere a cualquier presentación del esófago de Barrett clasificada como con una combinación común de una o más características descriptivas. Una subclase del esófago de Barrett puede referirse a una de las siguientes afecciones: esófago de Barrett, sin displasia, sin progresión en 5 años; esófago de Barrett, sin displasia, progresión a displasia de grado bajo/alto en 5 años; esófago de Barrett, indefinido para displasia, sin progresión en 5 años; esófago de Barrett, indefinido para displasia, progresión a adenocarcinoma o displasia de grado bajo/alto en 5 años; esófago de Barrett, atipia reactiva; esófago de Barrett, displasia de bajo grado, sin progresión en 5 años; esófago de Barrett, displasia de bajo grado, progresión a adenocarcinoma o displasia de alto grado en 5 años; esófago de Barrett, displasia de alto grado; adenocarcinoma de esófago que surge en un antecedente de esófago de Barrett. La subclase de esófago de Barrett puede referirse a una de las siguientes afecciones: displasia de bajo grado, displasia de alto grado, atipia reactiva, indefinida para displasia o esófago de Barrett indeterminado. La subclase de esófago de Barrett puede referirse a una cualquiera de las siguientes afecciones: epitelio columnar de tipo fúndico gástrico, epitelio columnar de tipo cardiaco o epitelio columnar de tipo intestinal con o sin células caliciformes presentes sobre la unión gastroesofágica.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "muestra de células", "muestra de tejido", o "muestra" significa una composición que comprende una célula aislada o una pluralidad de células. La muestra puede comprender una célula individual, una composición que comprende una pluralidad de células, una muestra de tejido tomada de un sujeto con un trastorno gastrointestinal, una muestra de tejido, una pluralidad de células del tracto gastrointestinal, o una pluralidad de células esofágicas. La muestra puede ser recién obtenida, fijada con formalina, fijada en alcohol y/o incluida en parafina. La muestra de células puede ser una biopsia aislada de un sujeto que ha sido diagnosticado con, se sospecha que tiene, o se ha identificado que tiene, uno o más trastornos gastrointestinales, epitelio columnar de tipo fúndico gástrico, epitelio columnar de tipo cardiaco o epitelio columnar de tipo intestinal con o sin células caliciformes presentes sobre la unión gastroesofágica o esófago de Barrett. La muestra puede comprender un tejido de un cepillado, raspado, biopsia por punción, biopsia por pellizco o resección quirúrgica de un sujeto. La muestra puede aislarse de un paciente humano en uno o más puntos temporales, de manera que al menos una muestra de tejido se aisle de cada punto temporal del mismo paciente. La muestra puede aislarse de múltiples ubicaciones espaciales del mismo paciente en el mismo punto temporal, incluyendo diferentes niveles endoscópicos. La muestra puede aislarse mediante muestreo aleatorio de áreas afectadas por trastornos gastrointestinales o esófago de Barrett o mediante técnicas guiadas por imágenes. La muestra puede incluir una sola célula o múltiples células o fragmentos de células o una alícuota de líquido corporal, tomado de un sujeto, por medios que incluyen venopunción, excreción, eyaculación, masaje, biopsia, aspiración con aguja, muestra de lavado, raspado, incisión quirúrgica o intervención u otros medios conocidos en la materia. La muestra se puede obtener por el sujeto o por un tercero, por ejemplo, un profesional médico. Ejemplos de profesionales médicos incluyen médicos, técnicos de emergencias médicas, enfermeras, personal de servicios de emergencia, psicólogos, personal físico médica, enfermera practicante, cirujanos, dentistas y cualquier otro profesional médico obvio que conozca un experto en la materia. Una muestra puede incluir células sanguíneas periféricas, leucocitos aislados o ARN extraído de células sanguíneas periféricas o leucocitos aislados. La muestra puede ser una pluralidad de muestras tomadas a múltiples niveles endoscópicos discretos. Por ejemplo, se toman diferentes muestras de un sujeto a diferentes niveles endoscópicos y se prepara una puntuación basada en la totalidad de las muestras en lugar de una sola muestra.

Como se usa en el presente documento, la expresión "características de análisis de imágenes" se refiere a las mediciones cuantitativas de biomarcadores y morfología dentro de objetos de imagen, incluyendo: características de intensidad de píxeles de los biomarcadores (media, suma, desviación estándar, momento); porcentajes de objetos que exhiben expresión alterada (sobreexpresión, expresión reducida o pérdida de expresión de biomarcadores); características de la relación de intensidad de píxeles (relación de un biomarcador entre diferentes compartimentos subcelulares, relación de un biomarcador a otro en el mismo o en un compartimento subcelular diferente); expresión conjunta o ubicación conjunta de dos o más biomarcadores dentro de la misma célula o dentro del mismo compartimento subcelular; textura de las señales de biomarcadores según lo evaluado mediante matrices de ocurrencia conjunta; morfometría, incluyendo el área objeto, diámetro equivalente, solidez, excentricidad. Las características se pueden ubicar en objetos segmentados basados en células, objetos estructurales de tejido, tipos

de células específicas, incluyendo células epiteliales, células endoteliales y células estromales, poblaciones específicas definidas mediante niveles de expresión de 1, 2 o 3 biomarcadores, y para obtener imágenes de microambientes o imágenes de regiones. La medida cuantitativa se puede transformar usando las ecuaciones descritas en el presente documento usando los coeficientes que se describen en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 2. Un experto en la materia entendería cómo transformar las mediciones en la puntuación bruta basándose en la divulgación en el presente documento y el conocimiento del experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término "control" significa tejido esofágico sano, tejido de esófago de Barrett sin displasia, tejido del esófago de Barrett de un sujeto que no progresó a displasia de grado bajo o grado alto, o a carcinoma de esófago.

Como se usa en el presente documento, el término "convertir" significa someter las características a una función de interpretación o algoritmo para un modelo predictivo de enfermedad. La función de interpretación también se puede producir mediante una pluralidad de modelos predictivos, tales como un modelo de regresión, una puntuación o clasificador bayesiano. La función de interpretación puede comprender uno o más términos asociados con uno o más biomarcadores o conjuntos de biomarcadores, uno o más términos asociados con la presencia o ausencia o distribución espacial de los tipos de células específicos desvelados en el presente documento. La función de interpretación comprende uno o más términos asociados con la presencia, ausencia, cuantía, intensidad o distribución espacial de las características morfológicas de una célula en una muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "ubicación" se refiere a un compartimento subcelular, célula completa o compartimento tisular. Los compartimentos subcelulares incluyen el núcleo, citoplasma, membrana plasmática y membrana nuclear. Los compartimentos tisulares incluyen el epitelio superficial, glándulas, lámina propia, estroma, capa muscular de la mucosa y tumor.

Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a cualquier molécula que se una o se intercala con un biomarcador, de manera covalente o no covalente, es decir, anticuerpos, moléculas de ADN o ARN. Las sondas pueden incluir conjuntos de sondas que incluyen una o más sondas que se unen a un único biomarcador. La expresión "conjunto de sondas" es a veces intercambiable para un grupo de dos o más sondas que permiten la detección de uno o más biomarcadores. La sonda o las sondas pueden marcarse con fluorescencia. La sonda marcada con fluorescencia puede ser específica para al menos un biomarcador. El grupo de sondas marcadas con fluorescencia puede detectar al menos aproximadamente dos biomarcadores diferentes. Cada sonda marcada con fluorescencia puede tener diferentes propiedades fluorescentes, que son suficientes para distinguir las diferentes sondas marcadas con fluorescencia en el grupo.

Los términos "reactivos" o "grupo de reactivos" se refieren a cualquier sustancia o mezcla para usar en análisis químico u otra reacción conocida por los expertos en la materia; es decir, tintes, disolventes, catalizadores, enzimas, patrones, moléculas orgánicas o inorgánicas.

La expresión "escáner óptico" se utiliza en toda la memoria descriptiva para describir cualquier dispositivo o serie de dispositivos que genere datos de imagen a partir de una muestra de células o conjunto de muestras de células o muestras de tejido. El escáner óptico se utiliza para describir cualquier dispositivo óptico o serie de dispositivos que generen datos de imágenes digitales a partir de una muestra o conjunto de muestras. El escáner óptico puede ser un microscopio conectado a un dispositivo óptico que genera datos de imágenes digitales, que, cuando se envía a un aparato de formación de imágenes, como una impresora láser, un lector de códigos de barras, un microscopio láser de barrido confocal, o una pantalla de imágenes (monitor), puede producir una imagen visible para un usuario.

Como se usa en el presente documento, el término "relación" significa la relación entre la cantidad de un biomarcador y la cantidad de un biomarcador diferente en el mismo o diferente compartimento subcelular o compartimento tisular. También puede significar la relación entre la cantidad de un biomarcador en un compartimento subcelular y la cantidad del mismo biomarcador en otro compartimento subcelular dentro de la misma célula. También puede significar la relación entre la cantidad de un biomarcador en un compartimento tisular y la cantidad del mismo biomarcador en otro compartimento tisular dentro de la misma biopsia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad de la suma de p53 nuclear" es la señal de la suma o total de p53 dentro de núcleos segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-p53 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad media de p53 nuclear" es la media de la intensidad de señal de p53 dentro de núcleos segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-p53 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos" se refiere a la relación entre la intensidad de señal media de HER2/neu y la intensidad media de citoqueratina-20 dentro de grupos de núcleos segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-citoqueratina-20 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "relación de intensidad del 95°cuantil de HER2/neu:intensidad del 95° cuantil de K20 en grupos de núcleos" se refiere a la relación entre la intensidad de señal del percentil 95 de HER2/neu y la intensidad de señal del percentil 95 de citoqueratina-20 dentro de grupos de núcleos segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-citoqueratina-20 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión conjunta de COX2 y CD68 celular" se refiere a la señal COX2 ubicada conjuntamente y la señal CD68 dentro de objetos celulares segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluye un anticuerpo anti-COX2, un anticuerpo anti-CD68 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad media de p53 en grupos de núcleos" es la media de la intensidad de señal de p53 dentro de grupos de núcleos segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-p53 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53" se refiere a la solidez de los bordes objeto de núcleos segmentados en células que exhiben sobreexpresión de p53 (por encima del umbral de positividad) y expresión reducida concomitante o pérdida de expresión de p16 (por debajo del umbral de positividad de p16) en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-p53, un anticuerpo anti-p16 y un marcador nuclear. Por ejemplo, la solidez de los bordes objetos de núcleos segmentados se calcula en una población de objetos basados en células segmentadas que pasan por dos filtros booleanos: la intensidad media de p53 nuclear es superior a 95 y la intensidad media de p16 celular es inferior a 100, en una escala de 0-1023 en imágenes de tejido de 10 bits, o una escala equivalente en imágenes de tejido de bits inferiores o superiores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática" es la señal de CD45RO total o suma dentro de los objetos de la membrana plasmática segmentada en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluye un anticuerpo anti-CD45RO y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "desviación estándar AMACR en el microambiente" es la desviación estándar de la intensidad de señal de AMACR en objetos basados en células segmentadas ubicados en rectángulos de microambiente de 161 x 161 píxeles en una imagen digital de tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-AMACR y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "textura de COX2 en el citoplasma" se refiere a la característica de textura de contraste extraída de una matriz de ocurrencia conjunta (descrita por Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern 1973; SMC-3: 610-21) y una medida de la intensidad de contraste de COX2 entre un píxel y su vecino en objetos de citoplasma segmentados en una imagen digital completa de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-COX2 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular" es la media de la intensidad de señal de HIF1alfa en objetos basados en células segmentadas ubicados en rectángulos de microambiente de 161 x 161 píxeles en una imagen digital de tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-HIF1alfa y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar)" es la media de la intensidad de señal de HIF1alfa multiplicada por la desviación estándar de la intensidad de señal de HIF1alfa en objetos basados en células segmentadas ubicados en rectángulos de microambiente de 161 x 161 píxeles en imagen digital de tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-HIF1alfa y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad media de p16 en el citoplasma" es la media de la intensidad de señal de p16 dentro de compartimentos del citoplasma segmentado en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-p16 y un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53" se refiere al área de, o al número de píxeles dentro de, núcleos objeto segmentados en células que exhiben sobreexpresión de p53 (por encima del umbral de positividad) y expresión reducida concomitante o pérdida de expresión de p16 (por debajo del umbral de positividad de p16) en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un anticuerpo anti-p53, un anticuerpo anti-p16 y un marcador nuclear. Por ejemplo, el área de objetos de núcleos segmentados se calcula en una población de objetos basados en células segmentadas que pasan por dos filtros booleanos: la intensidad media de p53 nuclear es superior a 95 y la intensidad media de p16 celular es inferior a 100, en una escala de 0-1023 en imágenes de 10 bits de muestras, o

una escala equivalente en imágenes de bits más bajos o más altos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "intensidad del 95º cuantil nuclear de Hoechst" es el percentil 95 de la intensidad de señal de Hoechst dentro de objetos de núcleos segmentados en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen un marcador nuclear.

Como se usa en el presente documento, la expresión "marcador nuclear" se refiere a la sustancia química histológica o fluorescente que se une a, o tiñe, los componentes de los núcleos, tales como el ADN, que cuando se obtienen imágenes se pueden utilizar para segmentar núcleos como objetos individuales con imágenes digitales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupos de núcleos" se refiere a la plantilla de análisis de imágenes que segmenta grupos de núcleos en una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluye un marcador nuclear. Por ejemplo, una plantilla de grupos de núcleos se basa en el suavizado gaussiano en el canal Hoechst de una imagen digital de un tejido marcado con reactivos que incluyen Hoechst, seguido de un filtro de orden de clasificación, umbral de imagen usando el método de Otsu, operaciones morfológicas para eliminar objetos pequeños (imagen abierta (erosión seguida de una dilatación con el mismo elemento estructurante), cerrar (dilatación seguida de una erosión con el mismo elemento estructurante) y dilatar con un plano, elemento estructurante en forma de disco)) y finalmente marcar los componentes conectados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "solidez nuclear" es una medida de la regularidad del contorno de la membrana nuclear, y se puede calcular como la relación entre el área del objeto nuclear y la cubierta convexa del objeto nuclear.

Como se usa en el presente documento, el término "puntuación" se refiere al valor numérico generado a partir del análisis de una muestra de un sujeto utilizando el modelo de predicción de riesgo de 15 características. La puntuación puede referirse a un valor único que se puede utilizar como componente en un modelo predictivo para el diagnóstico, pronóstico o plan de tratamiento clínico para un sujeto, en donde el valor único se calcula mediante la combinación de los valores de características descriptivas a través de una función de interpretación o algoritmo.

El "modelo de predicción de riesgo de 15 características" se define como el ajuste de las 15 características utilizando parámetros de ajuste y centro definidos, ponderado luego por los coeficientes procedentes del análisis de regresión de Cox univariante de las características y los resultados de progresión que se realizó en un estudio de capacitación de casos y controles anidados (véase la Tabla 2). La suma ponderada por coeficiente (véase, por ejemplo, la Tabla 2) de las 15 características ajustadas produce una puntuación de riesgo no sellada, que se ajusta de la siguiente manera:

$$Puntuación\ de\ riesgo = \begin{cases} 0 & \text{si la puntuación bruta es } < -10 \\ \frac{puntuación\ bruta + 10}{2} & \text{si } -10 < puntuación\ bruta < 10 \\ 10 & \text{si la puntuación bruta } > 10 \end{cases}$$

Se aplican valores de corte a la puntuación de riesgo para clasificar pacientes según el riesgo de progresión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la clase de riesgo se considera baja si la puntuación ajustada se encuentra entre 0 y menos de 5,5, intermedia si la puntuación ajustada es mayor o igual a 5,5 y menor de 6,4, y alta si la puntuación ajustada está entre mayor o igual a 6,4 y 10. Las puntuaciones ajustadas también se pueden asignar a una escala diferente y los diferentes valores de corte se pueden ajustar de acuerdo con las diferentes escalas.

Tabla 2: 15 características utilizadas por el clasificador de riesgo

Biomarcador	Característica de análisis de imagen	Medida	Centro	Escala	Coeficiente
p53	intensidad de la suma de p53 nuclear	75º percentil	0,219043	0,102888	-8,04439
p53	intensidad media de p53 nuclear	15º percentil	-0,72326	0,136933	6,358257
HER2/neu y K20	Relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos	25º percentil	-0,60261	0,202539	4,547325

(continuación)

Biomarcador	Característica de análisis de imagen	Medida	Centro	Escala	Coefficiente
HER2/neu y K20	Relación de intensidad del 95° cuantil de HER2/neu:intensidad del 95° cuantil de K20 en grupos de núcleos	25° percentil	-0,61577	0,200684	4,286031
COX2 y CD68	Expresión conjunta de la intensidad media de COX2 celular e intensidad media de CD68 celular	85° percentil	76,6323	48,9231	-0,02203
p53	Intensidad media de p53 en grupos de núcleos	5° percentil	-1,03016	0,225405	3,099642
p53, p16 y morfología nuclear (solidez)	Solidez nuclear en células p53+ p16-	IQR	0,130652	0,051562	15,62477
CD45RO	Intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática	75° percentil	-0,02231	0,186223	-3,76449
AMACR	Desviación estándar de AMACR en el microambiente	Desviación estándar media en los 5 microambientes principales o menos	1889,148	961,4859	0,000789
COX2	Textura de COX2 en el citoplasma	75° percentil	0,031565	0,081008	10,39816
HIF1alfa	Intensidad media de HIF-1alfa en el microambiente celular	Intensidad media de HIF-1 alfa en el 5 por ciento superior de microambientes (filtrado según la intensidad media de HIF-1 alfa) multiplicado por la cantidad de objetos en los microambientes filtrados	3385,765	1743,198	0,000349
HIF1alfa	Momento de HIF-1alfa en el microambiente celular (producto de la desviación estándar y la media)	95° percentil del momento de intensidad HIF-1alfa en el 5 por ciento superior de microambientes (filtrado en función del momento de intensidad HIF-1alfa medio) multiplicado	603055,9	585971,8	1,02E-06
		por el número de objetos en los microambientes filtrados			
p16	intensidad media p16 en el citoplasma	15° percentil	-0,79388	0,127974	-4,98699
p53, p16 y morfología nuclear (área)	Área nuclear en células p53+ p16-	IQR	116,8669	44,74047	0,014368
Morfología nuclear	Intensidad del 95° cuantil nuclear de Hoechst	25° percentil	-0,69377	0,039071	10,78732

Como se usa en el presente documento, la expresión "determinar el riesgo de progresión del esófago de Barrett" significa la probabilidad de progresar a una displasia de bajo grado, displasia de alto grado o adenocarcinoma/cáncer de esófago.

Como se usa en el presente documento, la expresión "clasificar el esófago de Barrett" significa asignar una subcategoría de diagnóstico del esófago de Barrett a un sujeto, incluyendo, sin displasia, atipia reactiva, indefinido para displasia, displasia de bajo grado, displasia de alto grado o adenocarcinoma/cáncer de esófago.

Como se usa en el presente documento, la expresión "detectar un efecto de campo asociado con la transformación maligna en un esófago" significa adquirir características y calcular una puntuación que se correlaciona con la

presencia de cambios moleculares y celulares en el campo preneoplásico que rodea lesiones displásicas y/o cancerosas en un esófago. Las áreas que rodean las lesiones displásicas y/o cancerosas pueden parecer histológicamente no displásicas o solo displasia de bajo grado, pero pueden presentar cambios o anomalías moleculares y celulares asociados con la transformación maligna en displasia de alto grado y/o cáncer. Estos cambios/anomalías pueden ocurrir dentro de las células epiteliales y estromales y se pueden cuantificar mediante características y convertirse en una puntuación. La detección de anomalías moleculares y celulares en este campo expandido puede superar las limitaciones del muestreo aleatorio y los diagnósticos subjetivos, permitiendo un diagnóstico más temprano y tratamiento de HGD y EAC.

Como se usa en el presente documento, el término "instrucciones" se refiere a materiales y métodos para marcar y teñir portaobjetos de tejido con sondas y reactivos, obtener imágenes de las sondas en las muestras de tejido, analizar las imágenes para extraer los datos de biomarcadores y procesar los datos en una puntuación.

También cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa más o menos un 10 % del valor numérico del número que se está utilizando. Por lo tanto, aproximadamente un 50 % significa el intervalo de 45 %-55 %.

Hablando en general, el término "tejido" se refiere a cualquier agregación de células especializadas de manera similar que están unidas en el rendimiento de una función particular.

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma que tiene una estructura específica que interactúa o se une específicamente con una molécula que comprende un antígeno. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye ampliamente anticuerpos de longitud completa y puede incluir determinados fragmentos de anticuerpos de los mismos. También se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos multivalentes y monovalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos que han madurado por afinidad. Un anticuerpo se une selectiva o específicamente a un biomarcador de un trastorno gastrointestinal si el anticuerpo se une preferentemente a un antígeno expresado por una célula y tiene menos de un 25 %, o menos de un 10 %, o menos de un 1 % o menos de un 0,1 % de reactividad cruzada con un polipéptido expresado por una célula dentro del tejido gastrointestinales o células procedentes de otro tejido que migra de un tejido al tejido gastrointestinal. Normalmente, el anticuerpo tendrá una afinidad de unión (valor de la constante de disociación (K_d)), para el antígeno o epítipo de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. La afinidad de unión se puede evaluar usando cualquier método conocido por un experto en la materia, tal como una resonancia de plasma superficial, ensayos de inmuoafinidad o ELISA.

El término "sujeto" se utiliza en toda la memoria descriptiva para describir un animal del que se toma una muestra. El animal puede ser un ser humano. Para el diagnóstico de aquellas afecciones que son específicas de un sujeto específico, tal como un ser humano, el término "paciente" puede usarse indistintamente. En algunos casos en la descripción, el término "paciente" se referirá a pacientes humanos que padecen una enfermedad o trastorno particular. El sujeto puede ser un ser humano sospechoso de tener o estar identificado como en riesgo de desarrollar un trastorno gastrointestinal o esófago de Barrett. El sujeto puede ser un animal no humano del que se aísla o se proporciona una muestra. El término "mamífero" abarca tanto seres humanos como no humanos e incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, cánidos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

Los términos "que trata" y "tratar", significan aliviar síntomas, eliminar la causa de manera temporal o permanente o prevenir o retardar la aparición de síntomas. El término "tratamiento" incluye alivio, eliminación de la causa (temporal o permanente) o prevención de síntomas y trastornos asociados con cualquier afección. El tratamiento puede ser tanto un tratamiento previo tal como un tratamiento al inicio de los síntomas.

Los kits y métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar con o en un sujeto que necesite dicho tratamiento, que también puede denominarse "que lo necesite". Como se usa en el presente documento, la expresión "que lo necesite" significa que se ha identificado que el sujeto tiene una necesidad del método o tratamiento particular y que el tratamiento se le ha dado al sujeto para ese propósito particular.

El método para determinar el riesgo de progresión del esófago de Barrett en un sujeto de acuerdo con la presente invención se describe anteriormente.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un mayor riesgo de progresión a metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, indefinida para displasia, displasia de bajo grado o displasia de alto grado.

El sujeto que se identifica como un mayor riesgo de progresión a metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva,

indefinida para displasia, displasia de bajo grado, displasia de alto grado o cáncer de esófago puede tratarse con una intervención terapéutica. El tratamiento puede ser una terapia de erradicación endoscópica, incluyendo terapia de ablación endoscópica, terapia fotodinámica endoscópica, crioterapia endoscópica, resección endoscópica de la mucosa, una terapia de resección quirúrgica, una terapia quirúrgica no endoscópica o terapia sistémica.

5 El sujeto puede haber recibido un diagnóstico de metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, indefinido para displasia, displasia de bajo grado, displasia de alto grado o cáncer de esófago. El método descrito en el presente documento puede comprender además tratar al sujeto que ha recibido el diagnóstico. El tratamiento puede ser una
10 terapia de erradicación endoscópica, incluyendo terapia de ablación endoscópica, terapia fotodinámica endoscópica, crioterapia endoscópica, resección endoscópica de la mucosa, una terapia de resección quirúrgica, una terapia quirúrgica no endoscópica o terapia sistémica.

En algunas realizaciones, la pluralidad de biomarcadores puede detectarse usando sondas que se unen específicamente a cada uno de los biomarcadores. Las sondas pueden ser fluorescentes, contener un marcador
15 fluorescente, o pueden detectarse mediante una sonda fluorescente secundaria o una sonda secundaria marcada con fluorescencia. Además, cada sonda puede marcarse con un fluoróforo diferente.

En algunas realizaciones, la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares marcados pueden formar imágenes para producir campos de visión que se analizan para extraer características asociadas con los biomarcadores y la
20 morfología.

En algunas realizaciones, la detección de la pluralidad de biomarcadores puede determinarse simultáneamente.

En algunas realizaciones, los núcleos celulares se pueden marcar con un grupo de reactivos seleccionados del grupo que consiste en Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinciones
25 de ácido nucleico de cianina y hematoxilina.

En algunas realizaciones, la puntuación se utiliza para determinar la frecuencia de la vigilancia endoscópica en un sujeto con esófago de Barrett o si un paciente es candidato para una intervención terapéutica para prevenir la
30 progresión del esófago de Barrett. La intervención terapéutica puede ser una terapia de erradicación endoscópica, incluyendo terapia de ablación endoscópica, terapia fotodinámica endoscópica, crioterapia endoscópica, resección endoscópica de la mucosa, una terapia de resección quirúrgica, una terapia quirúrgica no endoscópica o terapia sistémica.

35 En algunas realizaciones, la muestra comprende un cepillado, raspado, biopsia o resección quirúrgica de células del sujeto. La muestra puede recolectarse mediante muestreo endoscópico aleatorio, muestreo endoscópico asistido por computadora, muestreo endoscópico guiado por imágenes, o muestreo no endoscópico mediante cepillado, abrasión o raspado.

40 En algunas realizaciones, la muestra puede estar a temperatura ambiente o congelada. La muestra puede ser recién obtenida, fijada con formalina, fijada con alcohol o incluida en parafina.

El método para clasificar el esófago de Barrett en un sujeto de acuerdo con la presente invención se describe
45 anteriormente.

En algunas realizaciones, la clasificación del esófago de Barrett comprende metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, indefinido para displasia, displasia de bajo grado o displasia de alto grado.

50 El sujeto puede haber recibido un diagnóstico de metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, indefinido para displasia, displasia de bajo grado, displasia de alto grado o cáncer de esófago.

En algunas realizaciones, la pluralidad de biomarcadores puede detectarse usando sondas que se unen específicamente a cada uno de los biomarcadores. Las sondas pueden ser fluorescentes, contener un marcador
55 fluorescente, o pueden detectarse mediante una sonda fluorescente secundaria o una sonda secundaria marcada con fluorescencia. Además, cada sonda puede marcarse con un fluoróforo diferente.

En algunas realizaciones, la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares marcados pueden formar imágenes para producir campos de visión que se analizan para extraer características asociadas con los biomarcadores y la
60 morfología.

En algunas realizaciones, la detección de la pluralidad de biomarcadores puede determinarse simultáneamente.

En algunas realizaciones, los núcleos celulares se pueden marcar con un grupo de reactivos seleccionados del grupo que consiste en Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinciones
65 de ácido nucleico de cianina y hematoxilina.

En algunas realizaciones, la puntuación se utiliza para determinar la frecuencia de la vigilancia endoscópica en un sujeto con esófago de Barrett o si un paciente es candidato para una intervención terapéutica para prevenir la progresión del esófago de Barrett. La intervención terapéutica puede ser una terapia de erradicación endoscópica, incluyendo terapia de ablación endoscópica, terapia fotodinámica endoscópica, crioterapia endoscópica, resección endoscópica de la mucosa, una terapia de resección quirúrgica, una terapia quirúrgica no endoscópica o terapia sistémica.

En algunas realizaciones, la muestra comprende un cepillado, raspado, biopsia o resección quirúrgica de células del sujeto. La muestra puede recolectarse mediante muestreo endoscópico aleatorio, muestreo endoscópico asistido por computadora, muestreo endoscópico guiado por imágenes, o muestreo no endoscópico mediante cepillado, abrasión o raspado.

En algunas realizaciones, la muestra puede estar a temperatura ambiente o congelada. La muestra puede ser recién obtenida, fijada con formalina, fijada con alcohol o incluida en parafina.

En el presente documento se describe un método para detectar un efecto de campo asociado con la transformación maligna del esófago de Barrett en un sujeto, que comprende: a) obtener una muestra gastrointestinal superior del sujeto; b) marcar los núcleos celulares de la muestra con un grupo de reactivos; c) marcar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu; d) detectar la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares marcados con un escáner óptico; e) generar datos de imágenes digitales a partir de la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares marcados detectados; f) analizar la muestra marcada usando una plataforma de imagen digital para obtener imágenes de portaobjetos completos de fluorescencia multicanal para producir características de análisis de imágenes cuantitativas de alta dimensión; g) analizar las características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos, relación de intensidad del 95^o cuantil de HER2/neu:intensidad del 95^o cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática, desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular, momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53 e intensidad del 95^o cuantil nuclear de Hoechst; h) determinar una puntuación usando la combinación de las características de análisis de imágenes; e i) correlacionar la puntuación con la probabilidad de que el sujeto tenga displasia de alto grado o cáncer de esófago.

