

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN BIOINGENIERÍA MÉDICA  
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL**



**“RADIÓMICA HEPÁTICA DE IMÁGENES DE RAYOS X EN  
MURINOS TRATADOS CON METOTREXATO Y  
ASTAXANTINA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
BIOINGENIERÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

**P.L.B.M. José Manuel Alarcón de Jesús**

**DIRECTORA**

**Dra. en Q. Keila Isaac Olivé**

**CO-DIRECTORA**

**Dra. en C.S Nallely Jiménez Mancilla**

**Revisores**

**Dra. en C.S. Liliana Aranda Lara**

**Dr. en C. Eugenio Torres García**

**Toluca. México, octubre 2025**

## **Agradecimientos**

A mi familia, por su apoyo incondicional, por su paciencia en los momentos más exigentes y por recordarme siempre el valor de la perseverancia. Su confianza en mí ha sido el motor que impulsó cada avance de este proyecto.

A mis profesores y asesores, gracias por su orientación, por compartir su conocimiento con generosidad y por enseñarme a mirar la ciencia con rigor, curiosidad y responsabilidad. Cada comentario, cada corrección y cada conversación fueron fundamentales para dar forma a esta investigación.

A mis compañeros y amistades que me acompañaron durante este proceso, gracias por su presencia, sus palabras de ánimo y por recordarme que el camino académico también se construye con compañía y apoyo mutuo.

A todas las personas que, directa o indirectamente, contribuyeron al desarrollo de esta tesis —desde quienes facilitaron las herramientas, el espacio y los recursos experimentales, hasta quienes brindaron una palabra de apoyo en los momentos necesarios—, mi más sincero agradecimiento. Este trabajo es el resultado de un esfuerzo compartido.

# Índice de contenido

<b>(i) Índice de figuras y esquemas</b>	<b>5</b>
<b>(ii) Índice de tablas</b>	<b>6</b>
<b>1. Resumen</b>	<b>7</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Antecedentes</b>	<b>8</b>
2.1.1 Relevancia del diagnóstico temprano del daño hepático	8
2.1.2 Uso de modelos murinos en la investigación biomédica	9
2.1.3 Introducción a MTX: mecanismos de acción y aplicaciones clínicas	9
2.1.4 Toxicidad y efectos adversos del uso prolongado del MTX	10
2.1.5 Reducción de la eficacia clínica del MTX	11
2.1.6 Detección de hepatotoxicidad debida a MTX mediante técnicas de imágenes	11
2.1.7 Astaxantina como antioxidante	11
2.1.8 Evidencia preclínica y clínica de protección hepática	12
2.1.9 Evidencia del efecto hepatoprotector de ASTX en presencia de MTX	13
2.1.10 Radiómica como método de diagnóstico en imágenes	13
2.1.11 Estándares y reproducibilidad	14
2.1.12 Aplicaciones clínicas	14
2.1.13 Ventajas de la radiómica en contextos experimentales	15
2.1.14 Rayos X y segmentación en investigación	15
2.1.15 Métodos de segmentación en imágenes	15
2.1.16 Potencial análisis radiómico en imágenes bidimensionales	16
<b>2.2 Fundamentos teóricos</b>	<b>16</b>
2.2.1 Fundamentos generales de la radiómica	16
2.2.2 Principios físicos del uso de rayos X en imágenes médicas	17
2.2.3 Características radiómicas	19
2.2.4 Estándar IBSI, reproducibilidad y normalización	31
2.2.5 Segmentación de imágenes	34
2.2.6 Aplicaciones en hígado y modelos preclínicos.	38
2.2.7 Análisis estadístico y validación de características radiómicas.	40
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>43</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>44</b>
<b>5. Pregunta de investigación</b>	<b>46</b>
<b>6. Hipótesis</b>	<b>46</b>
<b>7. Objetivos</b>	<b>47</b>
7.1 Objetivo general	47
7.2 Objetivos específicos	47

<b>8. Método</b>	<b>48</b>
<b>8.1 Diseño del estudio</b>	<b>48</b>
<b>8.2 Operacionalización de las variables</b>	<b>48</b>
<b>8.3 Universo de trabajo y muestra</b>	<b>49</b>
8.3.1 Criterios de inclusión.	49
8.3.2 Criterios de exclusión	49
8.3.3 Criterios de eliminación	50
<b>8.4 Desarrollo del proyecto</b>	<b>50</b>
8.4.1 Tratamientos experimentales	51
8.4.2 Preparación de las soluciones de MTX y ASTX que se administraron a los ratones durante el tratamiento	51
8.4.3 Control del peso de los ratones	51
8.4.4 Sacrificio de los animales	52
8.4.5 Determinación de la masa de hígado relativa	52
8.4.6 Determinación de los niveles de la enzima hepática sérica TGP	52
8.4.7 Adquisición de imágenes	53
8.4.8 Procesamiento	54
8.4.9 Importación de datos y delimitación de la ROI	55
8.4.10 Selección de la ROI	55
8.4.11 Segmentación	55
8.4.12 Extracción de parámetros radiómicos	56
8.4.13 Selección de parámetros radiómicos para análisis	56
<b>8.5 Límite de tiempo y espacio</b>	<b>56</b>
<b>8.6 Diseño de análisis</b>	<b>56</b>
8.6.1 Análisis estadístico	56
<b>9. Implicaciones éticas</b>	<b>57</b>
<b>10. Resultados y discusión</b>	<b>57</b>
<b>11. Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>12. Bibliografía</b>	<b>68</b>

## Índice de figuras y esquemas

<b>Figura 1:</b> Estructura química del metrotexato. _____	<b>10</b>
Esquema 1: Diagrama de flujo de la metodología fase 1 del estudio. _____	50
Esquema 2: Diagrama de flujo de la metodología fase 2 del estudio. _____	53
<b>Figura 2:</b> Interfaz principal de 3D Slicer. _____	<b>54</b>
<b>Figura 3:</b> Selección de la ROI. _____	<b>60</b>
<b>Figura 4:</b> Validación previa de la confiabilidad de la segmentación semiautomática a emplear en el análisis radiómico _____	<b>61</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Principales parámetros radiómicos de primer orden. _____	<b>19</b>
<b>Tabla 2:</b> Principales parámetros radiómicos de segundo orden (GLCM). _____	<b>22</b>
<b>Tabla 3:</b> Principales parámetros radiómicos de segundo (GLRLM)). _____	<b>23</b>
<b>Tabla 4:</b> Principales parámetros radiómicos de orden superior (GLSZM) _____	<b>25</b>
<b>Tabla 5:</b> Principales parámetros radiómicos de orden superior (GLDM). _____	<b>26</b>
<b>Tabla 6:</b> Principales parámetros radiómicos de orden superior (NGTDM). _____	<b>27</b>
<b>Tabla 7:</b> Principales parámetros radiómicos de tamaño y volumen. _____	<b>29</b>
<b>Tabla 8:</b> Principales parámetros radiómicos de compacidad y esfericidad _____	<b>29</b>
<b>Tabla 9:</b> Parámetros radiómicos de elongación, planicidad y orientación. _____	<b>30</b>
<b>Tabla 10:</b> Principales parámetros radiómicos clasificadas como derivadas. _____	<b>30</b>
<b>Tabla 11:</b> Características de los métodos de segmentación _____	<b>36</b>
<b>Tabla 12:</b> Operacionalización de las variables involucradas en el estudio _____	<b>48</b>
<b>Tabla 13:</b> Parámetros técnicos que se consideraron en la adquisición de las imágenes radiográficas. _____	<b>53</b>
<b>Tabla 14:</b> Variación del peso promedio (g) de los ratones durante el estudio _____	<b>58</b>
<b>Tabla 15:</b> Peso del hígado de cada ratón el día del sacrificio y relación del peso promedio hígado/peso promedio corporal en cada grupo de tratamiento _____	<b>59</b>
<b>Tabla 16:</b> Valores promedio (U/L) de TGP determinados por ELISA el día del sacrificio ____	<b>59</b>
<b>Tabla 17:</b> Características radiómicas evaluadas _____	<b>62</b>
<b>Tabla 18:</b> Rasgos con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo MTX/ASTX. _____	<b>64</b>
<b>Tabla 19:</b> Valores en los cuatro grupos de los 16 parámetros que resultaron significativos en la comparación de los grupos MTX/ASTX vs control _____	<b>66</b>

## 1. Resumen

La hepatotoxicidad farmacológica es una de las principales limitaciones del uso clínico de fármacos como el metotrexato (MTX), que se emplea en la terapia de padecimientos como artritis reumatoide y cáncer. La detección de la hepatotoxicidad depende de métodos de diagnóstico invasivos y de técnicas poco sensibles capaces de evaluar cambios estructurales en etapas tempranas. La aplicación concomitante de métodos no invasivos emergentes, como la radiómica, brinda una alternativa prometedora para cuantificar alteraciones tisulares mediante el análisis de patrones de intensidad, textura y forma en las imágenes médicas.

El presente estudio exploratorio evalúa si el análisis radiómico aplicado a radiografías hepáticas de murinos es capaz de detectar las alteraciones que provoca la administración de MTX a bajas dosis y, al mismo tiempo, saber si la coadministración de astaxantina (ASTX) en un tratamiento combinado puede reducir tales alteraciones. Se utilizaron 20 ratones CD1, distribuidos equitativamente en 4 grupos experimentales: grupo control, MTX, ASTX y MTX + ASTX, sometidos a 5 semanas de tratamiento. Tras el sacrificio, se obtuvieron imágenes radiográficas de los hígados de cada ratón y se determinaron las características radiómicas de intensidad y textura siguiendo los estándares establecidos para garantizar la reproducibilidad.

Se encontraron parámetros radiómicos capaces de reflejar cambios asociados a daño estructural del hígado, aunque solamente en el grupo MTX/ATX. El estudio demuestra que es necesario ampliar las investigaciones en este campo debido a las ventajas que ofrece la radiografía simple en el uso clínico unido a la escasez de datos existentes sobre su uso en la detección del daño hepático del MTX a bajas dosis.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Antecedentes**

El hígado es un órgano esencial para el organismo. Participa en procesos vitales como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas; producción y secreción de bilis -importante en la digestión y absorción de las grasas-, y actúa como almacenamiento de glucógeno, vitaminas y minerales. Además, cumple un papel fundamental en la biotransformación y eliminación de compuestos endógenos y exógenos, como fármacos y alcohol (Asrani *et al.*, 2019).

Los daños hepáticos pueden desencadenar enfermedades crónicas, que representan una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, en especial cuando los síntomas pasan inadvertidos o no son detectados de manera temprana. Debido a que el hígado es especialmente vulnerable a toxinas y fármacos, para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, tratamiento, y medidas de prevención son esenciales los estudios experimentales orientados a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos en los que este órgano está involucrado (Asrani *et al.*, 2019).

#### **2.1.1 Relevancia del diagnóstico temprano del daño hepático**

La detección temprana de padecimientos asociados con el daño hepático es fundamental para la prevención de progresiones a estados crónicos. La biopsia hepática ha sido el método estándar de referencia para la evaluación de trastornos hepáticos como la fibrosis. Sin embargo, su aplicación clínica presenta limitaciones, tales como: (i) baja aceptación por parte de los pacientes debido al dolor y riesgo de sangrado; (ii) limitación en el tamaño de la muestra y (iii) ocasional presencia de variabilidad interobservador en la interpretación histológica (Castera *et al.*, 2008). La búsqueda de alternativas de métodos de diagnóstico no invasivos, que complementen o sustituyan a los procedimientos invasivos convencionales, representa un cambio de paradigma en la actualidad. Los métodos de diagnóstico no invasivos ofrecen ventajas considerables frente a los procedimientos invasivos tradicionales.

Modalidades de diagnóstico de imagen como el ultrasonido (US) o los rayos X (Rx) ofrecen ventajas con respecto a otras técnicas de mayor complejidad como la resonancia magnética (RM) o la tomografía computarizada (TC) en cuanto a duración, accesibilidad, asequibilidad, posibilidad de realizar seguimiento continuo y mayor aceptación por parte del paciente (Castera *et al.*, 2008). Sin embargo, es necesario implementar nuevas herramientas de diagnóstico que complementen las técnicas no invasivas más aceptadas, dirigidas a la detección temprana de

alteraciones estructurales. Dentro de estas herramientas se encuentra la radiómica, técnica que extrae parámetros cuantitativos de las imágenes médicas, imperceptibles al ojo humano, mediante la aplicación de algoritmos de computación con el objetivo de asociarlas a estados fisiológicos concretos. Ha demostrado su utilidad en enfermedades hepáticas como hígado graso (EHG), fibrosis, la cirrosis y cánceres de hígado (Wei et al., 2019; Sung et al., 2021; Le et al., 2025).

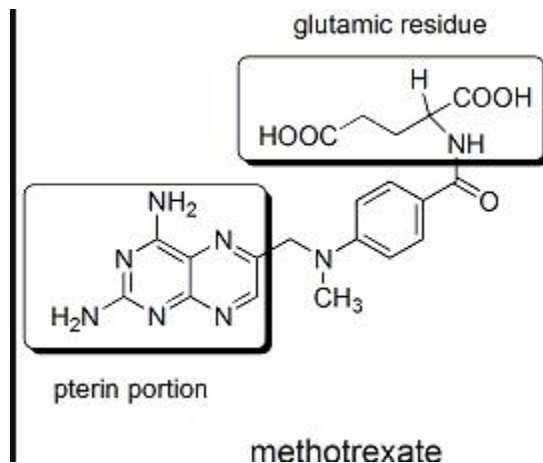
### **2.1.2 Uso de modelos murinos en la investigación biomédica**

El uso de modelos animales, en especial roedores como ratones y ratas, permite reproducir y modelar enfermedades humanas en condiciones experimentales controladas. Debido a sus semejanzas genéticas, fisiológicas y anatómicas con los humanos, su bajo costo, pequeño tamaño, corto ciclo de vida y facilidad de manipulación son indispensables en estudios preclínicos. Se utilizan para la evaluación de mecanismos de acción y respuestas fisiopatológicas a padecimientos inducidos, realizar análisis mediante técnicas moleculares de imagen, estudios histológicos y toxicológicos con el objetivo de validar terapias farmacológicas, estrategias diagnósticas antes de su aplicación en humanos. Son esenciales para comprender los mecanismos principales que subyacen en las enfermedades para prevenirlas, diagnosticarlas y tratarlas (Vandamme, 2014).

### **2.1.3 Introducción a MTX: mecanismos de acción y aplicaciones clínicas**

El metrotexato, (ácido 4-amino-10-metilfólico o metrotexato (MTX ,  $C_{20}H_{22}N_8O_5$ ) es un compuesto sintético análogo estructural del ácido fólico (FA) con actividad antiproliferativa, antiinflamatoria e inmunosupresora. Su estructura consiste en un anillo de pteridina, y un residuo de ácido dimetil-p-aminobenzoico unido al ácido glutámico (figura 1)

Tiene un amplio espectro de aplicaciones debido a sus diferentes mecanismos de acción. En oncología se utiliza para el tratamiento de leucemias, linfoma no-Hodking recidivante o refractario, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, osteosarcoma y otros tumores sólidos. Se aplica también en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, psoriasis, artritis idiopática juvenil poliarticular, miastenia *gravis*, *lupus*, así como en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, embarazo ectópico tubárico, dermatitis atópica, sarcoidosis pulmonar, enfermedades neurológicas y otras (Levêque et al., 2017, Bedoui et al., 2019; Kozminski et al., 2020).



**Figura 1.** Estructura química del metrotexato. Fuente: Ma et al., 2017

El mecanismo de acción del MTX depende de la dosis administrada. En dosis elevadas se utiliza en oncología como agente citotóxico ya que inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), entre otras enzimas dependientes del folato, lo que bloquea la síntesis de purinas y timidilato. Esta interrupción provoca un efecto antiproliferativo en células de rápida división, mecanismo eficaz en tratamientos de neoplasias (Tian and Cronstein, 2007; Kozminski *et al.*, 2020).

La administración de MTX a bajas dosis está orientada a la modulación inmunoinflamatoria. Promueve la acumulación y liberación de adenosina sobre tejidos inflamados. La adenosina actúa como un mediador antiinflamatorio, reduce el reclutamiento de leucocitos, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y modula la función de células inmunes. La acción de la adenosina inducida por MTX resulta eficaz en tratamientos para las enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Tian & Cronstein, 2007; Kozminski *et al.*, 2020).

#### **2.1.4 Toxicidad y efectos adversos del uso prolongado del MTX**

El uso prolongado del MTX, en especial en ausencia de medidas de mitigación como suplementación con ácido fólico, está asociado con alteraciones hepáticas. Dichas alteraciones incluyen la elevación de los niveles séricos de enzimas hepáticas y cambios histopatológicos progresivos que pueden variar entre vacuolización y degeneración hepatocitaria hasta fibrosis. La vulnerabilidad hepática depende de factores como la dosis acumulada y duración del tratamiento; y de comorbilidades asociadas como alcoholismo u obesidad (Liu *et al.*, 2019; Ezhilarasan D.,2021)

Mecanismos subyacentes identificados en modelos animales como el estrés oxidativo, daño mitocondrial y la activación de vías inflamatorias y fibrogénicas

sugieren que una exposición prolongada al MTX favorece alteraciones celulares que pueden desembocar en necrosis, disfunción bioenergética y fibrosis. Lo anterior sugiere que, la hepatotoxicidad inducida por MTX está mediada, parcialmente, por el desequilibrio oxidativo y la alteración del metabolismo energético en los hepatocitos (Hamed *et al.*, 2018; Ezhilarasan, 2021).

### **2.1.5 Reducción de la eficacia clínica del MTX**

Los efectos antiinflamatorios del MTX se encuentran mediados en mayor parte por la acumulación de adenosina en tejidos inflamados. Por lo que agentes antagonistas de receptores de adenosina, como la cafeína, pueden reducir la eficacia clínica del fármaco. Del mismo modo, interacciones farmacológicas como la administración simultánea de antibióticos, pueden interferir en la eliminación por vías renales del MTX lo que incrementa su concentración plasmática en el organismo y, en consecuencia, su toxicidad (Hamed *et al.*, 2018). Estos factores deben tomarse en cuenta en la práctica clínica y en el diseño de estudios experimentales, ya que pueden alterar los efectos del tratamiento (Prey & Paul, 2009; Bardi, 2010).

### **2.1.6 Detección de hepatotoxicidad debida a MTX mediante técnicas de imágenes**

Los mecanismos asociados al estrés oxidativo y heterogeneidad tisular inducida por tratamientos con dosis prolongadas de MTX pueden desencadenar cambios estructurales que afecten la organización del tejido hepático. Estos cambios pueden reflejar variaciones de textura y homogeneidad detectables en estudios de imagen. Por lo tanto, análisis cuantitativos como la radiómica son altamente eficaces para identificar diferencias entre tejidos dañados y sanos, que se pueden relacionar con hallazgos histológicos y biomarcadores (Ezhilarasan, 2021). Por ejemplo, radiografías torácicas y hepáticas simples analizadas por radiómica han permitido la detección temprana y estadificación de fibrosis (Park *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024).

### **2.1.7 Astaxantina como antioxidante**

La Astaxantina (ASTX) es un carotenoide xantofílico de origen natural que posee propiedades antioxidantes y moduladoras del metabolismo celular. De manera natural se encuentra en microalgas, crustáceos y algunas bacterias. Su naturaleza lipofílica le permite integrarse fácilmente a la membrana celular y mitocondrial, donde ejerce su acción biológica (Li, 2020; KOhandel *et al.*, 2022).

Estudios preclínicos y clínicos señalan que, además de su capacidad antioxidante, la ASTX posee efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y reguladores del metabolismo lipídico. También se ha descrito que posee actividad regulatoria mitocondrial independiente de su capacidad antioxidante. En humanos, las dosis de administración en pruebas clínicas se consideran segura entre 4 y 12 mg/día, mientras que en modelos animales para pruebas preclínicas suelen administrarse dosis más elevadas para profundizar el análisis de sus efectos protectores. (Chen and Kotani, 2016; Nishida *et al.*, 2021).