En el presente documento se describe un kit para determinar el riesgo de progresión de esófago de Barrett en un sujeto que comprende: a) uno o más reactivos para marcar núcleos celulares en una muestra; b) una o más sondas capaces de detectar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu; y c) instrucciones para analizar características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos, relación de intensidad del 95^o cuantil de HER2/neu:intensidad del 95^o cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática, desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular, momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, e intensidad del 95^o cuantil del núcleo de Hoechst, para generar una puntuación a partir de la muestra del sujeto.

La puntuación puede predecir el resultado clínico del esófago de Barrett en el sujeto, el riesgo de progresión, o la determinación de la etapa preneoplásica del esófago de Barrett en el sujeto y/o la determinación de la presencia de displasia de alto grado o cáncer de esófago.

En el presente documento se describe un kit para clasificar el esófago de Barrett en un sujeto, que comprende: a) uno o más reactivos para marcar núcleos celulares en una muestra; b) una o más sondas capaces de detectar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu; y c) instrucciones para analizar características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y núcleos celulares, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos, relación de intensidad del 95^o cuantil de HER2/neu:intensidad del 95^o cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para

p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática, desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular, momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, e intensidad del 95° cuantil del núcleo de Hoechst, para generar una puntuación a partir de la muestra del sujeto.

La puntuación puede predecir el resultado clínico del esófago de Barrett en el sujeto, el riesgo de progresión, o la determinación de la etapa preneoplásica del esófago de Barrett en el sujeto y/o la determinación de la presencia de displasia de alto grado o cáncer de esófago.

Los datos de imagen obtenidos con el escáner óptico se pueden analizar como se describe en Prichard JW *et al.* TissueCypher: A Systems Biology Approach to Anatomic Pathology. Journal of Pathology Informatics. 2015;6:48.

Por ejemplo, secciones de biopsias de Barrett fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) pueden teñirse con H&E mediante métodos histológicos estándar. Se pueden marcar secciones adicionales mediante inmunofluorescencia multiplexada para citoqueratina 20 (CK-20), Ki-67, b-catenina, p16, alfa-metilacil-coenzima A racemasa (AMACR), p53, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano/neu (HER2/neu), CDX-2, CD68, factor nuclear kappa-B (NF-kB) p65, ciclooxigenasa-2 (COX-2), factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1a), CD45RO, CD1a más Hoechst para marcar núcleos. El grupo de biomarcadores también puede incluir biomarcadores de procesos estromales tales como angiogénesis y subconjuntos de células inmunitarias específicas, por ejemplo, macrófagos. Los biomarcadores pueden, por ejemplo, multiplexarse en subgrupos de fluorescencia de cuatro canales que constan de Hoechst y tres biomarcadores por portaobjetos. Los portaobjetos se pueden hornear durante 30 minutos a 60 °C, desparafinar por inmersión en Aqua DePar (Biocare Medical, Concord, CA), seguido de la recuperación del epítipo en tampón de pH 9 de Tris-ácido etilendiaminotetraacético a 97-99 °C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego los portaobjetos se pueden lavar, bloquear primero con Image-iT FX Signal Enhancer (Life Technologies, Carlsbad, CA) y luego con tampón de bloqueo de suero de cabra al 5 % seguido de incubación con un cóctel de anticuerpos primarios que contiene anticuerpos (i) anti-CK-20, anti-Ki-67 y anti-b-catenina; (ii) anti-p16, anti-AMACR y anti-p53; (iii) anti-HER2/neu, anti-CK-20 y anti-CDX-2; (iv) CD68, NF-kB p65 y anti-COX2; o (v) anti-HIF-1 α , anti-CD45RO y anti-CD1a durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos pueden ser cualquier anticuerpo adecuado. Los portaobjetos se pueden lavar e incubar durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con un cóctel de anticuerpos secundarios que contenga, por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-IgG específica de isotipo de ratón y de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Alexa Fluors 488, 555 y 647 (Life Technologies), que son específicos de cada cóctel de anticuerpos primarios. Los portaobjetos se pueden lavar, marcar con Hoechst 33342 (Life Technologies) durante aproximadamente 3 minutos, lavar de nuevo y montar con un cubreobjetos de vidrio utilizando Prolong Gold Antifade (Life Technologies).

De los portaobjetos teñidos con H&E se pueden obtener imágenes con un aumento de x20. De los portaobjetos marcados con fluorescencia se pueden, por ejemplo, obtener imágenes mediante un escaneo de fluorescencia de 4 canales de portaobjetos completo con un aumento de x20 sobre, por ejemplo, un ScanScope FL (Aperio Technologies/Leica BioSystems, Vista, CA) utilizando un conjunto de filtros de cuatro bandas BrightLine® Pinkel optimizado para 4',6-diamidino-2-fenilindol, isotiocianato de fluoresceína, tetrametilrodamina y Cy5 (FF01-440/521/607/700-25) y filtros de excitación de paso de banda de banda única BrightLine® FF01-387/11-25, FF01-485/20-25, FF01-560/25-25 y FF01-650/13-25 (Semrock, Rochester, NY, EE.UU.). Se puede utilizar un dispositivo de calibración de fuente de luz para garantizar la iluminación constante necesaria para el análisis cuantitativo de imágenes (Lumen Dynamics/Excelitas Technologies Corp., Waltham, MA).

El análisis de imágenes, luego puede incluir, por ejemplo, análisis de imágenes de fluorescencia de portaobjetos completos. Este método puede incluir un mecanismo de lectura de archivos de alto rendimiento basado en el formato BigTiff para decodificar datos de imágenes sin procesar, Algoritmos de MatLab para segmentar objetos de tejidos de bajo nivel como núcleos, citoplasma, membrana plasmática y células completas para permitir la recopilación de características a nivel celular y subcelular y también modelos de visión por computadora de orden superior para la cuantificación espacial de biomarcadores en compartimentos tisulares, tales como el epitelio, áreas metaplásicas y lámina propia. Se pueden realizar análisis adicionales como se describe en Prichard JW *et al.* TissueCypher: A Systems Biology Approach to Anatomic Pathology. Journal of Pathology Informatics. 2015;6:48. También se pueden realizar otros métodos de análisis, que son similares a los métodos descritos en el presente documento.

Aunque las realizaciones en el presente documento se han descrito con considerable detalle con referencia a determinadas realizaciones preferidas de las mismas, son posibles otras versiones. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones adjuntas no debe limitarse a la descripción y las versiones preferidas contenidas en esta memoria descriptiva.

Ejemplos

EJEMPLO 1. Antecedentes: Se necesitan mejores métodos para predecir el riesgo de progresión del esófago de Barrett (BE). El presente objetivo fue determinar si un enfoque de patología de sistemas tisulares podría predecir la

progresión en pacientes con BE no displásico, indefinido para displasia o displasia de bajo grado.

Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles anidado para desarrollar y validar un sistema de clasificación que predice la progresión de BE a displasia de alto grado (HGD) o adenocarcinoma de esófago (EAC), basado en la cuantificación de variables epiteliales y estromales en biopsias iniciales. Se recopilaron datos de pacientes en programas de vigilancia endoscópica en 4 instituciones. Los pacientes cuyo BE progresó a HGD o EAC en ≥ 1 año ($n = 79$) se emparejaron con pacientes cuyo BE no progresó (controles, $n = 287$). Las biopsias se asignaron aleatoriamente a conjuntos de capacitación o validación. Se realizaron análisis de inmunofluorescencia para 14 biomarcadores y se analizaron biomarcadores cuantitativos y características morfométricas. Las características de pronóstico se seleccionaron en el conjunto de capacitación y se combinaron en clasificadores. El clasificador de mejor rendimiento se evaluó en el conjunto de validación.

Resultados: Se seleccionó un clasificador de 3 niveles y 15 características en el conjunto de capacitación y se probó en el conjunto de validación. El clasificador estratificó a los pacientes en clases de riesgo bajo, intermedio y alto (cociente de riesgo, 9,42; intervalo de confianza del 95 %, 4,6-19,24 (alto riesgo frente a bajo riesgo); $P < 0,0001$). También proporcionó información de pronóstico independiente que superó las predicciones realizadas con base en análisis de patología, longitud del segmento, edad, sexo o sobreexpresión de p53.

Conclusión: Se desarrolló una prueba de patología de sistemas tisulares que predice mejor el riesgo de progresión en BE que variables clínicopatológicas.

Impacto: La prueba puede mejorar el análisis histológico como un método objetivo y cuantitativo para estratificar el riesgo de pacientes con BE.

Diseño del estudio y pacientes: Se construyó un estudio de casos y controles anidado que utilizó una cohorte multicéntrica de pacientes con BE en programas de vigilancia endoscópica con datos de resultados clínicos de cuatro instituciones. Los casos de BE con diagnóstico de metaplasia solo o sin displasia (ND), indefinido para displasia (IND) o displasia de bajo grado (LGD) se recuperaron del Geisinger Health System, Universidad de Pittsburgh, Universidad de Pensilvania y Academic Medical Center (AMC), Ámsterdam, Países Bajos. Los diagnósticos se confirmaron por un único patólogo subespecialista gastrointestinal (GI) en cada institución de EE.UU. (J.M.D. (Casos de la Universidad de Pittsburgh), N.C.J. (Casos de la Universidad de Pensilvania), J.L. (Casos de Geisinger y AMC). Los criterios de inclusión fueron la disponibilidad de bloques de tejido y datos clínicopatológicos y la confirmación de metaplasia intestinal. Los criterios de exclusión fueron antecedentes de HGD/EAC, diagnóstico de HGD/EAC en menos de 1 año de seguimiento, calidad insuficiente del tejido según la evaluación de un patólogo, y preparación del tejido con fijador de Bouin o azul de metileno. Se seleccionó para cada paciente la biopsia de vigilancia más temprana que cumplió con los criterios de inclusión/exclusión. Pacientes que progresaron a HGD/EAC en ≥ 1 año (pacientes con progresión de incidentes/casos, $n = 41$ capacitación, $n = 38$ validación) se emparejaron con controles de no progresión con una mediana de tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC de 5,6 años ($n = 142$ capacitación, $n = 145$ validación) basado en el género, longitud del segmento y edad cuando fue posible. Se asignaron aleatoriamente conjuntos de casos y controles de las instituciones estadounidenses y europeas a conjuntos de capacitación o validación (Tabla 3). En el conjunto de capacitación, 33/41 pacientes con progresión progresaron a HGD y 8/41 a EAC y en el conjunto de validación independiente, 29/38 pacientes con progresión progresaron a HGD y 9/38 a EAC (Tabla 4). Los elementos de información recopilados fueron: fecha de recogida del caso, diagnóstico patológico original proporcionado por un patólogo generalista y un patólogo subespecialista GI revisó el diagnóstico para el caso probado, fecha y diagnóstico original de cada biopsia de vigilancia, criterio de valoración de la progresión (HGD/EAC), tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC (tiempo entre el caso probado y el diagnóstico de HGD/EAC o el último seguimiento), edad, sexo, raza y longitud de segmento (cm) y clase de segmento (corto ≤ 3 cm, largo > 3 cm). Faltaban datos de longitud de segmento para 24 pacientes. La edad y el género fueron completos para todos los pacientes. El diagnóstico patológico original extraído de los registros médicos se proporcionó por un patólogo generalista para 304/366 pacientes y por un patólogo subespecialista GI para 62/366 pacientes.

Tabla 3. Casos de pacientes y controles combinados

	Conjunto de capacitación				Conjunto de validación independiente					
	Pacientes sin progresión		Pacientes con progresión de incidentes		Pacientes sin progresión		Pacientes con progresión de incidentes			
N.º de pacientes	142		41		145		38			
Tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC (mediana en años (IQR))	5,9 (4,5, 8,2)		2,9 (2,3, 3,7)		5,5 (4,1, 8,5)		2,8 (2,0, 4,2)			
Edad (media de años $\pm$ DE)	56,5 $\pm$ 11,6		60,9 $\pm$ 12,2		61,0 $\pm$ 12,1		60,1 $\pm$ 11,3			
Longitud del segmento (%)										
Corto (< 3 cm)	63 (44,4)		16 (39,0)		58 (40,0)		10 (26,3)			
Largo (> 3 cm)	71 (50)		24 (58,5)		73 (50,3)		27 (71,1)			
Desconocido	8 (5,6)		1 (2,4)		14 (9,7)		1 (2,6)			
Género (%)										
Masculino	119 (83,8)		32 (78)		114 (78,6)		33 (86,8)			
Femenino	23 (16,2)		9 (22)		31 (21,4)		5 (13,2)			
Pacientes en cada clase de diagnóstico basada en diagnóstico del subespecialista GI (%)										
Cada Institución	ND	IND	LGD	ND	LGD	ND	ND	IND	LGD	
	134 (94,4)	3 (2,1)	5 (3,5)	26 (63,4)	1 (2,4)	14 (34,1)	138 (95,2)	2 (1,4)	5 (3,4)	2 (5,3) 5 (13,2)
N.º de pacientes (%)	AMC	Gei	UPenn	UPitt	AMC	Gei	UPenn	UPitt	AMC	Gei
	46 (32,4)	71 (50)	16 (11,3)	9 (6,3)	25 (61,0)	9 (22,0)	1 (2,4)	6 (14,6)	46 (31,7)	63 (43,5)
Tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC (mediana de años (IQR))	4,8 (4,2, 5,4)	7,2 (5,9, 8,9)	4,6 (3,2, 5,5)	11,6 (7,3, 12,0)	3,2 (2,9, 4,0)	2,2 (1,4, 3,0)	2,0 (N/D)	2,5 (1,6, 3,3)	5,0 (4,0, 7,8)	6,5 (4,2, 10,1)
'tiempo de vigilancia: número de días entre la biopsia probada y la última endoscopia con ND, IND o LGD (pacientes sin progresión) o endoscopia con diagnóstico HGD o EAC (pacientes con progresión de incidentes). Diagnóstico proporcionado por patólogo subespecialista GI para todos los pacientes. El diagnóstico original proporcionado por un patólogo generalista estuvo disponible para 160 pacientes en el conjunto de capacitación y para 144 pacientes en el conjunto de validación. AMC: Academic Medical Center, Países Bajos; Gei: Geisinger Health System; UPenn: Universidad de Pensilvania; UPitt, Universidad de Pittsburgh. DE: desviación estándar, IQR: intervalo intercuartil.										

Tabla 4. Resumen de los criterios de valoración de la progresión en pacientes con progresión de incidentes

	Conjunto de capacitación			Conjunto de validación independiente				
N.º de Pacientes con progresión de incidentes (las cuatro instituciones combinadas)	41			38				
N.º de pacientes con progresión de incidentes en cada clase de Dx	ND	IND	LGD	ND IND LGD				
	26	1	14	31	2	5		
Criterio de valoración de la progresión (HGD o EAC)	19 HGD 7 EAC	1 HGD 0 EAC	13 HGD 1 EAC	22 HGD 9 EAC	2 HGD 0 EAC	5 HGD 0 EAC		
N.º de Pacientes con progresión de incidentes (cada institución)	AMC	Geisinger	UPenn	UPitt	AMC	Geisinger	UPenn	UPitt
	25	9	1	6	28	4	3	3
Criterio de valoración de la progresión (HGD o EAC)	19 HGD 6 EAC*	8 HGD 1 EAC	1 HGD 0 EAC	5 HGD 1 EAC	22 HGD 6 EAC*	2 HGD 2 EAC	3 HGD 0 EAC	2 HGD 1 EAC
*adenocarcinomas de esófago en etapa temprana								

*adenocarcinomas de esófago en etapa temprana

Selección de biomarcadores candidatos: En el estudio se seleccionó y examinó el siguiente grupo candidato de 14 biomarcadores de proteínas: K20 (citoqueratina-20), Ki-67, β -catenina, p16INK4a, AMACR (alfa-metilacil-CoA racemasa), p53, HER2/neu, CDX-2, CD68, NF- κ B-p65, COX-2 (ciclooxygenasa-2), HIF-1 α (subunidad del factor 1-alfa inducible por hipoxia), CD45RO y CD1a. Los biomarcadores incluían marcadores de anomalías de células epiteliales que se han descrito en la progresión de BE y también biomarcadores estromales que se sabe que desempeñan un papel en la carcinogénesis.

Inmunomarcaje por fluorescencia: Se tiñeron secciones de 5 μ m de biopsias de BE fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) con H&E mediante métodos estándar. Se marcaron secciones adicionales mediante inmunofluorescencia multiplexada para el grupo de biomarcadores candidatos enumerados anteriormente, más marcaje con Hoechst, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Los biomarcadores se multiplexaron en subgrupos que consisten en Hoechst y 3 biomarcadores/portaobjetos detectados a través de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor-488, -555 y -647 (Life Technologies, Carlsbad, California).

Imágenes de portaobjetos completas: Se tomaron imágenes de portaobjetos teñidos con H&E con un aumento de 20x en un escáner de patología digital NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, KK, Japón). Se tomaron imágenes de portaobjetos inmunomarcados con fluorescencia a 20x en un ScanScope FL (Aperio Technologies/Leica BioSystems, Vista, CA) con una fuente de luz calibrada como se describió anteriormente. Se utilizó un procedimiento de imágenes estandarizado que incluía tiempos de exposición establecidos.

Análisis de imágenes: Se analizaron imágenes de fluorescencia de portaobjetos completos utilizando la plataforma de análisis de imágenes TissueCypher™ (Cemostics, Inc., Pittsburgh, PA), que produce datos de características cuantitativas de alta dimensión sobre biomarcadores y morfología. La plataforma utiliza algoritmos para segmentar objetos basados en células para permitir la recopilación cuantitativa de datos de características morfológicas y de biomarcadores a nivel celular y subcelular. La plataforma también emplea modelos de visión por computadora para cuantificar biomarcadores en el epitelio, metaplasia y lámina propia. Las características (mediciones continuas y cuantitativas de biomarcadores y/o morfología) incluyeron intensidades de biomarcadores y expresión conjunta dentro de compartimentos subcelulares y compartimentos tisulares apropiados, morfometría y mediciones de biomarcadores basadas en microambiente. Se extrajeron características de los biomarcadores candidatos y la morfología. El programa informático extrajo 1.184 características de análisis de imágenes/biopsia y las resumió como mediciones múltiples, (percentiles, IQR, porcentaje positivo, estadísticas de resumen espacial) dando como resultado 13.538 características/mediciones por biopsia. El programa informático de análisis de imágenes no conocía el estado de casos y controles de las muestras.

Análisis estadísticos: Se desarrolló un clasificador de predicción de riesgos dentro del conjunto de capacitación y se definió prospectivamente antes de la prueba en el conjunto de validación. Se probó la hipótesis de que los pacientes de la clase de riesgo bajo prevista tienen un riesgo significativamente menor de progresión a HGD/EAC que los pacientes de la clase de riesgo alto prevista. También se probó la hipótesis de que las clases de riesgo añadirían información de pronóstico independiente más allá del diagnóstico patológico y la longitud del segmento.

Desarrollo del modelo de predicción de riesgo: Se realizó una regresión logística condicional univariante en el conjunto de capacitación con 13.538 características/mediciones para comparar pacientes sin progresión con

pacientes con progresión y permitir la selección de características para la construcción de modelos multivariantes. Se combinaron características seleccionadas en clasificadores y se realizó una validación cruzada de exclusión (LOOCV, por sus siglas en inglés) para estimar el rendimiento pronóstico de los clasificadores. En cada repetición de la LOOCV, se apartó 1 grupo de casos y controles (progresión y no progresión emparejadas) y los restantes grupos de casos y controles se utilizaron como conjunto de capacitación. El modelo de predicción se construyó en el conjunto de capacitación mediante la suma de las características ponderadas mediante los coeficientes Cox univariantes, y luego este modelo se aplicó en los casos de prueba para calcular una puntuación. El proceso de LOOCV se repitió hasta que todos los grupos de casos y controles fueron tratados como el caso de prueba una vez. El resultado final del proceso de LOOCV fue una puntuación de riesgo para cada paciente en un intervalo de 0-10. El tiempo de supervivencia para la regresión de riesgos proporcionales de Cox se definió como el tiempo entre el caso probado en este estudio y el diagnóstico de progresión a HGD/EAC o el último seguimiento para la no progresión. La regresión de Cox solo se utilizó después de que se seleccionaron las características (mediante regresión logística condicional) para derivar las ponderaciones de estas características seleccionadas para calcular una puntuación de riesgo para el modelo de predicción, y existen similitudes sorprendentes entre la función de probabilidad logística condicional y función de probabilidad parcial utilizada para ajustar un modelo de riesgos proporcionales de Cox. Se calcularon los índices de concordancia (índices C) y se trazaron curvas de rendimiento diagnóstico (curvas ROC) basadas en el resultado binario de bajo/alto para el riesgo a 5 años de progresión a HGD/EAC. Se determinaron valores de corte para estratificar a los pacientes en clases de riesgo bajo, intermedio y alto. Los valores de corte se eligieron para lograr un valor predictivo negativo (NPV, por sus siglas en inglés) y un valor predictivo positivo (PPV, por sus siglas en inglés) de más de un 95 % y 65 %, respectivamente, no ajustado para la prevalencia de enfermedades en el conjunto de capacitación. Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier (KM) para representar la probabilidad de progresión a HGD/EAC en las 3 clases de riesgo. Se calcularon cocientes de riesgos (HR, por sus siglas en inglés) con intervalos de confianza (IC) del 95 % a partir de la regresión de riesgos proporcionales de Cox y los cocientes de posibilidades (OR, por sus siglas en inglés) con IC del 95 % se calcularon a partir de la regresión logística condicional. Se utilizó la prueba del orden logarítmico para evaluar la igualdad de probabilidad de las curvas de progresión de los grupos de riesgo a partir del análisis de KM, mientras que la prueba de puntuación se realizó con regresión logística condicional para examinar la significancia de la asociación de los grupos de riesgo con la incidencia de HGD/EAC.

Validación independiente del modelo de predicción de riesgos: El conjunto de validación independiente se puso en cuarentena durante la fase de capacitación. Los cálculos del tamaño de muestra indicaron que se requería un total de 43 pacientes en el conjunto de validación para asegurar un poder de un 80 % para detectar una diferencia significativa de un 50 % en el riesgo de progresión a los 5 años a HGD/EAC entre los clasificados como de alto riesgo frente a los de bajo riesgo, a un nivel de significancia de 0,05. Todos los parámetros del ensayo se especificaron previamente, incluyendo las 15 características/mediciones, coeficientes y valores de corte del clasificador antes de probar en el conjunto de validación. Se calculó la puntuación de riesgo para cada paciente y se asignaron las clases de riesgo según los valores de corte establecidos. Se calcularon el NPV y el PPV ajustados a la prevalencia para los grupos de riesgo bajo y alto pronosticados en función de las tasas de progresión anual informadas anteriormente para los pacientes con BE con diagnóstico del subespecialista GI de ND, IND y LGD de 0,6 %, 0,9 % y 9,1 %, respectivamente.

Comparación del rendimiento del clasificador frente a variables clínicas: Se realizaron modelos de Cox multivariante para evaluar si la prueba, tanto como clases categóricas como una variable continua, añadiría información de pronóstico independiente más allá de los factores clínicos tradicionales. Se dicotomizaron las siguientes variables: diagnóstico ((LGD frente a ND/IND combinados, sexo (0 para F, 1 para M), longitud del segmento (0 para corto, 1 para largo). El porcentaje de células que sobreexpresan p53 (determinado por el análisis de imágenes) y la edad se evaluaron como variables continuas. Los pacientes con falta de longitud de segmento y/o diagnóstico del patólogo generalista original se excluyeron de los modelos de Cox multivariante.

Resultados: La cohorte anidada de casos y controles incluyó muestras previas a la progresión de 79 (n = 41 en el conjunto de capacitación, n = 38 en el conjunto de validación) pacientes con BE con ND, IND o LGD que progresaron a HGD o EAC al menos 1 año después y 287 muestras de pacientes de control emparejados que no mostraron progresión (n = 142 en el conjunto de capacitación, n = 145 en el conjunto de validación). Los conjuntos de casos y controles de las instituciones estadounidenses y europeas se asignaron aleatoriamente al conjunto de capacitación o de validación. Los pacientes que no progresaron tuvieron una mediana de tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC de 5,9 (IQR 4,5, 8,2) y 5,5 años (IQR 4,1, 8,5) en los conjuntos de capacitación y validación, respectivamente. La mediana del tiempo hasta la progresión fue de 2,9 (IQR 2,3, 3,7) y 2,8 (IQR 2,0, 4,2) años en los conjuntos de capacitación y validación, respectivamente. Las características clínicas de los pacientes se resumen en la Tabla 3.

Desarrollo del clasificador de 15 características en el conjunto de capacitación: Se analizaron imágenes de fluorescencia de portaobjetos completos de marcaje de biomarcadores multiplexados mediante un programa informático de análisis de imágenes para generar 13.538 características/mediciones por biopsia en el conjunto de capacitación. Un conjunto de 17 características de análisis de imágenes procedentes de p53, HER2, Ki-67, K20, COX2, CD68, HIF-1 α , p16INK4A, AMACR, Se seleccionaron CD45RO y la morfología nuclear en función de los valores p de la regresión logística condicional univariante que comparaba casos frente a controles (Tabla 5).

Tabla 5. 17 características de análisis de imágenes candidatas (incluyendo las 15 características principales utilizadas por el clasificador de riesgo)

Biomarcador	Característica de análisis de imagen	Valor de p	Valor de p ajustado por diagnóstico	Coefficiente t	Utilizado por el clasificador de riesgo de 15 características
p53	intensidad de la suma de p53 nuclear	3,81 E-05	5,81 E-05	-8,04439	✓
p53	intensidad media de p53 nuclear	7,48E-05	0,000116779	6,358257	✓
HER2/neu y K20	Relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos	0,000155084	0,000312461	4,547325	✓
HER2/neu y K20	Relación de intensidad del 95° cuantil de HER2/neu:intensidad del 95° cuantil de K20 en grupos de núcleos	0,000318651	0,00064884	4,286031	✓
COX2 y CD68	Expresión conjunta de la intensidad media de COX2 celular e intensidad media de CD68 celular	0,00046706	0,000911804	-0,02203	✓
p53	Intensidad media de p53 en grupos de núcleos	0,000501393	0,000498535	3,099642	✓
p53, p16 y morfología nuclear (solidez)	Solidez nuclear en células p53+ p16-	0,000866951	0,00126554	15,62477	✓
CD45RO	Intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática	0,000873155	0,002141764	-3,78449	✓
AMACR	Desviación estándar de AMACR en el microambiente	0,000924663	0,001502611	0,000789	✓
COX2	Textura de COX2 en el citoplasma*	0,001318862	0,001909437	10,39816	✓
HIF1alpha	Intensidad media de HIF-1α en el microambiente celular	0,001758646	0,001040583	0,000349	✓
HIF1alpha	Momento de HIF-1α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar)	0,002189596	0,002420038	1,02E-06	✓
p16	intensidad media p16 en el citoplasma	0,00352243	0,003240205	-4,98699	✓
p53, p16 y morfología nuclear (área)	Área nuclear en células p53+ p16-	0,00388791	0,005517011	0,014368	✓
Morfología nuclear	Intensidad del 95° cuantil nuclear de Hoechst	0,022822291	0,03429373	10,78732	✓
Ki-67 y K20	Relación de intensidad del 95° cuantil de Ki-67:intensidad del 95° cuantil de K20 en grupos de núcleos	0,279157	0,340456	0,95634	x
Ki-67 y K20	Intensidad del 95° cuantil de Ki-67 en núcleos de células metaplásicas	0,10297	0,053479	1,73172	x

(continuación)

Biomarcador	Característica de análisis de imagen	Valor de p	Valor de p ajustado por diagnóstico	Coefficiente t	Utilizado por el clasificador de riesgo de 15 características
Se realizó una regresión logística condicional univariante con las 13.538 características/mediciones extraídas por el análisis de imágenes para comparar pacientes sin progresión (controles) frente a pacientes con progresión de incidentes (casos) en el conjunto de capacitación de pacientes con BE. La tabla enumera el subconjunto seleccionado de 17 características procedentes de 10 biomarcadores y morfología nuclear que mostraron diferencias significativas en pacientes con progresión de incidentes frente a pacientes sin progresión. Este conjunto de 17 características se introdujo en la construcción del modelo multivariante. Los valores p mostrados se estiman a partir de la regresión logística condicional. Los coeficientes proceden de la regresión de riesgos proporcionales de Cox de cada característica/medición. *La característica de textura de contraste se extrae de una matriz de co-ocurrencia y es una medida del contraste de intensidad de COX2 entre un píxel y su vecino en toda la imagen tisular, como lo describe Haralick <i>et al.</i> , IEEE Transactions On Systems, Man and Cybernetics, SMC-3:610-621 (1973).					