El mecanismo de acción clave de la ASTX consiste en la activación de la vía de señalización del factor nuclear Nrf2, lo que incrementa la expresión de genes relacionados con agentes antioxidantes como las enzimas hemooxigenasa-1 (HO-1), superóxido dismutasa (SOD), catalasa y enzimas de conjugación. Lo anterior fortalece la resistencia celular frente al estrés oxidativo (Davinelli *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2025). Además de su función antioxidante, la ASTX modula la función mitocondrial, mejora el potencial mitocondrial, reduce las pérdidas de ATP y mitiga la apoptosis mediada por mitocondria, lo que contribuye a la capacidad de preservar la viabilidad celular (Nishida *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2025).

Particularmente sobre el hígado, la ASTX disminuye la producción de mediadores fibrogénicos como TGF-B1. Regula, además, el equilibrio metaloproteinasa de matriz / inhibidores tisulares de metaloproteinasa (MMP/TIMP), y puede inhibir la activación de células estelares. Todos estos son procesos fundamentales para prevenir y frenar la progresión de fibrosis (Gao *et al.*, 2021).

### **2.1.8 Evidencia preclínica y clínica de protección hepática**

Múltiples estudios documentan los efectos preventivos y terapéuticos de la ASTX en padecimientos hepáticos como la fibrosis, y en escenarios de toxicidad inducida por fármacos. Dentro de estos efectos preventivos y terapéuticos resalta su capacidad para modular al estrés oxidativo, inflamación y procesos fibrogénicos (Li, 2020; Hamdan *et al.*, 2022).

En modelos animales, en especial en ratas, la ASTX mostró hepatoprotección frente a compuestos clásicos hepatotóxicos como el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). La administración de ASTX disminuyó los niveles de malondialdehído (MDA) -marcador de estrés oxidativo y peroxidación lipídica-, incrementó la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), y mejoró la arquitectura histológica hepática (Islam *et al.*, 2017).

### **2.1.9 Evidencia del efecto hepatoprotector de ASTX en presencia de MTX**

En relación específica con el MTX, estudios preclínicos en animales y cultivos celulares muestran que la ASTX atenúa la hepatotoxicidad inducida por este fármaco. Evidencias como la disminución de los valores de las enzimas séricas hepáticas ALT/AST, descenso del MDA, aumento de antioxidantes endógenos como glutatión reducido (GSH), SOD, CAT, reducción de marcadores apoptóticos y una mejora en la estructura histológica hepática indican hepatoprotección inducida por ASTX. Estos hallazgos indican que tanto el pretratamiento como el cotratamiento de ASTX con MTX produce una menor toxicidad hepática que la producida solo por MTX (Hamdam *et al.*, 2022).

En modelos experimentales de artritis reumatoide en ratas, el uso combinado de ASTX/MTX, en comparación con otros carotenoides, provoca un efecto antiinflamatorio potenciado, lo que indica interacciones sinérgicas y aditivas en la modulación inflamatoria (Pružinská *et al.*, 2024). Asimismo, en cultivos celulares de leucemia NALM-6, el cotratamiento de ASTX /MTX mostró un aumento del arresto celular y una reducción en la respuesta inflamatoria, evidenciando que los efectos de la interacción dependen del tipo de tejido y del objetivo terapéutico (Moridi *et al.*, 2024).

En conjunto, la evidencia de estudios preclínicos sugiere que la ASTX no solo ofrece protección al hígado frente al daño ocasionado por el MTX, sino que en algunos contextos puede coexistir sin disminuir su eficacia, e incluso potencia los efectos terapéuticos del fármaco (Azadian *et al.*, 2024; Pružinská *et al.*, 2024).

### **2.1.10 Radiómica como método de diagnóstico en imágenes**

La radiómica es una disciplina emergente que transforma imágenes médicas en datos cuantitativos. Extrae de manera automática características que describen la forma, textura, intensidad y distribución espacial de píxeles o vóxeles con el objetivo de identificar información, tanto biológica como patológica, contenida en las imágenes. Esta información extraída no es perceptible a simple vista, y una vez cuantificada, puede relacionarse con resultados clínicos, características histopatológicas y perfiles genómicos (Gillies *et al.*, 2015).

El flujo de trabajo radiómico está estandarizado con el fin de garantizar la reproducibilidad del proceso y está compuesto de varias fases: adquisición de la imagen, segmentación de la región de interés -que puede realizarse de manera manual, semiautomática y automática-, extracción de diferentes características radiómicas entre las cuales se encuentran la matriz de coocurrencia de niveles de gris (GLCM por sus siglas en inglés), matriz de longitud de secuencia de niveles de

gris (GLRLM), zona de tamaño de nivel de gris (GLSZM), matriz de diferencia de tonos de gris vecinos (NGTDM), matriz de dependencia de niveles de gris (GLDM), procesamiento y selección de características, modelado estadístico o aprendizaje automático, y validación y evaluación del rendimiento del modelo (Gillies *et al.*, 2015).

### **2.1.11 Estándares y reproducibilidad**

Una de las principales limitaciones de la radiómica es la falta de estandarización en definiciones y cálculo de características entre diferentes programas y protocolos de adquisición. Para atender esta problemática, la iniciativa Image Biomarker Standardisation Initiative (IBSI) ha establecido definiciones, valores de referencia y lineamientos técnicos que favorecen la compatibilidad entre estudios y softwares, mejorando la robustez de los resultados (Zwanenburg *et al.*, 2020).

El análisis radiómico cuantifica los datos contenidos en una imagen médica y los organiza en una serie de parámetros que facilitan la selección, descarte e interpretación de los resultados. Los parámetros de primer orden -nombrados también histogramas de intensidad- describen la distribución global de los niveles de gris de la región de interés (media, desviación estándar, asimetría, curtosis, entropía), sin tener en cuenta relaciones espaciales. Los parámetros de segundo orden se derivan de una serie de matrices como (GLDM) que cuantifica las dependencias de niveles de gris en una imagen. Analiza el número de vóxeles conectados dentro de una distancia determinada que dependen del vóxel central; (GLCM), que se encarga de analizar la relación de intensidades entre pares de píxeles/vóxeles, por lo que aporta medidas de homogeneidad, contraste y correlación. Otros descriptores de segundo orden incluyen a (GLRLM), que mide la longitud de secuencias de píxeles/vóxeles con intensidades similares, (GLSZM), que cuantifica zonas de tamaño homogéneo y (NGTDM), que caracteriza variaciones locales de textura. Complementariamente, los parámetros de forma describen características geométricas como área, volumen, superficie, esfericidad o compacidad, aportando información adicional para la caracterización estructural. (Zwanenburg *et al.*, 2020).

### **2.1.12 Aplicaciones clínicas**

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la radiómica en la detección y estadificación de padecimientos crónicos, caracterización de lesiones focales tanto benignas como malignas, estratificación de fibrosis y predicción de respuesta a terapias. Modelos radiómicos aplicados en imágenes hepáticas (Rx, TC, RM) logran

una alta precisión en la discriminación de padecimientos, aunque aún requieren de una validación multicéntrica y estandarización para aplicaciones clínicas. (Wei *et al.*, 2020; Le *et al.*, 2025).

### **2.1.13 Ventajas de la radiómica en contextos experimentales**

En el caso de estudios preclínicos con modelos animales, la radiómica es una herramienta que permite evaluar efectos ocasionados por toxicidad farmacológica o lesiones inducidas sobre órganos o sistemas con relevancia clínica (Park *et al.*, 2020). Su aplicación ofrece:

- Alta sensibilidad en la detección de cambios estructurales difícilmente detectables en análisis bioquímicos o histológicos.
- Capacidad cuantitativa para monitorizar progresiones temporales de alteraciones tisulares y agrupar efectos por tratamiento.
- Compatibilidad con imágenes tanto bidimensionales como tridimensionales, siempre y cuando la adquisición y segmentación mantengan criterios consistentes (Park *et al.*, 2020).

### **2.1.14 Rayos X y segmentación en investigación**

La utilización de radiografías en estudios de diagnóstico sigue siendo una de las modalidades con más uso en ambientes preclínicos y clínicos debido a su amplia disponibilidad, bajo costo, rapidez de adquisición entre toma y toma; y su relativa simplicidad técnica en comparación con otras modalidades más complejas como la TC o la RM. Además, representa un beneficio para estudios longitudinales al minimizar los riesgos por efectos acumulativos que provocan altas dosis de radiación. Esta serie de ventajas hacen que entornos experimentales, donde se requieren de múltiples adquisiciones en tiempo reducidos, deberían contar con esta modalidad de imagen, que permite la identificación de diferencias relevantes en la atenuación de los tejidos. Al analizar radiografías con un análisis radiómico se obtiene información cuantificable que permite transformar en datos cuantitativos y reproducibles variaciones sutiles en la atenuación de los tejidos. (Gillies *et al.*, 2016; Zwanenburg *et al.*, 2020).

### **2.1.15 Métodos de segmentación en imágenes**

En el análisis radiómico la segmentación de regiones de interés (ROI) representa un paso crítico, ya que determina la precisión y validez de los parámetros extraídos. Este proceso puede ser realizado de distintas formas:

- **Manual:** Dependiente del observador, que suele ser susceptible a sesgo y variabilidad interobservador.
- **Semiautomática:** Emplea algoritmos para la umbralización, crecimiento de regiones o contornos activos, pero siguen siendo dependientes del control y criterio del operador.
- **Automática:** Basada en técnicas de inteligencia artificial o aprendizaje profundo, posibilitan una segmentación más rápida y estandarizada, pero requieren de grandes volúmenes de datos y entrenamiento robusto para garantizar su fiabilidad. (Wei *et al.*, 2020).

### **2.1.16 Potencial análisis radiómico en imágenes bidimensionales**

Aunque la mayoría de los estudios radiómicos están enfocados a modalidades tridimensionales como TC y RM, nuevos estudios han demostrado que es posible extraer biomarcadores significativos de imágenes bidimensionales. En imágenes radiográficas un estudio radiómico puede detectar variaciones estructurales de textura y heterogeneidad difícilmente perceptibles a simple vista. Estudios radiómicos de radiografías torácica y hepática han detectado fibrosis de manera temprana (Park *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024). El carácter bidimensional de las radiografías facilita su procesamiento por lo que los análisis longitudinales se vuelven viables en estudios experimentales, permitiendo desarrollar biomarcadores no invasivos, altamente sensibles y reproducibles que complementen o sustituyan los estudios convencionales histológicos y bioquímicos (Gillies *et al.*, 2016; Zwanenburg *et al.*, 2020).

## **2.2 Fundamentos teóricos**

### **2.2.1 Fundamentos generales de la radiómica**

a) *Definición central:* La radiómica es una perspectiva analítica que convierte imágenes médicas en volúmenes de datos cuantificables mediante la extracción matemática de características. Esta disciplina permite acceder a información biológica y patológica invisible para el ojo humano, proporcionando una representación más profunda de los tejidos biológicos (Lambin *et al.*, 2012; Gillies *et al.*, 2016;).

b) *Objetivo principal*: El propósito de la radiómica es identificar y cuantificar patrones que puedan ser correlacionados con información histológica, biológica molecular, pronósticos o respuestas terapéuticas. Es decir, transforma imágenes en biomarcadores cuantitativos que pueden reflejar procesos fisiológicos subyacentes. (Kumar et al., 2012; Aerts et al., 2014).

c) *Diferencias con el análisis convencional de imágenes*: Una de las principales limitaciones del análisis imagenológico clásico es que depende en gran medida de la interpretación visual y experiencia del observador. El papel de la radiómica es eliminar dicha subjetividad empleando métodos de extracción cuantitativa que permitan describir de manera puntual las características de un tejido tales como forma, textura, densidad o intensidad (Gillies et al., 2016; Lambin et al., 2017;).

d) *Tipos de características extraídas*: Las características radiómicas pueden describirse según su nivel de complejidad (Parmar et al., 2015; Zwanenburg et al., 2020):

- Primer orden: describen la distribución de las intensidades de los píxeles/vóxeles mediante histogramas de intensidad.
- Forma/volumen: cuantifican la geometría, contornos y compacidad del tejido o lesión analizado.
- Textura: las matrices GLCM, GLRLM, GLSZM, NGTDM, GLDM se encargan de evaluar la distribución espacial de las intensidades de los píxeles/vóxeles.
- Características derivadas: son el resultado de la aplicación de transformadas o filtros (wavelet, filtros laplacianos, fractales) para el resaltado de patrones estructurales de la imagen analizada

e) *Importancia clínica y experimental*: La radiómica posee un gran potencial tanto en el ámbito clínico como en el experimental por ser una herramienta de diagnóstico no invasiva. Permite predecir la progresión de padecimientos y terapias, y una estratificación precisa del riesgo para el paciente. En modelos preclínicos, la radiómica permite correlacionar variaciones tisulares extraídas de una imagen con biomarcadores bioquímicos o histológicos, lo que posibilita el establecimiento de relaciones entre cambios estructurales y procesos biológicos subyacentes (Aerts et al., 2014; Kickingeder et al., 2016).

## 2.2.2 Principios físicos del uso de rayos X en imágenes médicas

a) *Fundamentos físicos y técnicos*: La radiografía simple en medicina se basa en la interacción de rayos X (Rx) con los tejidos biológicos. Al atravesar los tejidos los

fotones se atenúan en dependencia de la densidad y número atómico del tejido o material. Esta atenuación se describe mediante la ley de Beer-Lambert:

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

donde  $I$  es la intensidad transmitida,  $I_0$  representa la intensidad inicial del haz,  $\mu$  es el coeficiente lineal de atenuación y  $x$  el espesor del material.

La radiografía simple Rx genera una proyección bidimensional donde las estructuras con alta densidad electrónica, como hueso o metal, absorben una gran porción de la radiación emitida (bajo valor de la fracción  $\frac{I}{I_0}$ ) reflejándose como zona con alta radiopacidad, mientras que las estructuras con una menor densidad como tejidos blandos se reflejan radiolúcidos (mayor valor de la fracción  $\frac{I}{I_0}$ ). Este proceso físico es la base de la visualización estructural en la radiografía simple, ofreciendo una técnica de diagnóstico rápida y accesible, con suficientes contrastes para identificar cambios anatómicos o patológicos relevantes (Bushberg *et al.*, 2012; Gillies *et al.*, 2016).

b) *Características de la imagen radiográfica*: La calidad de una imagen radiográfica depende de una serie de parámetros técnicos como (Collewet *et al.*, 2004; Traverso *et al.*, 2018):

- **Intensidad**: corresponde al nivel de gris asignado a cada píxel, que depende de la cantidad de radiación que es capaz de atravesar el tejido y alcanzar el detector. La intensidad está sujeta al espesor y composición del tejido, así como a los parámetros de exposición (kVp y mAs).
- **Contraste**: determinado por las diferencias de intensidad entre regiones adyacentes, lo que permite visualizar estructuras internas o detectar alteraciones de textura. Este parámetro puede ser ajustado mediante el ajuste del haz, el uso de filtros o el procesamiento digital posterior.
- **Resolución**: expone la capacidad de la imagen para distinguir detalles finos. Puede ser categorizada en resolución espacial y de contrastes. La resolución espacial está determinada por el tamaño del píxel y la matriz del detector, mientras que la resolución de contraste consiste en la capacidad del sistema para detectar diferencias mínimas en la atenuación de tejidos similares.

c) *Justificación del uso de Rx en estudios preclínicos*: En comparación con otras modalidades como la TC o la RM de equipo y capacitación especializada, la radiografía destaca por su bajo costo, accesibilidad y facilidad de uso, lo que permite realizar estudios longitudinales frecuentes con una dosis de radiación relativamente baja. Lo anterior resulta una potencial ventaja en estudios con modelos animales

cuando es necesario realizar seguimientos continuos, evaluar lesiones y respuestas a terapias, tomar múltiples imágenes a diferentes tejidos sin alterar la viabilidad del sujeto experimental (Gillies *et al.*, 2016; Zwanenburg *et al.*, 2020).

Aunque el carácter bidimensional de las radiografías ofrece un nivel de detalle inferior al de las modalidades tridimensionales, las variaciones sutiles en textura y densidad pueden ser traducidas mediante análisis radiómicos en valores cuantitativos que permitan identificar biomarcadores que complementen la información obtenida mediante otras pruebas clínicas, fortaleciendo la interpretación clínica en la evaluación de patologías o respuestas a tratamientos (Avanzo *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2021).

### 2.2.3 Características radiómicas

#### Características de primer orden

a) *Características de primer orden*: Las características de primer orden (First Order Statistics, FOS) describen la distribución de los valores de intensidad dentro de una ROI sin tomar en cuenta la relación espacial entre píxeles o vóxeles. Estas métricas se encargan de cuantificar las propiedades globales de una imagen como su brillo, contraste, homogeneidad y dispersión, a partir de su histograma de intensidades. Su cálculo se basa en la frecuencia  $P(i)$  de cada nivel de intensidad  $i$  dentro de la ROI (Lambin *et al.*, 2017; Zwanenburg *et al.*, 2020). La tabla 1 muestra algunos de los principales parámetros clasificados como de primer orden

**Tabla 1:** Principales parámetros radiómicos clasificados de primer orden

Parámetro	Fórmula	Descripción	Valor alto indica	Valor bajo indica
<b>Media (Mean)</b>	$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_i$	Intensidad promedio dentro de la ROI.	Aumento en la densidad o atenuación tisular (p. ej. fibrosis, depósito de colágeno o inflamación).	Disminución de la densidad o pérdida estructural (necrosis, edema, daño hepático agudo).
<b>Varianza (Variance)</b>	$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (I_i - \mu)^2$	Grado de dispersión de los valores de intensidad.	Alta heterogeneidad; coexistencia de zonas densas y laxas.	Homogeneidad del tejido o imagen más uniforme.

<b>Desviación estándar (SD)</b>	$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$	Variabilidad de los valores alrededor de la media.	Gran variación estructural; posible daño celular o irregularidad.	Homogeneidad en la textura o tejido sano.
<b>Asimetría (Skewness)</b>	$Sk = \frac{1}{N\sigma^3} \sum_{i=1}^N (I_i - \mu)^3$	Sesgo del histograma hacia intensidades altas o bajas.	Colas hacia intensidades elevadas (posible fibrosis o calcificación).	Colas hacia intensidades bajas (necrosis o pérdida de densidad).
<b>Curtosis (Kurtosis)</b>	$Ku = \frac{1}{N\sigma^4} \sum_{i=1}^N (I_i - \mu)^4$	“Agudeza” del histograma.	Presencia de picos pronunciados; distribución de intensidades concentrada (p. ej. lesiones focales).	Distribución más plana; tejido heterogéneo o difuso.
<b>Entropía (Entropy)</b>	$H = - \sum_i P(i) \log_2[P(i)]$	Grado de aleatoriedad o desorden de intensidades.	Alta complejidad y desorganización; infiltración, necrosis o cambios estructurales.	Orden y homogeneidad; tejido sano.
<b>Energía (Energy)</b>	$E = \sum_i P(i)^2$	Cuantificación de la uniformidad del histograma (inversa de entropía).	Homogeneidad; textura uniforme y estable.	Alta variabilidad o presencia de lesiones heterogéneas.
<b>Rango (Range)</b>	$R = I_{max} - I_{min}$	Diferencia entre intensidades máximas y mínimas.	Amplia variabilidad de intensidades (tejido con áreas necróticas o fibrosadas).	Rango estrecho; textura uniforme.
<b>Coefficiente de</b>	$CV = \frac{\sigma}{\mu}$	Variabilidad relativa respecto a la media.	Mayor heterogeneidad o	Estructura estable o tejido sano.

<b>variación (CV)</b>			irregularidad tisular.	
<b>Percentiles (p10, p25, p75, p90)</b>	—	Valor de intensidad bajo el cual se encuentra cierto porcentaje de los píxeles.	Cambios en la distribución de intensidades; desplazamientos pueden indicar edema o fibrosis.	Distribución estable similar al control.

Datos tomados de: Lambin *et al.*, 2017 y Zwanenburg *et al.*, 2020)

b) *Interpretación general de las características de primer orden*: La interpretación general en el análisis de tejidos y lesiones se basa en que aumentos en los valores de parámetros como entropía, varianza o desviación estándar suelen asociarse a una mayor heterogeneidad estructural, manifestada usualmente en procesos como fibrosis, necrosis o inflamación. Por otro lado, variaciones en los valores de los parámetros como energía o rango de intensidad suelen indicar una pérdida de homogeneidad, un patrón recurrente en alteraciones patológicas (Lambin *et al.*, 2017; Zwanenburg *et al.*, 2020;).

### Características de segundo orden

a) *Características radiómicas de segundo orden*: Las características de segundo orden describen la distribución conjunta de intensidades y su relación espacial dentro de la ROI. A diferencia de las métricas de primer orden, que se basan únicamente en su histograma, éstas permiten cuantificar patrones de textura considerando la coocurrencia y repetición de intensidades vecinas, lo que brinda una mejor precisión al cuantificar la estructura interna de tejidos y lesiones y facilita la detección de variaciones sutiles asociables a eventos patológicos (Haralick *et al.*, 1973; Zwanenburg *et al.*, 2020).

Las características radiómicas de segundo orden cuentan con dos enfoques principales:

- **Matriz de coocurrencia de niveles de gris (GLCM)**: cuantifica la frecuencia con la que pares de valores de intensidad  $(i, j)$  aparecen dentro de una ROI con una distancia y dirección determinadas. Esta matriz permite caracterizar la regularidad y variabilidad local en las texturas, siendo especialmente útil en la identificación de patrones sutiles tisulares como inicios de fibrosis (Haralick *et al.*, 1973; Gillies *et al.*, 2016).

- **Matriz de longitud de corrida (GLRLM):** determina la cantidad y longitud de secuencias continuas “corridas” de píxeles con mismo valor de intensidad, aportando información sobre la repetitividad y granularidad de texturas. Es potencialmente útil en la evaluación de procesos de regeneración tisular tras daño o tratamiento (Gillies *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2020).

b) *Parámetros derivados de GLCM:* Sea  $P(i, j)$  la probabilidad normalizada de encontrar intensidades  $(i, j)$  dentro de una ROI a una distancia y dirección determinadas. Algunos de los principales parámetros derivados de la GLCM se muestran en la tabla 2 (Haralick *et al.*, 1973; Gillies *et al.*, 2016).

**Tabla 2:** Principales parámetros radiómicos de segundo orden obtenidos a partir de la matriz de coocurrencia de niveles de gris (GLCM).

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Contraste (Contrast)</b>	$\sum_{i,j} (i - j)^2 P(i, j)$	Intensidad de variaciones locales; un valor alto refleja diferencias marcadas entre píxeles vecinos.
<b>Homogeneidad (Homogeneity)</b>	$\sum_{i,j} \frac{P(i, j)}{1 + (i - j)^2}$	Indica qué tan próximas están las intensidades entre sí.
<b>Energía (Energy)</b>	$\sum_{i,j} [P(i, j)]^2$	Uniformidad de la textura; valores altos reflejan patrones regulares.
<b>Entropía (Entropy)</b>	$-\sum_{i,j} P(i, j) \log_2[P(i, j)]$	Grado de desorden o aleatoriedad textural.
<b>Correlación (Correlation)</b>	$\frac{\sum_{i,j} [(i - \mu_i)(j - \mu_j)P(i, j)]}{\sigma_i \sigma_j}$	Dependencia lineal entre intensidades vecinas.

Estas métricas permiten la detección de cambios microestructurales en el tejido o lesión, tales como desorganización fibrótica o pérdida de homogeneidad asociada

a daño tisular debido a condiciones patológicas o respuesta a tratamientos (Wei *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2021).

c) *Parámetros derivados de la GLRLM*: Propuesta originalmente por Galloway (1975), la GLRLM cuantifica el número de secuencias de píxeles contiguos (corridas) con el mismo valor de intensidad y su longitud. Sea  $P(i, j)$  el número de corridas de nivel de gris  $i$  y longitud  $j$ , esta matriz resume la estructura repetitiva y direccional de la textura dentro de la ROI. Los parámetros derivados de esta matriz se muestran en la tabla 3

**Tabla 3:** Principales parámetros radiómicos de segundo orden obtenidos a partir de la matriz de longitud de corrida de niveles de gris (GLRLM)).

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Énfasis en corridas cortas (Short Run Emphasis)</b>	$\frac{1}{N_r} \sum_{i,j} \frac{P(i,j)}{j^2}$	Proporción de corridas cortas, asociadas a texturas finas.
<b>Énfasis en corridas largas (Long Run Emphasis)</b>	$\frac{1}{N_r} \sum_{i,j} P(i,j)j^2$	Presencia de corridas largas, reflejando homogeneidad.
<b>No uniformidad en niveles de gris (Gray Level Non-Uniformity)</b>	$\frac{1}{N_r} \sum_i \left( \sum_j P(i,j) \right)^2$	Uniformidad en los niveles de gris de la imagen.
<b>No uniformidad en corridas largas (Run Length Non-Uniformity)</b>	$\frac{1}{N_r} \sum_j \left( \sum_i P(i,j) \right)^2$	Variabilidad de las longitudes de las corridas.

<b>Run Percentage (RP)</b>	$\frac{N_r}{N_p}$	Relación entre número de corridas y píxeles totales; estima densidad textural.
----------------------------	-------------------	--------------------------------------------------------------------------------

**Donde:**  $N_r$ , número total de corridas,  $N_p$ , número total de píxeles dentro de la ROI. Datos tomados de Galloway et al., 1975 y Zwanenburg et al., 2020).

d) *Interpretación general de las características de segundo orden:* En estudios radiómicos, valores elevados de contraste o entropía respecto a muestras de tejidos sanos suelen asociarse a heterogeneidad estructural y daño celular. En cambio, su decremento, acompañado con variaciones en energía y homogeneidad suele indicar homogeneidad y conservación en el tejido (Wei et al., 2020; Zwanenburg et al., 2020; Park et al., 2021;).

En conjunto, las características de segundo orden permiten traducir variaciones de textura microscópicas imperceptibles a simple vista lo que fortalece el valor diagnóstico y pronóstico de la radiómica como herramienta en métodos no invasivos (Gillies et al., 2016).

### **Características de orden superior**

a) *Características radiómicas de orden superior:* Las características de orden superior analizan patrones de textura complejos que dependen de la organización tridimensional o de distribuciones locales avanzadas de niveles de gris. A diferencia de las métricas de primer y segundo orden que se basan en histogramas o en distribuciones de coocurrencias simples, las métricas de orden superior modelan zonas o dependencias espaciales múltiples dentro de la ROI. Lo anterior permite captar aspectos aún más sutiles de los tejidos analizados, útiles en la cuantificación de la complejidad estructural y la organización del tejido (Gillies et al., 2016; Zwanenburg et al., 2020; Park et al., 2021).

Las matrices principales de orden superior son:

- **GLSZM** (Gray Level Size Zone Matrix): se encarga de medir la homogeneidad de zonas con igual intensidad.
- **GLDM** (Gray Level Dependence Matrix): Evalúa cuantos píxeles son dependientes de uno central dentro de una vecindad fija.
- **NGTDM** (Neighboring Gray Tone Difference Matrix): analiza diferencias locales entre un píxel y sus vecinos.

b) *Parámetros derivados de GLSZM*: La matriz de zonas de tamaño de nivel de gris (GLSZM) cuantifica el número de zonas (grupos de píxeles conectados) que comparten un mismo nivel de intensidad y tamaño dentro de la ROI. Sea  $P(i, j)$ , donde  $i$  es el número de zonas con nivel de gris y  $j$  es el tamaño. Las principales métricas derivadas de la matriz GLSZM se muestran en la Tabla 4 (Gillies *et al.*, 2016; Zwanenburg *et al.*, 2020;).

**Tabla 4:** Principales parámetros radiómicos de orden superior obtenidos a partir de la matriz de zonas de tamaño de nivel de gris (GLSZM)

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Small Zone Emphasis (SZE)</b>	$\frac{1}{N_z} \sum_{i,j} \frac{P(i,j)}{j^2}$	Proporción de zonas pequeñas, asociadas a textura fina o granular.
<b>Large Zone Emphasis (LZE)</b>	$\frac{1}{N_z} \sum_{i,j} P(i,j) j^2$	Presencia de zonas extensas de igual intensidad.
<b>Gray Level Non-Uniformity (GLNU)</b>	$\frac{1}{N_z} \sum_i \left( \sum_j P(i,j) \right)^2$	Uniformidad en la distribución de niveles de gris.
<b>Zone Size Non-Uniformity (ZSNU)</b>	$\frac{1}{N_z} \sum_j \left( \sum_i P(i,j) \right)^2$	Cuantifica la variabilidad de los tamaños de zona.
<b>Zone Percentage (ZP)</b>	$\frac{N_z}{N_p}$	Relación entre zonas y píxeles totales.

Donde:  $N_z$  número total de zonas detectadas,  $N_p$  número total de píxeles en la ROI.

c) *Interpretación derivada de GLSZM*: Las métricas obtenidas a partir de esta matriz reflejan el grado de fragmentación tisular o regeneración, ya que zonas pequeñas e irregulares suelen indicar daño o inflamación, en tanto que las zonas amplias y uniformes pueden reflejar una reorganización o reparación tisular (Gillies *et al.*, 2016; Zwanenburg *et al.*, 2020).

d) *Parámetros derivados de GLDM*: La matriz de dependencia del nivel de gris (GLDM) está basada en el principio de dependencia de intensidad, que consiste en medir cuántos píxeles dependientes se encuentran dentro de un radio fijo y presentan intensidades similares a un píxel central que actúa como dependencia  $\delta$ .

Sea  $P(i, j)$  el número de veces que un nivel de gris  $i$  presenta  $j$  dependencias dentro de la ROI. La tabla 5 muestra las principales métricas derivadas de esta matriz (Wei *et al.*, 2020; Zwanenburg *et al.*, 2020).

**Tabla 5:** Principales parámetros radiómicos de orden superior obtenidos a partir de la matriz de dependencia del nivel de gris (GLDM).

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Small Dependence Emphasis (SDE)</b>	$\frac{1}{N_d} \sum_{i,j} \frac{P(i,j)}{j^2}$	Cuantifica la proporción de dependencias pequeñas.
<b>Large Dependence Emphasis (LDE)</b>	$\frac{1}{N_d} \sum_{i,j} P(i,j) j^2$	Representa regiones con dependencias amplias (uniformidad).
<b>Gray Level Non-Uniformity (GLNU)</b>	$\frac{1}{N_d} \sum_i \left( \sum_j P(i,j) \right)^2$	Evalúa si ciertos niveles dominan la imagen.
<b>Dependence Non-Uniformity (DNU)</b>	$\frac{1}{N_d} \sum_j \left( \sum_i P(i,j) \right)^2$	Mide la variabilidad de dependencias.
<b>Dependence Entropy (DE)</b>	$-\sum_i \sum_j P(i,j) \log_2(P(i,j))$	Refleja el grado de desorden textural.

Donde:  $N_d$  es el número total de dependencias.

e) *Interpretación derivada de GLDM*: Estas métricas son altamente sensibles a variaciones locales suaves de densidad o textura, aspecto útil en la detección de alteraciones progresivas en tejidos que no muestran cambios morfológicos evidentes. Al cuantificar la densidad y consistencia local, variaciones respecto a un tejido sano de referencia suelen indicar valores altos de texturas uniformes, mientras

que, en el caso contrario, con valores bajos, pueden ser indicios de heterogeneidad tisular o bordes difusos (Wei *et al.*, 2020; Zwanenburg *et al.*, 2020).

f) **Parámetros derivados de NGTDM:** La matriz de diferencias de tonos grises adyacentes (NGTDM) cuantifica las diferencias locales entre el nivel de gris de un píxel y la media de sus vecinos adyacentes. Este método permite distinguir cuan diferente es cada región de su entorno lo que posibilita la captura de contrastes locales, rugosidad o variaciones de textura de bajo nivel. NGTDM ofrece una perspectiva de percepción de la textura, lo que complementa a las métricas de segundo orden (Gillies *et al.*, 2016).

Sea  $P(i)$  la probabilidad de aparición de un nivel de gris  $i$ , y  $A_i$  el promedio de intensidades de los vecinos del píxel con nivel  $i$  con diferencia local  $\delta_i = |i - A_i|$ . A partir de esta relación se derivados los parámetros que se muestran en la tabla 6, conocidos como parámetros derivados de NGTDM. (Amadasun and King, 1989; Zwanenburg *et al.*, 2020):

**Tabla 6:** Principales parámetros radiómicos de orden superior obtenidos a partir de la matriz de diferencias de tonos grises adyacentes (NGTDM).

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Coarseness</b>	$\frac{1}{\epsilon + \sum_i P(i)\delta_i}$	Mide la suavidad o granularidad de la textura.
<b>Contrast</b>	$\sum_i P(i)(i - \mu)^2 \delta_i$	Mide la variación de intensidad entre tonos de gris.
<b>Busyness</b>	$\frac{\sum_i P(i)\delta_i}{\sum_i ( i - \delta )P(i)}$	Indica la rapidez con la que cambian las intensidades entre píxeles.
<b>Complexity</b>	$\frac{\sum_{i,j}  i - j (P(i)\delta_i + P(j)\delta_j)}{N_p}$	Evalúa el grado de irregularidad entre tonos de gris
<b>Strength</b>	$\frac{\sum_i P(i)(i - \mu)^2}{\sum_i \delta_i}$	Evalúa la prominencia de patrones texturales.

g) *Interpretación general en el contexto biológico de los parámetros de orden superior*: Las métricas de orden superior permiten identificar variaciones estructurales microscópicas que pueden ser traducidas en indicadores de estado tisular en ámbitos tanto experimentales como clínicos. Según su patrón cuantitativo observado en las matrices GLSZM, GLDM, NGTDM sus métricas derivadas son capaces de señalar desde procesos degenerativos y patológicos hasta respuestas positivas a tratamientos. Por ejemplo:

- Valores elevados de SZE (Small Zone Emphasis), SDE (Small Dependence Emphasis) o Busyness respecto valores de referencia de tejidos sanos suelen ser indicativos de texturas fragmentadas o irregulares, señales típicas de daño en tejido o infiltración celular (Wei *et al.*, 2020).
- Valores elevados de LZE (Large Zone Emphasis) o LDE (Large Dependence Emphasis) pueden ser asociados a una buena homogeneidad y estructura uniforme. Lo que implica una textura continua y coherente dentro de la ROI, señal clara de un proceso de regeneración tisular (Park *et al.*, 2021).
- Elevada Entropía o Complexity se asocian con tejido desorganizado o necrótico, mientras que valores bajos pueden sugerir estructura preservada.

Estos parámetros se usan ampliamente en modelos animales y clínicos para detectar cambios tempranos en fibrosis o toxicidad farmacológica, incluso antes de que sean visibles en histología o bioquímica convencional, reforzando su potencial en medicina traslacional (Gillies *et al.*, 2016; Zwanenburg *et al.*, 2020;).

h) *Características radiómicas de forma y morfología*: Las características de forma describen la geometría tridimensional o bidimensional de la ROI, sin tener en cuenta los valores de intensidad de los píxeles/vóxeles que la integran. Este tipo de métricas cuantifican propiedades morfológicas del tejido segmentado, tales como tamaño, opacidad, irregularidad, volumen, esfericidad, elongación, entre otras. Lo que proporciona información sobre su arquitectura estructural (Parmar *et al.*, 2015; Zwanenburg *et al.*, 2020;).

### **Características de forma**

a) *Características de tamaño y volumen*: Estas métricas cuantifican la extensión o área del tejido analizado. Se emplean en descripciones de crecimiento, retracción

o deformación estructural. La tabla 7 indica los principales parámetros radiómicos clasificados en esta categoría.

**Tabla 7:** Principales parámetros radiómicos de tamaño y volumen.

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Volume (V)</b>	$N_p * v_{voxel}$	Representa el volumen total del VOI. N_p: número de vóxeles, v_voxel: volumen de cada vóxel.
<b>Surface Area (SA)</b>	$\sum A_{facetas}$	Suma del área de todas las caras triangulares del modelo segmentado.
<b>Surface to Volume Ratio (SVR)</b>	$\frac{SA}{V}$	Relación entre área superficial y volumen.

b) *Características de compacidad y esfericidad:* Evalúan la regularidad geométrica del tejido, comparando su forma con una esfera perfecta. La tabla 8 indica los principales parámetros radiómicos clasificados en esta categoría.

**Tabla 8:** Principales parámetros radiómicos de compacidad y esfericidad.

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Compactness 1 (C1)</b>	$\frac{V}{\pi^{\frac{1}{2}} * SA^{\frac{2}{3}}}$	Mide qué tan compacta es la forma.
<b>Compactness 2 (C2)</b>	$\frac{36\pi * V^2}{SA^3}$	Variante normalizada de la compacidad.
<b>Sphericity (<math>\Psi</math>)</b>	$\frac{\pi^{\frac{1}{3}} * 6V^{\frac{2}{3}}}{SA}$	Grado de similitud con una esfera perfecta (0–1).

c) *Características de elongación, planicidad y orientación:* métricas derivadas de elipsoides equivalentes que se aproximan a la ROI segmentada. Se emplean para

evaluar asimetrías y deformaciones direccionales. La tabla 9 indica los principales parámetros radiómicos clasificados en esta categoría.

**Tabla 9:** Parámetros radiómicos de elongación, planicidad y orientación.

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Elongation (E)</b>	$\sqrt{\frac{\lambda_2}{\lambda_1}}$	Relación entre los dos mayores ejes principales del elipsoide equivalente. $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3$ : autovalores del tensor de inercia.
<b>Flatness (F)</b>	$\sqrt{\frac{\lambda_3}{\lambda_1}}$	Relación entre el eje menor y mayor.
<b>Major Axis Length (L<sub>1</sub>)</b>	$4 * \sqrt{\lambda_1}$	Longitud del eje principal.
<b>Minor Axis Length (L<sub>3</sub>)</b>	$4 * \sqrt{\lambda_3}$	Longitud del eje menor.

d) *Características derivadas:* métricas combinadas que integran información volumétrica y superficial para reflejar la irregularidad total. La tabla 10 indica los principales parámetros radiómicos clasificados en esta categoría.

**Tabla 10:** Principales parámetros radiómicos clasificadas como derivadas.

Parámetro	Fórmula	Descripción
<b>Surface Area Density (SAD)</b>	$\frac{SA}{N_p}$	Densidad superficial relativa a los vóxeles analizados.
<b>Maximum 2D Diameter (Dmax)</b>	$\max(d(p_1, p_2))$	Máxima distancia entre dos puntos del contorno.
<b>Bounding Box Volume Ratio (BBR)</b>	$\frac{V}{V_{bbox}}$	Proporción del volumen real respecto al volumen de su caja delimitante.
<b>Maximum 3D Diameter (3DDmax)</b>	$\sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + (z_1 - z_2)^2}$	Diámetro máximo tridimensional dentro del VOI.