Las características procedentes de CDX2, β -catenina, CD1a y NF- κ B p65 no se seleccionaron debido a una clasificación baja basada en los valores p. Se examinó la tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) durante el proceso de selección de características para controlar los posibles errores de probabilidad debido a múltiples pruebas. La FDR para las 17 características principales seleccionadas durante el proceso de desarrollo del clasificador fue de 0,025 %. Por lo tanto, la probabilidad de que una característica en el conjunto de 17 características se seleccionara al azar era insignificante. Se seleccionó la medición más significativa para cada una de las 17 características de análisis de imágenes seleccionadas basadas en la regresión logística condicional univariante y se usó en la construcción de modelos predictivos. Las principales características/mediciones de análisis de imágenes 3, 6, 9, 12, 15 y 17 basadas en valores p de la regresión logística condicional se ajustaron utilizando los parámetros de centro y ajuste procedentes del conjunto de capacitación. La suma ponderada (por coeficientes del modelo de Cox univariantes) se calculó para producir una puntuación de riesgo. El 98 % de las puntuaciones brutas variaron entre -10 y 10. Se realizó un ajuste para garantizar que la puntuación de riesgo variara de 0-10 utilizando la siguiente fórmula:

$$puntuación = \begin{cases} 0 & \text{si la puntuación bruta es } < -10 \\ \frac{puntuación\ bruta + 10}{2} & \text{si } -10 < puntuación\ bruta < 10 \\ 10 & \text{si la puntuación bruta } > 10 \end{cases}$$

Usando las puntuaciones de riesgo generadas por estos clasificadores a través de la LOOCV, Los índices C para las características principales 3, 6, 9, 12, 15 y 17 fueron 0,674, 0,672, 0,716, 0,755, 0,797 y 0,792, respectivamente, demostrando que el modelo de mejor rendimiento se basó en 15 características/mediciones de análisis de imágenes. Las 15 características/mediciones procedieron de p53, HER2, K20, COX2, CD68, HIF-1 α , p16INK4A, AMACR, CD45RO y morfología nuclear e incluyeron múltiples características de análisis de imágenes procedentes de biomarcadores individuales (Tabla 5). Se incluye un diagrama de flujo que detalla las etapas para desarrollar el clasificador (FIG. 5). Los patrones de expresión de los biomarcadores en los que se basa el clasificador de 15 características se muestran en la FIG. 1 para pacientes con progresión representativos. AUROC (área bajo la curva de rendimiento diagnóstico) para el clasificador de 15 características fue de 0,872 en pacientes de las cuatro instituciones (FIG. 2, Panel A), 0,842 en pacientes estadounidenses y 0,870 en pacientes de AMC, lo que indica una alta precisión de pronóstico.

Se eligieron dos valores de corte para producir un clasificador de 3 niveles que estratificaba a los pacientes en grupos de riesgo bajo, intermedio y alto. Los gráficos de Kaplan-Meier (KM) de la probabilidad de progresión a los 5 años a HGD/EAC en pacientes puntuados como de riesgo bajo, intermedio y alto demostraron que el clasificador estratificó pacientes con progresión a partir de pacientes sin progresión en todas las instituciones combinadas y en pacientes de EE.UU. y de AMC por separado (Figura 2, Paneles B-D). Los HR fueron 4,19 (IC del 95 % 1,52, 11,57) para riesgo intermedio frente a bajo y 14,73 (IC del 95 % 6,55, 33,16) para riesgo alto frente a bajo. Tanto las pruebas del orden logarítmico como las de puntuación mostraron que las 3 clases de riesgo previstas por el clasificador tenían un riesgo diferente de progresión a HGD/EAC ($p < 0,0001$).

Los cambios moleculares y celulares capturados por el clasificador de 15 características se ilustran en la FIG. 3, que compara imágenes de endoscopia, imágenes de biopsia de BE teñidas con H&E e imágenes de marcaje de fluorescencia multiplexado de los 9 biomarcadores en los que se basa el clasificador en un paciente con progresión (FIG. 3, Paneles A-C) y un paciente sin progresión (FIG. 3, Paneles D-F). Las imágenes de endoscopia para ambos pacientes mostraron BE sin lesiones visibles aparentes (FIG. 3, Panel A y Panel D). Las biopsias de ambos pacientes se confirmaron como ND por un patólogo subespecialista GI (FIG. 3B y E). El clasificador de 15 características puntuó el paciente con progresión de alto riesgo debido a múltiples cambios moleculares y celulares

(FIG. 3, Panel C), que incluía la sobreexpresión de p53, HER2/neu y COX-2 e infiltración por macrófagos, linfocitos de memoria y células estromales que expresan HIF-1 α . El paciente sin progresión se puntuó como de bajo riesgo debido a la ausencia de características de alto riesgo (FIG. 3, Panel F).

- 5 En modelos de Cox multivariante en los que la progresión a HGD/EAC se evaluó primero en relación con variables clínicas solamente, luego, en relación con las clases de riesgo previstas añadidas a las variables clínicas, las clases de riesgo intermedio y de alto riesgo proporcionaron un poder de pronóstico que era independiente del diagnóstico del patólogo (tanto generalista como subespecialista GI), longitud del segmento, edad, sexo y porcentaje de células que sobreexpresan p53 (Tabla 6). El diagnóstico del subespecialista y la edad también fueron variables independientes significativas. Sin embargo, la edad media fue mayor en pacientes con progresión que en pacientes sin progresión (Tabla 3). La magnitud de los HR indicó que las clases de riesgo previstas proporcionaron un poder de pronóstico más fuerte que las variables clínicas (Tabla 6). Se observaron resultados similares cuando se evaluó la puntuación de riesgo de 15 características como una variable continua (Tabla 7).

15 **Tabla 6. Comparación del rendimiento predictivo de las clases de riesgo previstas por la prueba frente a las variables clínicas en el conjunto de capacitación de pacientes con BE**

A. Rendimiento pronóstico de las clases de riesgo frente a las variables clínicas*		
Variable	Cociente de riesgo multivariante (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	2,17 (1,05 - 4,47)	0,04
Longitud del segmento de BE (largo frente a corto)	1,09 (0,55 - 2,19)	0,8
Edad	1,03 (0,99, - 1,06)	0,12
Género	0,85 (0,37 - 1,97)	0,71
p53 (% de células que sobreexpresan)	4,23 (0,09 - 202,5)	0,46
Análisis con prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	1,57 (0,74 - 3,37)	0,24
Longitud del segmento de BE (largo frente a corto)	1 (0,49 - 2,03)	
Edad	1,05 (1,02 - 1,09)	0,002
Género	1,74 (0,611 - 4,48)	0,25
p53 (% de células que sobreexpresan $\pm$)	0,05 (0 - 4,18)	0,19
Clases de riesgo (previstas por prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a Riesgo bajo</i>	8,08 (2,65 - 24,65)	0,0002
<i>Alto riesgo frente a Riesgo bajo</i>	33,02 (11,8 - 92,44)	< 0,0001
B. Rendimiento pronóstico de las clases de riesgo frente al diagnóstico del subespecialista GI**		
Variable	Cociente de riesgo multivariante (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	6,8 (3,54, - 13,08)	< 0,0001
Análisis con prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	3,25 (1,57 - 6,75)	0,002
Clases de riesgo (previstas por prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a Riesgo bajo</i>	4,64 (1,67 - 12,87)	0,003
<i>Alto riesgo frente a Riesgo bajo</i>	10,98 (4,67 - 25,81)	< 0,0001

(continuación)

B. Rendimiento pronóstico de las clases de riesgo frente al diagnóstico del subespecialista GI**		
Variable	Cociente de riesgo multivariante (IC 95 %)	Valor de P
Se ejecutaron modelos de Cox multivariante en los que se evaluó primero la progresión a HGD/EAC en relación con las variables clínicas únicamente, luego en relación a las clases de riesgo pronosticadas por la prueba y las variables clínicas en pacientes sin progresión y pacientes con progresión de incidentes. Se dicotomizaron las siguientes variables clínicas: diagnóstico del patólogo (LGD frente a ND o IND), género (0 para F, 1 para M), longitud del segmento de BE (0 para corto (≤ 3 cm) 1 para largo (> 3 cm) y clases de riesgo (riesgo alto frente a bajo y riesgo intermedio frente a bajo). La edad y p53 se evaluaron como variables continuas. *n = 35 pacientes con progresión de incidentes y n = 116 pacientes sin progresión con datos completos para todas las variables evaluadas. **n = 41 pacientes con progresión de incidentes y n = 142 pacientes sin progresión (todos los pacientes del grupo de capacitación) para el análisis en la parte B. ‡ Calculado por el programa informático de análisis de imágenes (porcentaje de células con intensidad media de p53 en núcleos > 95 en una escala de 0-1023 en las imágenes de tejido de 10 bits).		

Tabla 7. Comparación del rendimiento predictivo de la puntuación de riesgo como una variable continua frente a las variables clínicas en el conjunto de capacitación

A. Análisis de Cox multivariante de la puntuación de riesgo frente a variables clínicas*		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin puntuación de riesgo		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	2,17 (1,05 - 4,47)	0,04
Longitud del segmento de BE (largo frente a corto)	1,09 (0,55 - 2,19)	0,8
Edad	1,03 (0,99, - 1,06)	0,12
Género	0,85 (0,37 - 1,97)	0,71
p53 (% de células que sobreexpresan)	4,23 (0,09 - 202,5)	0,46
Análisis con puntuación de riesgo		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	1,59 (0,73 - 3,47)	0,25
Longitud del segmento de BE (largo frente a corto)	0,88 (0,42 - 1,82)	0,73
Edad	1,05 (1,02 - 1,09)	0,003
Género	1,53 (0,6 - 3,91)	0,38
p53 (% de células que sobreexpresan)	0,01 (0 - 1,66)	0,08
Puntuación de riesgo continua	1,94 (1,61 - 2,35)	$< 0,0001$
B. Análisis de Cox multivariante de la puntuación de riesgo frente al diagnóstico del subespecialista GI**		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin puntuación de riesgo		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	6,8 (3,54 - 13,06)	$< 0,0001$
Análisis con puntuación de riesgo		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	2,12 (0,94 - 4,79)	0,07
Puntuación de riesgo continua	1,59 (1,35 - 1,89)	$< 0,0001$
Se ejecutaron modelos de Cox multivariante en los que se evaluó primero la progresión a HGD/EAC en relación con las variables clínicas únicamente, luego en relación a la puntuación de riesgo como variable continua y variables clínicas en pacientes sin progresión y pacientes con progresión de incidentes. Se dicotomizaron las siguientes variables clínicas: diagnóstico del patólogo (LGD frente a ND o IND), sexo (0 para F, 1 para M), longitud del segmento de BE (0 para corto (≤ 3 cm). 1 para largo (> 3 cm). Edad, p53 y la puntuación de riesgo se evaluaron como variables continuas. *n = 35 pacientes con progresión de incidentes y n = 116 pacientes sin progresión con datos completos para todas las variables evaluadas. **n = 41 pacientes con progresión de incidentes y n = 142 pacientes sin progresión (todos los pacientes del conjunto de capacitación) para el análisis en la parte B.		

Rendimiento del clasificador de 15 características en el conjunto de validación independiente: La prueba definida prospectivamente se evaluó luego en el conjunto de validación independiente de pacientes con BE (Tabla 3). El análisis ROC mostró que la prueba especificada previamente predijo el riesgo de progresión a los 5 años a HGD/EAC con AUROC de 0,804 en pacientes de las cuatro instituciones (FIG. 4, Panel A), 0,860 en pacientes estadounidenses y 0,717 en pacientes de AMC. El análisis de KM demostró que el clasificador de 15 características podía distinguir pacientes con progresión de incidentes de pacientes sin progresión en el conjunto de validación completo de pacientes y en pacientes de EE.UU. y AMC por separado (FIG. 4, Paneles B-D), validando de forma independiente el rendimiento del clasificador de 15 características que se observó en el conjunto de capacitación. Los HR fueron 2,45 (IC del 95 % 0,99, 6,07) para la comparación del grupo de riesgo intermedio frente al de riesgo bajo y 9,42 (IC del 95 % 4,61, 19,24) (FIG. 4, Panel E), para el grupo de riesgo alto frente al de riesgo bajo ($p < 0,0001$ para las pruebas del orden logarítmico y de puntuación). La probabilidad de progresión a HGD/EAC a los 5 años aumentó continuamente a medida que aumentaba la puntuación de riesgo de 15 características (FIG. 4, Panel F). El NPV y el PPV ajustados por prevalencia basados en la progresión a los 5 años a HGD/EAC para el clasificador de 15 características en el conjunto de validación fueron 0,98 y 0,26 utilizando las tasas de progresión informadas anteriormente. Las proporciones ajustadas por prevalencia de pacientes con puntuación de riesgo bajo, intermedio y alto según la prueba fueron 77 %, 15 % y 8 %, respectivamente.

Los modelos de Cox multivariante que evaluaron un modelo reducido con variables clínicas únicamente y un modelo completo con el clasificador de 15 características añadido en el conjunto de validación mostraron que la clase de alto riesgo proporcionó un poder de pronóstico que era independiente del diagnóstico del patólogo general y del subespecialista GI, longitud del segmento, edad, género y porcentaje de células que sobreexpresan p53 (Tabla 8A). Aunque los cocientes de riesgo sugieren una asociación de la variable p53 con el riesgo de progresión, los valores de p para la variable p53 en las regresiones de Cox (tanto sin la prueba de predicción de riesgos como con la prueba de predicción de riesgos) no fueron estadísticamente significativos, lo que indica que el efecto de la variable p53 no se puede distinguir de la posibilidad aleatoria independientemente del valor de los cocientes de riesgo. El diagnóstico del subespecialista GI mostró poder pronóstico cuando se evaluó solo; sin embargo, ya no era estadísticamente significativo cuando las clases de riesgo previstas se añadieron al modelo de Cox (Tabla 8B). Se observaron resultados similares cuando se evaluó la puntuación de riesgo como una variable continua (Tabla 9).

Tabla 8. Rendimiento pronóstico de clases de riesgo frente a variables clínicas en un conjunto de validación independiente de pacientes con BE

A. Rendimiento pronóstico de las clases de riesgo frente a las variables clínicas*		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis <i>sin</i> prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	1,55 (0,67-3,58)	0,31
Longitud del segmento (largo frente a corto)	2,53 (1,00-8,42)	0,05
Edad	0,99 (0,98-1,02)	0,38
Género	1,47 (0,51-4,29)	0,48
p53 (% de células que sobreexpresan) ‡	6,87 (0,01-4755,13)	0,56
Análisis <i>con</i> prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	1,27 (0,53-3,01)	0,59
Longitud del segmento (largo frente a corto)	1,91 (0,75-4,87)	0,17
Edad	0,99 (0,96-1,02)	0,4
Género	1,01 (0,34-3,05)	0,98
p53 (% de células que sobreexpresan)	0,6 (0-728,87)	0,89
Clases de riesgo (previstas por la prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a bajo</i>	2,11 (0,66-6,7)	0,21
<i>Riesgo alto frente a bajo</i>	7,27 (3,2-16,49)	< 0,0001

(continuación)

B. Rendimiento pronóstico de clases de riesgo frente al subespecialista GI**		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis <i>sin</i> prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	3,19 (1,24-8,2)	0,02
Análisis <i>con</i> prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	1,33 (0,5-3,53)	0,57
Clases de riesgo (previstas por la prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a bajo</i>	2,37 (0,95-5,93)	0,07
<i>Riesgo alto frente a bajo</i>	8,95 (4,27-18,77)	< 0,0001
Se ejecutaron modelos de Cox multivariante en los que se evaluó primero la progresión a HGD/EAC en relación con las variables clínicas únicamente, luego en relación con las clases de riesgo y las variables clínicas en pacientes sin progresión y pacientes con progresión de incidentes en el conjunto de validación. Diagnóstico del patólogo, género, longitud del segmento y clases de riesgo se dicotomizaron como se describe en Métodos. La edad y p53 se evaluaron como variables continuas. Las pruebas de Mann-Whitney no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la edad, género o longitud de segmento en pacientes con progresión frente a pacientes sin progresión (p=0,72, 0,36, 0,09, respectivamente). *n = 30 pacientes con progresión de incidentes y n = 103 pacientes si progresión con datos completos para todas las variables evaluadas. **n = 38 pacientes con progresión de incidentes y n = 145 pacientes sin progresión (todos los pacientes del conjunto de validación) para el análisis en la parte B. ‡ Calculado por el programa informático de análisis de imágenes.		

Tabla 9. Comparación del rendimiento predictivo de la puntuación de riesgo como una variable continua frente a las variables clínicas en el conjunto de validación

A. Análisis de Cox multivariante de la puntuación de riesgo frente a variables clínicas*		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis <i>sin</i> puntuación de riesgo		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	1,55 (0,67 - 3,58)	0,31
Longitud del segmento de Barrett (largo frente a corto)	2,53 (1 - 6,42)	0,05
Edad	0,99 (0,96 - 1,02)	0,38
Género	1,47 (0,51 - 4,29)	0,48
p53 (% de células que sobreexpresan)	6,87 (0,01 - 4755,13)	0,56
Análisis <i>con</i> puntuación de riesgo		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	1,41 (0,6 - 3,33)	0,44
Longitud del segmento de Barrett (largo frente a corto)	1,86 (0,73 - 4,73)	0,19
Edad	1 (0,97 - 1,03)	0,94
Género	0,9 (0,3 - 2,73)	0,86
p53 (% de células que sobreexpresan)	0,05 (0 - 83,69)	0,42
Puntuación de riesgo continua	1,65 (1,35 - 2,03)	< 0,0001
B. Análisis de Cox multivariante de la puntuación de riesgo frente al subespecialista GI**		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis <i>sin</i> puntuación de riesgo		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	3,19 (1,24 - 8,2)	0,02

(continuación)

Análisis con puntuación de riesgo		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	1,35 (0,5 - 3,64)	0,55
Puntuación de riesgo continua	1,71 (1,44 - 2,04)	< 0,0001
Se ejecutaron modelos de Cox multivariante en los que se evaluó primero la progresión a HGD/EAC en relación con las variables clínicas únicamente, luego en relación con la puntuación de riesgo y las variables clínicas en pacientes sin progresión y pacientes con progresión de incidentes. Se dicotomizaron las siguientes variables clínicas: diagnóstico del patólogo (LGD frente a ND o IND), género (0 para F, 1 para M), longitud del segmento de BE (0 para corto (≤ 3 cm), 1 para largo (> 3 cm) y puntuación de riesgo. Edad, p53 y la puntuación de riesgo se evaluaron como variables continuas. *n = 30 pacientes con progresión de incidentes y n = 103 pacientes sin progresión con datos completos para todas las variables evaluadas. **n = 38 pacientes con progresión de incidentes y n = 145 pacientes sin progresión (todos los pacientes del conjunto de validación) para el análisis en la parte B.		

Debate: Utilizando un diseño de estudio de casos y controles anidado, se ha desarrollado y validado de forma independiente una nueva prueba multivariante que predice el riesgo futuro de progresión a HGD/EAC en pacientes con BE. La prueba produce una puntuación de riesgo que se puede utilizar como un variable independiente continua para estimar el riesgo de progresión a los 5 años a HGD/EAC. La prueba incorpora una estratificación de riesgo de 3 niveles para clasificar a los pacientes como de riesgo bajo, intermedio o alto de progresión. Hubo una gran diferencia en la tasa de progresión entre los pacientes con puntuaciones de bajo riesgo y aquellos con puntuaciones de alto riesgo. El grupo de pacientes de alto riesgo previsto tenía un riesgo 9,4 veces mayor de desarrollar HGD/EAC en comparación con el grupo de bajo riesgo. Adicionalmente, las clases de riesgo proporcionaron información predictiva independiente que superó a los factores de riesgo tradicionales, incluyendo el diagnóstico original del patólogo general y también el diagnóstico del patólogo GI experto. Los análisis de Cox multivariante mostraron que el género masculino y la longitud del segmento no proporcionaron poder de pronóstico. Sin embargo, los casos y controles se emparejaron según el género y, cuando fue posible, la longitud del segmento. De manera importante, la prueba demostró una estratificación del riesgo que era independiente de variables clínicas tradicionales en una cohorte independiente de pacientes con BE.

El enfoque de patología de sistemas tisulares desarrollado y validado en este estudio puede proporcionar a los patólogos información que complementa el análisis histológico y proporcionar a los gastroenterólogos, otros proveedores y pacientes una puntuación de riesgo individualizada para guiar la toma de decisiones sobre la frecuencia de la vigilancia y las terapias. El clasificador de 3 niveles identifica a los pacientes con muy bajo riesgo de progresar a HGD/EAC dentro de los 5 años. Si se valida más, este hallazgo sugiere que la frecuencia de vigilancia endoscópica en este grupo de pacientes puede extenderse posiblemente a 5 años. El clasificador también identifica a los pacientes con riesgo muy alto de progresión. Las guías clínicas actuales recomiendan la intervención con terapia ablativa endoscópica para HGD confirmada y existe una creciente evidencia que respalda la terapia ablativa para LGD confirmada. Los pacientes identificados como de alto riesgo por el clasificador incluyeron pacientes con LGD, IND y ND confirmados por un patólogo GI experto. La validación independiente de este enfoque de predicción de riesgo proporciona un posible apoyo para extender la terapia ablativa a pacientes con EB con IND y ND mediante la identificación objetiva de múltiples cambios moleculares y celulares indicativos de progresión futura. La patología estándar es cualitativa y propensa a la variación entre observadores, incluso entre subespecialistas GI. El enfoque descrito en el presente documento es cuantitativo, objetivo y superó tanto el diagnóstico generalista como el diagnóstico del subespecialista GI. Si bien el enfoque de prueba descrito en el presente documento inicialmente añadiría costes a la vigilancia de los pacientes con BE, existe el posible compensatorio de reducir los costes de atención médica futuros debido a la menor frecuencia de vigilancia endoscópica en pacientes de bajo riesgo y al tratamiento endoscópico temprano para prevenir la progresión maligna en pacientes de alto riesgo.

Las limitaciones de este estudio incluyen la naturaleza retrospectiva de la cohorte, lo que puede dar como resultado un sesgo de selección y un tamaño de muestra limitado. Sin embargo, un estudio prospectivo más amplio no habría sido factible para la capacitación y la validación inicial del clasificador de riesgo debido a la muy baja prevalencia de progresión de la enfermedad en BE. El estudio carecía de revisión patológica central, aunque todos los casos fueron revisados por un único patólogo subespecialista GI en cada una de las instituciones estadounidenses. La cohorte retrospectiva incluyó pacientes en vigilancia en múltiples centros, lo que impidió la estandarización de los protocolos de fijación y almacenamiento de biopsias. Sin embargo, todas las biopsias se obtuvieron durante la vigilancia endoscópica y, por lo tanto, reflejan muestras de BE de rutina que requieren una evaluación de riesgos. Si bien la patología digital ha ganado terreno en los últimos años, el uso de imágenes y análisis de imágenes en los laboratorios de anatomía patológica sigue siendo limitado. El enfoque descrito en el presente documento podría implementarse en un laboratorio clínico central de referencia capaz de ofrecer servicios de patología anatómica y equipado con la instrumentación de imagen necesaria, el programa informático de análisis de imágenes, y personal técnico especializado en patología digital.

Muchos biomarcadores se han mostrado prometedores para la predicción de riesgos en BE, incluyendo

biomarcadores como p53 y AMACR que se evaluaron en este estudio. A pesar de los grandes esfuerzos realizados, hasta la fecha no se han validado ni traducido en la práctica clínica biomarcadores para la predicción de riesgos. Los desafíos para la predicción de riesgos incluyen la heterogeneidad genética y no genética en tejidos y la consiguiente necesidad de evaluar múltiples rutas de carcinogénesis. El papel de los componentes epiteliales y estromales en la carcinogénesis sugiere que un enfoque de biología de sistemas para patología anatómica puede superar las limitaciones de estudios anteriores. Aunque los biomarcadores tales como p53 se han mostrado prometedores en la predicción de riesgos, no todos los pacientes tienen anomalías de p53 detectables en la etapa previa a la progresión y un subconjunto de pacientes sin progresión también presenta anomalías de p53. Aunque el BSG recomienda el IHC p53 como ayuda de diagnóstico, no es suficiente como biomarcador único para la predicción de riesgos. Los métodos utilizados para detectar y puntuar biomarcadores también han obstaculizado su implementación. Los métodos de patología tradicionales tienen una utilidad limitada en la evaluación de múltiples biomarcadores debido a las dificultades para manejar múltiples pruebas de IHC en biopsias de BE limitadas, variación del observador y los desafíos de integrar manualmente datos morfológicos y biomarcadores en un pronóstico. La prueba que se desarrolló y validó en este estudio representa una mejora considerable sobre las variables clínicas y los biomarcadores individuales evaluados por IHC para proporcionar una predicción de riesgos individualizada. Este enfoque de prueba ayuda a la patología mediante la medición objetiva de múltiples anomalías moleculares y celulares que pueden preceder a los cambios morfológicos epiteliales evaluados por patólogos. La puntuación de riesgo validada en este estudio identifica que los pacientes con EB de alto riesgo tienen pérdida de supresión tumoral, pérdida del control del ciclo celular, angiogénesis estromal, patrones alterados de infiltración de células inmunitarias, aumento de la inflamación y anomalías morfológicas, que son indicadores tempranos de progresión. El clasificador utiliza múltiples características de análisis de imágenes extraídas del mismo biomarcador para capturar diferentes patrones de expresión (Tabla 5). Por ejemplo, p53 está mutado con frecuencia en BE y, aunque algunas mutaciones conducen a la acumulación de proteína p53, otros conducen a la pérdida de la proteína p53. Mediante la evaluación de las intensidades medias y sumatorias y también de las intensidades en grupos de núcleos extraídos mediante un programa informático de análisis de imágenes, el clasificador multivariante tiene como objetivo cuantificar múltiples patrones de anomalías de p53 en una manera objetiva y estandarizada. El clasificador multivariante también incorpora características de análisis de imágenes basadas en microambientes que capturan anomalías localizadas tales como sobreexpresión focal de AMACR y grupos de células que sobreexpresan HIF-1 α . El perfil de expresión génica, los enfoques de secuenciación del ADN y los enfoques moleculares para evaluar mutaciones y metilación de ADN también se han aplicado a las pruebas de diagnóstico y pronóstico en BE. Si bien estas tecnologías han ayudado al descubrimiento de biomarcadores y son prometedoras en la predicción de riesgos, tienen la desventaja de requerir la digestión de tejidos, lo que da como resultado la pérdida de morfología y relaciones espaciales entre biomarcadores, que puede ser relevante para los resultados del paciente. Adicionalmente, las pruebas específicas que utilizan estas tecnologías genómicas no se han validado de forma independiente en BE.

Además de las ventajas de la plataforma de tecnología de prueba de sistemas de tejidos, este estudio se vio reforzado por el uso de una cohorte diversa de pacientes de cuatro instituciones de gran volumen. Una presentación adicional de la cohorte fue la exclusión de pacientes con HGD/EAC prevalente, permitiendo el desarrollo de una prueba que predice la progresión de incidentes. Adicionalmente, la prueba se validó en un conjunto independiente de pacientes con BE. El ensayo se puede realizar en secciones de bloques FFPE que se toman para la vigilancia endoscópica de rutina.

En resumen, el enfoque de patología de sistemas tisulares validado en este estudio cuantifica múltiples procesos epiteliales y estromales y predice mejor el riesgo de progresión a HGD/EAC en pacientes con BE que las variables clínicas, incluyendo el diagnóstico patológico. Este enfoque de patología de sistemas tisulares proporciona la oportunidad de mejorar la histología cualitativa actual como un método cuantitativo para estratificar el riesgo de EB en pacientes de alto riesgo que pueden beneficiarse del tratamiento y pacientes de bajo riesgo en los que se pueden extender los intervalos de vigilancia.

EJEMPLO 2. Antecedentes: Existe una necesidad de herramientas mejoradas para detectar displasia de alto grado (HGD) prevalente y adenocarcinoma de esófago (EAC) en pacientes en programas de vigilancia endoscópica para el esófago de Barrett (BE).

Objetivo: En un estudio anterior, un clasificador multivariante, basado en un enfoque de análisis de tejidos que detecta múltiples cambios moleculares y celulares en biopsias de BE antes de la progresión, se desarrolló para predecir el riesgo futuro de progresión en BE. Este estudio tuvo como objetivo determinar si el clasificador multivariante podría detectar un efecto de campo asociado con HGD y EAC prevalentes en biopsias con diagnóstico de metaplasia intestinal no displásica (ND), indefinido para displasia (IND) o displasia de bajo grado (LGD) de pacientes con BE.

Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles anidado para desarrollar y validar un clasificador para estratificar el riesgo de pacientes con BE basado en una plataforma de imágenes que cuantifica múltiples variables epiteliales, estromales y morfológicas en biopsias de BE. Se recopilaron datos de una cohorte multicéntrica de pacientes en programas de vigilancia endoscópica en 4 instituciones en Estados Unidos o Europa. En un estudio anterior se desarrolló un clasificador multivariante en un conjunto de capacitación de biopsias de BE ND, IND y LGD

previas a la progresión de pacientes que progresaron a HGD/EAC en ≥ 1 año ($n = 41$) y biopsias iniciales de controles sin progresión emparejados ($n = 142$). Las secciones de biopsia se inmunomarcaron con fluorescencia para un grupo de 14 biomarcadores epiteliales y estromales, se obtuvieron imágenes y se analizaron mediante programa informático de análisis de imágenes para extraer biomarcadores cuantitativos y características morfológicas. En el conjunto de capacitación se seleccionó un clasificador de 3 niveles basado en 15 características cuantitativas procedentes de 9 biomarcadores y morfología. En el estudio presentado en el presente documento, el clasificador de 3 niveles seleccionado se evaluó en un conjunto de validación independiente de biopsias de BE con diagnósticos de ND, IND o LGD de pacientes que tenían un diagnóstico de HGD o EAC en < 1 año (casos prevalentes, $n = 30$) y controles sin progresión emparejados ($n = 145$).

Resultados: El clasificador detectó múltiples cambios moleculares y celulares en biopsias de BE ND, IND y LGD de pacientes con prevalencia de HGD o EAC. El clasificador de 3 niveles estratificó a los pacientes en clases de riesgo bajo, intermedio y alto en el conjunto de validación independiente de casos prevalentes y pacientes sin progresión (cociente de riesgo 23,18; intervalo de confianza del 95 % 8,57-62,73 para BE de riesgo alto frente a riesgo bajo, $p < 0,0001$ (FIG. 6)). Las clases de riesgo previstas por el clasificador también proporcionaron información de pronóstico independiente que superó el diagnóstico patológico proporcionado por patólogos generalistas y subespecialistas gastrointestinales (Tabla 10).

Tabla 10. Rendimiento de clases de riesgo previstas por la prueba frente al diagnóstico patológico en la estratificación de pacientes con BE con HGD/EAC prevalente a partir de pacientes con BE sin progresión.

A. Rendimiento predictivo de clases de riesgo frente al diagnóstico del patólogo generalista		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	9,65 (3,39 - 27,47)	$< 0,0001$
Análisis con prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	3,47 (1,15 - 10,48)	0,03
Clases de riesgo (previstas por la prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a bajo</i>	9,99 (1,84 - 54,2)	0,01
<i>Riesgo alto frente a bajo</i>	21,25 (4,26 - 105,86)	0,0002
B. Rendimiento predictivo de clases de riesgo frente al diagnóstico del patólogo subespecialista GI		
Variable	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	12,95 (6,24 - 26,89)	$< 0,0001$
Análisis con prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	3,87 (1,71 - 8,77)	0,001
Clases de riesgo (previstas por la prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a bajo</i>	5,37 (1,66 - 17,4)	0,01
<i>Riesgo alto frente a bajo</i>	12,46 (4,11 - 37,76)	$< 0,0001$
Se ejecutaron modelos de Cox multivariante en los que se evaluó primero el diagnóstico posterior de HGD/EAC en relación con el diagnóstico patológico solo, luego en relación con las clases de riesgo y el diagnóstico patológico en pacientes sin progresión y pacientes con HGD/EAC prevalente en el conjunto de validación. Las variables se dicotomizaron como sigue; diagnóstico: LGD frente a ND e IND combinados, clases de riesgo previstas por la prueba: clase de riesgo intermedio frente a bajo y clase de riesgo alto frente a bajo.		

Conclusiones: Una prueba de patología de sistemas tisulares predice mejor la presencia de HGD y EAC prevalentes en BE que las variables clínico-patológicas, y puede mejorar la histología como método de diagnóstico objetivo para identificar pacientes que requieren intervención terapéutica. Los resultados indican que los cambios moleculares y celulares asociados con la transformación maligna en BE pueden extenderse más allá de áreas con HGD o EAC definitivo y pueden detectarse como un efecto de campo mediante la prueba de patología de sistemas tisulares.

EJEMPLO 3. Antecedentes: Existe una necesidad de herramientas mejoradas para detectar displasia de alto grado (HGD) y adenocarcinoma de esófago (EAC) en pacientes con esófago de Barrett (BE). En trabajos anteriores, se demostró que un clasificador de 3 niveles predijo el riesgo de progresión de incidentes en BE. El presente objetivo fue determinar si este clasificador de riesgo podría detectar un efecto de campo en biopsias no displásicas (ND), indefinidas para displasia (IND) o displasia de bajo grado (LGD) a partir de pacientes con BE con HGD/EAC prevalente.

Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles multiinstitucional para evaluar un clasificador de riesgo desarrollado previamente que se basa en características de imagen cuantitativas procedentes de 9 biomarcadores y morfología, y predice el riesgo de HGD/EAC en pacientes con BE. El clasificador de riesgo se evaluó en biopsias ND, IND y LGD de pacientes con BE diagnosticados con HGD/EAC en endoscopia repetida (casos prevalentes, n = 30, mediana de tiempo hasta el diagnóstico de HGD/EAC 140,5 días) y en pacientes sin progresión (controles, n = 145, mediana del tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC 2.015 días).

Resultados: El clasificador de riesgo estratificó los casos prevalentes y los pacientes sin progresión en clases de riesgo bajo, intermedio y alto (cociente de posibilidades, 46,0; intervalo de confianza del 95 %, 14,86-169 (alto riesgo frente a bajo riesgo); $p < 0,0001$). El clasificador también proporcionó información de pronóstico independiente que superó al diagnóstico del subespecialista y generalista.

Conclusión: Una prueba de patología de sistemas tisulares predice mejor la prevalencia de HGD/EAC en pacientes con BE que las variables patológicas. Los resultados indican que cambios moleculares y celulares asociados con la transformación maligna en BE se pueden detectar como un efecto de campo utilizando la prueba.

Introducción

El esófago de Barrett (BE) es un precursor del adenocarcinoma de esófago (EAC), que es el tipo de cáncer de más rápido crecimiento por incidencia en EE.UU. con tasas de supervivencia a 5 años de un 18 % (1). El EAC se puede prevenir si la displasia se detecta y se trata temprano con terapias de erradicación endoscópica tales como ablación por radiofrecuencia (RFA) y/o la resección endoscópica de la mucosa (EMR) (2-4). Las pautas actuales del American College of Gastroenterology (ACG) recomiendan la vigilancia por endoscopia con biopsias a intervalos determinados por el diagnóstico patológico (5). El diagnóstico de displasia en BE está limitado por la naturaleza aleatoria del muestreo endoscópico, que pueden pasar por alto áreas displásicas y por variación entre observadores (6). Si bien endoscopistas expertos pueden detectar lesiones sutiles que contienen displasia de alto grado (HGD) y EAC en centros de gran volumen, el reconocimiento de lesiones sutiles es más desafiante en el entorno comunitario (7). Estas limitaciones pueden dar como resultado endoscopias repetidas y diagnósticos tardíos de HGD y EAC (8).

Se ha descrito un efecto de campo en muchos tipos diferentes de cáncer, incluso en EAC (9, 10). La displasia y el EAC pueden ser multifocales en BE. Se han encontrado las mismas mutaciones y metilación anómala de ADN en múltiples niveles y en grandes campos en BE (11, 12), lo que indica cancerización de campo. Un campo preneoplásico que rodea una HGD o EAC puede parecer histológicamente no displásico (ND) o displasia de bajo grado (LGD), pero exhibe cambios moleculares y celulares asociados con la transformación maligna. La detección de anomalías en este campo ampliado puede superar las limitaciones del muestreo aleatorio y los diagnósticos subjetivos, permitiendo un diagnóstico más temprano de HGD y EAC.

Se han evaluado muchos biomarcadores en BE (13-16) y la British Society of Gastroenterology (BSG) recomienda la inmunohistoquímica (IHC) de p53 para ayudar al diagnóstico de displasia (17). Sin embargo, no se han validado biomarcadores para detectar de forma fiable el efecto de campo o las anomalías asociadas con la displasia prevalente y el EAC en BE. Se ha demostrado que un enfoque de patología de sistemas tisulares basado en una plataforma de imágenes que cuantifica tanto anomalías epiteliales como estromales ayuda a distinguir la HGD de BE no displásico con atipia reactiva (18, 19). También se ha demostrado que este enfoque de imágenes predice la progresión de incidentes en BE, mediante la cuantificación objetiva de características moleculares y celulares que preceden cambios morfológicos definitivos (20) (FIG. 7). El ensayo emplea marcaje de inmunofluorescencia multiplexado de 9 biomarcadores epiteliales y estromales en secciones a partir de biopsias fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). Se obtienen imágenes de los portaobjetos marcados con fluorescencia mediante escaneo de fluorescencia de portaobjetos completo, y el programa informático de análisis de imágenes automatizado extrae datos cuantitativos de expresión y localización de los biomarcadores y la morfología. La etapa final utiliza un clasificador multivariante para integrar los datos del análisis de imágenes cuantitativo en puntuaciones individualizadas que se correlacionan con el riesgo de HGD/EAC (FIG. 7 (20)). Esto puede tener aplicaciones en la detección de cambios moleculares y celulares en el campo preneoplásico expandido asociado con HGD/EAC. El objetivo de este estudio fue determinar si este ensayo puede detectar anomalías indicativas de un efecto de campo en biopsias ND, indefinidas para displasia (IND) y LGD de pacientes con BE con HGD/EAC prevalente.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y pacientes

Se construyó un estudio de casos y controles que utilizó una cohorte multicéntrica de pacientes con BE con datos de resultados clínicos de cuatro instituciones de alto volumen (Geisinger Health System, Universidad de Pittsburgh, Universidad de Pensilvania y Academic Medical Center (AMC), Amsterdam, Holanda). Se recuperaron casos de BE con ND, IND o LGD confirmado por un patólogo subespecialista gastrointestinal (GI) (J.M.D., J.L., N.C.J.). Para pacientes con múltiples niveles de biopsia tomados en la misma endoscopia, se seleccionó la biopsia con mayor diagnóstico determinado por un patólogo subespecialista GI (LGD fue el diagnóstico más alto, luego IND y ND fue el más bajo). Para pacientes con múltiples niveles de biopsia con el mismo diagnóstico, el patólogo de cada institución

seleccionó un bloque representativo con suficiente tejido para análisis. Los criterios de inclusión fueron la disponibilidad de bloques de tejido y datos clínico-patológicos, y la confirmación de metaplasia intestinal por un subespecialista GI. Los criterios de exclusión fueron la calidad insuficiente de tejido (evaluado por un patólogo) y el uso de fijador de Bouin o azul de metileno en el procesamiento de la muestra que puede interferir con el inmunomarcaje de fluorescencia. Los casos fueron pacientes que tenían HGD/EAC en la endoscopia repetida en < 1 año (n = 23) o tenían antecedentes de HGD/EAC tratados, volvieron a ND, IND o LGD y tuvieron HGD/EAC en endoscopia repetida (n = 7) (casos prevalentes, n = 30 en total). Se incluyeron casos prevalentes con y sin antecedentes previos, como se describió anteriormente, ya que ambos subgrupos de pacientes pueden albergar HGD o EAC temprano que pueden ser difíciles de reconocer durante la endoscopia. Los controles sin progresión no mostraron HGD/EAC en la endoscopia repetida y tuvieron una mediana de tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC de 5,6 años (n = 145). Los elementos de información recopilados fueron: fecha de recogida del caso, diagnóstico patológico original y diagnóstico del subespecialista GI para el caso probado en este estudio, fecha y diagnóstico original de cada biopsia de vigilancia, criterio de valoración de la progresión (HGD/EAC), tiempo de vigilancia libre de HGD/EAC (tiempo entre el caso probado y el diagnóstico de HGD/EAC o el último seguimiento), edad, sexo y longitud del segmento (cm) y clase de segmento (corto ≤ 3 cm, largo > 3 cm). El estudio fue aprobado por las juntas de revisión institucional de cada institución.

Inmunomarcaje por fluorescencia

Se tiñeron secciones de 5 µm de biopsias de BE FFPE con H&E mediante métodos histológicos estándar. K20, p16INK4a, AMACR, p53, HER2/neu, CD68, COX-2, HIF-1α y CD45RO se marcaron mediante inmunofluorescencia multiplexada de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (19). Los biomarcadores se multiplexaron en subgrupos de 3 anticuerpos primarios por portaobjetos detectados a través de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor-488, -555 y -647 y Hoechst-33342 para marcar el ADN (Life Technologies, Carlsbad, California).

Imágenes de portaobjetos completas

Se tomaron imágenes de portaobjetos teñidos con H&E con un aumento de 20x en un escáner de patología digital NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, KK, Japón). Se obtuvieron imágenes de portaobjetos inmunomarcados con fluorescencia utilizando un procedimiento operativo estándar con un aumento de 20x en un ScanScope FL (Leica BioSystems, Vista, CA) como se describió anteriormente (19).

Análisis de imágenes

Se analizaron imágenes de fluorescencia de portaobjetos completos utilizando la plataforma de análisis de imágenes TissueCypher™ (Cernostics, Inc., Pittsburgh, PA), que utiliza algoritmos automatizados de análisis de imágenes de tejidos para segmentar objetos basados en células y estructuras de tejidos (por ejemplo, compartimentos epiteliales y estromales) para permitir la recopilación de datos de características de morfología y biomarcadores cuantitativos y contextuales. Los algoritmos de análisis de imágenes se han descrito en detalle anteriormente (19). Las 15 características empleadas por el clasificador de riesgo (Tabla 2, (20)) se extrajeron de las imágenes de tejidos de portaobjetos completos de fluorescencia.

Análisis estadísticos

En un estudio previo se desarrolló un clasificador de predicción de riesgo para la predicción de la progresión de incidentes a HGD/EAC (FIG. 7 (20)). En este estudio, se probó la hipótesis de que los pacientes en la clase de alto riesgo pronosticado tienen un riesgo significativamente mayor de presencia de HGD/EAC prevalente que los pacientes en la clase de riesgo bajo pronosticado. También se probó la hipótesis de que las clases de riesgo proporcionarían información de pronóstico independiente y más sólida más allá de la del diagnóstico patológico (patólogo subespecialista GI o generalista). Los cálculos del tamaño de la muestra indicaron que se requirió un total de 43 pacientes (incluyendo los casos prevalentes y sin progresión) para asegurar un poder de un 80 % para detectar una diferencia significativa de un 50 % en el riesgo de HGD/EAC prevalente entre los clasificados como de alto riesgo frente a de bajo riesgo, a un nivel de significancia de 0,05. Todos los parámetros del ensayo fueron especificados previamente, incluyendo las 15 características/mediciones de análisis de imágenes, parámetros de escala, el modelo clasificador y los valores de corte definidos en el estudio anterior (20). Se calculó la puntuación de riesgo y la clase de riesgo (bajo, intermedio o alto) para cada caso.

Las curvas de rendimiento diagnóstico (curvas ROC) se trazaron basándose en el resultado binario del diagnóstico posterior de HGD/EAC (casos) frente a sin progresión de la enfermedad (control) y las puntuaciones de riesgo continuo de la prueba. También se trazaron curvas ROC para el porcentaje de células que sobreexpresan p53 (determinado por el programa informático de análisis de imágenes como se describió anteriormente (19)). La comparación con p53 se realizó ya que el BSG recomienda el IHC p53 para ayudar en el diagnóstico de displasia (17). Se utilizó regresión logística para evaluar la significancia de la asociación de los grupos de riesgo pronosticados como variable independiente con el diagnóstico posterior de HGD/EAC prevalente o no como variable dependiente. A partir de la regresión logística se calcularon los cocientes de posibilidades (OR) con un IC del 95 % que miden la fuerza de la asociación entre los grupos de riesgo previstos y el diagnóstico posterior de HGD/EAC.

Comparación del rendimiento del clasificador frente al diagnóstico patológico: Se realizó una regresión logística multivariante y una regresión de Cox multivariante para comparar el rendimiento de las clases de riesgo producidas por el clasificador frente al diagnóstico patológico por un generalista o subespecialista GI incluida como la variable independiente, en la predicción del diagnóstico posterior de HGD/EAC incluido como variable dependiente. El diagnóstico patológico fue dicotomizado: LGD frente a ND e IND combinados. Los casos de IND y ND se combinaron debido al tamaño de muestra limitado del subconjunto de IND (2 casos sin progresión y 1 prevalente tenían un diagnóstico del subespecialista de IND).

Resultados

Pacientes:

La cohorte de casos y controles incluyó biopsias con diagnóstico de ND (n = 13), IND (n = 1) o LGD (n = 16) de 30 pacientes con BE con HGD o EAC (casos prevalentes, mediana de tiempo hasta el diagnóstico de HGD/EAC 140,5 días, IQR 56, 241) y 145 muestras de pacientes de control emparejados con datos de resultados clínicos que no muestran progresión de la enfermedad (ND n = 138, IND n = 2, LGD n = 5, tiempo medio de vigilancia libre de HGD/EAC 2.015 días, IQR 1.498, 3.111). 22/30 casos prevalentes se diagnosticaron con HGD y 8/30 fueron diagnosticados con EAC en la endoscopia repetida (Tabla 11). Los pacientes control eran de una cohorte evaluada en un estudio previo (20), mientras que los casos prevalentes no se habían evaluado previamente. La mayoría de los pacientes eran hombres, y una mayor proporción de pacientes con HGD/EAC eran hombres (93,3 %) y tenían EB de segmento largo (63,3 %) en comparación con pacientes sin progresión (78,6 % eran hombres, 50,3 % tenían segmento largo), lo cual es consistente con los estudios epidemiológicos publicados en EAC (21, 22). Las características clínicas de los pacientes se resumen en la Tabla 11.

Rendimiento del clasificador de riesgo de 15 características en la estratificación de casos prevalentes de pacientes sin progresión:

El clasificador de riesgo de 15 características especificado previamente se evaluó en el conjunto de biopsias BE de casos prevalentes y pacientes sin progresión. El análisis ROC basado en el resultado binario (diagnóstico posterior de HGD/EAC frente a ninguna progresión de la enfermedad) y las puntuaciones de riesgo continuo mostraron que el clasificador tenía la capacidad de distinguir HGD/EAC prevalente de pacientes sin progresión con AUROC de 0,893, mientras que el % de células que sobreexpresan p53 tenía AUROC de 0,594 (Figura 8, Panel A). Se realizaron subanálisis en los subconjuntos de casos prevalentes con y sin antecedentes de HGD o EAC, ya que los casos con antecedentes de HGD/EAC pueden albergar un mayor número de mutaciones y otras anomalías que los casos sin antecedentes. El análisis ROC de los subconjuntos de casos prevalentes con y sin antecedentes de HGD o EAC (n = 7 y 23, respectivamente) mostró que el clasificador tenía un fuerte rendimiento predictivo para distinguir ambos subconjuntos de pacientes sin progresión (AUROC = 0,926 y 0,883, respectivamente). AUROC para las subclases ND/IND y LGD fueron 0,873 y 0,792, respectivamente. Un diagrama de caja y bigotes mostró puntuaciones de riesgo de 15 características más altas en los casos prevalentes frente a pacientes sin progresión ($p < 0,0001$, Figura 8, Panel B). La regresión logística demostró que el clasificador de 15 características podría estratificar pacientes con riesgos significativamente diferentes de HGD/EAC prevalente; Los OR fueron 46,0 (IC del 95 % 14,86-169, $p < 0,0001$) para la comparación del grupo de riesgo alto frente a riesgo bajo y 7,67 (IC del 95 % 2,24-28,14, $p = 0,001$) para el grupo de riesgo intermedio frente al de riesgo bajo (Figura 8, Panel C). El clasificador identificó tanto biopsias no displásicas como LGD de casos prevalentes como de riesgo alto (Figura 8, Panel D). La probabilidad de diagnóstico de HGD/EAC en la endoscopia repetida aumentó continuamente a medida que aumentaba la puntuación de riesgo de 15 características (Figura 8, Panel E). En la regresión logística multivariante en la que el diagnóstico posterior de HGD/EAC se evaluó primero en relación con el diagnóstico patológico solo, luego, en relación con las clases de riesgo previstas añadidas al diagnóstico patológico, la magnitud de los OR indicó que la clase de alto riesgo prevista proporcionó un poder predictivo independiente y más fuerte que el diagnóstico patológico por el generalista o subespecialista GI en esta cohorte de pacientes (Tabla 12). Se obtuvieron resultados similares con modelos de regresión de Cox multivariante (datos no mostrados).

Los pacientes identificados como de alto riesgo exhibieron múltiples anomalías epiteliales y estromales que se cuantifican mediante las 15 características de análisis de imágenes utilizadas por el clasificador de riesgo. Las anomalías detectadas en las biopsias ND y LGD en pacientes con HGD/EAC prevalente incluyeron sobreexpresión de p53, HER2/neu y COX-2, sobreexpresión focal de AMACR, infiltración de la lámina propia por células CD45RO-positivas, células CD68-positivas y células estromales que expresan HIF-1 α (Figura 9). El mayor poder predictivo de las clases de riesgo en comparación con el diagnóstico patológico se ilustró en un paciente con segmento de 2 cm de BE con biopsias disponibles de dos niveles endoscópicos. Las biopsias de 32 cm y 34 cm se diagnosticaron como ND y LGD, respectivamente, por un subespecialista GI en este estudio, y como ND e IND, respectivamente, por un patólogo general que registró el diagnóstico original. La biopsia repetida 56 días después mostró HGD. Las biopsias de los dos niveles, que se evaluaron con fines ilustrativos, obtuvieron una puntuación de 8,9 y 8,7 (en una escala de 0-10) con la puntuación de riesgo de 15 características, demostrando que estaban presentes cambios moleculares y celulares de alto riesgo similares en ambos niveles de biopsia a pesar del diagnóstico patológico diferente (Figura 10, Paneles A-J).

Debate

- Utilizando un diseño de estudio de casos y controles, se validó un clasificador multivariante que evalúa biopsias ND, IND y LGD para detectar prevalencia de HGD/EAC en pacientes con BE. La prueba integra biomarcadores cuantitativos y datos morfológicos en una puntuación de riesgo e incorpora una estratificación de riesgo de 3 niveles para clasificar pacientes como de riesgo bajo, intermedio o alto de HGD/EAC. El grupo de pacientes de alto riesgo previsto tenía un riesgo 46 veces mayor de HGD/EAC prevalente en comparación con el grupo de bajo riesgo. De manera importante, las clases de riesgo proporcionaron un poder predictivo más fuerte que el diagnóstico del patólogo generalista y GI experto en esta cohorte de pacientes, y demostraron una alta precisión en la detección de la presencia de HGD/EAC prevalente, incluso en biopsias no displásicas. El ensayo de patología de sistemas tisulares utilizado en este estudio, por lo tanto, puede proporcionar a médicos y pacientes una puntuación individualizada que indique el potencial de HGD/EAC prevalente, que puede ayudar en la toma de decisiones sobre exámenes de vigilancia más rigurosos y terapia endoscópica en pacientes con BE con ND, IND o LGD. Este estudio se vio reforzado por el uso de una cohorte diversa de pacientes de cuatro instituciones de gran volumen en EE.UU. y Europa. El estudio se vio reforzado por la tecnología de ensayo, que evalúa múltiples rutas asociadas con la carcinogénesis, y también es cuantitativa y objetiva. El ensayo se puede realizar en secciones de bloques FFPE y, por tanto, es compatible con la práctica clínica.
- Los centros de referencia expertos tienen tasas más altas de detección de HGD/EAC y anomalías de las mucosas que los centros comunitarios, pero el reconocimiento de lesiones sutiles que contienen HGD y EAC temprano puede ser un desafío en todos los entornos (7, 23). La vigilancia endoscópica es eficaz cuando se realiza de acuerdo con las guías de práctica, sin embargo, la adherencia a las pautas varía entre entornos (23, 24). La HGD y el EAC temprano pueden pasar por alto por muestreo aleatorio, lo que puede dar como resultado endoscopias repetidas y retrasos en el diagnóstico y tratamiento de HGD y EAC. Un diagnóstico de LGD confirmado por múltiples subespecialistas GI es una fuerte variable independiente de progresión maligna (25, 26). Sin embargo, la variabilidad entre observadores en el diagnóstico, incluso entre los subespecialistas GI, ha sido bien documentado (6, 27).
- A pesar de los grandes esfuerzos para identificar y validar biomarcadores en BE (13-16), ninguno se ha traducido a la práctica para superar las limitaciones del muestreo aleatorio mediante la detección de un efecto de campo. Se ha demostrado que IHC p53 tiene importancia diagnóstica y pronóstica en BE (17, 28). Sin embargo, la evaluación de p53 por sí sola no es suficiente ya que no todos los pacientes tienen anomalías detectables en los niveles de proteína p53, y un subconjunto de pacientes que presentan anomalías de p53 no desarrollan HGD o EAC (14, 29). Enfoques moleculares tales como secuenciación de ADN, expresión génica, perfiles de mutación y metilación se han aplicado a las pruebas de diagnóstico y pronóstico en BE (30-32), pero aún no se han evaluado en la detección de anomalías en el campo expandido que rodea a HGD y EAC. Estas tecnologías tienen la desventaja de requerir la digestión de tejidos, dando como resultado la pérdida de información contextual, tal como morfología nuclear y las relaciones espaciales que son relevantes para los resultados del paciente. Otras desventajas incluyen el requisito de muestras frescas congeladas para algunos de estos enfoques genómicos, que es un problema logístico en la práctica clínica, y también la necesidad de una microdissección láser de áreas de tejido basada en una revisión subjetiva para algunos de estos enfoques.
- El clasificador de riesgo evaluado en este estudio identifica a los pacientes que tienen HGD/EAC prevalente, a pesar de recibir un diagnóstico patológico de ND, IND o LGD. Las anomalías cuantificadas por el ensayo incluyen pérdida de supresión tumoral, pérdida del control del ciclo celular, cambios morfológicos, aumento de la inflamación, angiogénesis estromal y patrones alterados de infiltración de células inmunitarias (20). Si se valida en estudios adicionales, este hallazgo sugiere que la detección objetiva de múltiples anomalías moleculares y celulares en el campo preneoplásico de BE podría superar algunas de las limitaciones del muestreo endoscópico aleatorio y el diagnóstico patológico, y permitir la detección más temprana de HGD/EAC en todos los entornos de la práctica. Se requieren estudios adicionales para evaluar el rendimiento del ensayo en biopsias de diferentes niveles endoscópicos. Pruebas ex vivo tales como esta también pueden complementar técnicas endoscópicas más nuevas, tales como la endomicroscopía láser volumétrica (33), proporcionando análisis cuantitativos y objetivos de las rutas implicadas en la transformación maligna.
- Se reconoce fácilmente las limitaciones de este estudio, que incluyen la naturaleza retrospectiva del estudio, el diseño del estudio de cohortes de casos y controles en el que la proporción de casos prevalentes no era representativa de la población general, y el pequeño número de casos prevalentes disponibles, como se refleja en los amplios intervalos de confianza que se informan. Además, se requerirán estudios más amplios para validar los presente hallazgos. Sin embargo, los grandes estudios prospectivos son un desafío en BE debido a la baja prevalencia de progresión maligna. El conjunto de biopsias y pacientes fue heterogéneo; las biopsias tenían diagnósticos de ND, IND y LGD, 22/30 pacientes tenían HGD prevalente, mientras que 8/30 tenían EAC prevalente, y los intervalos entre la biopsia probada y la endoscopia repetida que demostraba HGD/EAC eran variables. En este estudio se evaluaron biopsias de un solo nivel de endoscopia y se requieren estudios adicionales con biopsias de múltiples niveles de endoscopia de pacientes con lesiones sutiles que contienen HGD o EAC temprano. La cohorte de este estudio incluyó pacientes en vigilancia en múltiples centros en EE.UU. y Europa durante un amplio período de tiempo, lo que impidió la estandarización de variables preanalíticas. Sin embargo, las biopsias reflejan muestras

de rutina que requieren una evaluación de riesgos precisa.

El ensayo requiere instrumentación y un programa informático que no podrían integrarse fácilmente en los laboratorios de patología actuales, que apenas están comenzando a adoptar la patología digital. El ensayo se ha desplegado en un laboratorio central de referencia equipado con los recursos necesarios, que permite a los médicos de los centros de referencia de expertos y los centros comunitarios solicitar el ensayo. Los portaobjetos sin teñir se pueden enviar al laboratorio de referencia, se realiza el ensayo y el laboratorio proporciona un informe clínico al médico que lo solicita y al patólogo que lo envía. El proceso de prueba tarda aproximadamente 3 días hábiles. El enfoque de prueba se sumaría inicialmente al coste de la vigilancia de BE. Sin embargo, las pruebas de predicción de riesgo pueden dar como resultado el ahorro de costes en pacientes de alto riesgo mediante la reducción de endoscopias repetidas y el tiempo del patólogo requerido para diagnosticar HGD/EAC, permitiendo una intervención más temprana con terapias endoscópicas para reducir la incidencia y la mortalidad por EAC. En pacientes de bajo riesgo existe la posibilidad de reducir los costes futuros mediante la extensión de los intervalos de vigilancia (34, 35). Si bien es factible analizar biopsias de múltiples niveles en BE de segmento largo, esto puede añadir un coste significativo en un subconjunto de pacientes, lo que puede superar el posible ahorro de costes al reducir las endoscopias innecesarias o intervenir temprano para prevenir la progresión.

En resumen, el ensayo de patología de sistemas tisulares examinado en este estudio cuantifica objetivamente múltiples procesos epiteliales y estromales que predicen la prevalencia de HGD/EAC en pacientes con BE. El ensayo puede mejorar los métodos histológicos actuales para permitir una detección más temprana de HGD/EAC, lo que facilitará intervenciones terapéuticas más tempranas y eficaces.