Las características de forma dependen ampliamente de la precisión de la segmentación y resolución espacial de las imágenes empleadas. De acuerdo con las recomendaciones del estándar ISBI (Image Biomarker Standardisation Initiative), para garantizar la reproducibilidad entre estudios es necesario ejecutar una serie de directrices tanto de procesamiento como de validación, entre las cuales se encuentran (Zwanenburg *et al.*, 2020):

- Interpolación isotrópica previa al cálculo de métricas tridimensionales, con el fin de homogeneizar las dimensiones de los vóxeles y evitar distorsiones geométricas.
- Mantener consistencia en las unidades de píxel/vóxel ( $mm^2, mm^3$ ) para garantizar consistencia entre cohortes o equipos de adquisición.
- Validar los resultados experimentales mediante el uso de fantasmas (phantoms) digitales o bases de datos públicas con el fin de validar la precisión y reproducibilidad de las métricas adquiridas mediante diferentes condiciones de trabajo.

#### **2.2.4 Estándar ISBI, reproducibilidad y normalización**

La “Image Biomarker Standardisation Initiative” (ISBI) es una organización internacional creada con el propósito de establecer un marco metodológico común que garantice consistencia, comparabilidad y reproducibilidad de características radiómicas extraídas a partir de imágenes médicas. Su objetivo principal es reducir al mínimo la variabilidad entre distintos algoritmos, grupos de investigación y plataformas de software, asegurando que los datos extraídos tengan el mismo significado y valor independientemente del origen de los datos o de las herramientas utilizadas en su extracción (Zwanenburg *et al.*, 2020).

La creación de la ISBI surgió como una respuesta a la necesidad de estandarización, para evitar que mismos conjuntos de imágenes pudieran generar distintos resultados dependiendo del tipo de metodología empleada. Por lo tanto, la ISBI actúa como un marco de referencia internacional encargado de definir la terminología, flujos de trabajo, fórmulas matemáticas y criterios de validación esenciales para obtener mediciones consistentes y comparables entre diferentes centros de investigación (Zwanenburg *et al.*, 2020). Los pasos de este flujo de trabajo se describen brevemente a continuación.

El flujo de trabajo establecido por la ISBI establece la serie de procesos que se requiere en un análisis radiómico para garantizar reproducibilidad y comparabilidad.

Esa secuencia de pasos busca que desde la adquisición de la imagen hasta la validación de los resultados se pueda replicar bajo las mismas condiciones técnicas, reduciendo cualquier tipo de variabilidad metodológica que altere los resultados (Zwanenburg *et al.*, 2020).

### **Flujo de trabajo**

a) *Adquisición de imágenes*: es necesario establecer un protocolo radiológico que condicione los parámetros físicos requeridos para la adquisición de la imagen que será estudiada como: voltaje del tubo (kVp), corriente (mAs), campo de visión (FOV) y la matriz del detector. Todos los metadatos adquiridos deberán ser registrados en un formato estándar DICOM que documentará las condiciones exactas de la obtención de la imagen.

b) *Procesamiento*: esta etapa incluye todos aquellos procesos donde la imagen deberá de ser tratada, normalizando las intensidades mediante escalados de valores de píxel/vóxel, corrigiendo variaciones de tamaño entre pixeles/vóxeles mediante interpolación isotrópica y reducciones de ruido y artefactos por medio de la implementación de filtros. Asimismo, delimitando la ROI mediante un método de segmentación acorde a las necesidades del estudio.

c) *Extracción de características*: La IBSI define los operadores matemáticos necesarios para el cálculo de las características radiómicas de primer, segundo y orden superior. La documentación de las condiciones de cálculo como el software utilizado, su versión y los parámetros utilizados ayudan a mantener una buena trazabilidad en el estudio.

d) *Postprocesamiento y reducción de dimensionalidad*: Una vez extraídas las características radiómicas es necesario realizar una evaluación de la redundancia entre ellas (análisis de correlación) donde se seleccionarán únicamente aquellas que tengan mayor significancia biológica o clínica comprobada, paso necesario para evitar un sobreajuste en el modelo.

e) *Validación y reproducibilidad*: Finalmente, los resultados deberán ser evaluados mediante pruebas intra e interobservador, validación cruzada entre diferentes plataformas y análisis de robustez frente a condiciones variables como el ruido, tamaño de píxel/vóxel o método de segmentación.

En conjunto, los pasos de este flujo de trabajo aseguran que el análisis radiómico en cada una de sus etapas pueda ser reproducido y validado. Lo anterior, permite la generación de biomarcadores confiables que puedan ser comparables entre distintos estudios y entornos.

f) *Reproducibilidad y confiabilidad de los biomarcadores*: La reproducibilidad se define como la capacidad de obtener resultados consistentes bajo condiciones variables de adquisición, segmentación o cálculo (Traverso *et al.*, 2018). Para su evaluación se emplean métricas que permiten cuantificar la consistencia de los resultados obtenidos mediante diferentes metodologías como el coeficiente de correlación intraclase (ICC) y el Coeficiente de concordancia de Lin (CCC). Algunos factores críticos que afectan la reproducibilidad son:

- Calidad del equipo de imagen (diferencias en la calibración entre escáneres).
- Modalidad de segmentación empleada (manual o automática).
- Interpolación de vóxeles (anisotropía espacial).
- Escala de cuantificación de intensidad utilizada en el procedimiento.

La iniciativa IBSI recomienda que la documentación de metadatos, así como de todas las fases de procesamiento sea una etapa crítica con el fin de facilitar la reproducibilidad del flujo de trabajo del análisis radiómico (Zwanenburg *et al.*, 2020).

g) *Criterios de validación*: de acuerdo con la iniciativa IBSI, la validación de las características radiómicas extraídas se compone de tres fases:

- Validación técnica: concordancia entre resultados obtenidos con distintos softwares, versiones o analistas.
- Validación biológica: correlación con biomarcadores tisulares, histológicos o moleculares.
- Validación clínica: evaluación de la capacidad predictiva o diagnóstica en poblaciones independientes.

Cada característica radiómica debe demostrar estabilidad ( $ICC > 0.8$ ) y relevancia biológica o clínica antes de ser utilizada como biomarcador (Lambin *et al.*, 2017).

### **Uso de IBSI sobre otros estándares**

Aunque existen otros marcos de referencia como DICOM-RT, QIBA (Quantitative Imaging Biomarkers Alliance) o NEMA, la Image Biomarker Standardisation Initiative (IBSI) se distingue por tener un enfoque exhaustivo en la estandarización matemática y semántica de las características radiómicas. Además, ofrece un lenguaje común que permite que los distintos desarrolladores de software y grupos de investigación tengan consistencia computacional en sus procedimientos desde la adquisición hasta el análisis (Zwanenburg *et al.*, 2020).

## 2.2.5 Segmentación de imágenes

a) *Segmentación y relevancia radiómica*: La segmentación de imágenes médicas es el proceso de delimitar y aislar regiones anatómicas o estructuras específicas de interés (ROI, región de interés o VOI, Volumen de interés) dentro de una imagen digital con el propósito de cuantificar parámetros específicos y extraer características cuantitativas (Pham *et al.*, 2000).

En la radiómica, la segmentación es un paso fundamental en el flujo de trabajo, ya que determina en gran medida la precisión y validez de las características extraídas. Contornos imprecisos o inconsistentes pueden alterar significativamente los datos obtenidos de textura, forma o intensidad, generando deficiencias que comprometan la fiabilidad de los resultados. (Zwanenburg *et al.*, 2020).

La segmentación define qué parte del tejido o lesión será analizada, por lo que su correcta ejecución influye directamente en la reproducibilidad, robustez y validez clínica de los parámetros radiómicos. Se estima que hasta un 60% de la variabilidad entre estudios radiómicos es debido a deficiencias en la segmentación de las regiones analizadas (Parmar *et al.*, 2015; Traverso *et al.*, 2018).

Desde el punto de vista conceptual, la segmentación es el proceso en el cual se clasifica cada píxel o vóxel dependiendo del tipo de imagen analizada en regiones homogéneas, de acuerdo con criterios como intensidad, textura o relaciones espaciales. Por lo que, la segmentación constituye la base del análisis radiómico. Cualquier error cometido en la delimitación de regiones de interés se propagará a etapas posteriores, afectando la extracción de características, reproducibilidad y la interpretación biológica o clínica (Pham *et al.*, 2000; Fave *et al.*, 2016).

b) *Modalidades de segmentación*: La segmentación de imágenes puede clasificarse en tres modalidades principales: manual, semiautomática y automática, cada una de ellas cuenta con sus propias ventajas, limitaciones y aplicaciones específicas de acuerdo con el tipo de estudio y complejidad del análisis radiómico.

b1) *Segmentación manual*: consiste en la delimitación directa de la ROI por parte de un experto (radiólogo, anatomista o investigador) utilizando herramientas digitales de dibujo y trazado.

Esta técnica es llamada el “Estándar de oro” debido a su alta precisión anatómica, especialmente en estudios experimentales o con volúmenes reducidos de datos donde es necesario un control detallado de las estructuras. Sin embargo, al depender de la experiencia y criterio del operador su principal limitación es presentar una alta variabilidad inter e intraobservador. Además, esta modalidad de

segmentación depende de largos tiempos de trabajo por lo que su escalado a estudios que cuenten con grandes cantidades de datos o múltiples modalidades de imagen se vuelve inviable. Por esta razón, aunque es esencial en la validación inicial de modelos radiómicos, se busca continuamente su remplazo por métodos parcial o totalmente automatizados (Taha and Hanbury, 2015; Saha *et al.*, 2016).

b2) *Segmentación semiautomática*: combina la intervención humana con algoritmos computacionales que asistan o refinan el contorneado de ROI. Entre los enfoques empleados están los métodos de crecimiento de regiones (Region Growing), umbralización adaptativa o contornos activos (snakes), los cuales ajustan los bordes de la ROI en función de patrones o gradientes de intensidad homogénea. En este procedimiento, la tarea del operador es definir una región inicial donde el algoritmo se expandirá hasta alcanzar límites establecidos por diferencias de intensidad o textura. Este método reduce enormemente los tiempos y la variabilidad entre observadores, manteniendo el control y criterio humano del operador en el flujo de trabajo. El rendimiento de este enfoque suele depender de la calidad de imagen, los parámetros de umbralización y la experiencia del analista (Yushkevich *et al.*, 2006; Hatt *et al.*, 2017).

b3) *Segmentación automática*: se basa en modelos computacionales avanzados e inteligencia artificial, capaces de identificar, clasificar y delimitar regiones anatómicas o patológicas sin necesidad de una intervención humana directa. Los métodos actuales suelen emplear redes neuronales convolucionales (CNNs) y arquitecturas tipo U-Net, que han demostrado un alto potencial en el análisis de múltiples modalidades de imagen médica.

La principal característica de este método de segmentación es que requiere de modelos entrenados con grandes volúmenes de datos, a partir de los cuales aprendan a generar máscaras predictivas capaces de replicar contornos delimitados de forma manual con gran precisión y consistencia. De este modo, su mayor ventaja es su disposición para procesar datos de una manera masiva, aunque su desempeño puede llegar a verse afectado por la presencia de artefactos en las imágenes o de patologías atípicas. Además, su precisión depende enormemente de la calidad y representabilidad de los conjuntos de entrenamiento (Ronneberger *et al.*, 2015; Isensee *et al.*, 2021).

La segmentación automática debe de ser validada frente a una segmentación manual de referencia, empleando métricas de superposición como el coeficiente de Dice (DSC) o el índice de Jaccard (JI), definidos como:

$$DSC = \frac{2|A \cap B|}{j}, JI = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

Donde A representa la máscara de referencia y B la segmentación obtenida automáticamente.

DSC y JI son las métricas más utilizadas para evaluar la superposición entre la segmentación automática y la referencia manual. Valores de DSC > 0.8 suelen considerarse aceptables en aplicaciones clínicas (Taha and Hanbury, 2015). La tabla 11 resume las ventajas, desventajas y grado de reproducibilidad de los tres métodos de segmentación anteriormente mencionados.

**Tabla 11:** Características de los métodos de segmentación

<b>Modalidad de segmentación</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ventajas principales</b>	<b>Desventajas / limitaciones</b>	<b>Aplicaciones más comunes</b>	<b>Grado de reproducibilidad</b>
<b>Manual</b>	Delimitación directa de la región de interés por un operador experto, utilizando herramientas de dibujo digital.	Alta precisión anatómica en estructuras pequeñas o complejas. Permite control total del contorno.	Alta variabilidad inter- e intraobservador. Tiempos prolongados. Escalabilidad limitada.	Estudios piloto, validación de modelos automáticos, investigación preclínica.	Baja a moderada (dependiente del operador).
<b>Semi automática</b>	El usuario define un punto o región inicial y el software expande o ajusta automáticamente e el contorno mediante algoritmos de umbralización, crecimiento de regiones o contornos activos.	Reduce el tiempo de segmentación y la variabilidad interobservador. Mantiene control humano parcial.	Depende de la calidad de la imagen y parámetros de configuración. Puede requerir corrección manual.	Radiología clínica, segmentación tumoral o de órganos homogéneos.	Moderada a alta (si se aplican criterios uniformes).
<b>Automática</b>	Segmentación basada en algoritmos de inteligencia artificial (IA),	Altamente reproducible, rápida y escalable. Ideal para grandes	Requiere bases de datos de entrenamiento amplias y diversas.	Proyectos multicéntricos, estudios clínicos masivos,	Alta (DSC > 0.8 en modelos validados).

	aprendizaje profundo o modelos estadísticos entrenados con bases de datos anotadas.	volúmenes de datos.	Sensible a artefactos o variaciones de contraste.	implementación diagnóstica asistida.	
--	-------------------------------------------------------------------------------------	---------------------	---------------------------------------------------	--------------------------------------	--

**Datos tomados de:** Pham *et al.*, 2000; Yushkevich *et al.*, 2006; Ronneberger *et al.*, 2015; Taha and Hanbury, 2015; Saha *et al.*, 2016; Hatt *et al.*, 2017; Traverso *et al.*, 2018; Zwanenburg *et al.*, 2020; Isensee *et al.*, 2021;)

### Limitaciones en la segmentación radiómica

a) *Variabilidad inter e intraobservador:* La variabilidad interobservador se refiere a las discrepancias entre distintos operadores al segmentar la misma estructura, mientras que la variabilidad intraobservador describe las diferencias en un mismo operador al repetir la segmentación en distintos momentos. Ambas fuentes de variación tienen la posibilidad de generar falsos positivos o inconsistencias en las métricas radiómicas de textura y forma, lo que disminuye la sensibilidad de los modelos predictivos e influye negativamente en la precisión y fiabilidad de los modelos. Esta problemática disminuye progresivamente en la transición de segmentaciones manual a semiautomática y automática. (Zhu *et al.*, 2021).

La iniciativa IBSI recomienda reportar el coeficiente de correlación intraclass (ICC) como medida de reproducibilidad entre observadores, considerando valores superiores a 0.85 como indicativos de una buena concordancia (Zwanenburg *et al.*, 2020).

b) *Influencia de la resolución de artefactos:* La presencia de diferencias en el tamaño de píxeles/vóxeles, la resolución espacial, artefactos ocasionados por movimiento o dispersión pueden generar bordes difusos o contornos imprecisos, lo que puede afectar negativamente la extracción de características radiómicas que dependan de gradientes o de la homogeneidad local de la intensidad. Por lo que la correcta calibración de los parámetros de adquisición y control de calidad, previo al análisis, permiten reducir estos efectos negativos y mejorar la consistencia de la segmentación (Fave *et al.*, 2015).

c) *Problemas de segmentación en estructuras difusas:* En casos donde los tejidos presentan bordes poco definidos o transiciones de intensidad graduales, como cuando el tejido muestra inflamación, fibrosis e incluso necrosis parcial, la modalidad de segmentación automática tiende a subsegmentar o sobresegmentar las regiones, lo que genera errores en el volumen total y en la forma del tejido o lesión. En estos casos la validación cruzada con segmentación manual es

obligatoria para evitar sesgos en la cuantificación de las características radiómicas. (Coroller *et al.*, 2016).

d) *Estandarización o reproducibilidad*: La segmentación radiómica debe seguir protocolos estandarizados de procesamiento que incluyan normalización, filtrado e interpolación. Además, debe conservar los metadatos DICOM completos para asegurar la trazabilidad del proceso. Iniciativas de estandarización como IBSI y QIBA recomiendan documentar los criterios de segmentación, software utilizado, parámetros de suavizado y tamaño de píxeles/vóxeles para permitir la reproducibilidad y comparabilidad de resultados entre estudios. (Hatt *et al.*, 2017; Zwanenburg *et al.*, 2020).

e) *Estrategias para mejorar la reproducibilidad*: La reproducibilidad de la segmentación radiómica depende de la consistencia anatómica del tejido analizado, la precisión geométrica de las regiones delimitadas y de la estandarización del procedimiento. Con el fin de mejorarla, existen una serie de recomendaciones que permitan disminuir la subjetividad humana y aumentar la confiabilidad de los resultados:

- Uso de atlas anatómicos digitales o máscaras de referencia.
- Entrenamiento de múltiples observadores y evaluación cruzada.
- Correlación de contorno automáticos mediante algoritmos de refinamiento morfológico.
- Validación estadística con métricas de superposición (DSH, Hausdorff distance, IoU).
- Integración de aprendizaje profundo supervisado con segmentaciones manuales expertas.

Por lo que, mantener protocolos estandarizados, validar las herramientas de segmentación y documentar el proceso son pasos indispensables para asegurar la reproducibilidad y credibilidad clínica de los resultados. La segmentación es un proceso elemental sobre el cual se edifica el análisis radiómico. Su precisión es un reflejo de la calidad de los biomarcadores extraídos y del grado de control morfológico del estudio (Arbelaez *et al.*, 2011).

### **2.2.6 Aplicaciones en hígado y modelos preclínicos.**

a) *Uso de la radiómica en hígado*: El hígado es un órgano de alta relevancia en la medicina debido al papel central en el metabolismo, desintoxicación y control de homeostasis. Además, su susceptibilidad a padecimientos agudos y crónicos como

inflamación, fibrosis y tumorigénesis lo convierten en un objetivo frecuente de estudio en el ámbito clínico y experimental con el fin de evaluar efectos terapéuticos, farmacológicos y toxicológicos (Venkatesh *et al.*, 2018). En consecuencia, la radiómica hepática ha emergido como una alternativa no invasiva capaz de evaluar de manera cuantitativa el microambiente tisular, identificando patrones en la textura, intensidad, morfología y heterogeneidad que pueden ser indicios de cambios estructurales subyacentes, indetectables mediante técnicas convencionales histológicas o bioquímicas (Lubner *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2019).

Diversos estudios han explorado la capacidad de la radiómica hepática aplicada a imágenes de TC, RM y Rx para diferenciar entre tejidos hepáticos normales, inflamado o neoplásicos (Wu *et al.*, 2020). Investigaciones recientes sugieren que imágenes bidimensionales de Rx son suficientes para el análisis de textura tisular, siendo capaces de detectar alteraciones en la densidad hepática que son asociadas a procesos como fibrosis o daño oxidativo (Park *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024). Por otra parte, en imágenes tridimensionales como TC parámetros como entropía y uniformidad son capaces de diferenciar entre diferentes grados de fibrosis hepática con una precisión del 82% (Lubner *et al.*, 2017).

La radiómica hepática ofrece la posibilidad de cuantificar la respuesta terapéutica, lo que constituye una herramienta eficiente en la evaluación longitudinal en modelos animales y humanos. A diferencia de la biopsia, que es invasiva y ofrece información de una muestra localizada, los análisis radiómicos proporcionan una visión integral del órgano completo, facilitando el monitoreo de progresiones o regresiones patológicas de forma objetiva y repetible (Chlebus *et al.*, 2019; Banerjee *et al.*, 2020).

b) *Evidencia en estudios animales*: En modelos preclínicos, la radiómica ha demostrado su potencial como herramienta de diagnóstico para la detección de cambios tisulares estructurales o inducidos antes de que sean visibles macroscópicamente. En modelos murinos de daño hepático se ha observado que características radiómicas relacionadas con la heterogeneidad de textura (GLCM – Entropy, GLSZM – ZoneVariance) y la uniformidad de intensidad pueden reflejar estrés oxidativo, inflamación y regeneración tisular (Ezhilarasan, 2021; Park *et al.*, 2021).

c) *Traducción preclínica y relevancia metodológica*: El análisis radiómico hepático en modelos experimentales representa una etapa intermedia entre los ensayos *in vitro* y la aplicación clínica. Su integración permite validar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores imagenológicos frente a técnicas convencionales. Además, al optimizar los parámetros de adquisición y segmentación permite preparar el terreno a futuras aplicaciones en humanos,

reduciendo errores metodológicos y mejorando la comparabilidad multicéntrica. Asimismo, los modelos preclínicos proporcionan un entorno donde es posible ajustar y validar algoritmos de segmentación y extracción de características radiómicas para garantizar su estabilidad frente a variaciones en las condiciones de trabajo (Zwanenburg et al., 2020; Galván et al., 2022;).

### 2.2.7 Análisis estadístico y validación de características radiómicas.

Uno de los principales retos en radiómica es la denominada “maldición de la dimensionalidad”, presente cuando el número de variables radiómicas supera ampliamente al número de observaciones o muestras disponibles, lo que puede ocasionar modelos sobreajustados (overfitted) con una baja capacidad de generalización. Además, muchas de las variables extraídas presentan una frecuente colinealidad o redundancia, por lo que la reducción y selección adecuada de características resulta indispensable.

Los métodos de selección de variables suelen tener tres enfoques:

- **Filtrado estadístico:** aplicación de pruebas como ANOVA, Kruskal Wallis o t—test para identificar características significativamente distintas entre grupos experimentales o clínicos. (Hawkins *et al.*, 2022).
- **Selección por correlación o varianza:** consiste en eliminar parámetros altamente correlacionados ( $r > 0.9$ ) o con baja varianza, conservando solo las variables informativas y no redundantes.
- **Uso de métodos multivariantes:** algoritmos como PCA (Principal Component Analysis), que resume la información en componentes ortogonales; LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator), que penaliza los coeficientes menos relevantes; y RFE (Recursive Feature Elimination), que selecciona iterativamente las características con mayor peso predictivo (Vallières *et al.*, 2017).

De acuerdo con las recomendaciones de la iniciativa IBSI deben conservarse aquellas variables que demuestren robustez y reproducibilidad ante variaciones técnicas o de segmentación. Este enfoque es indispensable en estudios preclínicos que cuentan con poblaciones reducidas, donde el riesgo de sobreajuste (Overfitting) es elevado. Además, la reducción dimensional de variables permite identificar los biomarcadores más representativos del fenómeno biológico estudiado. (Traverso *et al.*, 2018; Zwanenburg *et al.*, 2020;).

a) Evaluación de reproducibilidad y robustez: La reproducibilidad en radiómica se refiere a la capacidad de obtener resultados consistentes bajo condiciones de

análisis similares, mientras que la robustez hace referencia a la estabilidad de las características frente a cambios en la adquisición o procesamiento (Zhao *et al.*, 2021). Ambas propiedades son esenciales en la validación de biomarcadores cuantitativos y pueden evaluarse en contextos intraobservador (repetición por el mismo analista) e interobservador (diferentes analistas o segmentaciones).

Entre las métricas más empleadas destacan:

- **Coefficiente de correlación intraclase (ICC):** cuantifica la consistencia entre mediciones, considerándose aceptable un  $ICC \geq 0.75$ .
- **Coefficiente de variación (CV%):** expresa la dispersión relativa de las características respecto a su media, útil para comparar estabilidad entre distintas condiciones experimentales.
- **Pruebas test-retest:** determinan la estabilidad de las características radiómicas mediante imágenes repetidas o simuladas, permitiendo identificar parámetros sensibles al ruido o variaciones técnicas (Ger *et al.*, 2022).

Factores técnicos como el tamaño del píxel/vóxel, el nivel de cuantización de intensidad, los filtros de suavizado o realce y los métodos de normalización influyen significativamente en la estabilidad de los parámetros radiómicos extraídos (Fave *et al.*, 2019). Por esta razón, la iniciativa IBSI propone protocolos de validación multicéntrica que incorporan el uso de phantoms digitales o físicos, pruebas de repetición controlada y análisis comparativos intersoftware. Medidas que buscan garantizar que los resultados radiómicos sean comparables entre estudios, centros y plataformas, promoviendo la reproducibilidad internacional (Zwanenburg *et al.*, 2020).

b) Validación biológica e histológica: En estudios preclínicos, la validez de un modelo radiómico se refuerza mediante la correlación con indicadores biológicos o histológicos. Por ejemplo, en modelos de hepatotoxicidad, las características de textura que reflejan heterogeneidad o cambios estructurales pueden correlacionarse con niveles séricos de ALT, AST, MDA, SOD o GSH, o bien con hallazgos histológicos de inflamación y fibrosis (Fave *et al.*, 2019; Azadian *et al.*, 2024).

Este tipo de validación permite determinar si las variaciones observadas en las características radiómicas reflejan procesos biológicos reales y no simplemente artefactos de imagen o ruido técnico. Además, la validación externa mediante conjuntos de datos independientes o replicaciones experimentales aumenta la confianza en la estabilidad y generalización del modelo (Traverso *et al.*, 2018).

Sin embargo, debe de ser tomada en cuenta la variabilidad biológica intraindividual entre animales, que puede influir en la interpretación de los resultados. En tales casos, se recomienda aplicar análisis estadísticos mixtos o modelos jerárquicos que contemplen efectos aleatorios asociados a individuos o grupos experimentales, mejorando así la precisión (Kumar *et al.*, 2023).

c) Limitaciones y perspectivas: A pesar de su potencial como método de diagnóstico, la radiómica se enfrenta a una gran variedad de limitaciones metodológicas y biológicas. Entre ellas, el riesgo de sobreajuste en estudios con muestras pequeñas, la dependencia del software de segmentación y la subrepresentación de la complejidad biológica en los modelos actuales (Demircioğlu, 2025).

### **3. Planteamiento del problema**

La hepatotoxicidad inducida por MTX representa una gran limitación en la continuidad terapéutica de diversos padecimientos (artritis reumatoide, diferentes tipos de cáncer, psoriasis, etc) dificultando, e incluso empeorando, la situación de una gran parte de la población a nivel global. El uso de compuestos antioxidantes como la ASTX podría preservar o mitigar la integridad tisular del hígado sin comprometer la eficacia del tratamiento. No obstante, los métodos de evaluación convencionales, tanto para detectar daño hepático o para detectar si este daño se revierte por el uso de agentes protectores, no permiten dar un seguimiento eficiente a la respuesta terapéutica y los posibles cambios estructurales tempranos. La mejor forma de conocer el nivel de daño es a partir de estudios histológicos, los cuales funcionan en estudios preclínicos, pero son menos socorridos en la clínica por ser invasivos.

Una posible solución a este problema es el análisis radiómico. Si este se aplica a modalidades de imagen accesibles como la radiografía simple, quizás se detecten cambios estructurales de forma no invasiva antes de que puedan manifestarse de manera visible, lo que aportaría una nueva perspectiva en los estudios longitudinales. Este estudio propone un estudio preclínico piloto en un modelo murino que pretende evaluar si la radiómica de radiografías simples puede detectar los efectos hepatotóxicos del MTX y las propiedades mitigadoras del daño hepático de la ASTX. Se espera que los resultados puedan validarse con pruebas biológicas (histológicas), y se puedan establecer las bases para futuros estudios preclínicos, y aplicaciones clínicas o farmacológicas.

#### 4. Justificación

El hígado representa una parte fundamental para la homeostasis del organismo, desempeñando funciones clave en el metabolismo de agentes tóxicos. Cumple un rol importante como reservorio de glucógeno, vitaminas y minerales. Sin embargo, su alta actividad metabólica lo vuelve altamente susceptible a desarrollar alteraciones fisiopatológicas que afectan su funcionamiento. Dentro de los factores de riesgo más comunes se encuentran los tratamientos farmacológicos prolongados, que se emplean comúnmente en la mitigación de padecimientos crónicos. El MTX, fármaco ampliamente utilizado en terapias oncológicas e inflamatorias, es un ejemplo de ello, reconocido por su alta hepatotoxicidad.

A pesar de la toxicidad comprobada del MTX, su uso es indispensable en el tratamiento de padecimientos que alteran la calidad de vida. Por tal razón, se realizan esfuerzos constantes para encontrar un cotratamiento que pueda disminuir o prevenir los efectos adversos ocasionados por la terapia con este fármaco. Se ha comprobado que la ASTX, un carotenoide con propiedades antioxidantes y provitamínicas, puede inducir un efecto “protector” hepático capaz de mitigar la hepatotoxicidad ocasionada por fármacos.

Sin embargo, los métodos convencionales de evaluación, tanto de daño hepático como del efecto protector de la ASTX, como análisis histológicos y bioquímicos no cuentan con la sensibilidad suficiente para detectar alteraciones tempranas de padecimientos fisiopatológicos. Además, por su carácter invasivo estos métodos resultan inviables en estudios longitudinales que busquen determinar la respuesta terapéutica progresiva o regresiva, particularmente en estudios preclínicos.

Una propuesta emergente que busca eliminar tal limitación es la radiómica, un análisis cuantitativo que permitiría, en principio, realizar descripciones tisulares de textura, morfología e intensidad en imágenes médicas, capaces de detectar cambios microestructurales mucho antes de que sean visibles en estudios moleculares e histológicos. Su principal ventaja es que no es un proceso invasivo, pues se realiza a partir de una imagen, por lo que el diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta a tratamientos pueden agilizarse enormemente. No obstante, este enfoque tiene poca presencia en entornos experimentales debido a que suele utilizarse en modalidades de imagen con alta complejidad técnica, como TC o RM, lo que dificulta realizar estudios longitudinales de bajo costo.

Investigaciones recientes sugieren que imágenes bidimensionales de Rx son suficientes para el análisis de textura tisular, pues son capaces de detectar alteraciones en la densidad hepática asociadas a procesos como fibrosis o daño oxidativo. El uso de modalidades de imagen con mayor accesibilidad y baja complejidad técnica, como la radiografía simple, podría ser una alternativa potencial

en análisis radiómicos. Podrían realizarse estudios preclínicos experimentales que busquen evaluar progresiones fisiopatológicas o respuestas a tratamientos en un lapso extenso, sin disminuir la calidad de los biomarcadores en comparación a los obtenidos con alguna modalidad de imagen más avanzada.

## **5. Pregunta de investigación**

¿Un análisis radiómico de radiografía simple hepática es capaz de detectar el efecto hepatotóxico del MTX y el efecto hepatoprotector de la ASTX?

## **6. Hipótesis**

Si la administración de ASTX como cotratamiento reduce la hepatotoxicidad inducida por MTX y, por ende, la degeneración progresiva en el tejido hepático, entonces un análisis radiómico aplicado a radiografías hepáticas de murinos tratados con MTX y ASTX es capaz de reflejar este efecto en parámetros radiómicos, y se encontrará que:

- (i) Hay una mayor heterogeneidad tisular en el grupo tratado con MTX con respecto al control
- (ii) Hay una mayor homogeneidad tisular en el grupo tratado con ASTX con respecto al control
- (iii) Hay una menor heterogeneidad tisular en el grupo tratado con MTX/ASTX con respecto al control que en el grupo MTX con respecto al control.
- (iv) Hay una menor homogeneidad tisular en el grupo tratado con MTX/ASTX con respecto al grupo control.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Evaluar si un análisis radiómico de imágenes de Rx hepáticas puede detectar los efectos hepatotóxicos ocasionados por el MTX y los hepatoprotectores inducidos por la ASTX en un modelo murino

### **7.2 Objetivos específicos**

- Diseñar un modelo murino para el análisis de la hepatotoxicidad del MTX y los efectos moduladores de la ASTX.
- Obtener radiografías hepáticas *post mortem* del modelo murino bajo condiciones controladas de adquisición.
- Extraer las características radiómicas de textura, forma e intensidad a partir de las imágenes obtenidas
- Identificar los parámetros radiómicos que reflejen el efecto hepatotóxico del MTX y el hepatoprotector de la ASTX sobre la toxicidad del MTX.
- Validar las características radiómicas mediante parámetros que indican toxicidad como el valor de la enzima sérica TGP.

## 8. Método

### 8.1 Diseño del estudio

El presente estudio es exploratorio, experimental, analítico, prospectivo, no paramétrico de casos y controles. Está dividido en dos fases.

- **Obtención de las muestras (Fase 1):** Fase correspondiente a la selección de los animales participantes en el estudio desde la población animal, la administración del MTX y la ASTX, y la obtención de las muestras biológicas (hígado y suero de los animales) para su análisis.
- **Procesamiento de datos (Fase 2):** Fase compuesta por la adquisición de imágenes de Rx simple del tejido de estudio, el procesamiento de dichas imágenes, la posterior extracción de parámetros radiómicos y el análisis estadístico de los datos obtenidos.

### 8.2 Operacionalización de las variables

La tabla 12 muestra las variables incluidas en este estudio y su clasificación.

**Tabla 12:** Operacionalización de las variables involucradas en el estudio

Variable	Definición teórica	Definición operacional	Escala de medición
Grupos de estudio (Variable cualitativa). Única variable independiente del estudio.	Grupos de participantes que reciben una intervención específica o son sometidos a un protocolo de estudio concreto.	Grupos de ratones divididos en control (CTL), metotrexato (MTX), astaxantina (ASTX) y cotratamiento de metotrexato y astaxantina (MTX/ASTX)	Nominal multicotómica.
Peso corporal (Cuantitativa continua). Variable dependiente.	Masa total del cuerpo de un ser vivo, compuesta por tejidos, huesos, grasa y agua.	Masa total de los ratones de los grupos tratados en el estudio, medidos con una balanza.	De razón.
Peso del hígado (Cuantitativa continua) Variable dependiente.	Masa total del tejido, hepático incluida la grasa y agua	Masa del hígado de los ratones de los grupos tratados en el estudio, medidos con una balanza.	De razón.
Relación masa del hígado / masa corporal (Cuantitativa continua) Variable dependiente.	Masa del hígado dividida entre la masa corporal	Masa del hígado de los ratones de los grupos tratados en el estudio dividido entre el peso de estos.	De razón

<p>Enzima TGP (transaminasa glutámico-pirúvica), también conocida como ALT (alanino aminotransferasa) (Cuantitativa continua) Variable dependiente.</p>	<p>Enzima que ayuda al hígado a transformar alimentos en energía.</p>	<p>Valores de TGP medidos por la técnica ELISA en el suero de los ratones de los cuatro grupos en estudio.</p>	<p>De razón.</p>
<p>Parámetros radiómicos (Cuantitativas, algunas continuas y otras discretas) Variables dependientes.</p>	<p>Métricas cuantitativas relacionadas con la forma y otros atributos de una región de interés, que se extraen de imágenes médicas mediante algoritmos computacionales, para obtener información sobre su biología.</p>	<p>Métricas relacionadas con la forma y otros atributos de una región de interés extraídas de las imágenes radiográficas bidimensionales de los hígados de los ratones de los grupos tratados en el estudio.</p>	<p>Algunas de razón y otras de intervalo</p>

### 8.3 Universo de trabajo y muestra

Para este estudio la especie seleccionada fue la cepa de ratón CD1. Desde el nacimiento de los ratones, todos fueron sometidos a las mismas condiciones de esterilidad y de calidad de vida, con condiciones de humedad (30-40%), temperatura estándar (20-24°C), y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. Asimismo, tuvieron acceso libre a una dieta de alimento estándar PMI5001 e hidratación con agua purificada. Con el fin de reducir las diferencias en los resultados, ocasionados por alteraciones clínicas, se plantearon un grupo de criterios y requisitos que los candidatos deberán cumplir.

#### 8.3.1 Criterios de inclusión.

En el estudio se incluyeron 20 ratones macho, que aparentemente luzcan sanos, y que durante el proceso de crecimiento hayan alcanzado a las 10 semanas de vida un rango de peso que oscile entre los 30 y 35 gramos.

#### 8.3.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron los animales que no alcanzaron el rango de peso establecido, y que durante su periodo de crecimiento presentaron alteraciones clínicas evidentes que pudieran afectar su conducta y calidad de vida.

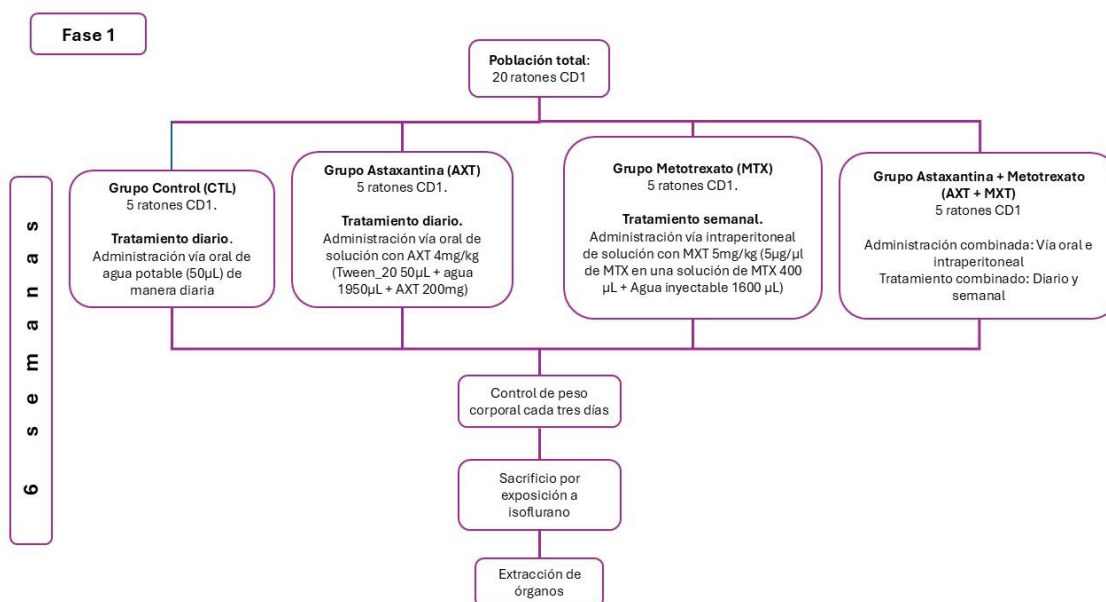
### 8.3.3 Criterios de eliminación

Animales que fallezcan durante el estudio o que estén bajo visible sufrimiento durante el estudio.

## 8.4 Desarrollo del proyecto

### Fase 1

El esquema 1 resume los pasos experimentales que se siguieron durante la fase 1. A continuación, se describen los procedimientos que se realizaron en esta fase.



*Esquema 1: Diagrama de flujo de la metodología involucrada en la fase 1 del estudio.*

Los 20 ratones de la muestra se distribuyeron de manera equitativa y aleatoria en 4 grupos de 5 animales ( $n=5$ ) cada uno: grupo control (CTL), grupo astaxantina (ASTX), grupo metotrexato (MTX), grupo metotrexato + astaxantina (MTX + ASTX) que recibieron tratamiento experimental durante 6 semanas.

Dada la naturaleza exploratoria del estudio el tamaño de la muestra no se calculó mediante fórmulas estadísticas tradicionales, ya que el objetivo principal no es probar una hipótesis formal, sino generar ideas y explorar el efecto de una intervención. Se utilizó una muestra pequeña, guiada por principios éticos y prácticos, como la reducción de costos y el uso mínimo de animales.