BIBLIOGRAFÍA PARA EL EJEMPLO 3

1. Cancer Facts & Figures 2016, American Cancer Society.
2. Bulsiewicz WJ, Kim HP, Dellon ES, Cotton CC, Pasricha S, Madanick RD, *et al.* Safety and efficacy of endoscopic mucosal therapy with radiofrequency ablation for patients with neoplastic Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013; 11:636-42.
3. Pasricha S, Bulsiewicz WJ, Hathorn KE, Komanduri S, Muthusamy VR, Rothstein RI, *et al.* Durability and predictors of successful radiofrequency ablation for Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 12:1840-7 e1.
4. Phoa KN, van Vilsteren FG, Weusten BL, Bisschops R, Schoon EJ, Ragunath K, *et al.* Radiofrequency ablation vs endoscopic surveillance for patients with Barrett esophagus and low-grade dysplasia: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;311:1209-17.
5. Shaheen NJ, Falk GW, Iyer PG, Gerson LB. ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2015;111:30-50.
6. Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart J, *et al.* Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation. *Hum Pathol.* 2001;32:368-78.
7. Schölvinc D, Van Der Meulen K, Bergman JJ, Weusten BL. Detection of Lesions in Dysplastic Barrett's Esophagus: Are Expert Endoscopists Doing a Better Job Than Community Endoscopists? *Gastrointestinal Endoscopy.* 2015;81:AB139.
8. Visrodia K, Singh S, Krishnamoorthi R, Ahlquist DA, Wang KK, Iyer PG, *et al.* Magnitude of Missed Esophageal Adenocarcinoma After Barrett's Esophagus Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 150:599-607 e7.
9. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, *et al.* Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1523-32.
10. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63:1727-30.
11. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus. *Cancer Res.* 1999;59:4784-7.
12. Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI, *et al.* Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2000;60:5021-6.
13. Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ. Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Oncogene.* 1996;13:1867-73.
14. Bird-Lieberman EL, Dunn JM, Coleman HG, Lao-Sirieix P, Oukrif D, Moore CE, *et al.* Population-based study reveals new risk-stratification biomarker panel for Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2012;143:927-35 e3.
15. Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW, Verheij J, Kalisvaart M, Looijenga LH, *et al.* Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus. *Gut.* 2012;62:1676-83.
16. Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW, Verheij J, Kalisvaart M, Looijenga LH, *et al.* Value of alpha-methylacyl-CoA racemase immunochemistry for predicting neoplastic progression in Barrett's oesophagus. *Histopathology.* 2013;63:630-9.
17. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragunath K, Ang Y, Kang JY, Watson P, *et al.* British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut.* 2014;63:7-42.

18. Gough A, Lezon T, Faeder J, Chennubhotla C, Murphy R, Critchley-Thorne R, *et al.* High Content Analysis And Cellular And Tissue Systems Biology: A Bridge Between Cancer Cell Biology And Tissue-Based Diagnostics. En: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB, editors. The Molecular Basis of Cancer 4^a Edición 4^a ed. Nueva York: Elsevier; 2014.
19. Prichard JW, Davison JM, Campbell BB, Repa KA, Reese LM, Nguyen XM, *et al.* TissueCypher: A Systems Biology Approach to Anatomic Pathology. *Journal of Pathology Informatics*. 2015;6:48.
20. Critchley-Thorne RJ, Duits LC, Prichard JW, Davison JM, Jobe BA, Campbell BB, *et al.* A Tissue Systems Pathology Assay for High-Risk Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25:958-68.
21. Mathieu LN, Kanarek NF, Tsai HL, Rudin CM, Brock MV. Age and sex differences in the incidence of esophageal adenocarcinoma: results from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Registry (1973-2008). *Dis Esophagus*. 2013;27:757-63.
22. Weston AP, Badr AS, Hassanein RS. Prospective multivariate analysis of clinical, endoscopic, and histological factors predictive of the development of Barrett's multifocal high-grade dysplasia or adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:3413-9.
23. Abrams JA, Kapel RC, Lindberg GM, Saboorian MH, Genta RM, Neugut AI, *et al.* Adherence to biopsy guidelines for Barrett's esophagus surveillance in the community setting in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:736-42; quiz 10.
24. Verbeek RE, Leenders M, Ten Kate FJ, van Hillegersberg R, Vleggaar FP, van Baal JW, *et al.* Surveillance of Barrett's esophagus and mortality from esophageal adenocarcinoma: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2014;109:1215-22.
25. Curvers WL, ten Kate FJ, Krishnadath KK, Visser M, Elzer B, Baak LC, *et al.* Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus: overdiagnosed and underestimated. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1523-30.
26. Duits LC, Phoa KN, Curvers WL, Ten Kate FJ, Meijer GA, Seldenrijk CA, *et al.* Barrett's oesophagus patients with low-grade dysplasia can be accurately risk-stratified after histological review by an expert pathology panel. *Gut*. 2015;64:700-6.
27. Kerkhof M, van Dekken H, Steyerberg EW, Meijer GA, Mulder AH, de Bruine A, *et al.* Grading of dysplasia in Barrett's oesophagus: substantial interobserver variation between general and gastrointestinal pathologists. *Histopathology*. 2007;50:920-7.
28. Horvath B, Singh P, Xie H, Thota PN, Sun X, Liu X Expression of p53 predicts risk of prevalent and incident advanced neoplasia in patients with Barrett's esophagus and epithelial changes indefinite for dysplasia. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015.
29. Sikkema M, Kerkhof M, Steyerberg EW, Kusters JG, van Strien PM, Looman CW, *et al.* Aneuploidy and overexpression of Ki67 and p53 as markers for neoplastic progression in Barrett's esophagus: a case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:2673-80.
30. Jin Z, Cheng Y, Gu W, Zheng Y, Sato F, Mori Y, *et al.* A multicenter, double-blinded validation study of methylation biomarkers for progression prediction in Barrett's esophagus. *Cancer Res*. 2009;69:4112-5.
31. Eluri S, Brugge WR, Daglilar ES, Jackson SA, Styn MA, Callenberg KM, *et al.* The Presence of Genetic Mutations at Key Loci Predicts Progression to Esophageal Adenocarcinoma in Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2015;110:828-34.
32. Del Portillo A, Lagana SM, Yao Y, Uehara T, Jhala N, Ganguly T, *et al.* Evaluation of Mutational Testing of Preneoplastic Barrett's Mucosa by Next-Generation Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Endoscopic Samples for Detection of Concurrent Dysplasia and Adenocarcinoma in Barrett's Esophagus. *J Mol Diagn*. 2015; 17:412-9.
33. Evans JA, Poneros JM, Bouma BE, Bressner J, Halpem EF, Shishkov M, *et al.* Optical coherence tomography to identify intramucosal carcinoma and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:38-43.
34. Hao J, Snyder SR, Pitcavage J, Critchley-Thorne RJ. A Cost-effectiveness analysis of a test that predicts risk of malignant progression in Barrett's esophagus. 21st Annual International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research Meeting. Washington DC 2016.
35. Gordon LG, Mayne GC, Hirst NG, Bright T, Whiteman DC, Watson DI. Cost-effectiveness of endoscopic surveillance of non-dysplastic Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*. 2014;79:242-56 e6.

Tabla 11. Características del paciente

	Pacientes sin progresión	Casos prevalentes
N.º de pacientes	145	30
Tiempo de vigilancia libre de HQD/EAC (mediana de días (IQR))	2.015 (1.488, 3.111)	140,5 (56, 241,3)
Edad (media de años ± DE)	61,0 ± 12,1	61,8 ± 9,5
Longitud del segmento (%)		
Corto (≤ 3 cm)	58 (40,0)	9 (30,0)

(continuación)

Tabla 11. Características del paciente								
	Pacientes sin progresión				Casos prevalentes			
Largo (> 3 cm)	73 (50,3)				19 (63,3)			
Desconocido	14 (9,7)				2 (6,7)			
Sexo (%)								
Masculino	114(78,6)				28 (83,3)			
Femenino	31 (21,4)				2 (6,7)			
Pacientes en cada clase de diagnóstico (%)	ND	IND	LGD		ND	IND	LGD	
	138 (95,2)	2 (1,4)	5 (3,4)		13 (43,3)	1 (3,3)	16 (53,3)	
Diagnósticos de criterio de valoración (%)	nd	nd	nd		HGD 7 (53,8) EAC 6 (46,2)	HGD 1 (100) EAC 0 (0)	HGD 14 (87,5) EAC 2 (12,5)	
Cada Institución	Pacientes sin progresión				Casos prevalentes			
N.º de pacientes (%)	AMC	Gei	UPenn	UPitt	AMC	Gei	UPenn	UPitt
	46 (31,7)	63 (43,5)	15 (10,3)	21 (14,5)	4 (13,3)	12 (40,0)	7 (23,3)	7 (23,3)
Tiempo de vigilancia libre de HQD/EAC (mediana de días (IQR))	1.816 (1.458, 2.847,3)	2.361 (1.522, 3.698)	1.497 (1.277, 1.736)	2.306 (2.055, 3.155,5)	98,5 (60,5, 172,5)	42 (19, 134,5)	220 (176, 321)	179 (123, 242)
*tiempo de vigilancia: número de días entre la biopsia probada y la última endoscopia con ND, IND o LGD (pacientes sin progresión) o endoscopia con diagnóstico HGD o EAC (casos prevalentes). Diagnóstico proporcionado por patólogo subespecialista GI. AMC: Academic Medical Center, Países Bajos; Gei: Geisinger Health System; UPenn: Universidad de Pensilvania; UPitt, Universidad de Pittsburgh. DE: desviación estándar, IQR: intervalo intercuartil.								

Tabla 12. Rendimiento de clases de riesgo previstas por la prueba frente al diagnóstico patológico en la estratificación de pacientes con BE con HGD/EAC prevalente a partir de pacientes con BE sin progresión.		
A. Rendimiento predictivo de clases de riesgo frente al diagnóstico del patólogo generalista		
Variable	Cociente de posibilidades (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	12,67 (4,17 - 44,05)	< 0,0001
Análisis con prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo general (LGD frente a ND/IND)	5,28 (1,42 - 21,39)	0,01
Clases de riesgo (previstas por la prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a bajo</i>	12,23 (2,19 - 95,92)	0,007
<i>Riesgo alto frente a bajo</i>	32,16 (6,40 - 246,84)	0,0001
B. Rendimiento predictivo de clases de riesgo frente al diagnóstico del patólogo subespecialista GI		
Variable	Cociente de posibilidades (IC 95 %)	Valor de P
Análisis sin prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	28,0 (9,47 - 96,63)	< 0,0001
Análisis con prueba de predicción de riesgos		
Dx del patólogo subespecialista GI (LGD frente a ND/IND)	10,36 (2,85 - 42,46)	0,0006
Clases de riesgo (previstas por la prueba)		
<i>Riesgo intermedio frente a bajo</i>	5,16 (1,34 - 20,34)	0,01

(continuación)

Tabla 12. Rendimiento de clases de riesgo previstas por la prueba frente al diagnóstico patológico en la estratificación de pacientes con BE con HGD/EAC prevalente a partir de pacientes con BE sin progresión.**B. Rendimiento predictivo de clases de riesgo frente al diagnóstico del patólogo subespecialista GI**

Variable	Cociente de posibilidades (IC 95 %)	Valor de P
<i>Riesgo alto frente a bajo</i>	24,65 (7,15 - 96,56)	< 0,0001

Se ejecutaron regresiones logísticas multivariante en las que se evaluó primero el diagnóstico posterior de HGD/EAC como variable dependiente en relación con el diagnóstico patológico solo, luego en relación con las clases de riesgo y el diagnóstico patológico, incluida como variable independiente en casos sin progresión y prevalentes. Las variables se dicotomizaron; diagnóstico: LGD frente a ND/IND combinados, clases de riesgo previstas: clase de riesgo intermedio frente a bajo y clase de riesgo alto frente a bajo. Parte A, n = 130 pacientes con diagnóstico del generalista registrados durante la vigilancia. Parte B, n = 175 pacientes con diagnóstico del subespecialista GI proporcionado para este estudio.

Si bien las realizaciones se han descrito con referencias a realizaciones de ejemplo de las mismas, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar varios cambios en la forma y los detalles y que están dentro del alcance de lo que se describe y reivindica en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un riesgo de progresión de esófago de Barrett en un sujeto, que comprende:

- a) proporcionar una muestra del sujeto;
- b) detectar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu;
- c) determinar características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y morfología, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos de núcleos, relación de intensidad del 95° cuantil de HER2/neu:intensidad del 95° cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática, desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1 α en el microambiente celular, momento de HIF-1 α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53 e intensidad del 95° cuantil nuclear de Hoechst;
- d) determinar una puntuación usando la combinación de las características de análisis de imágenes; y
- e) correlacionar la puntuación con el riesgo de progresión de esófago de Barrett en el sujeto.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene un mayor riesgo de displasia de bajo grado, displasia de alto grado o cáncer de esófago.

3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el sujeto ha recibido un diagnóstico de metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, indefinido para displasia, displasia de bajo grado o displasia de alto grado.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la detección de la pluralidad de biomarcadores comprende usar sondas que se unen específicamente a cada uno de los biomarcadores; opcionalmente en donde las sondas son fluorescentes y/o comprenden un marcador fluorescente, o se detectan mediante una sonda secundaria que es fluorescente y/o comprende un marcador fluorescente, opcionalmente en donde cada sonda está marcada con un fluoróforo diferente.

5. El método de la reivindicación 4, en donde se obtienen imágenes de portaobjetos marcados para producir campos de visión y/o se analizan portaobjetos completos para extraer características asociadas con biomarcadores y morfología.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la detección de la pluralidad de biomarcadores se determina simultáneamente.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra comprende células que contienen núcleos celulares y en donde los núcleos celulares están marcados con un grupo de reactivos seleccionados del grupo que consiste en Hoechst, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinciones de ácido nucleico de cianina y hematoxilina.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la puntuación se usa para determinar si un paciente es candidato para una intervención terapéutica para prevenir la progresión del esófago de Barrett; opcionalmente en donde la intervención terapéutica es una terapia de erradicación endoscópica, terapia quirúrgica endoscópica y/o terapia de resección quirúrgica, o una terapia quirúrgica no endoscópica o terapia sistémica.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde (a) la muestra comprende un cepillado, raspado, biopsia o resección quirúrgica de células y/o tejido obtenido del sujeto, (b) la muestra está a temperatura ambiente o congelada, o (c) la muestra se obtuvo recientemente, fijada con formalina, fijada con alcohol o incluida en parafina.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra se obtuvo mediante muestreo endoscópico aleatorio, muestreo endoscópico asistido por computadora, muestreo endoscópico guiado por imágenes, o muestreo no endoscópico mediante cepillado, abrasión o raspado.

11. Un método para clasificar el esófago de Barrett en un sujeto que comprende:

- a) proporcionar una muestra del sujeto;
- b) detectar una pluralidad de biomarcadores en la muestra, en donde la pluralidad de biomarcadores son p53, HIF-1 α , COX2, p16, alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR), CD68, CD45RO, K20 y HER2/neu;
- c) determinar las características de análisis de imágenes asociadas con la pluralidad de biomarcadores y morfología, en donde las características de análisis de imágenes son la intensidad de la suma de p53 nuclear, intensidad media de p53 nuclear, relación de intensidad media de HER2/neu:intensidad media de K20 en grupos

- de núcleos, relación de intensidad del 95º cuantil de HER2/neu:intensidad del 95º cuantil de K20 en grupos de núcleos, expresión conjunta de CD68 y COX2 celular, intensidad media de p53 en grupos de núcleos, solidez nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53, intensidad de la suma de CD45RO en la membrana plasmática, desviación estándar de AMACR en el microambiente, textura de COX2 en el citoplasma, intensidad media de HIF-1α en el microambiente celular, momento de HIF-1α en el microambiente celular (producto de la media y la desviación estándar), intensidad media de p16 en el citoplasma, área nuclear en células negativas para p16 que sobreexpresan p53 e intensidad del 95º cuantil nuclear de Hoechst;
- 5 d) determinar una puntuación usando la combinación de las características de análisis de imágenes; y
- 10 e) correlacionar la puntuación con una clasificación del esófago de Barrett.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la clasificación del esófago de Barrett comprende metaplasia intestinal no displásica, atipia reactiva, displasia de bajo grado y displasia de alto grado.
- 15 13. El método de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en donde la detección de la pluralidad de biomarcadores comprende usar sondas que se unen específicamente a cada uno de los biomarcadores.
- 20 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la muestra comprende células que contienen núcleos celulares, y en donde los núcleos celulares están marcados con un grupo de reactivos seleccionados del grupo que consiste en Hoechst, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinciones de ácido nucleico de cianina y hematoxilina.