#### **8.4.1 Tratamientos experimentales**

- El grupo control (CTL) recibió una dosis de 50  $\mu\text{L}$  de agua potable administrada vía oral de forma diaria (de lunes a sábado) por un periodo de 5 semanas.
- El grupo astaxantina (ASTX) recibió una dosis de ASTX de 4 mg/kg de peso corporal de ratón (equivalente a 4  $\mu\text{g/g}$ ), administrada diariamente (de lunes a sábado) vía oral, durante 5 semanas. A cada ratón se les administró por vía oral 2  $\mu\text{L/g}$  de peso de solución de ASTX, equivalente a una dosis de 5  $\mu\text{g/g}$ . Se asumió que la dosis administrada será de 4  $\mu\text{g/g}$  en lugar de 5  $\mu\text{g/g}$ , para considerar posibles pérdidas durante la preparación y administración de la solución
- El grupo metotrexato (MTX) recibió una dosis de MTX equivalente a 5 $\mu\text{g/g}$  corporal. que se administró semanalmente por vía intraperitoneal durante 5 semanas para obtener una dosis total acumulada equivalente a 25 mg/kg.
- El grupo “MTX + ASTX” recibió una dosis combinada de MTX (administrado una vez a la semana vía intraperitoneal) y ASTX (administrada de lunes a viernes por vía igual) de la misma manera que la recibieron los grupos MTX y ASTX por separado.

Para evitar el dolor y estrés de los animales durante la administración semanal del MTX en los grupos MTX y MTX/ASTX, los animales fueron anestesiados con isoflurano previo a la administración.

#### **8.4.2 Preparación de las soluciones de MTX y ASTX que se administraron a los ratones durante el tratamiento**

Metotrexato (MTX): Se preparó una solución de MTX de 5 mg/mL (equivalente a 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) a partir de 400  $\mu\text{L}$  de la solución farmacéutica Fresexate (MTX: 25 mg/mL) y 1600  $\mu\text{L}$  de agua inyectable.

Astaxantina (ASTX): Se tomaron 200 mg de perlas sólidas comerciales que contienen 2.5% de ASTX y se disolvieron en 50  $\mu\text{L}$  de tween-20. Se añadió 1950  $\mu\text{L}$  de agua purificada para obtener una solución de 2.5 mg/mL (equivalente a 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

#### **8.4.3 Control del peso de los ratones**

Durante las 6 semanas de duración del experimento (5 semanas de tratamiento y el sacrificio en la sexta), se registró el peso corporal de cada animal cada tres días con el fin de monitorear su evolución y respuesta al tratamiento.

#### **8.4.4 Sacrificio de los animales**

Una vez completadas las 5 semanas, los animales descansaron durante una semana en la que se suspendieron los tratamientos, antes de realizar el sacrificio. Los animales se sacrificaron por exposición a isoflurano siguiendo las recomendaciones de los comités de ética sobre el sacrificio animal.

#### **8.4.5 Determinación de la masa de hígado relativa**

Una vez sacrificados los animales se les extrajo el hígado, el cual se enjuagó para retirar los restos de sangre y se determinó la masa en una balanza analítica. Con la masa promedio de los hígados de los animales de cada grupo y el peso promedio de los animales del mismo grupo referido, se calculó la masa relativa del hígado como:

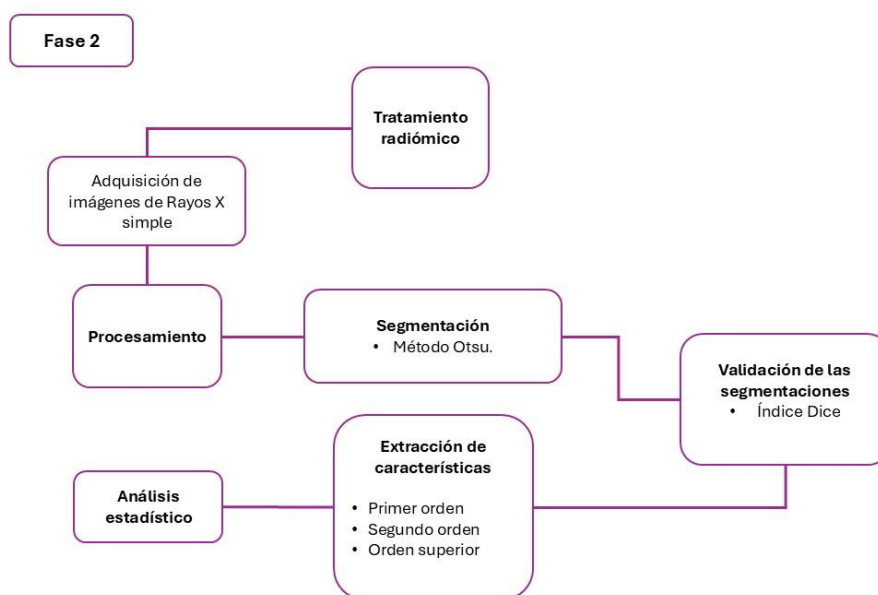
$$Masa\ relativa = \frac{masa\ promedio\ del\ hígado}{masa\ promedio\ del\ ratón}$$

#### **8.4.6 Determinación de los niveles de la enzima hepática sérica TGP**

Después de extraer la sangre a cada animal, ésta se centrifugó a 3000 rpm por 10 min para separar el suero. A partir del suero separado se determinó mediante ELISA el contenido de la enzima sérica TGP (U/L).

## Fase 2

El esquema 2 resume los pasos experimentales que se siguieron durante la fase 2.



*Esquema 2: Diagrama de flujo de la metodología involucrada en la fase 2 del estudio.*

### 8.4.7 Adquisición de imágenes

Una vez extraídos y lavados los hígados, se procedió a tomar las imágenes de Rx. La adquisición de imágenes se realizó utilizando el sistema de imagen preclínica multimodal XTREME II (Bruker Biospin Corp.) el cual tiene alta precisión y resolución en la captura de imágenes. Los parámetros considerados para la adquisición de las imágenes se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13:** Parámetros técnicos que se consideraron en la adquisición de las imágenes radiográficas.

Parámetro	Imágenes de Rayos X
Tipo de exposición	Estándar
Tiempo de exposición	2 segundos
Modo	Alta velocidad
FOV	10

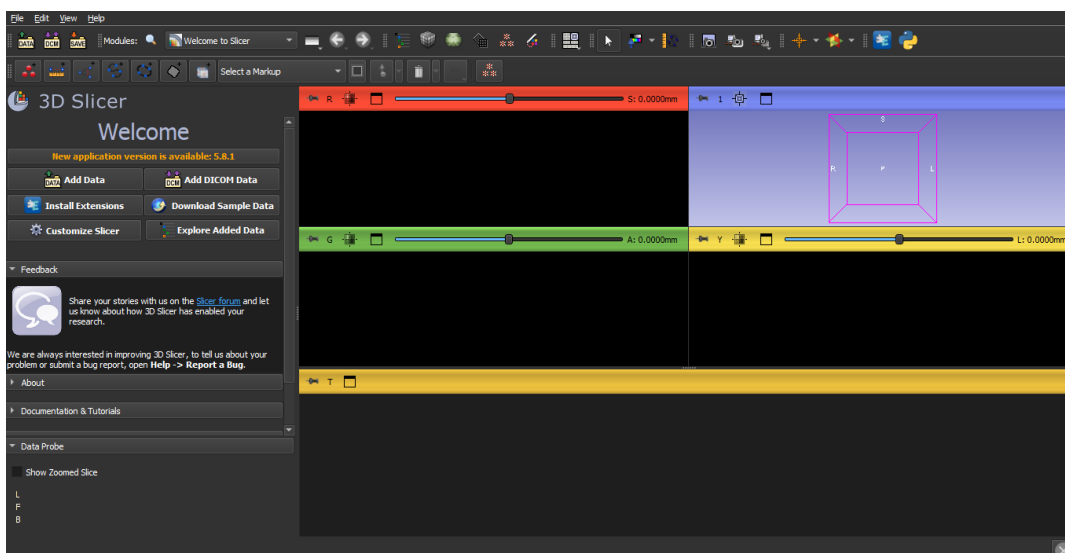
FStop	2
Plano Focal	0

Las imágenes se generaron en formato DICOM (Digital imaging and Communications in Medicine.), un formato estándar a nivel internacional en la investigación biomédica que garantiza la integridad y trazabilidad de la información de cada archivo.

### 8.4.8 Procesamiento

El procesamiento de las imágenes y el análisis radiómico posterior se realizó utilizando la plataforma 3D Slicer (V. 5.8.0), un software de código abierto dedicado y reconocido en la investigación biomédica por su capacidad de manipular y analizar imágenes médicas de diversos formatos. Esta herramienta permite visualizar, segmentar y analizar tanto imágenes bidimensionales como reconstrucciones tridimensionales.

3D slicer ofrece una amplia variedad de módulos y complementos que permite la manipulación de volúmenes en dos y tres dimensiones, lo que garantiza una trazabilidad y fiabilidad de todos los procesos realizados en este software. Las imágenes previamente obtenidas en formato DICOM fueron importadas al software para su posterior procesamiento y análisis. La Figura 1 muestra la interfaz principal de 3D Slicer.



**Figura 2:** Interfaz principal de 3D Slicer.

#### **8.4.9 Importación de datos y delimitación de la ROI**

La importación de imágenes con formato DICOM se realizó mediante el módulo DICOM de 3D Slicer, que facilita la carga y visualización de las imágenes para su procesamiento y análisis. Después de importadas las imágenes, se realizó su procesamiento como volúmenes, utilizando la sección “Volume Rendering”, donde se habilitó la visualización del conjunto completo de cortes. En el caso de una imagen bidimensional (como la radiográfica) solo hay un corte. Esta sola imagen se preparó para su posterior segmentación.

La sección “Volume Rendering” permite definir manualmente la ROI, delimitando únicamente el área donde se encuentra el órgano de estudio. Esta acción permite descartar zonas irrelevantes de la imagen, así como reducir de manera significativa la carga computacional.

#### **8.4.10 Selección de la ROI**

Una vez delimitada la ROI se creó un nuevo volumen para realizar las acciones posteriores únicamente sobre la zona seleccionada.

#### **8.4.11 Segmentación**

La segmentación es un paso fundamental en el análisis y tratamiento de imágenes médicas. Posibilita el aislamiento de regiones anatómicas de interés para la posterior extracción de características radiómicas. Se empleó el software 3D Slicer, para la segmentación de imágenes, cuyas herramientas de carácter semiautomático como “Segment Editor” refinan el proceso.

Los algoritmos de “Segment Editor” dividen la imagen en un primer plano y un fondo. Para garantizar la reproducibilidad y trazabilidad en la segmentación se utilizó el método de umbralización de Otsu, el cual calcula el valor umbral a partir del histograma de intensidades separado en dos clases: tejido y fondo, maximizando las diferencias entre las intensidades de ambas zonas.

La consideración del operador dentro de este método de segmentación radica en realizar ajustes manuales en los umbrales que el algoritmo define de manera automática, evitando de esta forma sobresegmentaciones o subsegmentaciones. Estos ajustes manuales van desde ajustar el umbral, realizar recortes para delimitar de manera más precisa las áreas, e incrementar o disminuir los márgenes para rellenar o eliminar huecos e islas dentro y fuera del área de procesamiento.

Para evaluar la eficacia de los métodos semiautomáticos se realizó una validación de las segmentaciones mediante su superposición contra métodos manuales (referencias). Se consideraron segmentaciones exitosas aquellas que alcanzaron un índice de Dice superior a 0.9. Posteriormente, las segmentaciones se compararon utilizando la sección “Segment comparison” que permite un análisis automático de coincidencias y discrepancias.

#### **8.4.12 Extracción de parámetros radiómicos**

3D Slicer ofrece un complemento basado en Python llamado PyRadiomics. La extracción de los parámetros radiómicos se realizó con este complemento. El procedimiento es automático. Se seleccionó manualmente el volumen a someter al algoritmo, ya que este complemento por default ingresa el volumen con los datos descartados por la ROI. Se extrajeron los parámetros de primer orden, segundo orden y orden superior.

#### **8.4.13 Selección de parámetros radiómicos para análisis**

De los 103 parámetros que permite extraer el software utilizado se eliminaron inicialmente (i) los descriptores de forma pues las características del hígado, una vez extraído, no permiten un análisis consistente; (ii) los que se relacionan con reconstrucciones tridimensionales ya que las imágenes radiológicas utilizadas fueron de carácter bidimensional. De esta forma quedaron 93 rasgos a evaluar inicialmente.

### **8.5 Límite de tiempo y espacio**

La mayor parte del proyecto se ejecutó en la Facultad de Medicina, en el bioterio de los Laboratorios de neuroinmunoendocrinología y de Investigación en Teranóstica. Los hígados extraídos se llevaron al Laboratorio de Investigación en Radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) para la adquisición de las imágenes *ex vivo* de Rx.

### **8.6 Diseño de análisis**

#### **8.6.1 Análisis estadístico**

Los datos de las variables consideradas en la etapa 1 se expresan como la media  $\pm$  DE. Para comparar los valores entre grupos se utilizó ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey. En los casos que se consideró pertinente se realizaron comparaciones entre un grupo de tratamiento y el grupo control mediante la prueba t de Student para dos grupos independientes. Previamente se realizó la prueba de

Fisher para conocer la homogeneidad de las varianzas. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$  para la prueba de una cola.

## **9. Implicaciones éticas**

El estudio se realizó de acuerdo con los criterios bioéticos para el uso de animales de laboratorio en estudios preclínicos exploratorios descritos en la norma oficial mexicana NOM-062-1999 (2002). Dicha norma establece las especificaciones técnicas y condiciones adecuadas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio con fines experimentales. Asimismo, se siguieron las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del National Institutes of Health (NIH, 8ª edición, 2011), consideradas un estándar internacional en la investigación biomédica con uso de animales.

## **10. Resultados y discusión**

### **Fase 1: Comprobación del daño hepático inducido por MTX**

El daño hepático que induce el MTX es conocido (Hamdan *et al.*, 2022). Para comprobar si el MTX a las bajas dosis empleadas induce daño hepático que pueda detectarse mediante radiómica de Rx se utilizaron tres variables: variación del peso corporal de los animales, peso del hígado al final del estudio y determinación de la enzima hepática TGP.

La variación del peso corporal de los animales de experimentación es una de las variables más usadas para evaluar los efectos nocivos de un medicamento. En la tabla 14 se muestra la variación del peso corporal (%) de los animales sometidos al estudio desde el inicio del tratamiento ( $t_0$ ) hasta el día del sacrificio ( $t_f$ ). Sólo el ratón 5 del grupo de control mostró pérdida de peso (-1.8%), aunque dentro del rango normal de la variabilidad (Talbot *et al* 2019). La ganancia promedio de peso en todos los animales está en concordancia con el aspecto saludable que se observó durante todo el estudio. Las variaciones observadas están en el rango reportado por otros autores, aunque a diferentes dosis a las utilizadas en nuestro experimento (Pružinská *et al.*, 2024). Tal como se esperaba, la mayor ganancia de peso se observó en el grupo control (11%). La menor ganancia de peso (7.5%) se observó en el grupo ASTX. Este resultado se explica por el hecho de que la ASTX tiende a disminuir la grasa corporal y el estrés oxidativo sistémico debido a la mejoría que induce en el metabolismo lipídico (Nawaz *et al.*, 2021). Aunque también hay evidencias de que induce vías apoptóticas (Moridi *et al.*, 2024) que pudieran haber contribuido al menor aumento de peso corporal promedio de los animales.

**Tabla 14:** Variación del peso promedio (g) de los ratones durante el estudio

Tratamientos	Ratón	Peso inicio $t_0$ (g)	Peso final $t_f$ (g)	Variación (%)
Grupo control	1	28.86	31.5	
	2	33.83	37.1	
	3	28.02	30.8	
	4	29.44	36.5	
	5	33.0	32.4	-1.8
	Promedio	30.63	33.66	+10.8
	DE	2.61	2.93	
	% RSD	8.52	8.70	
	Min	28.02	30.80	
Máx	33.83	37.10		
Grupo ASTX	1	34.3	39.3	
	2	33.32	34.6	
	3	34.71	35.7	
	4	32	33.9	
	5	33.11	36.5	
	Promedio	33.49	36.00	+7.5
	DE	1.07	2.10	
	% RSD	3.18	5.83	
	Min	32.00	33.90	
Máx	34.71	39.30		
Grupo MTX	1	33.18	36.10	
	2	31.32	35.30	
	3	36.02	38.10	
	4	34.4	37.70	
	5	36.17	39.20	
	Promedio	34.22	37.28	+9.1
	DE	2.04	1.57	
	% RSD	5.95	4.21	
	Min	31.32	35.30	
Máx	36.17	39.20		
Grupo MTX + ASTX	1	32.22	34.5	
	2	33.72	36.1	
	3	33.85	36.4	
	4	30.16	32.2	
	5	31.73	33.4	
	Promedio	32.34	34.52	+6.8
	DE	1.53	1.78	
	% RSD	4.72	5.16	
	Min	30.16	32.20	
Máx	33.85	36.40		

Los pesos del hígado de cada ratón el día del sacrificio así como la relación peso promedio hígado/peso promedio corporal se muestran en la tabla 15. La comparación intergrupala de los pesos de los hígados después de los tratamientos, mediante ANOVA de una vía ( $p=0.29$ ) con prueba post-hoc de Tukey tampoco arrojó diferencias significativas entre grupos. La comparación mediante la prueba t de Student entre el aumento promedio de masa hepática del grupo MTX (+9%) y la

disminución la masa hepática promedio del grupo MTX/ASTX (-4%) con respecto al grupo control tampoco fue significativa.

Una variable más objetiva para evaluar la toxicidad sobre un órgano es la relación peso promedio del órgano/peso promedio corporal ya que elimina la influencia del peso corporal del animal. Los valores de esta relación muestran un ligero incremento de la toxicidad hepática en los dos grupos tratados con MTX con respecto al grupo control, en particular en el grupo MTX/ASTX (tabla 15),

**Tabla 15:** Peso del hígado de cada ratón el día del sacrificio y relación del peso promedio hígado/peso promedio corporal en cada grupo de tratamiento

Ratón	Grupo CTL	Grupo ASTX	Grupo MTX	Grupo MTX/ASTX
1	1.8953	2.1075	1.9915	1.8906
2	2.0911	2.1416	2.3306	2.065
3	1.9894	2.1751	2.4687	1.8008
4	2.2034	1.8252	2.1876	1.6889
5	2.1933	2.2629	2.3234	2.5236
Promedio	2.0745	2.10246	2.26036	1.99378
DE	0.1326	0.1654	0.1802	0.3265
% RSD	6.39	7.86	7.97	16.37
Min	1.8953	1.8252	1.9915	1.6889
Max	2.1933	2.2629	2.4687	2.5236
Relación peso promedio hígado/peso promedio corporal	0.061	0.058	0.066	0.073

Una variable más sensible para la evaluación de daño hepático es la determinación de enzimas hepáticas como la TGP. Los valores promedio de esta enzima el día del sacrificio determinados por ELISA se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16:** Valores promedio (U/L) de TGP determinados por ELISA el día del sacrificio

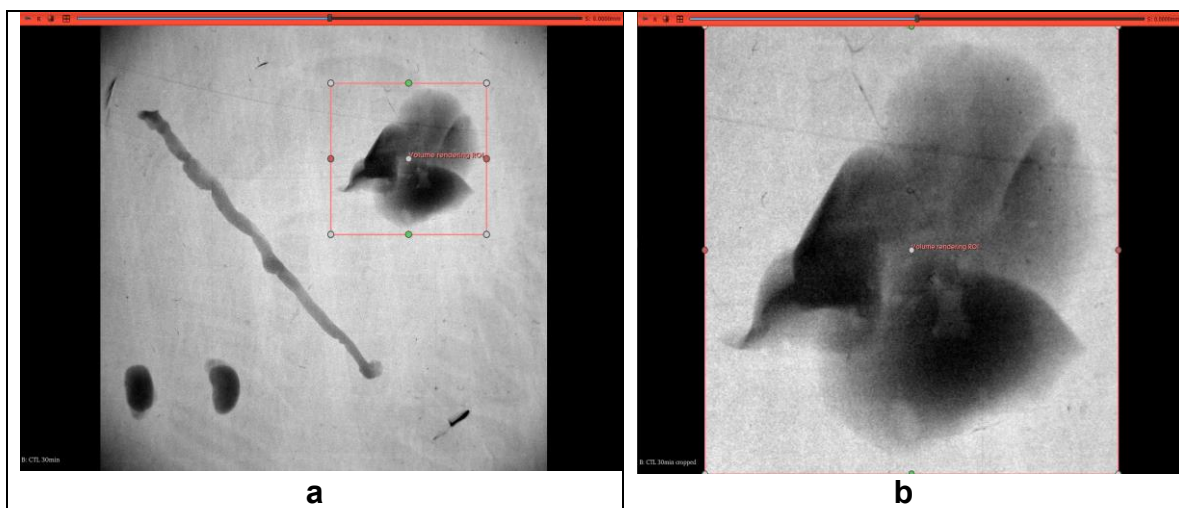
	Grupo control	Grupo ATX	Grupo MTX	Grupo MTX + ASTX
<b>Promedio</b>	18.0	36.1	33.1	37.2
<b>DE</b>	9.7	12.3	20.8	30.1
<b>Mín</b>	3.4	19.5	7.8	9.7
<b>Máx</b>	31.7	54.4	87.6	112.7
<b>Rango</b>	28.3	34.9	79.8	103.0

El valor promedio de TGP se elevó de manera significativa en los tres grupos sometidos a tratamiento con respecto al control en el orden MTX/ASTX>

MTX>ASTX. Nuevamente se observa, al igual que en la tabla 15 que el daño hepático es mayor en el grupo MTX/ASTX. Se ha determinado que en dependencia de la dosis el MTX y la ASTX y, en particular, la combinación de ambos puede desencadenar vías celulares que conducen a la apoptosis (Moridi *et al.*, 2024). Entre estas vías está la interrupción del ciclo celular. Experimentos *in vitro* con células NALM-6 han demostrado que MTX, ASTX y, particularmente la combinación de ambos induce disminución de la viabilidad celular a diferentes dosis, que los autores atribuyen a detención del ciclo celular en la fase G1 y a la potenciación de los efectos del MTX (Moridi *et al.*, 2024). También se ha encontrado que la ASTX y otros carotenoides pueden inhibir la proliferación y reducir la supervivencia de células K562 de manera dosis-dependiente mediante apoptosis e interrupción del ciclo celular (Pérez-Gálvez *et al.*, 2020). De ocurrir estos mecanismos en el hígado deben conducir a la elevación de las enzimas hepáticas en el torrente sanguíneo.