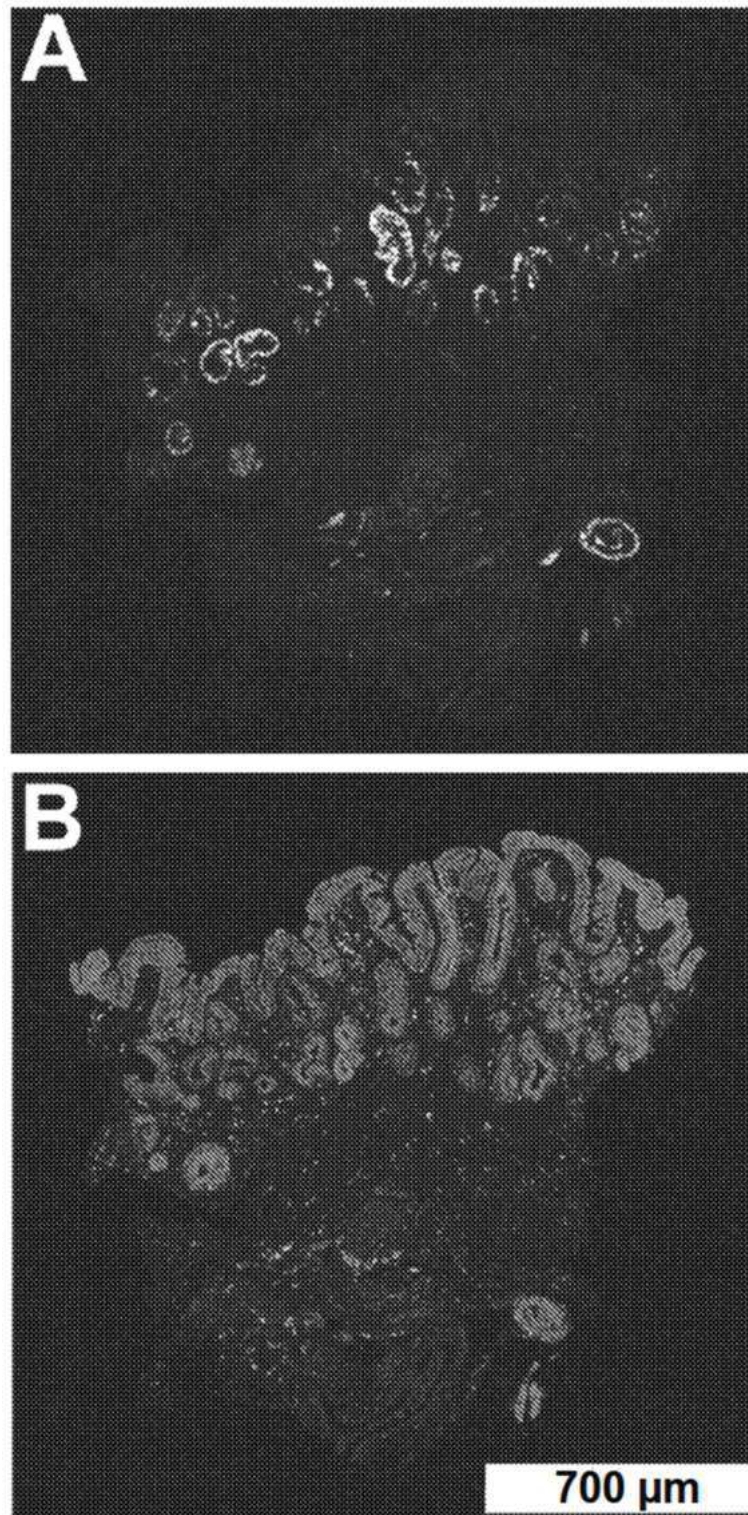


FIG. 1A-B

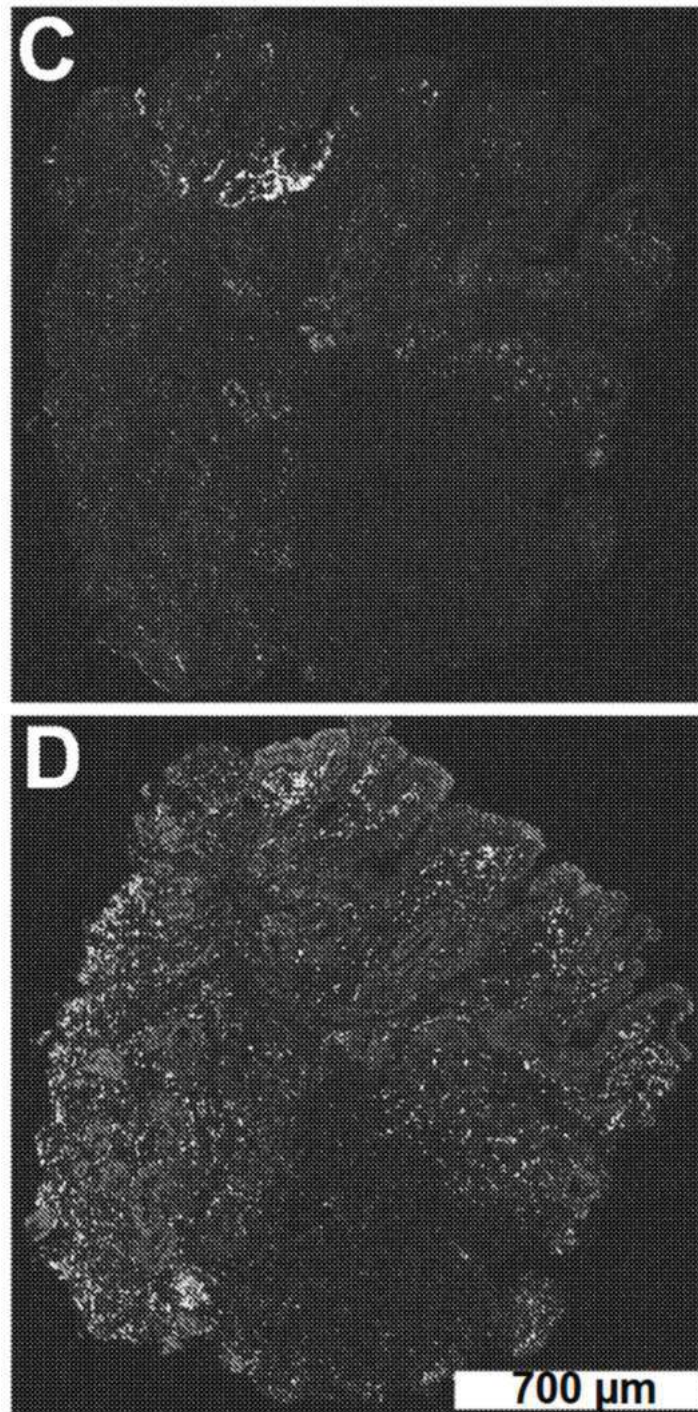


FIG. 1C-D

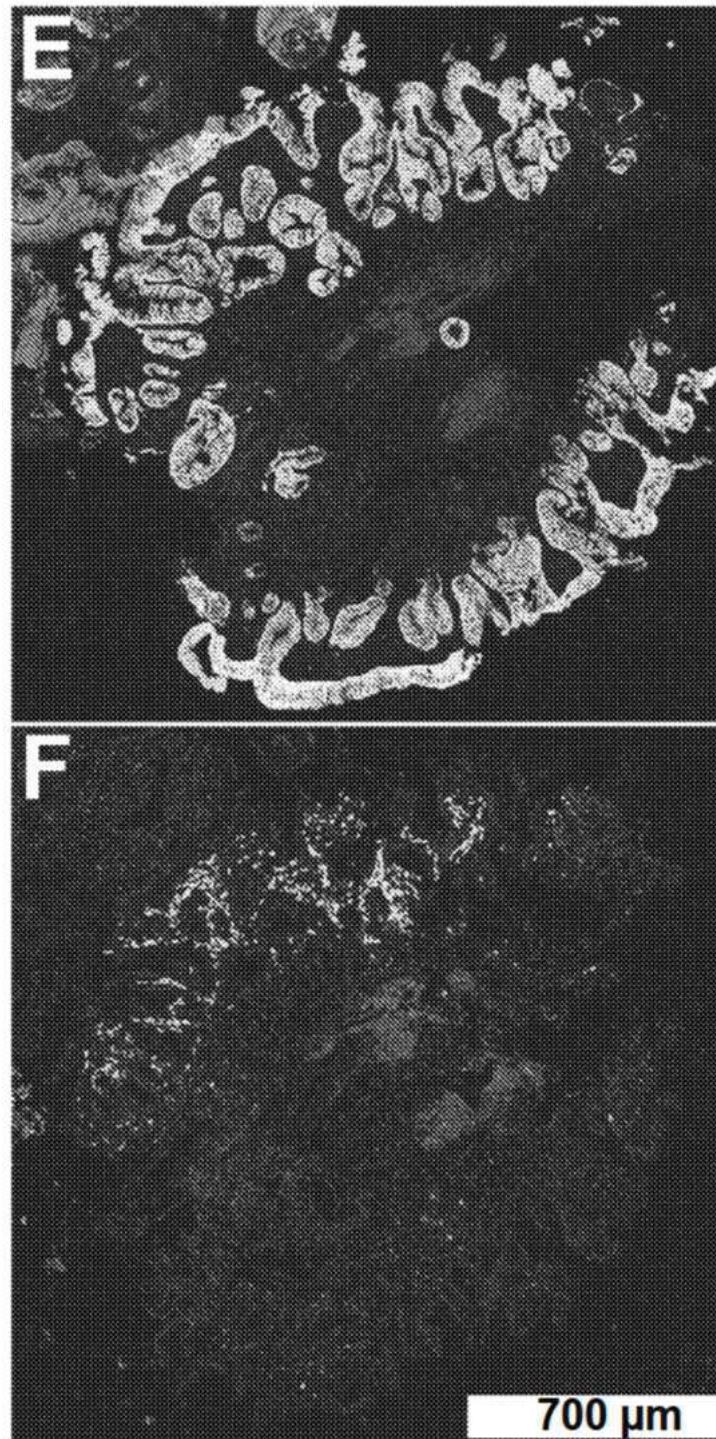


FIG. 1E-F

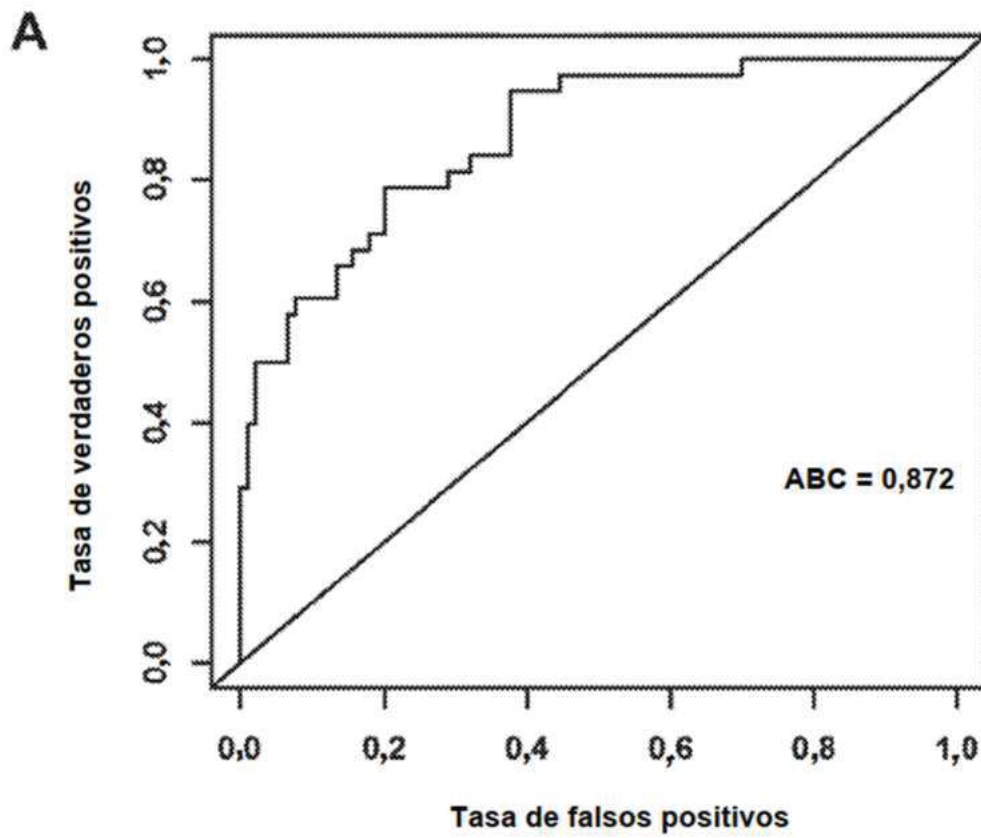


FIG. 2A

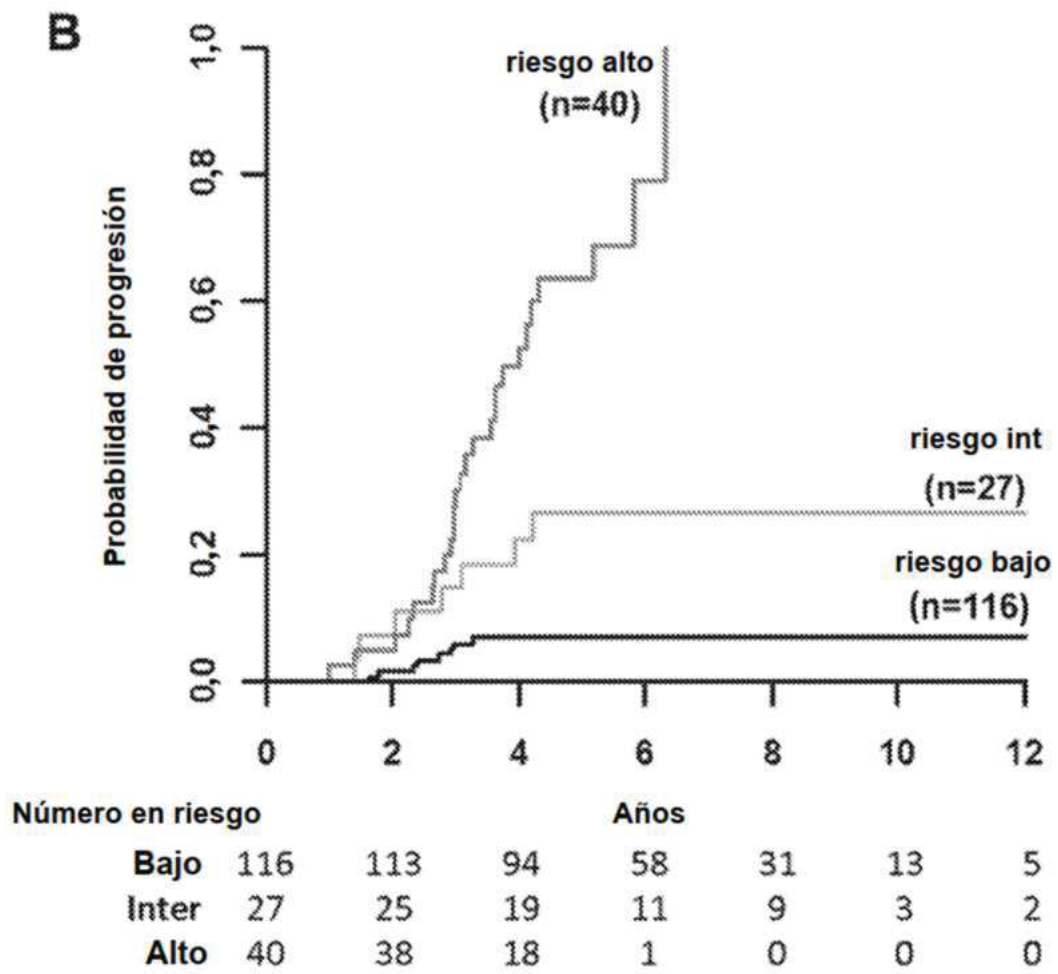


FIG. 2B

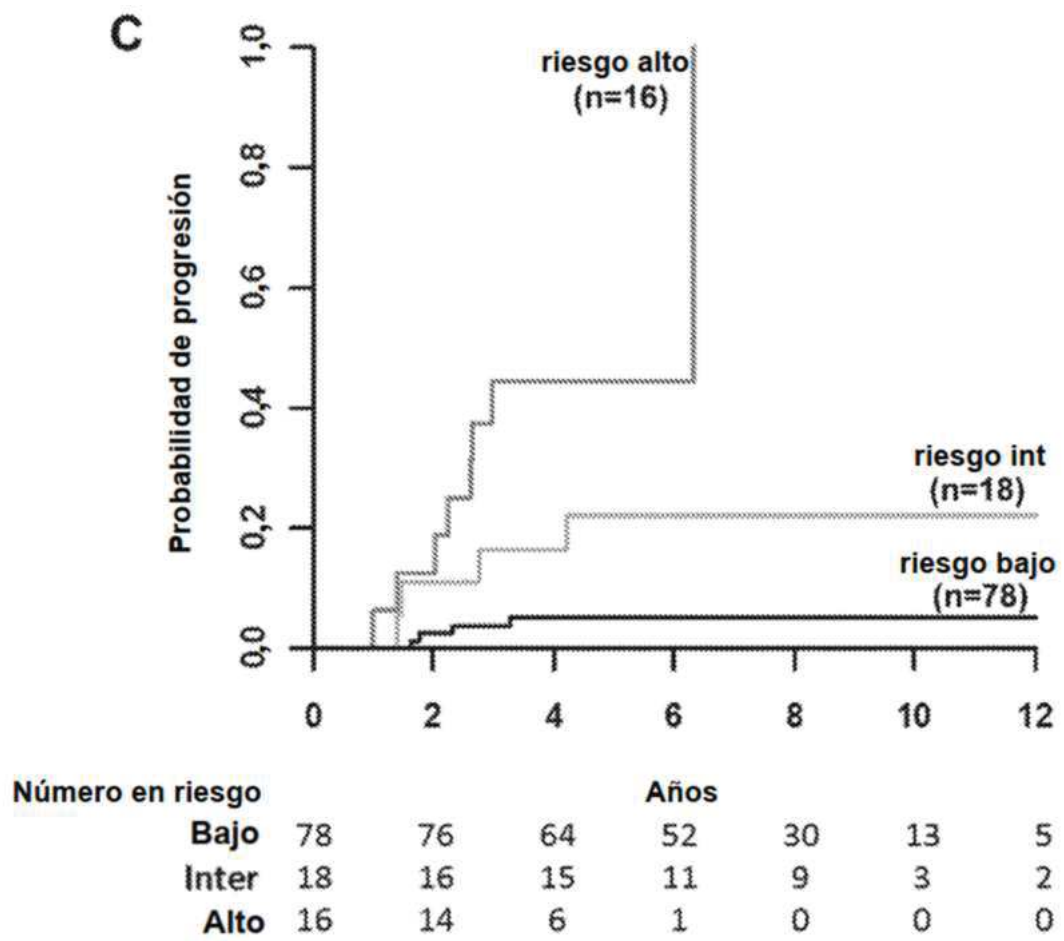


FIG. 2C

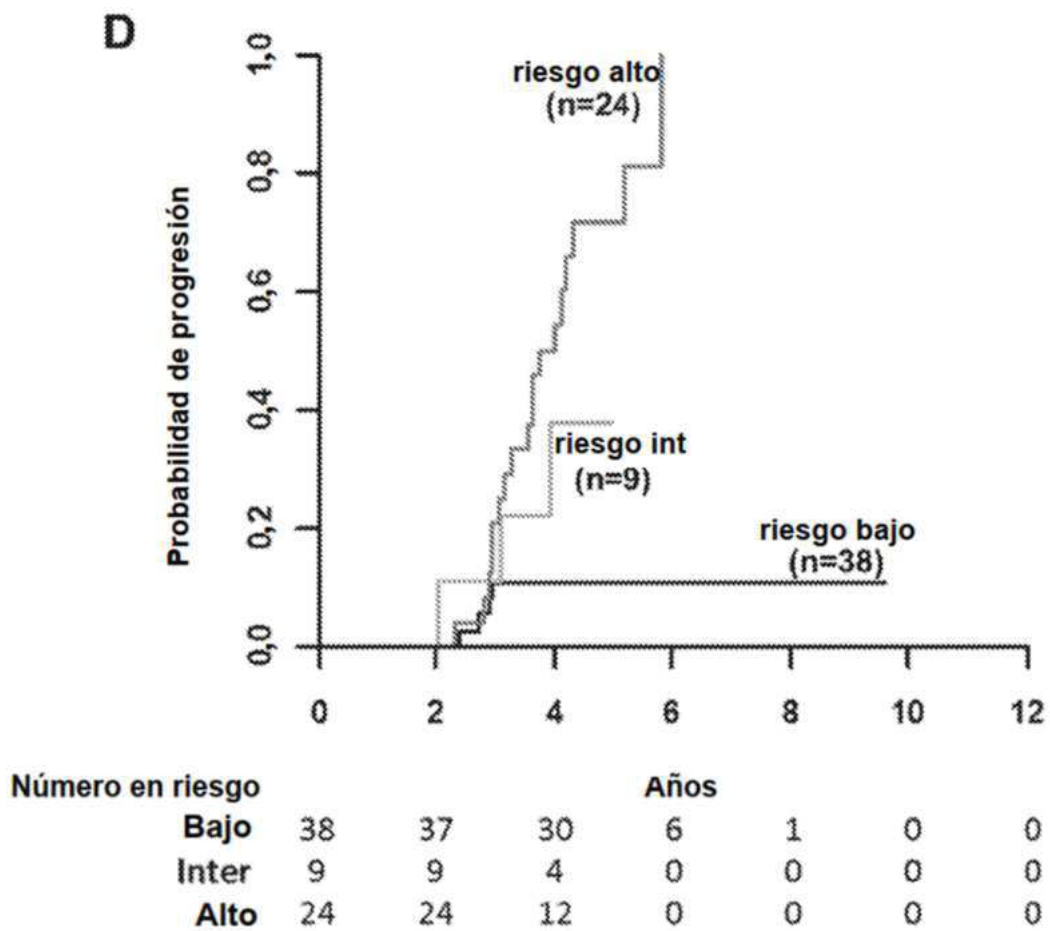


FIG. 2D

E	Grupo de pacientes	Comparación	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Cociente de posibilidades (IC 95 %)
	Las 4 instituciones combinadas	Riesgo alto frente a bajo	14,73 (6,55, 33,16)	29,77 (7,32, 121,10)
		Riesgo inter frente a bajo	4,19 (1,52, 11,57)	7,65 (1,89, 31,07)
	Pacientes estadounidenses	Riesgo alto frente a bajo	14,35 (4,23, 48,69)	19,34 (3,31, 112,88)
		Riesgo inter frente a bajo	4,62 (1,16, 18,48)	8,28 (1,39, 49,33)
	Pacientes holandeses	Riesgo alto frente a bajo	10,82 (3,58, 32,64)	55,25 (4,47, 682,43)
		Riesgo inter frente a bajo	4,79 (1,04, 22,02)	7,36 (0,74, 73,58)