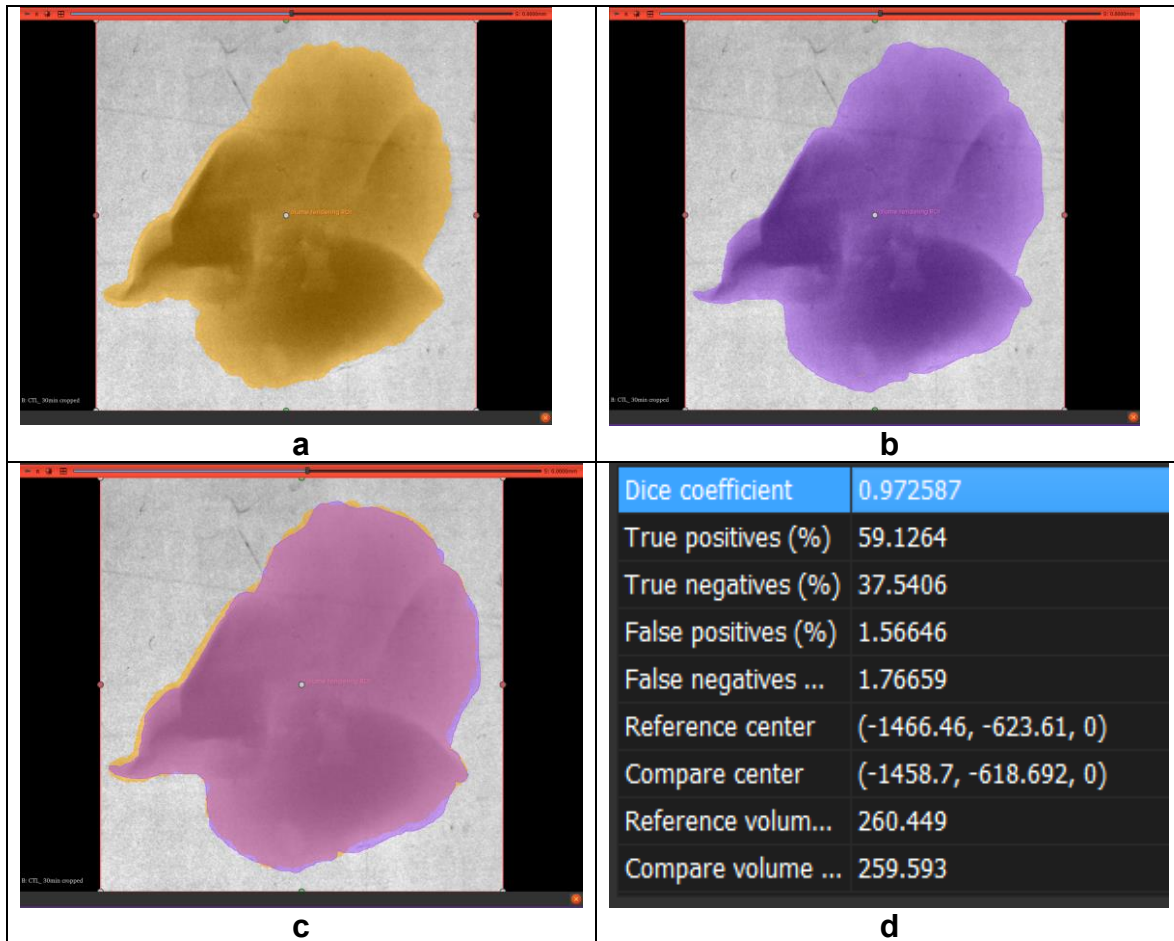
## Fase 2

Luego de establecer que los tratamientos indujeron daño hepático mediante los marcadores empleados se inició la fase 2 de toma de imágenes y evaluación radiómica. La selección manual de la ROI mediante 3D Slicer se muestra en la figura 2a. Una vez delimitada la ROI, se creó un nuevo volumen para realizar las acciones posteriores únicamente sobre la zona seleccionada, el cual se muestra en la figura 2b.



**Figura 3:** Selección de la ROI. (a) Selección manual mediante 3D Slicer. (b) Volumen obtenido con la sección “Volume Rendering” a partir de la selección manual efectuada

Con el objetivo de utilizar en el trabajo la segmentación semiautomática, se realizó una evaluación previa de la confiabilidad del método. Los resultados para la imagen utilizada para la validación se muestran en la figura 3.



**Figura 4:** Validación previa de la confiabilidad de la segmentación semiautomática a emplear en el análisis radiómico (a) Zona de umbralización determinada por métodos semiautomáticos (b) Zona de umbralización determinada por métodos manuales (c) Superposición de las segmentaciones manual y automática (d) Coeficiente Dice de la segmentación semiautomática sobre la manual en la imagen evaluada.

Luego de determinado que la correlación entre la segmentación manual y semiautomática establece una alta similitud entre ambas (coeficiente DICE promedio de 0.97) el trabajo posterior se efectuó mediante segmentación semiautomática.

Para conocer cuáles de los 93 rasgos radiómicos extraídos se analizarían, se determinó el coeficiente de variación (%CV) de cada uno en el grupo control. Solo se analizaron posteriormente los rasgos más reproducibles (%CV < 10). La tabla 17 muestra los rasgos analizados e indica los que cumplieron con el criterio de menor variabilidad, y fueron seleccionados para su análisis.

**Tabla 17:** Características radiómicas evaluadas

<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>CV (%)</b>
10Percentile	8760.50	1728.37	19.73
90Percentile	46849.80	1876.69	<b>4.01</b>
Energy	2.66E+14	4.60E+13	17.30
Entropy	11.00	0.07	<b>0.64</b>
InterquartileRange	21348.85	2929.29	13.72
Kurtosis	2.09	0.16	<b>7.61</b>
Maximum	63599.40	1240.17	<b>1.95</b>
MeanAbsoluteDeviation	11509.78	938.15	<b>8.15</b>
Mean	27357.70	1741.88	<b>6.37</b>
Median	26309.10	2411.58	<b>9.17</b>
Minimum	695.60	1555.41	223.61
Range	62903.80	1591.78	<b>2.53</b>
RobustMeanAbsoluteDeviation	8783.27	981.61	11.18
RootMeanSquared	30614.11	1511.13	<b>4.94</b>
Skewness	0.11	0.18	163.00
TotalEnergy	2.66E+14	4.60E+13	17.30
Uniformity	5.26E-04	3.20E-05	<b>6.08</b>
Variance	1.88E+08	2.32E+07	12.35
Autocorrelation	1.43E+06	1.04E+05	<b>7.31</b>
ClusterProminence	2.89E+12	6.08E+11	21.01
ClusterShade	1.66E+08	2.37E+08	143.20
ClusterTendency	1.18E+06	1.59E+05	13.48
Contrast	9.73E+03	3.38E+03	34.74
Correlation	0.98	0.01	<b>0.60</b>
DifferenceAverage	75.62	13.62	18.01
DifferenceEntropy	7.62	0.27	<b>3.51</b>
DifferenceVariance	3807.39	1313.10	34.49
Id	0.04	0.01	17.66
Idm	0.02	0.00	27.77
Idmn	1.00	0.00	<b>0.05</b>
Idn	0.97	0.00	<b>0.49</b>
Imc1	-0.33	0.02	<b>-4.55</b>
Imc2	1.00	0.00	<b>0.01</b>
InverseVariance	0.01	0.00	18.50
JointAverage	1065.49	36.92	<b>3.46</b>
JointEnergy	0.00	0.00	103.52
JointEntropy	18.33	0.12	<b>0.67</b>
MCC	0.99	0.01	<b>0.52</b>
MaximumProbability	0.00	0.00	214.47
SumAverage	2130.98	73.83	<b>3.46</b>
SumEntropy	11.97	0.08	<b>0.65</b>
SumSquares	297397.51	39727.94	13.36
DependenceEntropy	11.21	0.08	<b>0.74</b>

DependenceNonUniformity	261525.68	21945.12	<b>8.39</b>
DependenceNonUniformityNormalized	0.93	0.02	<b>1.70</b>
DependenceVariance	0.08	0.10	126.29
GrayLevelNonUniformity	148.27	17.53	11.82
GrayLevelVariance	301086.18	37188.87	12.35
HighGrayLevelEmphasis	1440717.19	105579.91	<b>7.33</b>
LargeDependenceEmphasis	1.17	0.14	12.08
LargeDependenceHighGrayLevelEmphasis	1592381.23	110006.96	<b>6.91</b>
LargeDependenceLowGrayLevelEmphasis	0.06	0.12	218.20
LowGrayLevelEmphasis	0.00	0.00	177.07
SmallDependenceEmphasis	0.97	0.01	<b>0.70</b>
SmallDependenceHighGrayLevelEmphasis	1403851.29	105653.90	<b>7.53</b>
SmallDependenceLowGrayLevelEmphasis	0.00	0.00	71.04
GrayLevelNonUniformity	146.47	17.89	12.21
GrayLevelNonUniformityNormalized	0.00	0.00	<b>6.74</b>
GrayLevelVariance	300458.91	36618.60	12.19
HighGrayLevelRunEmphasis	1442176.35	106528.96	<b>7.39</b>
LongRunEmphasis	1.03	0.03	<b>2.87</b>
LongRunHighGrayLevelEmphasis	1461060.87	106759.19	<b>7.31</b>
LongRunLowGrayLevelEmphasis	0.01	0.03	218.02
LowGrayLevelRunEmphasis	0.00	0.00	101.41
RunEntropy	11.04	0.07	<b>0.67</b>
RunLengthNonUniformity	277323.96	23178.87	<b>8.36</b>
RunLengthNonUniformityNormalized	0.99	0.00	<b>0.22</b>
RunPercentage	0.99	0.00	<b>0.25</b>
RunVariance	0.02	0.02	160.63
ShortRunEmphasis	1.00	0.00	<b>0.09</b>
ShortRunHighGrayLevelEmphasis	1437486.09	106488.20	<b>7.41</b>
ShortRunLowGrayLevelEmphasis	0.00	0.00	70.78
GrayLevelNonUniformity	144.39	17.63	12.21
GrayLevelNonUniformityNormalized	0.00	0.00	<b>6.73</b>
GrayLevelVariance	300379.64	36395.70	12.12
HighGrayLevelZoneEmphasis	1443373.14	107390.74	<b>7.44</b>
LargeAreaEmphasis	2.18	2.51	115.41
LargeAreaHighGrayLevelEmphasis	1520551.76	109032.46	<b>7.17</b>
LargeAreaLowGrayLevelEmphasis	1.12	2.50	223.48
LowGrayLevelZoneEmphasis	0.00	0.00	65.42
SizeZoneNonUniformity	266316.73	22237.00	<b>8.35</b>
SizeZoneNonUniformityNormalized	0.96	0.01	<b>0.69</b>
SmallAreaEmphasis	0.99	0.00	<b>0.26</b>
SmallAreaHighGrayLevelEmphasis	1424783.14	107254.08	<b>7.53</b>
SmallAreaLowGrayLevelEmphasis	0.00	0.00	78.37
ZoneEntropy	11.13	0.08	<b>0.69</b>
ZonePercentage	0.98	0.01	<b>0.53</b>
ZoneVariance	1.14	2.50	220.07
Busyness	0.00	0.00	20.70

Coarseness	0.00	0.00	27.83
Complexity	112575266.73	30449241.47	27.05
Contrast	5.11	1.09	21.34
Strength	294.56	83.11	28.21

\*Los 48 parámetros sombreados son los que se utilizaron para las comparaciones entre los grupos de tratamiento y el grupo control.

Para la comparación entre los grupos se utilizaron solamente los 48 rasgos destacados en la tabla 18 cuyo coeficiente de variación en el grupo control fue <10%. Como el ANOVA con los 4 grupos (Control, ASTX, MTX y MTX/ASTX) no mostró diferencias significativas entre grupos se realizó entonces la comparación de cada grupo con respecto al grupo control, obteniéndose los siguientes resultados:

(i) No hubo diferencias significativas en los 48 rasgos analizados entre el grupo control y el grupo ASTX. Este resultado es explicable, ya que la ASTX no produce efecto tóxico significativo a las bajas dosis empleadas (dosis total 7  $\mu$ moles). Se esperaba un incremento en la homogeneidad, que no se observó, probablemente debido al bajo tamaño de la muestra, o a que la Rx no es sensible a pequeños cambios en la homogeneidad tisular.

(ii) No hubo diferencias significativas en los 48 rasgos analizados entre el grupo control y el grupo MTX a pesar de que los resultados del % del peso del hígado con respecto al peso corporal del ratón (tabla 15) y el valor de la enzima hepática TGP (tabla 16) indican que el MTX indujo daño hepático. El pequeño tamaño de la muestra y la baja dosis acumulada de MTX (1.93  $\mu$ moles) probablemente sean las causas de que el análisis radiómico no permitiera observar tales diferencias.

(iii) En la comparación entre el grupo control y el grupo MTX/ASTX se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en 16 de los 48 rasgos analizados (33%), que se muestran en la tabla 18. Este resultado está en concordancia con el mayor daño celular que provoca la combinación MTX/ASTX (tablas 15 y 16).

**Tabla 18:** Rasgos con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo MTX/ASTX.

Parámetro	Valor de p	Clasificación del parámetro
90Percentile	0.027	FO
Mean	0.019	FO
Median	0.038	FO
RootMeanSquared	0.015	FO
HighGrayLevelEmphasis	0.006	SO (GLDM)

LargeDependenceHighGrayLevelEmphasis	0.004	SO (GLDM)
SmallDependenceHighGrayLevelEmphasis	0.006	SO (GLDM)
HighGrayLevelRunEmphasis	0.006	SO (GLRLM)
LongRunHighGrayLevelEmphasis	0.005	SO (GLRLM)
ShortRunHighGrayLevelEmphasis	0.006	SO (GLRLM)
HighGrayLevelZoneEmphasis	0.006	SO (GLSZM)
LargeAreaHighGrayLevelEmphasis	0.005	SO (GLSZM)
SmallAreaHighGrayLevelEmphasis	0.006	SO (GLSZM)
Autocorrelation	0.007	SO (GLCM)
JointAverage	0.004	SO (GLCM)
SumAverage	0.004	SO (GLCM)

De acuerdo con la tabla 18 las diferencias estadísticamente significativas se encontraron en 4 parámetros de primer orden y 12 de segundo orden relacionados con la textura. De los parámetros de segundo orden 3 corresponden a la matriz GLCM, 3 a la matriz GLDM, 3 a la matriz GLRLM y 3 a la matriz GLSZM. Todas estas matrices están asociadas a la textura de la imagen.

Los parámetros radiómicos de primer orden son descriptores estadísticos simples derivados de los valores de intensidad de los píxeles o vóxeles de una imagen. En este caso, que la imagen es plana, se refieren a la intensidad de los píxeles. Estos parámetros se basan en el histograma de niveles de gris de la imagen y describen características descriptivas como la media, la varianza, la asimetría, la curtosis, la energía y la entropía, características que proporcionan una visión cuantitativa de la distribución de la intensidad de la imagen, como su media, su dispersión y su forma.

Los parámetros radiómicos derivados de la matriz GLCM registran la frecuencia de pares de vóxeles o píxeles con niveles de gris específicos que se producen a una distancia específica ( $\delta$ ) y dirección ( $\theta$ ) entre sí.

Los parámetros de la matriz GLDM cuantifican las dependencias del nivel de gris dentro de una imagen midiendo el número de vóxeles (píxeles en este caso) conectados dentro de una distancia específica que dependen de un píxel central. Un píxel se considera "dependiente" de su píxel central si su diferencia de nivel de gris se encuentra dentro de un umbral establecido ( $(|i-j| < a)$ ), por lo que estos parámetros son útiles para evaluar la textura de la imagen.

Los parámetros radiómicos derivados de la matriz GLRLM caracterizan la textura de una imagen mediante el análisis de la longitud de píxeles consecutivos (o vóxeles) con la misma intensidad de nivel de gris en una dirección determinada.

Los parámetros radiómicos derivados de la matriz GLSZM caracterizan la textura de una imagen cuantificando el tamaño de las zonas homogéneas para cada intensidad de nivel de gris. Una zona de nivel de gris se define como un grupo de vóxeles conectados (o píxeles en 2D) que comparten la misma intensidad de nivel de gris.

Los parámetros radiómicos significativos están todos relacionados con la intensidad y la relación entre los píxeles y el nivel de gris. Un mayor nivel de gris (zona más clara) se asocia con un mayor grado de fibrosis, y es precisamente la fibrosis lo que induce el tratamiento con MTX. La tabla 19 muestra los valores obtenidos en los cuatro grupos de los parámetros que resultaron significativos en la comparación entre el grupo MTX/ASTX vs control.

**Tabla 19:** Valores en los cuatro grupos de los 16 parámetros que resultaron significativos en la comparación de los grupos MTX/ASTX vs control

	<b>ASTX</b>	<b>Control</b>	<b>MTX/ASTX</b>	<b>MTX</b>
<b>90Percentile</b>	4.8E+04 ± 3.3E+03 (6.9%)	4.7E+04 ± 1.9E+03 (4.0%)	4.9E+04 ± 1.7E+03 (3.5%)	4.8E+04 ± 2.4E+03 (4.9%)
<b>Mean</b>	2.8E+04 ± 2.9E+03 (10%)	2.7E+04 ± 1.7E+03 (6.4%)	3.0E+04 ± 1.9E+03 (6.2%)	2.8E+04 ± 3.9E+03 (14.1%)
<b>Median</b>	2.8E+04 ± 3.7E+03 (13.4%)	2.6E+04 ± 2.4E+03 (9.2%)	2.9E+04 ± 2.1E+03 (7.2%)	2.6E+04 ± 4.4E+03 (16.7%)
<b>RootMeanSquared</b>	3.2E+04 ± 2.6E+03 (8.3%)	3.1E+04 ± 1.5E+03 (4.9%)	3.3E+04 ± 1.6E+03 (4.8%)	3.1E+04 ± 3.1E+03 (9.8%)
<b>Autocorrelation</b>	1.6E+06 ± 2.9E+05 (17.8%)	1.4E+06 ± 1.0E+05 (7.3%)	1.7E+06 ± 1.4E+05 (8.3%)	1.6E+06 ± 3.0E+05 (19.5%)
<b>JointAverage</b>	1.1E+03 ± 1.2E+02 (10.5%)	1.1E+03 ± 3.7E+01 (3.5%)	1.2E+03 ± 5.6E+01 (4.7%)	1.1E+03 ± 1.6E+02 (14.3%)
<b>SumAverage</b>	2.3E+03 ± 2.4E+02 (10.5%)	2.1E+03 ± 7.4E+01 (3.5%)	2.3E+03 ± 1.1E+02 (4.7%)	2.2E+03 ± 3.2E+02 (14.3%)
<b>HighGrayLevelEmphasis</b>	1.6E+06 ± 2.8E+05 (18.2%)	1.4E+06 ± 1.1E+05 (7.3%)	1.7E+06 ± 1.3E+05 (7.8%)	1.6E+06 ± 3.0E+05 (19.3%)
<b>LargeDependenceHighGrayLevelEmphasis</b>	1.7E+06 ± 3.1E+05 (18.3%)	1.6E+06 ± 1.1E+05 (6.9%)	1.9E+06 ± 1.3E+05 (6.9%)	1.7E+06 ± 3.3E+05 (18.8%)
<b>SmallDependenceHighGrayLevelEmphasis</b>	1.5E+06 ± 2.8E+05 (18.2%)	1.4E+06 ± 1.1E+05 (7.5%)	1.6E+06 ± 1.3E+05 (8.0%)	1.5E+06 ± 3.0E+05 (19.4%)
<b>HighGrayLevelRunEmphasis</b>	1.6E+06 ± 2.8E+05 (18.2%)	1.4E+06 ± 1.1E+05 (7.4%)	1.7E+06 ± 1.3E+05 (8.0%)	1.6E+06 ± 3.1E+05 (19.3%)
<b>LongRunHighGrayLevelEmphasis</b>	1.6E+06 ± 2.9E+05 (18.2%)	1.5E+06 ± 1.1E+05 (7.3%)	1.7E+06 ± 1.3E+05 (7.6%)	1.6E+06 ± 3.1E+05 (19.3%)
<b>ShortRunHighGrayLevelEmphasis</b>	1.6E+06 ± 2.8E+05 (18.2%)	1.4E+06 ± 1.1E+05 (7.4%)	1.7E+06 ± 1.3E+05 (7.4%)	1.6E+06 ± 3.0E+05 (19.4%)
<b>HighGrayLevelZoneEmphasis</b>	1.6E+06 ± 2.9E+05 (18.2%)	1.4E+06 ± 1.1E+05 (7.4%)	1.7E+06 ± 1.3E+05 (7.8%)	1.6E+06 ± 3.1E+05 (19.4%)

<b>LargeAreaHighGrayLevel Emphasis</b>	1.6E+06 ± 3.0E+05 (18.2%)	1.5E+06 ± 1.1E+05 (7.2%)	1.8E+06 ± 1.3E+05 (7.3%)	1.7E+06 ± 3.2E+05 (19.1%)
<b>SmallAreaHighGrayLevel Emphasis</b>	1.5E+06 ± 2.8E+05 (18.2%)	1.4E+06 ± 1.1E+05 (7.5%)	1.7E+06 ± 1.3E+05 (7.9%)	1.6E+06 ± 3.0E+05 (19.4%)

Como se aprecia en la tabla solo la comparación realizada entre el grupo control y el grupo MTX/ASTX resultó significativa en los 16 parámetros.

## 11. Conclusiones

El objetivo general se cumplió de manera parcial, se identificaron parámetros radiómicos relacionados con la textura en tejidos hepáticos que evidencian un efecto hepatotóxico y alteraciones estructurales particularmente en el grupo tratado con MTX + ASTX. Hallazgos consistentes con las observaciones de variación de peso relativo del hígado y niveles séricos de TGP lo que refuerza la presencia de un daño tisular. En conjunto, los resultados indican que, incluso a partir de una modalidad de imagen de relativa baja complejidad como la radiografía simple, es posible extraer características radiómicas capaces de reflejar cambios relacionados con hepatotoxicidad y degeneración tisular.

De manera contraintuitiva, el grupo tratado con MTX + ASTX presentó un mayor grado de daño celular en comparación a los grupos con tratamiento separado. Situación previamente reportada en la literatura, puede deberse a interacciones farmacológicas inesperadas, donde la combinación de quimioterapéuticos con antioxidantes no necesariamente ejerce un efecto protector. Sino que por el contrario puede potenciar la toxicidad al sobrecargar las rutas metabólicas y de detoxificación o modificar el balance redox en un ambiente ya comprometido por el MTX.

Cabe resaltar que en este estudio las dosis administradas en cada tratamiento pueden considerarse bajas o moderadas para evaluar la degeneración tisular en un periodo de tiempo corto. Asimismo, la captura de imágenes ex vivo, junto con un tamaño de muestra reducido, contribuyeron a limitantes que pudieron influir en la sensibilidad de los análisis radiómicos y en la estadística de las comparaciones.

Sin embargo, los hallazgos obtenidos confirman el potencial de la radiómica como herramienta para la evaluación de hepatotoxicidad a partir de imágenes de baja complejidad. Lo que destaca nuevamente la necesidad de profundizar la investigación con tamaños de muestra mayores, diseños experimentales más robustos e incluso modalidades de captura diferentes, con el fin de formular nuevas hipótesis que permitan llegar a conclusiones más precisas y generalizables.

## 12. Bibliografia

- Aerts, H. J. W. L., et al. (2014). Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach. *Nature Communications*, 5, 4006.
- Amadasun, M., & King, R. (1989). Textural features corresponding to textural properties. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 19(5), 1264–1274.
- Arbelaez, P., Maire, M., Fowlkes, C., & Malik, J. (2011). Contour detection and hierarchical image segmentation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 33(5), 898–916.
- Asrani, S-K., Devarbhavi, H., Eaton, J., Kamath, P.S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol* 70(1):151-171. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.
- Avanzo, M., et al. (2020). Radiomics and its role in cancer research: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 152, 102976.
- Azadian, R., Mohammadalipour, A., Memarzadeh, M.R., Hashemnia, M., Aarabi, M.H. (2024). Examining hepatoprotective effects of astaxanthin against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats through modulation of Nrf2/HO-1 pathway genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 397: 371–380 <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02581-8>
- Bardi, N., et al. (2010). Methotrexate-induced hepatic injury: Mechanisms and implications. *Toxicology Letters*, 197(2), 77–84.
- Banerjee, S., et al. (2020). Radiomics in liver diseases: Current progress and future opportunities. *Liver International*, 40(9), 2242–2255.
- Bushberg, J. T., et al. (2012). *The Essential Physics of Medical Imaging* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Castera, L., Forns, X., Alberti, A. (2008). Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 48(5):835-47. doi: 10.1016/j.jhep.2008.02.008.
- Chen, J-T., Kotani, K. (2016). Astaxanthin as a Potential Protector of Liver Function: A Review. *J Clin Med Res.* 2016;8(10):701-704 <http://dx.doi.org/10.14740/jocmr2672w>
- Chlebus, G., et al. (2019). Automatic liver tumor segmentation in CT with convolutional neural networks. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 38(4), 1036–1046.
- Choi, T. W., et al. (2019). Texture analysis of liver fibrosis using MRI-based radiomics. *European Radiology*, 29(10), 5180–5189.

- Collewet, G., et al. (2004). Influence of MRI acquisition protocols on texture classification. *Magnetic Resonance Imaging*, 22(1), 81–91.
- Coroller, T. P., et al. (2016). CT-based radiomic signature predicts distant metastasis in lung adenocarcinoma. *Radiotherapy and Oncology*, 114(3), 345–350.
- Davinelli, S., Saso, L., D'Angeli, F., Calabrese, V., Intrieri, M., & Scapagnini, G. (2022). Astaxanthin as a modulator of Nrf2, NF-κB, and their crosstalk: Molecular mechanisms and possible clinical applications. *Molecules*, 27(2), 502.
- Demircioğlu, A. (2025). Methodological limitations and future perspectives in radiomics. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*.
- Ezhilarasan, D. (2021). Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. *Toxicology* 458:152840. doi: 10.1016/j.tox.2021.152840.
- Fave, X., et al. (2016). Impact of image preprocessing on the volume dependence and prognostic potential of radiomic features in non-small cell lung cancer. *Translational Cancer Research*, 5(4), 349–363.
- Galloway, M. M. (1975). Texture analysis using gray level run lengths. *Computer Graphics and Image Processing*, 4(2), 172–179.
- Galván, I., et al. (2022). Preclinical validation of radiomics features as imaging biomarkers in liver disease models. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 155.
- Gao, L-J., Zhu, Y-Q, Xu, L. (2021). Mechanisms of protective effects of astaxanthin in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatoma Res* 7:30 DOI: 10.20517/2394-5079.2020.150
- Ger, R.B., Wei, L., El Naqa, I., Wang, J. (2023). The Promise and Future of Radiomics for Personalized Radiotherapy Dosing and Adaptation. *Semin Radiat Oncol* 33(3):252–261. doi: 10.1016/j.semradonc.2023.03.003.
- Gillies, R. J., Kinahan, P. E., & Hricak, H. (2016). Radiomics: Images are more than pictures, they are data. *Radiology*, 278(2), 563–577.
- Hamdan, S.S., Kamal, Y.M., Waheed, H.J. (2022). Astaxanthin affects oxidative stress biomarkers in methotrexate-induced hepatotoxicity. *Int J Health Sci* 6(56):10584-10596 <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS6.12832>
- Hamed, K.M., Dighriri, I.M., Baomar, A.F., Alharthy, B.T., Alenazi, F.E., Alali, G.H., Alenazy, R.H., Alhumaidi, N.T., Alhulayfi, D.H., Alotaibi, Y.B., Alhumaidan, S.S., Alhaddad, Z.A., Humadi, A.A., Alzahrani, S.A., Alobaid, R.H. (2022). Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. *Cureus* 14(9):e29518. doi: 10.7759/cureus.29518.

- Haralick, R. M., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 3(6), 610–621.
- Hatt, M., et al. (2017). Radiomics: Data mining and quantitative image analysis applied to clinical radiotherapy and oncology. *Current Opinion in Oncology*, 29(6), 405–412.
- Hoque, M.R., Razzaque, A., Zawad, A.N.M.S., Rahman, S.W. (2023). Status of Renal and Liver Function in Rheumatoid Arthritis (RA) Patients of Chattogram, Bangladesh Treated with Methotrexate (MTX). *J Biosci Med* 11(9):114-126 doi: 10.4236/jbm.2023.119010.
- Islam, M. A., et al. (2017). Astaxanthin ameliorates hepatic damage and oxidative stress induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Experimental Biology and Medicine*.
- Isensee, F., et al. (2021). nnU-Net: A self-configuring method for deep learning-based biomedical image segmentation. *Nature Methods*, 18, 203–211.
- Kohandel, Z., Farkhondeh, T., Aschner, M., Pourbagher-Shahri, A.M., Samarghandian, S. (2022). Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomed Pharmacother*. 145:112179. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112179.
- Kozminski, P., Halik, P.K., Chesori, R., Gniazdowska, E. (2020). Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Diferent Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int J Mol Sci* 21(10):3483; <https://doi.org/10.3390/ijms2110348>.
- Kickingeder, P., et al. (2016). Radiomic profiling of glioblastoma: Identifying subtypes and improving survival prediction. *Neuro-Oncology*, 18(2), 251–259.
- Kumar, V., et al. (2012). Radiomics: The process and the challenges. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(9), 1234–1248.
- Kumar A.J., Mithun, S., Sherkhane, U.B., Dwivedi, P., Puts, S., Osong, B., Traverso, A., Purandare, N., Wee, L, Rangarajan, V., Dekker, A. (2023) Emerging role of quantitative imaging (radiomics) and artificial intelligence in precision oncology. *Explor Target Antitumor Ther*.4:569–82. <https://doi.org/10.37349/etat.2023.00153>
- Lambin, P., et al. (2012). Radiomics: Extracting more information from medical images using advanced feature analysis. *European Journal of Cancer*, 48(4), 441–446.
- Le, M.H.N., Kha, H.Q., Tran, N.M., Nguyen, P.K., Huynh, H.H., Huynh, P.K., Lam, H., Le, N.Q.K. (2025). Radiomics in liver research: A paradigm shift in disease detection and staging *Eur J Radiol Artif Int* 2: 100016 <https://doi.org/10.1016/j.ejrai.2025.100016>.

- Levêque, D., Becker, G., Toussaint, E., Fornecker, L-M., Paillard, C. (2017). Clinical pharmacokinetics of methotrexate in oncology. *Int J Pharmacokinetics* 2(2):137-147 doi:10.4155/ipk-2016-0022
- Li, J., et al. (2020). Astaxanthin in liver health and disease: A potential therapeutic agent *Drug Des Devel Ther* 14:2275–2285. doi: 10.2147/DDDT.S230749
- Liu, L., Liu, S., Wang, C., Guan, W., Zhang, Y., Hu, W., Zhang, L., He, Y., Lu, J., Li, T., Liu, X., Xuan, y., Wan, P. (2019). Folate Supplementation for Methotrexate Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review *J Clin Reumatol* 25(5):197-202. doi: 10.1097/RHU.0000000000000810
- Lubner, M. G., et al. (2017). CT texture analysis: Quantitative assessment of hepatic fibrosis and inflammation. *Radiology*, 282(3), 789–798.
- Moridi, N., Najafzadeh, M., Sayedi, M., Sajjadi, S.M. (2024). Astaxanthin Co-treatment with Low Dose Methotrexate Increases the Cell Cycle Arrest and Ameliorates the Methotrexate -induced Inflammatory Response in NALM-6. *IJMCM* 13(2):133-146. DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.13.2.133
- Nawaz, A., Nishida, Y., Takikawa, A., Fujisaka, S., Kado, T., Aminuddin, A., Bilal, M., Jeelani, I., Aslam, M.R., Nishimura, A., Kuwano, T., Watanabe, Y., Igarashi, Y., Okabe, K., Ahmed, S., Manzoor, A., Usui, I., Yagi, K., Nakagawa, T., Tobe, K. (2021). Astaxanthin, a Marine Carotenoid, Maintains the Tolerance and Integrity of Adipose Tissue and Contributes to Its Healthy Functions. *Nutrients*. 13(12):4374. doi: 10.3390/nu13124374.
- Nishida, Y., Nawaz, A., Hecht, K., Tobe, K. (2021) Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants. *Nutrients* 14(1):107. doi: 10.3390/nu14010107.
- Park, S., et al. (2020). Radiomics-based prediction model for outcomes of PD-1/PD-L1 immunotherapy in metastatic urothelial carcinoma *Eur Radiol* 30: 5392–5403 <https://doi.org/10.1007/s00330-020-06847-0>.
- Park, S., et al. (2021). Radiomics analysis of chest X-ray and liver imaging for early fibrosis detection. *Scientific Reports*, 11, 15708.
- Parmar, C., et al. (2015). Radiomic machine-learning classifiers for prognostic biomarkers of head and neck cancer. *Frontiers in Oncology*, 5, 272.
- Perez-Galvez A, Viera I, Roca M. (2020). Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants *Antioxidants (Basel)*9(6):505. doi: 10.3390/antiox9060505.
- Pham, D. L., Xu, C., & Prince, J. L. (2000). Current methods in medical image segmentation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2, 315–337.
- Prey, S., & Paul, C. (2009). Effect of caffeine on methotrexate efficacy: Clinical and experimental perspectives. *J European Acad Dermatol Venereol*, 23(6), 682–687.

- Pružinská, K., Chrastina, M., Khademnematollahi, S., Vyletelová, V., Gajdošová, L., Pastvová, L., Dráfi, F., Poništ, S., Pašková, L., Kucharská, J., Sumbalová, Z., Muchová, J., Martiniaková, S., Bauerová, C. (2024). Astaxanthin, Compared to Other Carotenoids, Increases the Efficacy of Methotrexate in Rat Adjuvant Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*25(16): 8710. <https://doi.org/10.3390/ijms25168710>.
- Ronneberger, O., Fischer, P., & Brox, T. (2015). U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. *MICCAI Conference Proceedings*, 9351, 234–241.
- Saha, A., et al. (2018). Effects of manual and automatic segmentation on radiomic features in liver lesions. *Journal of Medical Imaging*, 5(2), 024001.
- Taha, A. A., & Hanbury, A. (2015). Metrics for evaluating 3D medical image segmentation: Analysis, selection, and tool. *BMC Medical Imaging*, 15(1), 29.
- Talbot sr, Biernot s, Bleich a, Maarten van Dijk r, Ernst I, Ha`ger Ch, et al. Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal *Laboratory Animals* 2019, 0(0) 1–12 , doi: 10.1177/0023677219883319,
- Tian, H., Cronstein, B.N. (2007). Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bull NYU Hosp J Dis* 65(3):168-173
- Traverso, A., et al. (2018). Repeatability and reproducibility of radiomic features: A systematic review. *Radiology*, 289(2), 407–418.
- Vallières, M., Kay-Rivest, M., Perrin, L.J., Liem, X., Furstoss, C., Sultanem, K., Seuntjens, J., El Naqa, I. (2017). Radiomics strategies for risk assessment of tumour failure in head-and-neck cancer. *Sci Rep* 7:10117 DOI:10.1038/s41598-017-10371-5
- Vandamme, T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci* 6(1):2-9. doi: 10.4103/0975-7406.124301.
- Venkatesh, S. K., et al. (2018). Quantitative imaging in liver diseases. *Abdominal Radiology*, 43, 2829–2845.
- Wang, L., et al. (2024). Radiomics-based assessment of hepatic fibrosis using X-ray imaging in experimental models. *Computers in Biology and Medicine*, 173, 108138.
- Wei, J., Jiang, H., Gu, D., Niu, M., Fu, F., Han, Y., Song, B., Tian, J. (2020). Radiomics in liver diseases: Current progress and future opportunities. *Liver Int* 40(9):2050–2063. doi: 10.1111/liv.14555
- Wu, J., et al. (2020). Radiomics of liver imaging: Emerging applications and challenges. *Cancer Imaging*, 20(1), 87.

- Yushkevich, P. A., et al. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Improved efficiency and reliability. *NeuroImage*, 31(3), 1116–1128.
- Zhao, X., Zhou, Y., Zhang, Y., Han, L., Mao, L., Yu, Y., Li, X., Zeng, M., Wang, M., Liu, Z. (2021). Radiomics Based on Contrast-Enhanced MRI in Differentiation Between Fat-Poor Angiomyolipoma and Hepatocellular Carcinoma in Noncirrhotic Liver: A Multicenter Analysis. *Front Oncol* 11: | <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.744756>
- Zhu, Y., Weng, S., Li, Y. et al (2021). A radiomics nomogram based on contrast-enhanced MRI for preoperative prediction of macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma. *Abdom Radiol* 46, 3139–3148 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00261-021-02989-x>
- Zwanenburg, A., et al. (2020). The Image Biomarker Standardisation Initiative (IBSI): Standardised quantitative radiomics. *Radiology*, 295(2), 328–338.