FIG. 2E

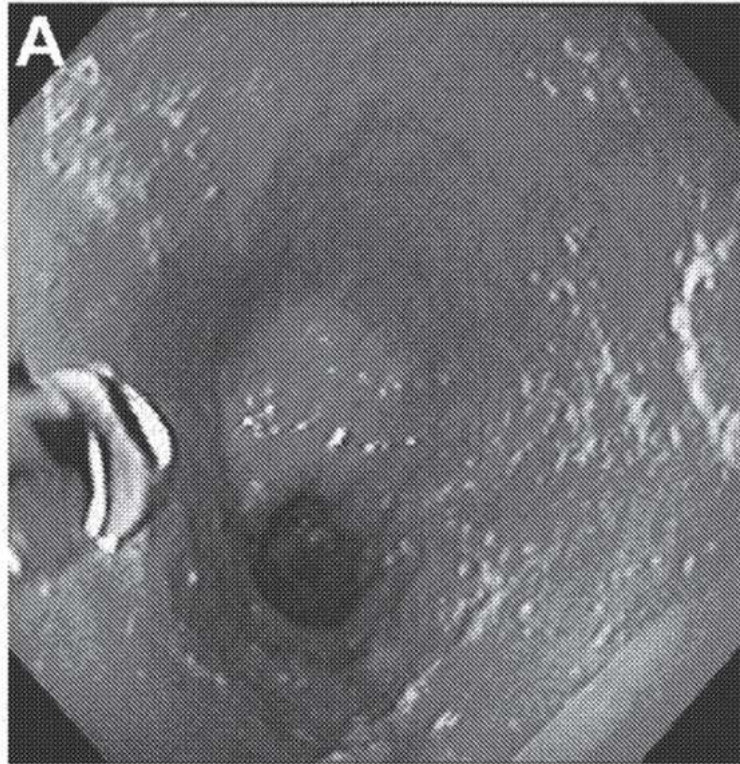


FIG. 3A

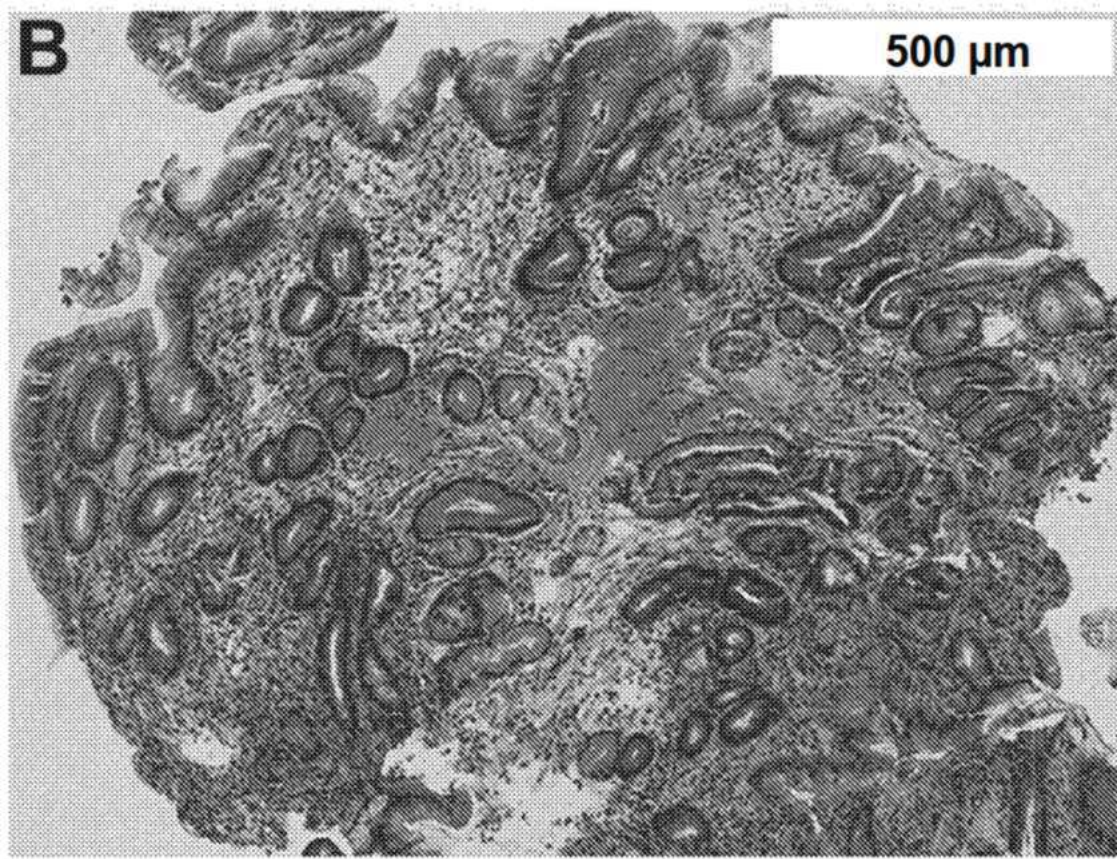


FIG. 3B

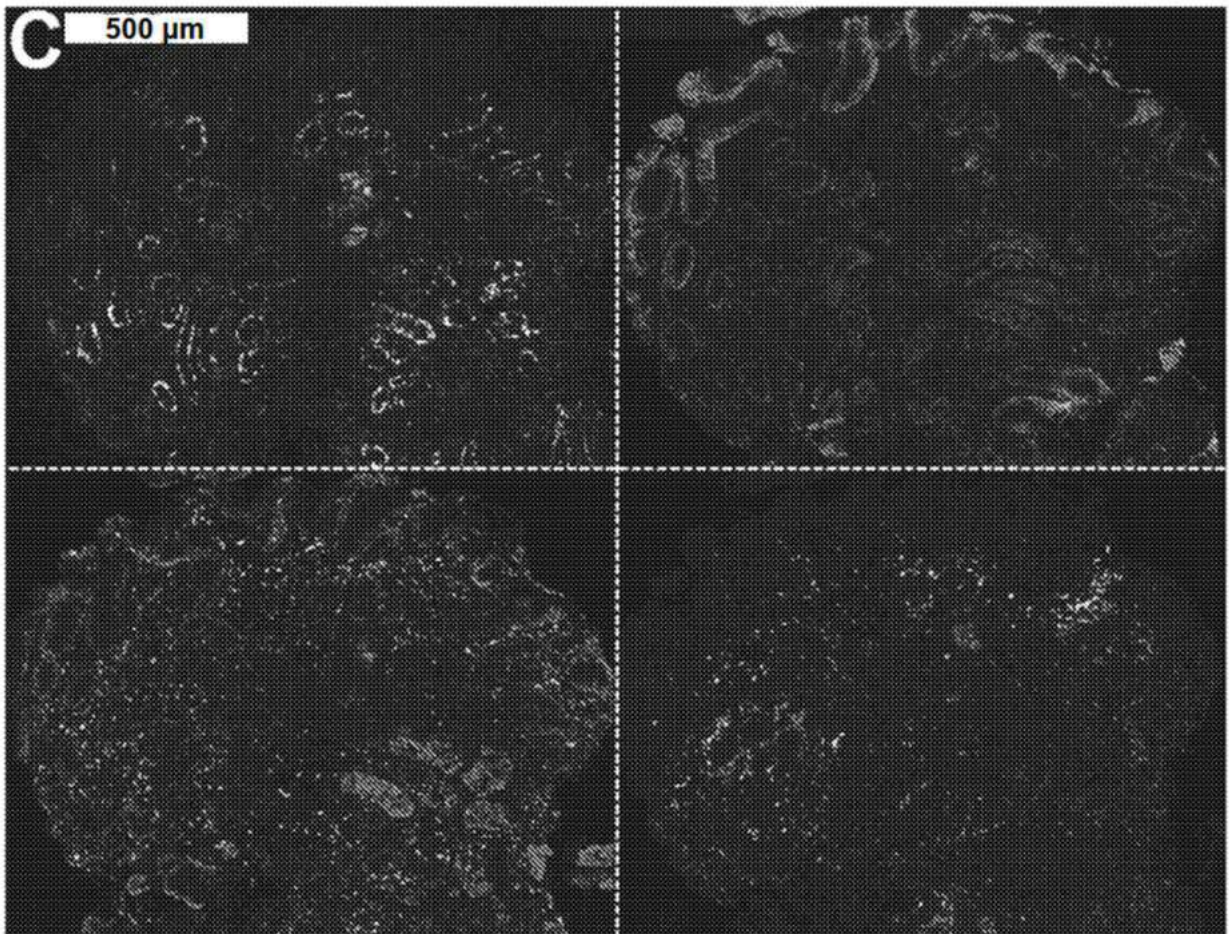


FIG. 3C

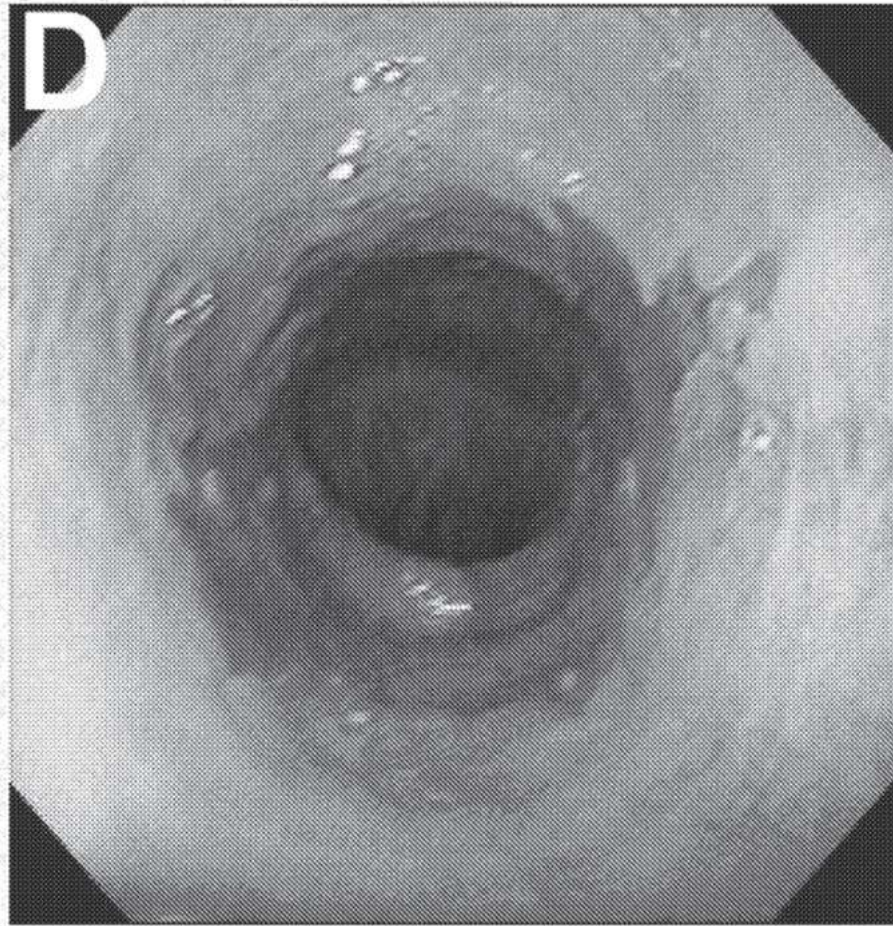


FIG. 3D

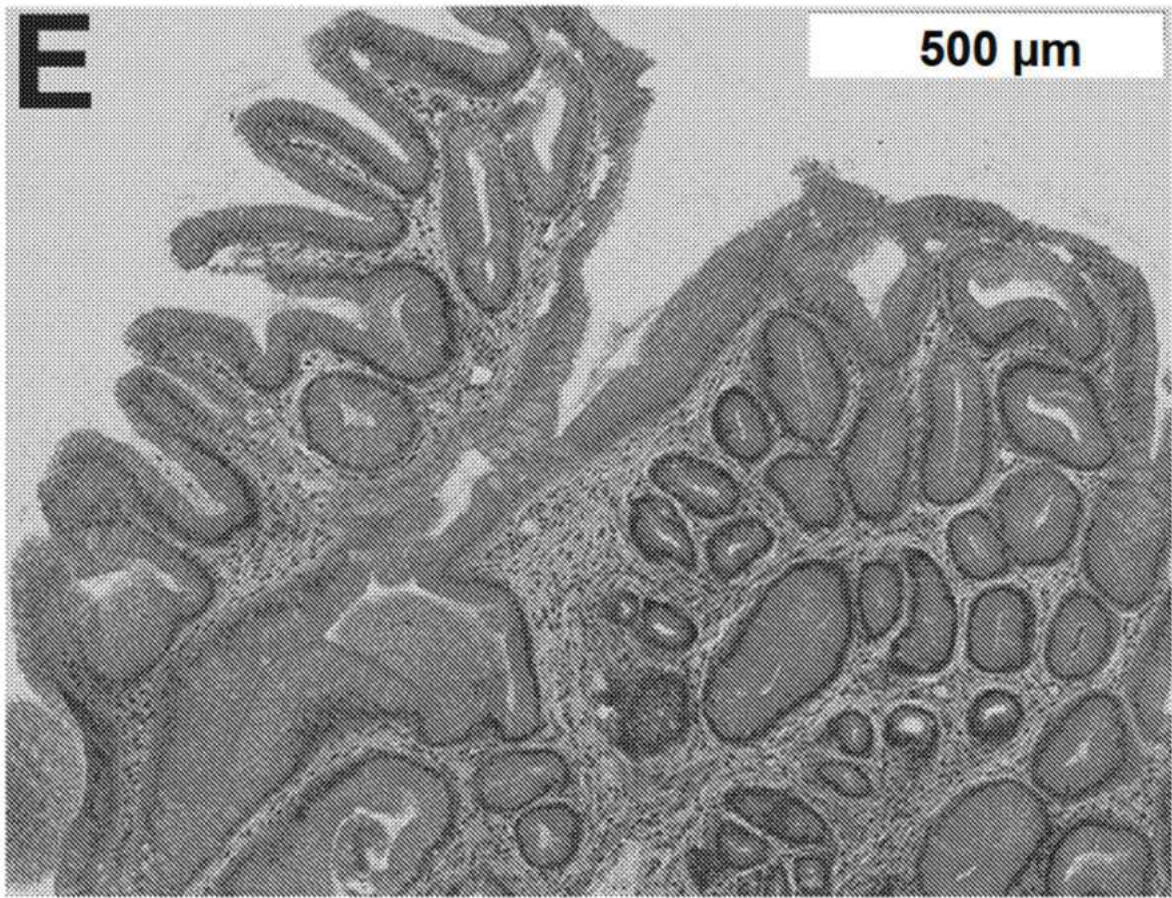


FIG. 3E

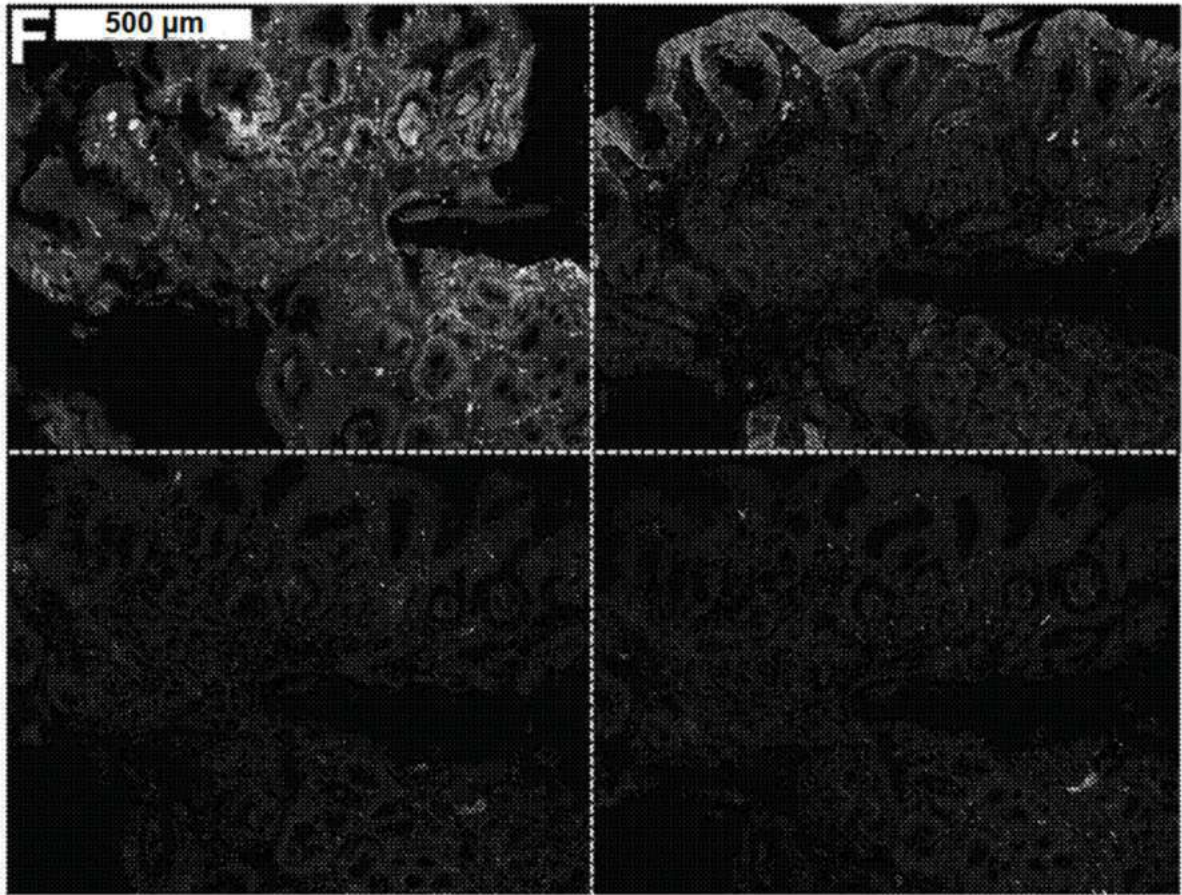


FIG. 3F

A

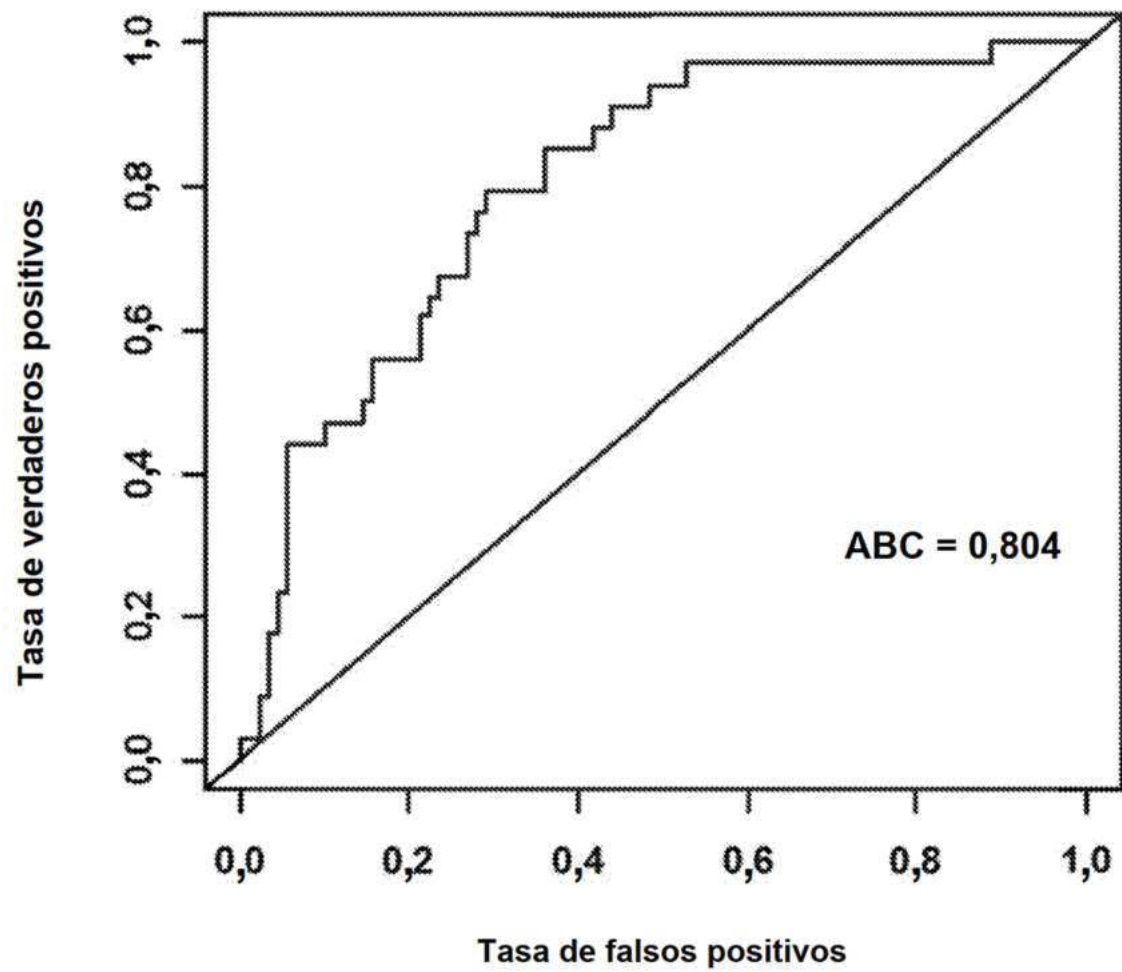


FIG. 4A

B

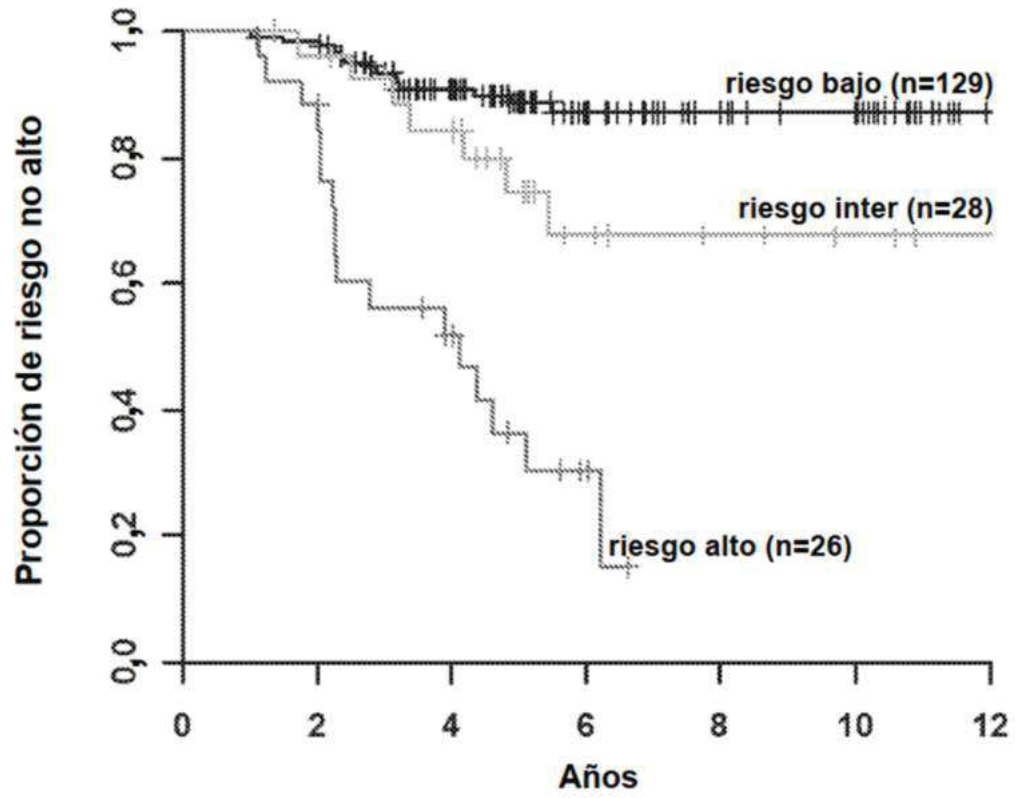


FIG. 4B

C

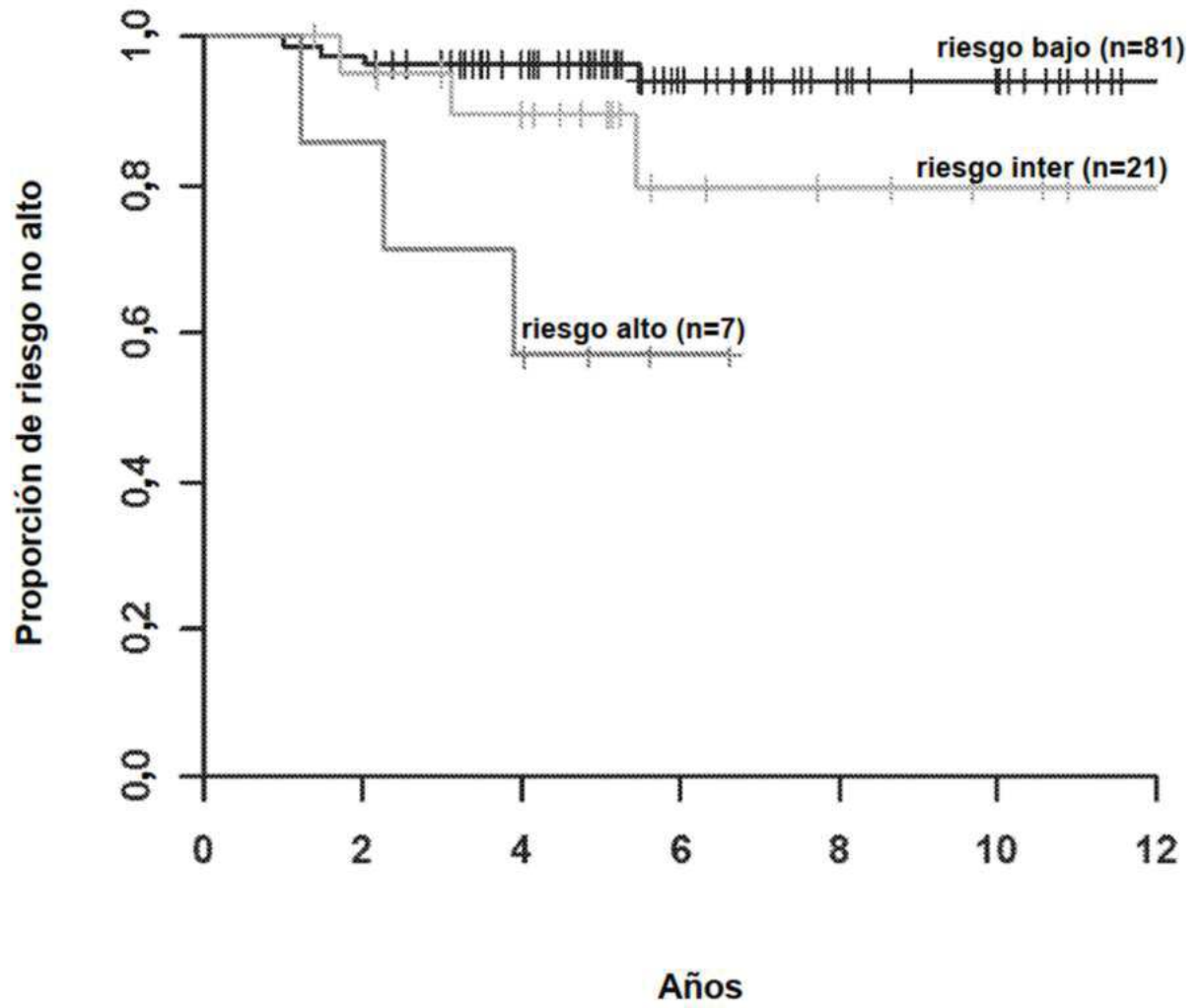


FIG. 4C

D

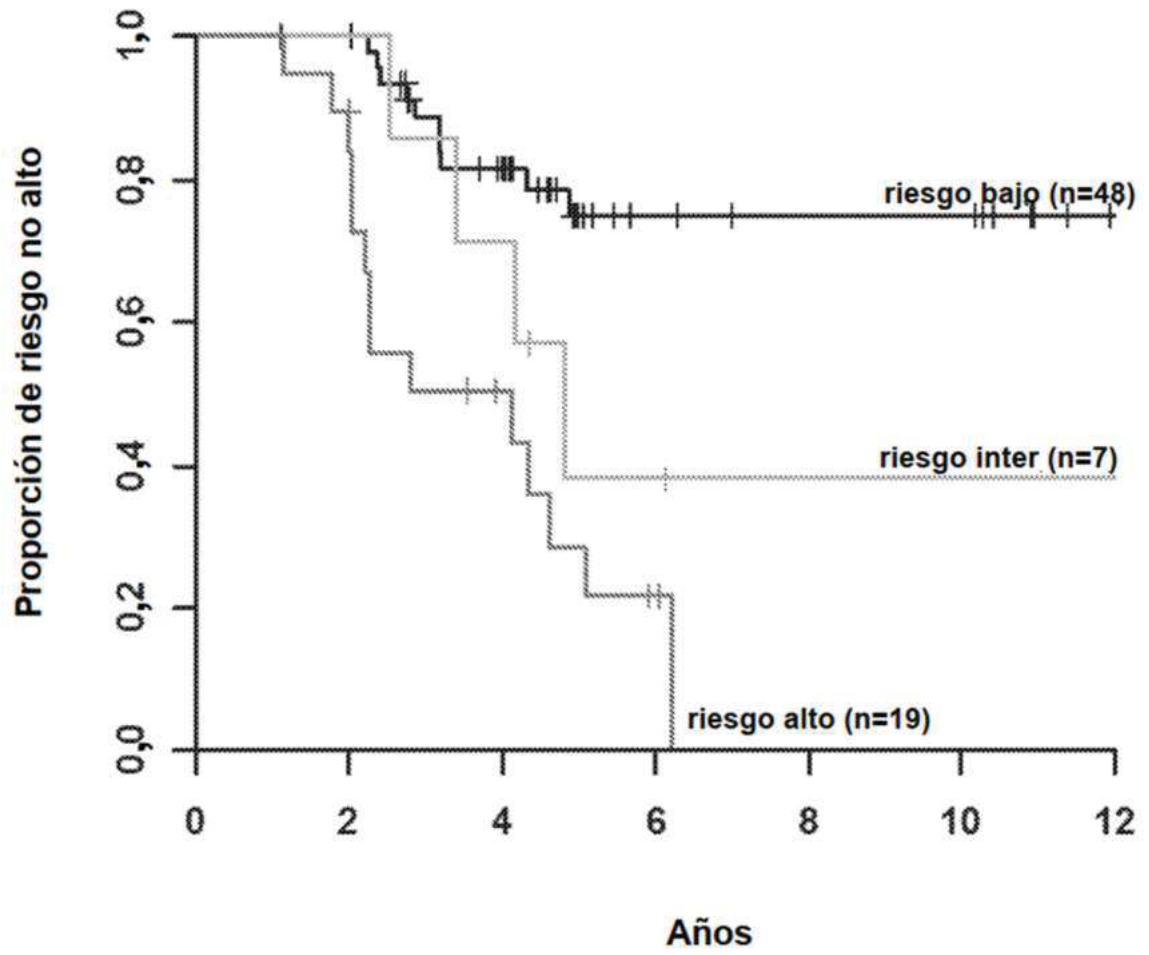


FIG. 4D

E

Grupo de pacientes	Comparación	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Cociente de posibilidades (IC 95 %)
Las 4 instituciones combinadas	Riesgo alto frente a bajo	9,42 (4,61, 19,24)	9,40 (2,65, 33,28)
	Riesgo inter. frente a bajo	2,45 (0,99, 6,07)	2,35 (0,66, 8,41)
Pacientes estadounidenses	Riesgo alto frente a bajo	10,79 (2,40, 48,59)	8,87 (0,91, 86,36)
	Riesgo inter. frente a bajo	3,24 (0,72, 14,50)	1,82 (0,33, 10,15)
Pacientes holandeses	Riesgo alto frente a bajo	5,75 (2,54, 13,02)	9,93 (2,13, 46,18)
	Riesgo inter. frente a bajo	2,71 (0,85, 8,66)	3,26 (0,46, 23,33)

FIG. 4E

F

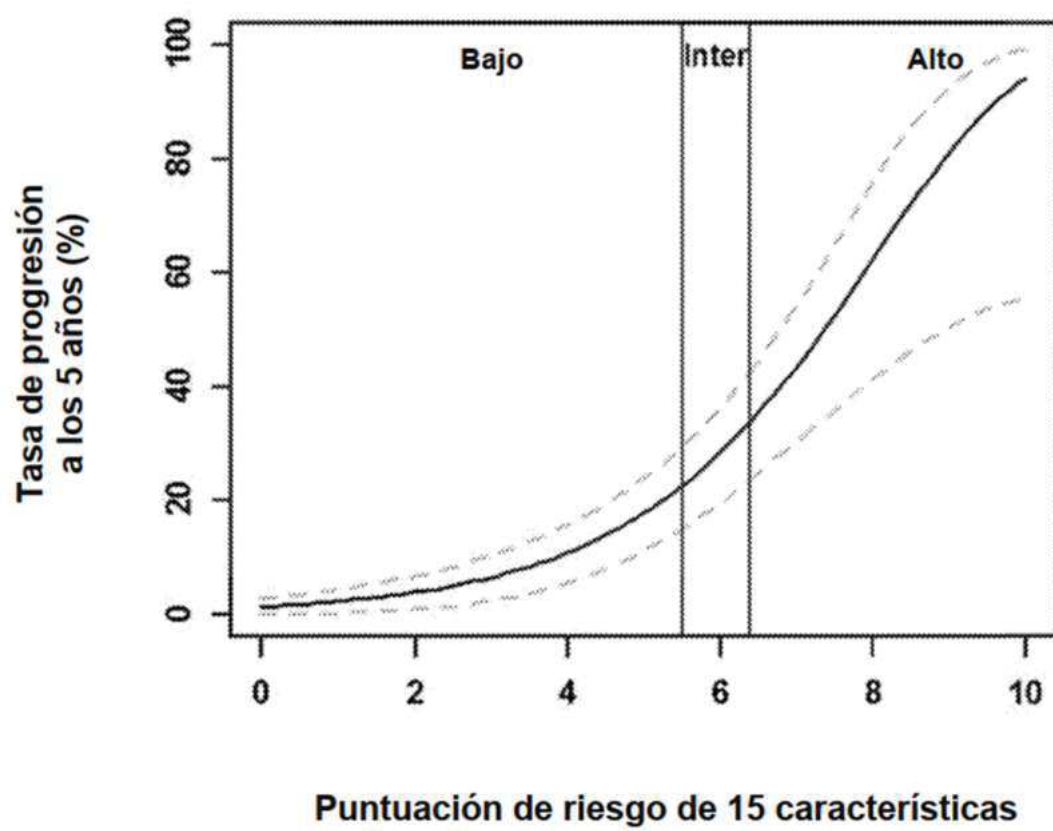


FIG. 4F

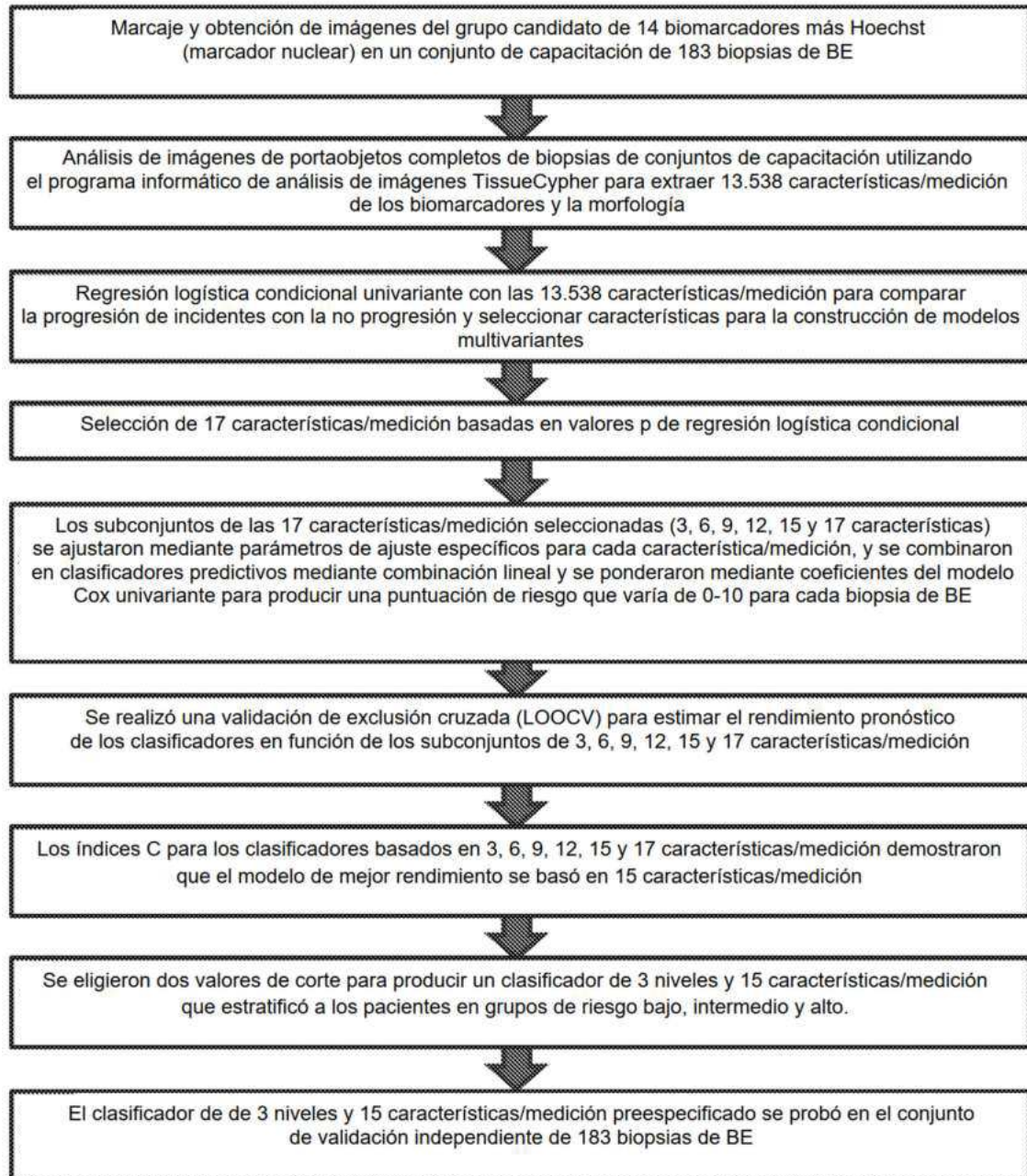


FIG. 5

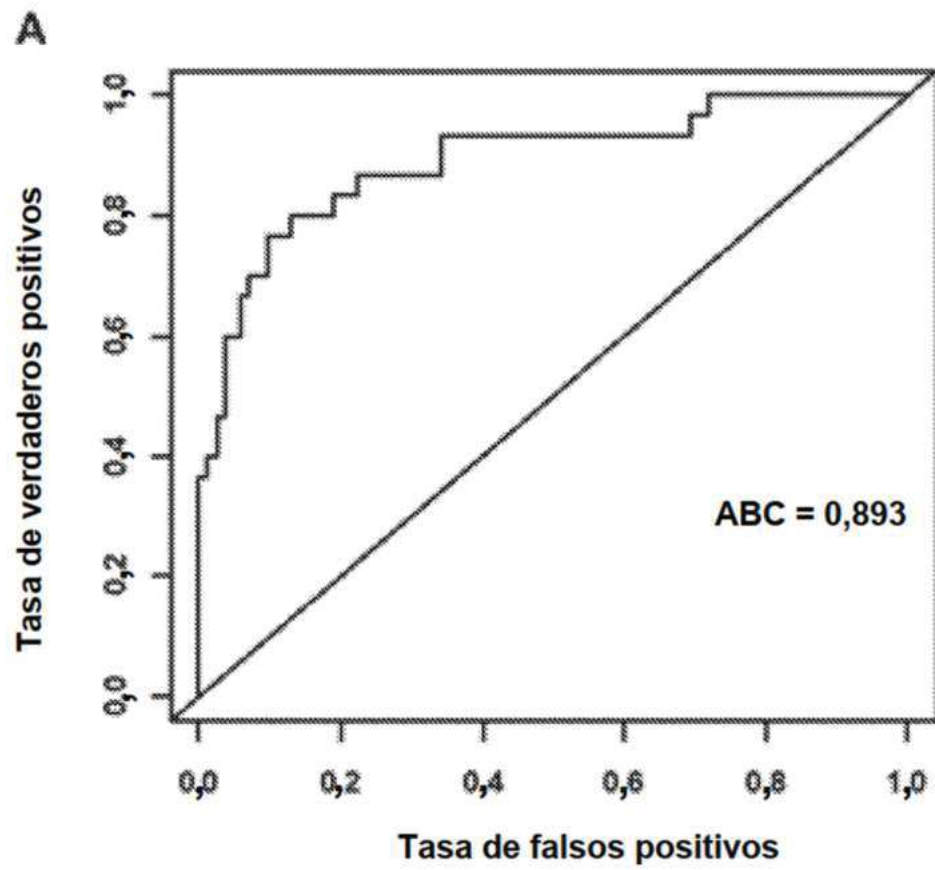


FIG. 6A

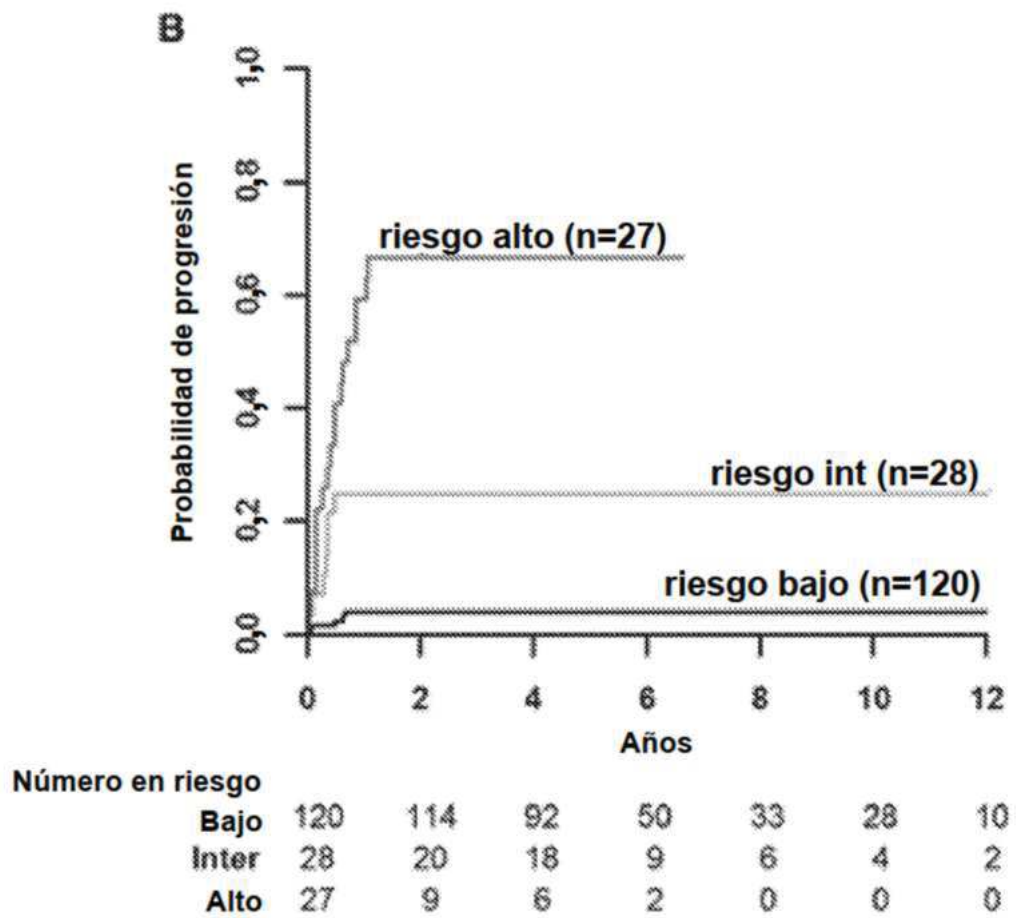


FIG. 6B

C

Comparación	Cociente de riesgo (IC 95 %)	Cociente de posibilidades (IC 95 %)
Riesgo alto frente a riesgo bajo	23,18 (8,57, 62,73)	25,44 (5,33, 121,41)
Riesgo inter. frente a riesgo bajo	7,05 (2,24, 22,22)	2,83 (0,82, 9,79)

FIG. 6C

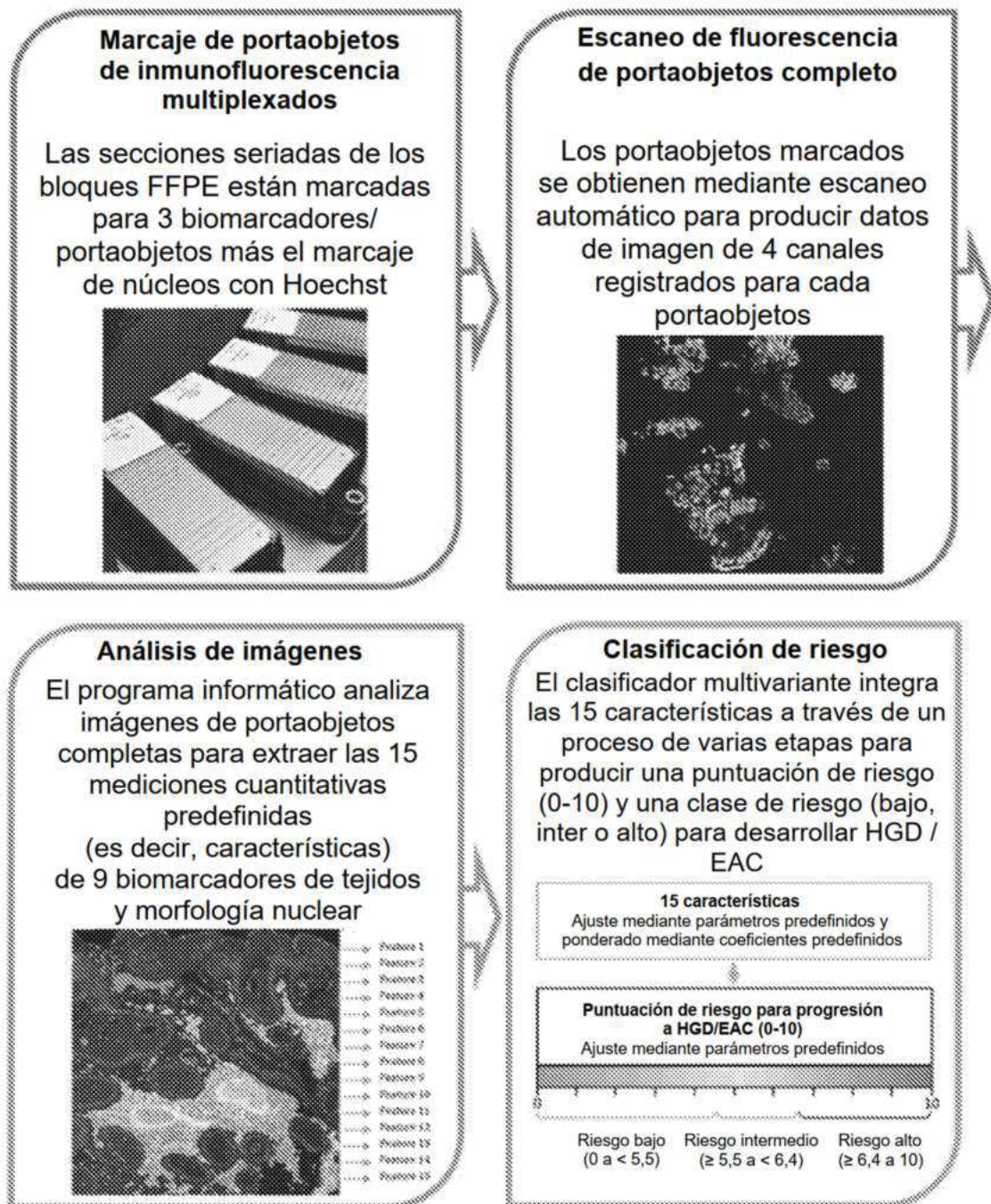


FIG. 7

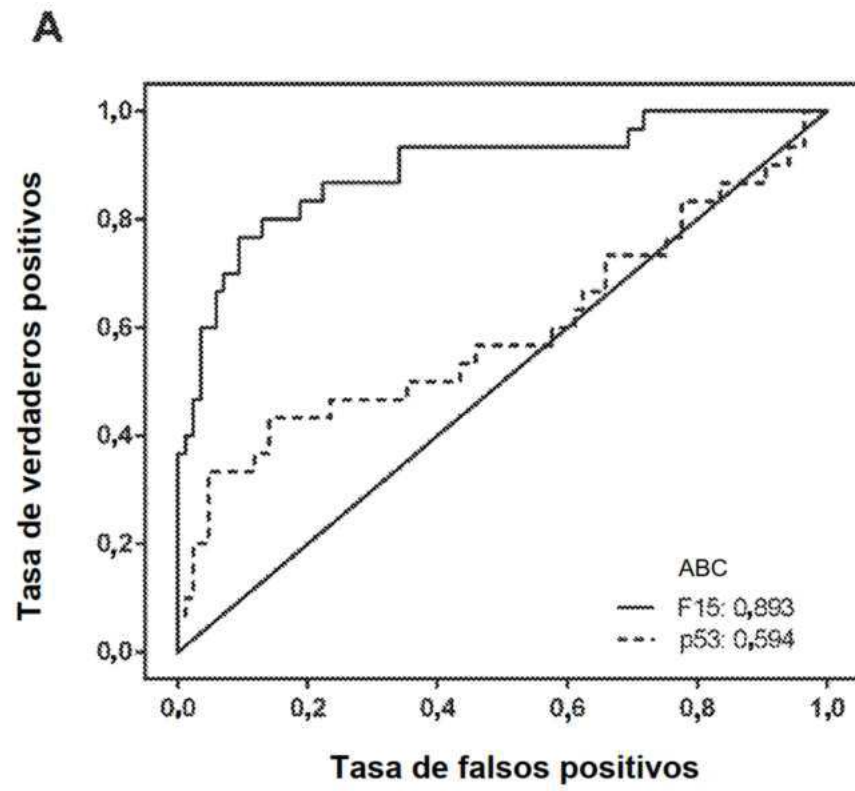


FIG. 8A

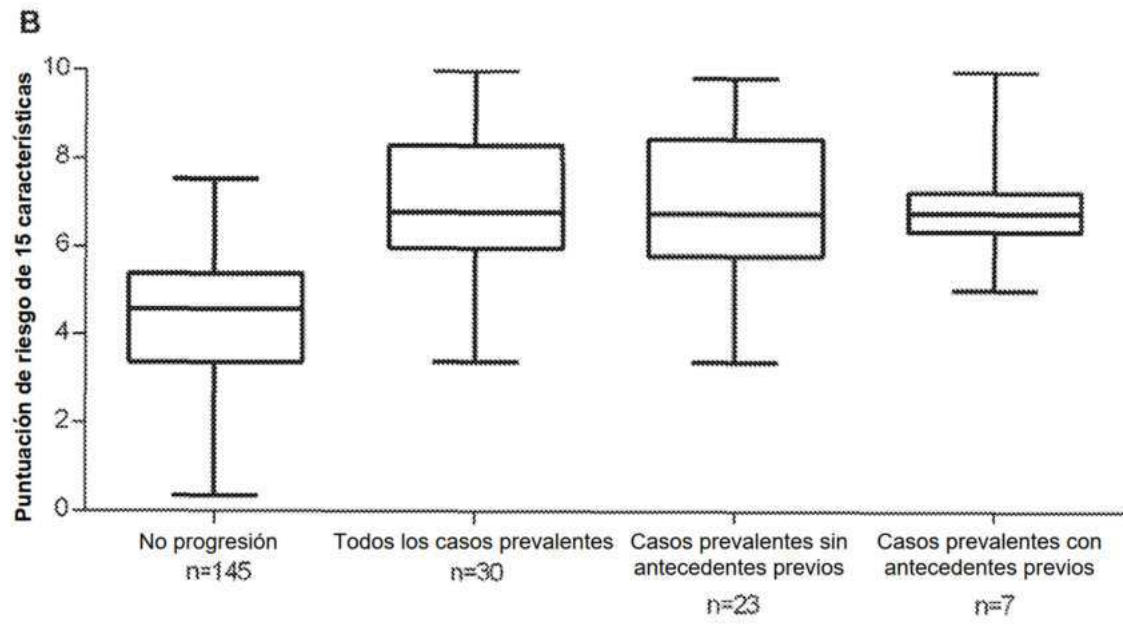


FIG. 8B

C

Comparación	OR (IC 95 %)	Valor P
Riesgo inter frente a riesgo bajo	7,67 (2,24 - 28,14)	0,001
Riesgo alto frente a riesgo bajo	46,0 (14,86 - 169)	< 0,0001

D

Subconjunto de pacientes	Diagnóstico patológico	Riesgo bajo	Riesgo inter	Riesgo alto
Casos prevalentes	ND/IND	3	4	8
	LGD	2	3	10
No progresión	ND/IND	114	19	7
	LGD	1	2	2

FIG. 8C-D

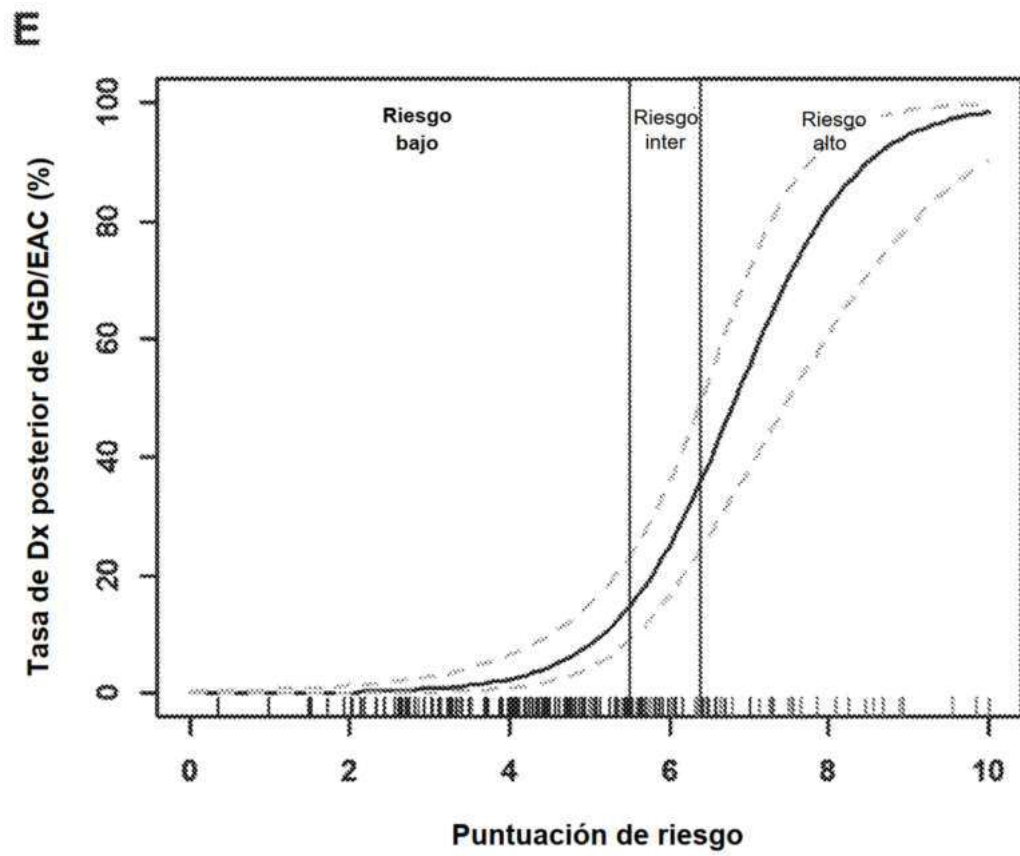


FIG. 8E

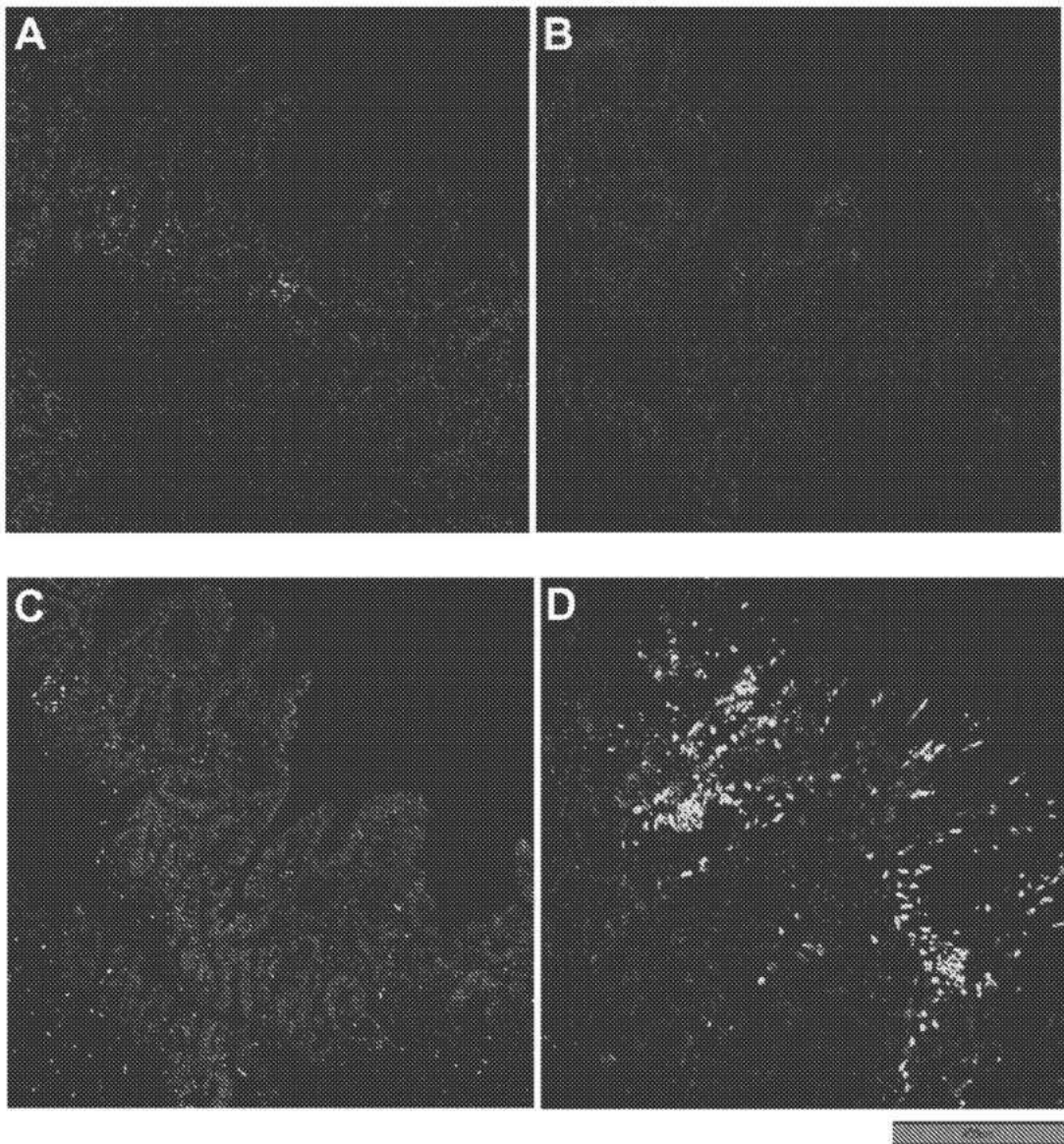


FIG. 9A-D

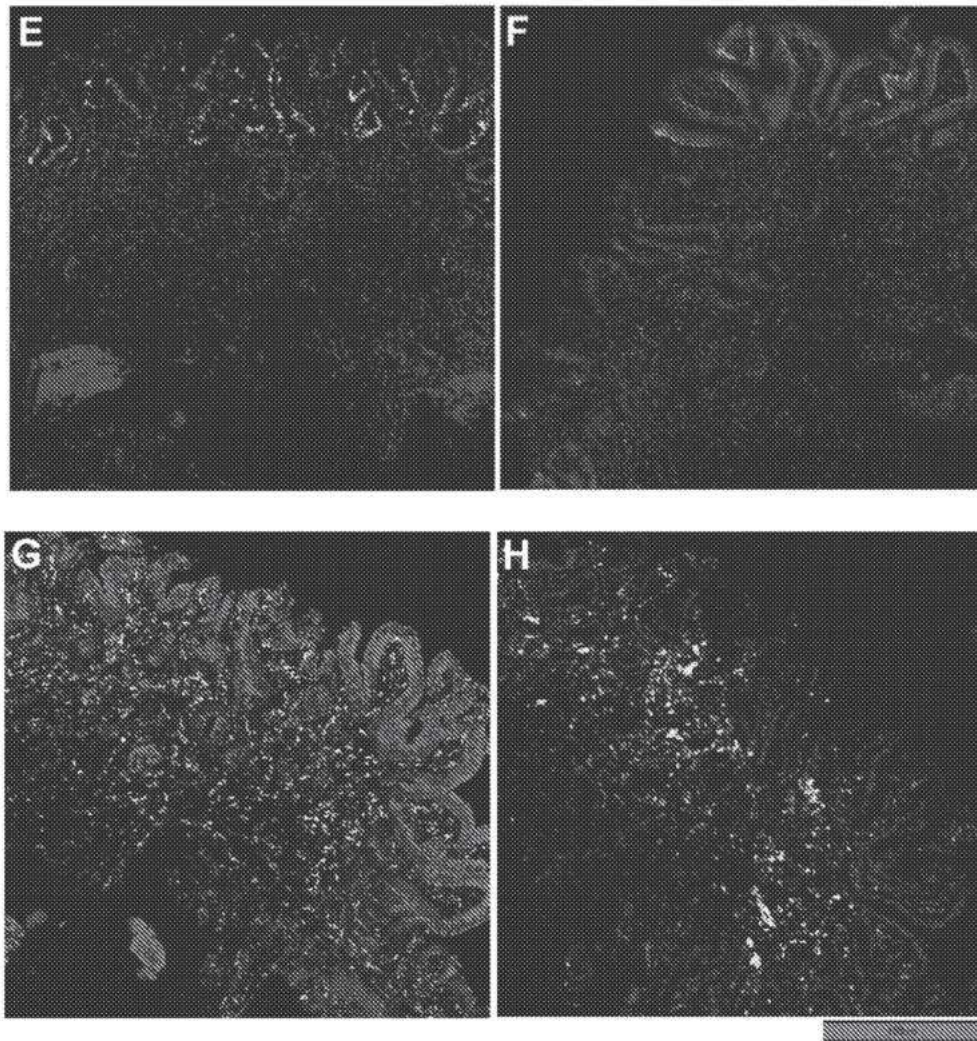


FIG. 9E-H

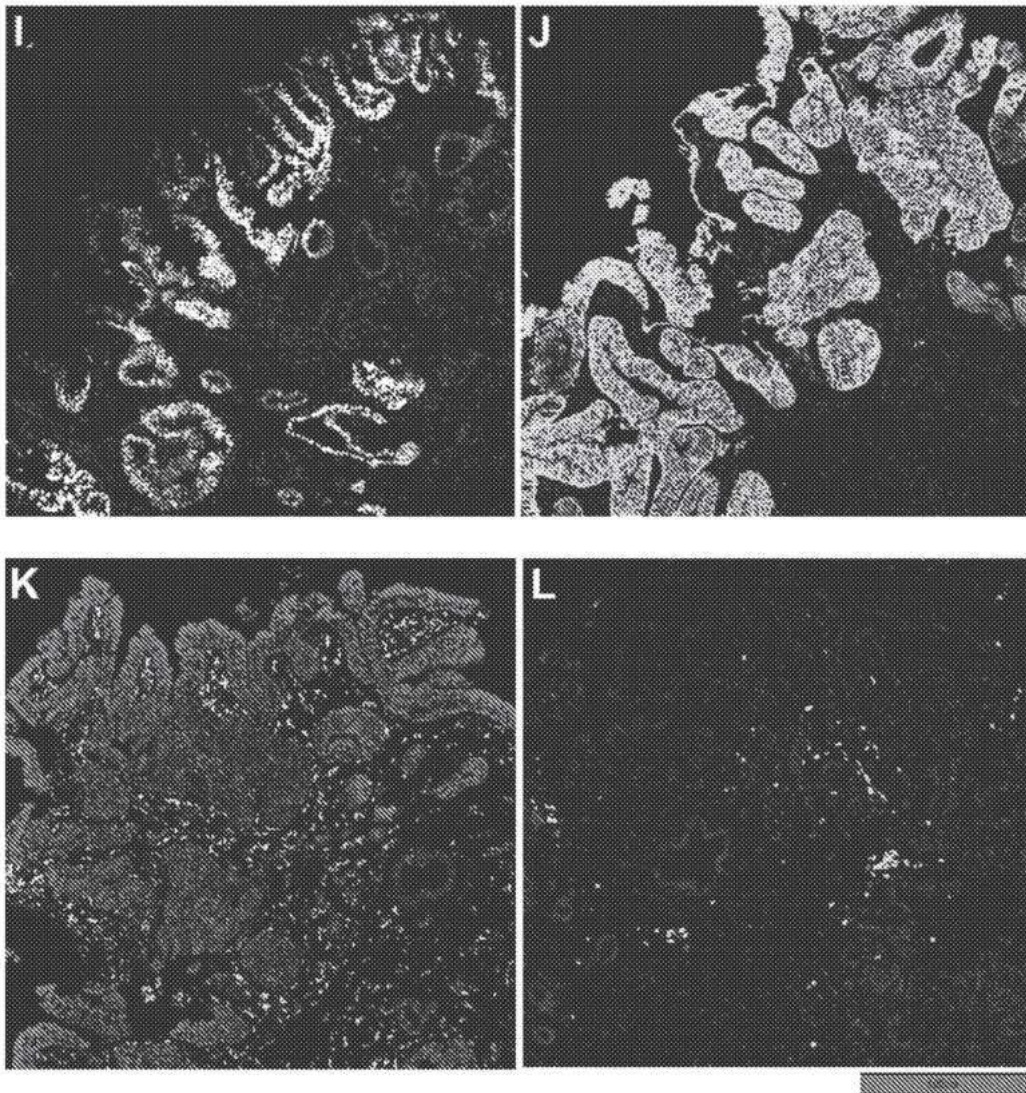


FIG. 9I-L

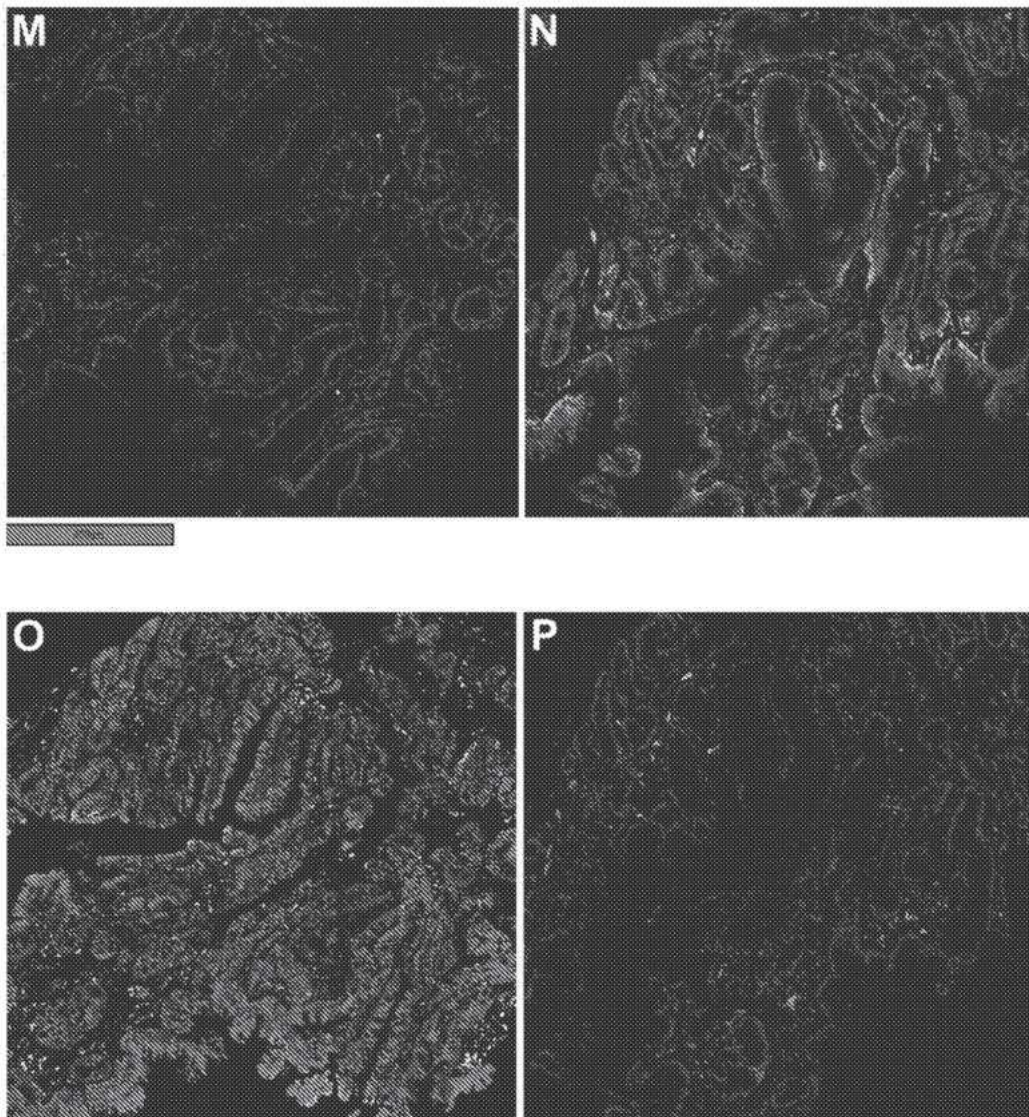


FIG. 9M-P

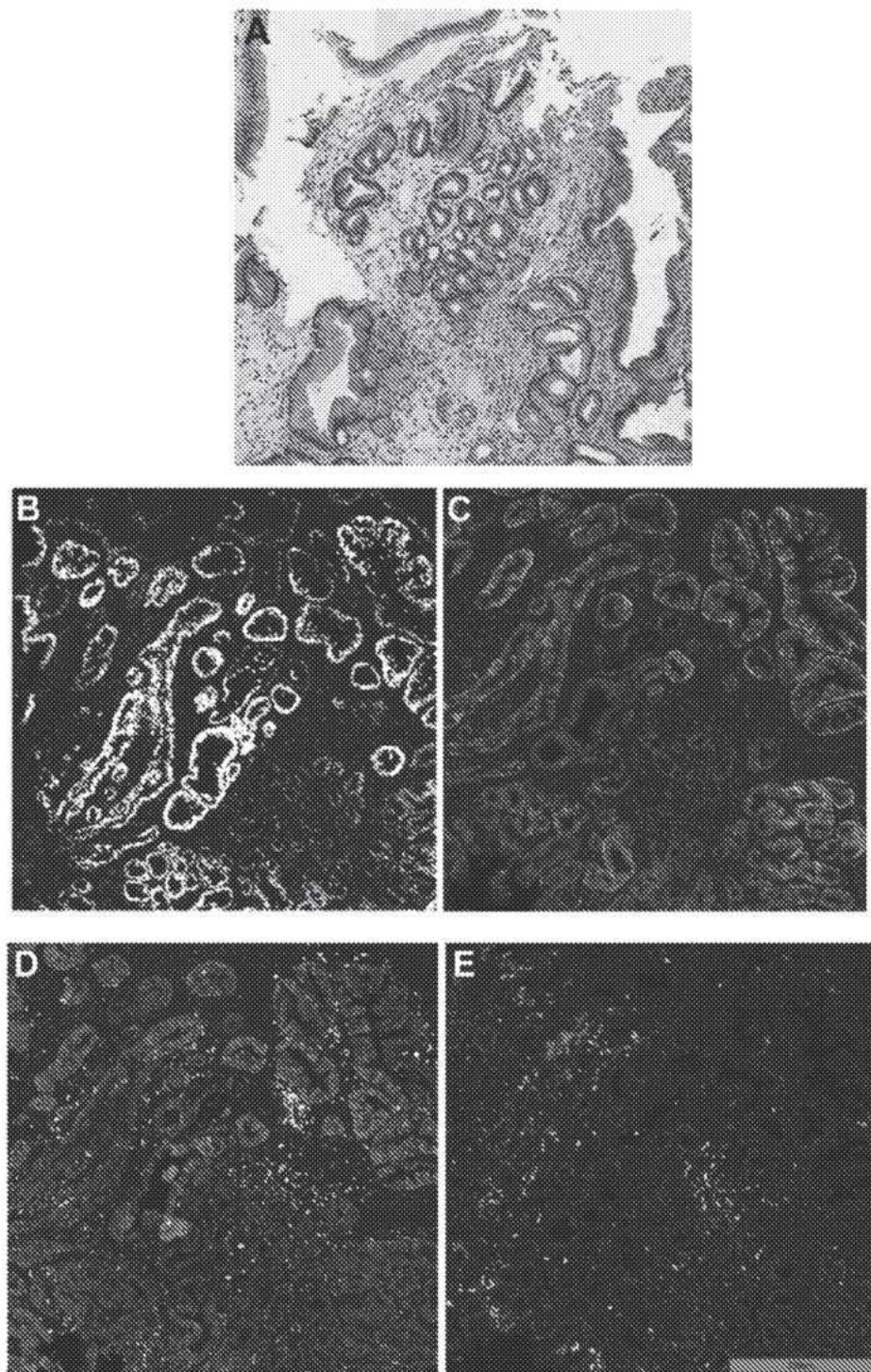


FIG. 10A-E

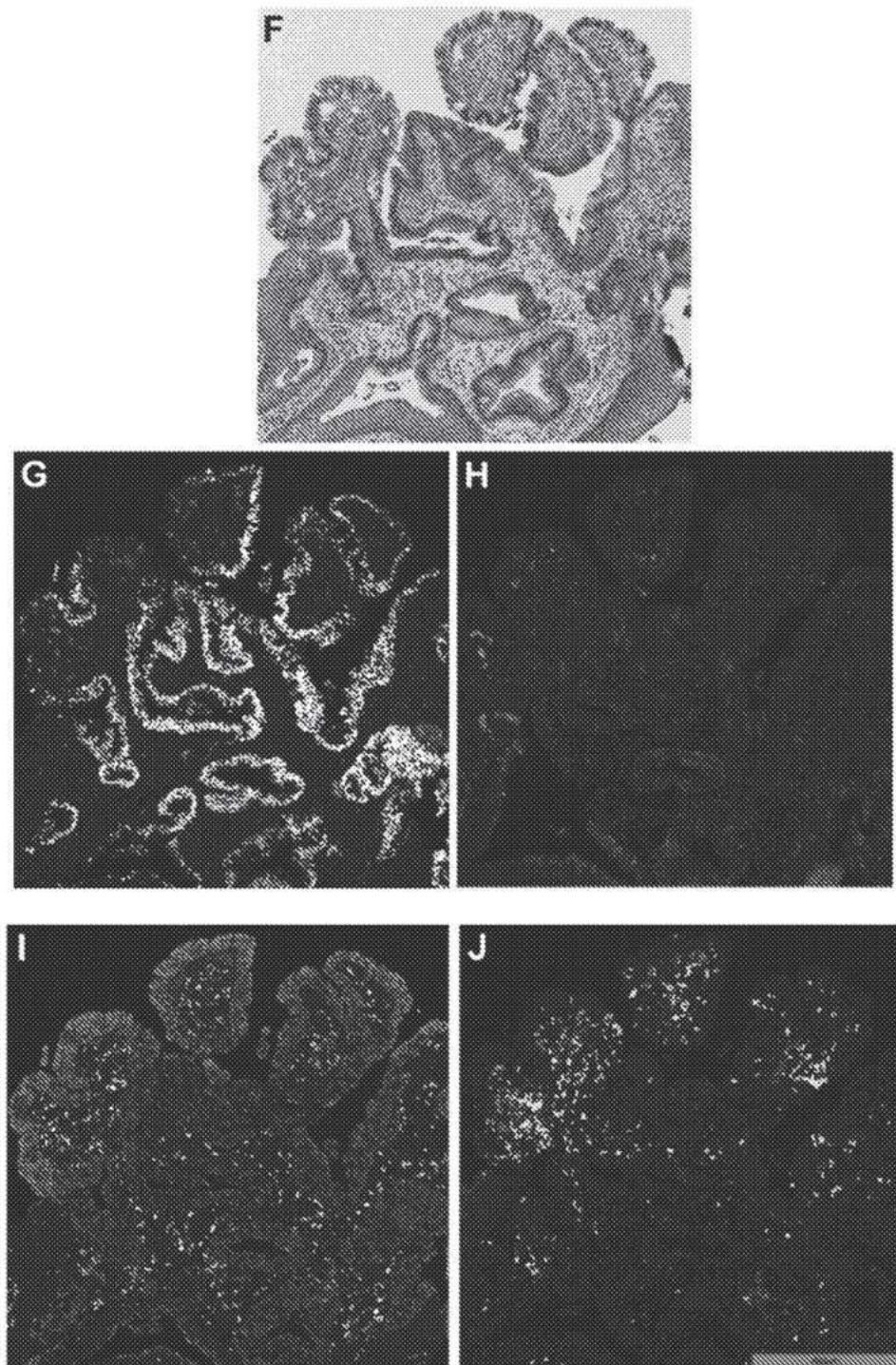


FIG. 10F-J